

# 番木瓜体细胞胚发生及发育的影响因素

黄俊潮 叶克难 陈 谷 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

**摘 要** 研究了影响番木瓜 (*Carica papaya*) 体细胞胚发生、发育的一些因素。结果表明: ① 番木瓜无菌小苗幼根在附加 NAA 1.0 mg/L+ KT 0.5 mg/L+ GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L 的改良 MS 培养基上可诱导出大量具良好胚性潜能的愈伤组织; ② 愈伤组织在附加 NAA 0.25 mg/L+ KT 0.25 mg/L 的改良 MS 培养基上可连续继代并得到胚性化; ③ 在所试验的激素种类中, KT 是适于体细胞胚的发育, 最适浓度为 0.5 mg/L; ④ 0.1% ~ 0.3% 的活性炭有利于体胚的发生、发育; ⑤ 体细胞胚在固体培养基上完成球形胚期前的发育, 在液体培养液中完成球形胚期后的发育可提高成熟体胚的产量和质量。

**关键词** 番木瓜, 体细胞胚, 体胚发生

**分类号** Q 343.6

番木瓜转基因植株都是通过体细胞胚发生系统途径获得, 虽然番木瓜体细胞胚发生已有较多的报道<sup>[1-3]</sup>, 但这些研究均集中在体胚的诱导方面, 对体胚的后期发育及再生缺乏深入研究, 因此得到的体胚难以萌发或成苗率极低。本文以番木瓜 F<sub>1</sub> 代小苗幼根为外植体, 建立起高频率的番木瓜体细胞胚发生系统, 进一步探讨了影响番木瓜体胚发育的因素。

## 1 材料和方法

(1) 植物材料: 以岭南番木瓜 F<sub>1</sub> 种子为材料, 参照叶克难等<sup>[1]</sup>方法获得根外植体。

(2) 培养基: 全部实验均采用改良 MS 培养基<sup>[1]</sup>, 固体培养基附加 0.8% 琼脂, 针对不同情况另加激素。

(3) 愈伤组织的诱导和继代: 根外植体接种于附加不同激素组合 (表 1) 的改良 MS 培养基上诱导愈伤组织, 4 周后挑选浅黄色松软愈伤组织在含不同激素组合的培养基上继代, 继代周期为 4 周。

(4) 体胚的发生发育: 继代两次的胚性愈伤组织转入含不同激素组合的液体培养基 (除特别注明, 均含 0.2% 活性炭), 愈伤组织接种量为 33 g/L, 每 7 d 换一次新鲜培养液。换培养液时用不同孔径的网筛滤去愈伤组织及对体胚进行同步化培养。

(5) 体胚的再生: 成熟体胚经无菌水冲洗后置于垫有滤纸的无菌培养皿中, 封口膜封口后放在暗处 7 d, 体胚经自然脱水后在无激素的改良培养基上成苗, 一个月后统计成苗率<sup>[4]</sup>。

收稿日期: 1995-09-04 黄俊潮, 男, 31 岁, 助理研究员

## 2 结果与讨论

### 2.1 愈伤组织的诱导

接种于含不同激素浓度的改良 MS 培养基的幼根切段 2 d 后即吸涨膨大, 随后在切面上开始形成愈伤组织, 15 d 即全部愈伤化, 结果如表 1. 从表 1 可以看出在 MS<sub>1</sub> 和 MS<sub>2</sub> 上诱导的愈伤均为黄白色, 且长出根, 胚性化较差, 而在 MS<sub>3</sub> 上诱导出的愈伤组织为淡黄色, 没有根长出, 具有一定的胚性. Chen 等<sup>[2]</sup>和叶克难等<sup>[1]</sup>以根段为外植体分别在 MS+ NAA 1.0 mg/L+ KT 0.5 mg/L+ GA<sub>3</sub> 1.0 mg/L 和 0.5 MS+ NAA 2.0 mg/L+ KT 1.0 mg/L+ GA<sub>1</sub> 1.0 mg/L 上诱导愈伤组织得到较低的诱导率. 通过降低 NAA 和 GA<sub>2</sub> 浓度得到 100% 的诱导率, 可见激素的组合及其浓度对比对愈伤组织的诱导及随后的体胚诱导很关键, 叶克难等<sup>[1]</sup>用 NAA 2.0+ BA 1.0 诱导的愈伤组织始终未见有体胚发生.

表 1 不同激素组合浓度对番木瓜愈伤组织诱导的影响

Tab. 1 Effect of hormone concentrations on induction of calli in root sections of papaya

培养基	激素成分 /mg·L <sup>-1</sup>	愈伤组织特征	诱导率 /%
MS <sub>1</sub>	NAA 2.0, KT 1.0, GA 1.0	黄白色, 疏松, 长根	100
MS <sub>2</sub>	NAA 2.0, KT 0.5, GA 0.5	黄白色, 疏松, 长根	100
MS <sub>3</sub>	NAA 1.0, KT 0.5, GA 0.5	淡黄色, 疏松, 不长根	100

### 2.2 愈伤组织的继代和体胚发生的诱导

将在 MS<sub>3</sub> 上诱导的愈伤组织在不同激素组合浓度的改良 MS 培养基上继代两代 (每代 28 d) 后得到的结果列于表 2.

表 2 不同激素组合浓度对愈伤组织继代的影响

Tab. 2 Effect of hormone concentrations on subculture of calli

培养基	激素成分 /mg·L <sup>-1</sup>	活性炭浓度 /%	愈伤组织生长量	体胚数 <sup>1)</sup>
MS <sub>3</sub>	0	0	+	0
MS	NAA 1.0, KT 0.5, GA 0.5	0	++	0
MS <sub>3</sub>	NAA 1.0, KT 0.5, GA 0.5	0.2	+++	+
MS	NAA 0.25, KT 0.25	0.2	++	+++

1) 愈伤组织生长及体胚数分 4 级: 0 无, + 少量, ++ 中等, +++ 大量

在不含任何激素的 MS<sub>3</sub> 培养基上继代的愈伤组织生长缓慢, 继代两代不见有体胚出现. 在原来诱导愈伤的 MS<sub>3</sub> (即 MS<sub>3</sub>) 培养基上继代的愈伤组织在继代培养中逐渐出现褐化, 继两代不见有体胚发生, 而同样的培养基附加上 0.2% 的活性炭则愈伤组织生长快, 且不出出现褐化现象, 继代两代后有少量体胚出现. 在降低激素浓度和附加 0.2% 活性炭的 MS<sub>3</sub> 上继代的愈伤组织生长速度适中, 继代两次后有大量体胚出现 (图 1). Chen 等<sup>[2]</sup>和叶克难等<sup>[1]</sup>同样以根为外植体, 但愈伤组织的诱导, 继代及体胚发生均在同一种含较高浓度激素的培养基中完成, 本实验愈伤组织的继代及体胚的诱导则在降低激素浓度下进行, 体胚的发生可在两个月内实现, 降低激素浓度还可以减少培养细胞发生变异, 用于番木瓜体胚发生的外植体有根<sup>[2,4]</sup>, 下胚轴<sup>[3]</sup>和未成熟胚<sup>[6]</sup>, 所用激素有 2,4-D 或 NAA, 它们各有优缺点, 合子胚诱导体

图 1 胚性愈伤组织

Fig. 1 Embryogenic callus

图 2 体细胞胚

Fig. 2 Somatic embryos

胚发生周期短(一般 3~6 周),但取材难,根和下胚轴诱导体胚发生周期长(大约 14 周)但材料较易得到,一般地用 2,4-D 体胚发生的频率比用 NAA 的高,我们使愈伤组织的继代在降低 NAA 浓度及附加一定浓度的活性炭的培养基中进行可以在较短时间内获得高频率的体胚发生.

### 2.3 影响体胚发育的因素

2.3.1 激素对体胚发育的影响 将在 MS<sub>7</sub> 上继代两次的胚性愈伤组织转入含不同激素的改良 MS 培养基中振荡培养,3 周后观察体胚发育情况并试验体胚成苗,结果见表 3.

表 3 不同激素对体胚发育的影响

Tab. 3 Effect of hormone on the development of somatic embryos of papaya

培养基	激素 (mg <sup>o</sup> L <sup>-1</sup> )	正常体胚	体胚成苗率 %
MS <sub>8</sub>	0	0	/
MS <sub>9</sub>	NAA 0.5	58	42
MS <sub>10</sub>	GA 0.5	37	10
MS <sub>11</sub>	KT 0.5	88	80

表 4 不同 KT 浓度对体胚发育的影响

Tab. 4 Effect of KT concentration on the development of somatic embryos of papaya

培养基	[KT] /mg <sup>o</sup> L <sup>-1</sup>	正常体胚	体胚成苗率 %
MS <sub>12</sub>	0.25	89	74
MS <sub>13</sub>	0.5	87	82
MS <sub>14</sub>	1.0	70	51
MS <sub>15</sub>	2.0	57	46

从表 3 中可以看出,不同激素对体胚发育影响很大,在不含激素的培养基中,没有成熟体胚出现.单独的 NAA 和 GA 均不适合体胚的发育,而 KT 则有利于体胚的发育. Chen 等<sup>[2]</sup>在体胚的整个发生发育过程均用同一培养基,得到的体胚必须在含 NAA 的培养基上才能萌发,且再生苗的根不是从胚根长出,而是从愈伤组织上长出. Fitch 等<sup>[2,5]</sup>用 2,4-D 诱导番木瓜未成熟胚及番木瓜幼苗下胚轴体细胞胚发生,体胚在降低 2,4-D 或不含激素的培养条件下成熟,一些体胚发育异常,他们没有提到体胚的直接成苗情况.将胚性愈伤组织转到含有 KT 0.5 mg/L 的改良 MS 培养液中培养得到了大量双极性成熟体胚(图 2),体胚成苗率高达 80%. 不同的 KT 浓度对番木瓜体胚发育也有影响,研究结果列于表 4. 含 KT 0.

5 mg/L 的  $MS_3$  较适于体胚的发育, 具有较高的正常体胚率和体胚再生率 (以下的体胚发育实验均在附加 KT 0.5 mg/L 的改良  $MS_2$  培养基上进行). 含 KT 0.25 mg/L 的  $MS_2$  虽产生较高的正常体胚, 但体胚较小, 其成苗率较低, 而在含 KT 1 mg/L 和 KT 2 mg/L 的培养基上形成较多的多子叶体胚和子叶合生体胚, 从而影响体胚的成苗率.

2.3.2 活性炭对体胚发育的影响 活性炭对体胚的诱导有促进作用, 对体胚的发育也有很大的影响 (图 3): 不含活性炭和活性炭含量太高 (如高于 0.4%) 的培养条件均不利于体胚的正常发育, 而适当的活性炭浓度 (0.1% ~ 0.3%) 较利于体胚的发育. 在培养过程中观察到, 在不含活性炭的培养基上培养的体胚呈黄色, 双极性差, 成苗试验多愈伤化, 而在活性炭含量高于 0.4% 的培养条件下, 体胚呈白色, 结构不紧密, 体胚成苗率也低, 在适当浓度活性炭 (0.1% ~ 0.3%) 的培养条件下, 体胚呈浅黄绿色, 体胚结构致密, 成苗率较高. 适当浓度的活性炭促进体胚正常发育的机理尚不清楚, 可能在于它的吸附作用<sup>[2]</sup>.

2.3.3 渗透压对体胚发育的影响 蔗糖在培养基中既作碳源, 又能维持一定的渗透压. 不同的蔗糖浓度对番木瓜体胚的发育有明显的作 用. 培养基中含 9% 的蔗糖能使体胚的发育停止于球形胚期, 含 6% 蔗糖的培养基上只有少数的成熟体胚出现, 但体胚细小, 难以成苗, 低于 1% 的蔗糖浓度体胚生长快, 体胚常提前萌发, 成苗率低. 而 3% 的蔗糖浓度适于番木瓜体胚的整个发育时期. 结果与叶克难<sup>[1]</sup>, Chen<sup>[2]</sup>和 Litz<sup>[6]</sup>的一致.

2.3.4 培养方式对体胚发育的影响 不同的培养方式对体胚的发育也有影响, 表 5 是体胚在 3 种不同的培养方式下的发育情况.

从表 5 中可以看出, 在固体培养条件下, 得到的体胚较少 (每克胚性愈伤组织 168 个), 但正常体胚占的比例高, 正常体胚成苗率也高. 悬浮培养得到的体胚大约是固体培养的 4 倍, 正常体胚占的比例较低, 成苗率也较低, 第三种培养方式综合了前两种培养方式的优点, 得到较多的正常体胚及较高的体胚成苗率, 一般认为, 在固体培养基上生长的体胚比在液体上生长的质量高, 但液体培养具有扩大体胚生产

图 3 活性炭对体胚发育的影响

Fig. 3 Effect of cothue oharooal on the development of somatic emtyos of povpaya

表 5 不同培养方式对体胚发育的影响

Tab. 5 Effect of culture ways on somatic embryo development of papaya

培养方式	体胚总数 / 个 · g <sup>-1</sup>	正常体胚数 / 个 · g <sup>-1</sup>	正常体胚成苗率 / %
固态静止培养	168	146	87
悬浮振荡培养	520	313	78
固态静止培养+ 悬浮振荡培养 <sup>1)</sup>	411	327	83

1) 球形胚前固态培养, 球形胚后悬浮培养

量及易于体胚分选收集等优点. 通过观察体胚生长发育的周期, 发现由单细胞到球形胚的生长过程需要 15 d 左右的时间, 球形胚向心形胚, 鱼雷形胚直至子叶形胚发展较快, 整个过程

只需 15 d 左右时间. 因此, 让体胚在固体培养基上完成其早期发育, 而在液体培养基上完成其后期发育, 这种培养方式综合了固体培养和液体培养各自的优点, 使其体胚经历液体培养的时间短, 但仍能用过筛的方法使体细胞胚实现同步化, 从而提高体胚的质量.

本研究通过优化番木瓜体细胞胚的发育条件, 得到大量的成苗率达 80% 的成熟体胚, 为番木瓜人工种子的研制及外源基因转化番木瓜奠定了基础.

### 参 考 文 献

- 1 叶克难, 马蕾, 李宝健. 番木瓜悬浮培养的体胚发生与植株再生. 植物学报, 1991, 33(7): 565~ 568
- 2 Chen M H, Wang P J, Maeda E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. Plant Cell Rep, 1987, 6: 348~ 351
- 3 Fitch M M M, Manshardt R M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). Plant Cell Rep, 1990, 9: 320~ 324
- 4 叶克难, 余迪求, 黄俊潮. 脱水对番木瓜体细胞胚贮藏和萌发的影响. 中山大学学报(自然科学版), 1993, 32(1): 63~ 69
- 5 Fitch M M M, High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 32: 205~ 212
- 6 Litz R E. Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension cultures. J Amer Soc Hort Sci, 1986, 111: 969~ 972

## ies of Factors Influencing the Somatic Embryogenesis of *Carica papaya*

Huang Junchao\* Ye Kenan Chen Gu Li Baojian

**Abstract** Abundant calli were induced from young roots of hybrid papaya on modified MS medium supplemented with NAA 1.0 mg/L+ KT 0.5 mg/L+ GA 0.5 mg/L. Callus could be subcultured on medium containing NAA 0.25 mg/L+ KT 0.25 mg/L on which somatic embryos were also induced. of the tested phytohormones, 0.5 mg/L kinetin was most profitable for the development of somatic embryos of papaya. 0.1%~ 0.3% activated charcoal improved the somatic embryogenesis. The quantity and quality of somatic embryos could be greatly improved when the embryos before globular stage were cultured on solid subculture medium while embryos after globular stage in liquid development medium.

**Keywords** papaya (*Carica papaya* L.), somatic embryo, embryogenesis

\* Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275