

番木瓜胚珠高频率体胚发生和植株再生

邹韵霞 郭惠珊

(生物工程研究中心)

摘要 将番木瓜 (*Carica papaya* L.) 受精胚珠接种于MS + IAA 1mg/L + BA 2mg/L + GA₃ 2mg/L + S(蔗糖) 3% 和 1/2MS + 谷胺酰胺 400mg/L + CW(椰子汁) 20% + S 6% 的培养基中, 诱导愈伤组织, 愈伤组织继代培养于MS + CW 2% + S 6% + 2,4-D 2mg/L 的培养基上, 进行了几种激素配比和基本培养基(MS和改良MS)对诱导胚性愈伤组织、体胚发生和植物再生培养基的比较实验。结果表明: 在改良MS + 硫酸腺嘌呤 160mg/L + NAA 1mg/L + BA 0.5mg/L + GA₃ 1mg/L + S 4% 培养基中获得理想胚性愈伤组织和体胚, 在改良MS + 硫酸腺嘌呤 160mg/L + NAA 1mg/L + KT 0.5mg/L + GA₃ 1mg/L + S 4% 产生正常具三裂片和根系的小植株。进行番木瓜体胚包埋、制成人工种子, 实验获得小苗, 并移栽成功。

关键词 胚珠, 胚性愈伤组织, 体胚, 番木瓜 (*Carica papaya* L.)

番木瓜为番木瓜科 (*Caricaceae*) 番木瓜属 (*Carica*) 植物, 分布于热带和亚热带地区。现在中国和世界各地的番木瓜几乎都被环斑病毒 (PRV) 及花叶病毒感染^[1,2], 给番木瓜种植业带来了极为严重的问题。因此通过生长点组织培养再生番木瓜的方法来培养无毒苗具有实际意义。同时, 通过胚性愈伤组织及体胚发生的研究, 为人工种子的研制及抗病毒植株的培养提供了材料。目前番木瓜幼年实生苗茎尖已培养成功^[3], 也有从幼年实生苗茎部的愈伤组织诱导体细胞胚^[4], 以及从叶柄产生愈伤组织并诱导体细胞胚^[5]。但他们都未报导体细胞胚是否培养出小植株。Litz等^[6]从胚珠的愈伤组织诱导体细胞胚, 并从体细胞胚产生小植株^[7]。M H Chen (1987) 和 R A Drew (1987) 也成功地从番木瓜根外植体产生体细胞胚和再生植株^[8,9]。

本研究对广东岭南番木瓜穗中红品种和杂交种(园优一号)的受精胚珠进行培养, 获得胚性愈伤组织、体胚和正常小植株。

1 材料与方 法

1.1 材 料

广东河南园艺公司提供番木瓜 (*Carica papaya* L.) “穗中红” 两性和雌性未受精

本文1991年7月5日收到

* 国家“863”高技术计划资助项目

胚珠及杂交种“园优一号”杂交65天后的种子。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织的诱导及继代培养 将幼果在无菌条件下剖开, 取出受精和未受精的胚珠, 分别接种于 MS + IAA 1mg/L + BA 2mg/L + GA₃ 2mg/L + S 3% 和 1/2 MS + 谷酰胺 400mg/L + CW 20% + S 6% 培养基, 2~4 个月后受精的胚珠产生褐色、结构致密的愈伤组织块, 而未受精胚珠不产生愈伤组织。愈伤组织继代培养于 MS + CW 20% + S 6% + 2,4-D 2mg/L 的固体培养基上, 并进行了 2,4-D 浓度梯度 2, 4, 6, 8mg/L 不同组合的培养。

1.2.2 胚性愈伤组织及体胚诱导的培养 将愈伤组织切成小块接入诱导培养基, 比较了不同附加物及不同基本成分 (MS、改良 MS⁽⁸⁾) 基本培养基的诱导结果, 并进行培养基 (MSO) 附加 6, 8, 10% 的不同浓度蔗糖对体胚诱导及成苗的影响的液体振荡培养实验。

1.2.3 体胚诱导成苗的实验 进行了附加不同激素及浓度的培养, MS 基本培养基附加不同蔗糖浓度对体胚成苗效果的影响比较实验。

以上培养条件均为光强度 2000Lux 下培养 16h 与暗培养 8h, 温度 25℃ ± 1, 振荡培养转速为 100rpm。

1.2.4 人工种子包埋、转换成苗及移栽 取正常体胚, 用 3% 海藻酸钠包埋, 置成苗培养基中培养, 成苗后移至土壤栽种。

2 结果

2.1 诱导愈伤组织及继代培养的最适培养基

接种 2~4 个月后, 受精的胚珠在 2 种培养基都能产生褐色愈伤组织块、结构致密。如果将这些愈伤组织继代在同样的培养基中, 无明显的增殖效果。而继代于附有不同 2,4-D 浓度的 MS + CW 20% + S 6% 的培养基中, 只有在 2,4-D 为 2mg/L 时, 愈伤组织得到明显的增殖 (图版-1), 其它浓度的培养基只在愈伤组织周围产生粘稠的分泌物, 而愈伤组织无增殖现象。可见继代培养基以 MS + 2,4-D 2mg/L + CW 20% + S 6% 为最适培养基。

2.2 诱导胚性愈伤组织及体胚发生的最适培养基

从表 1 可看到, I₁ 培养基没有诱导产生胚性愈伤组织, 但在一些小块的愈伤组织上产生少量的体胚; I₂、I₃ 培养基均能产生胚性愈伤组织 (图版-2), 并从胚性愈伤组织产生体胚, 从这些胚性愈伤组织中可观察到不同时期的胚 (图版-3) 不经任何机械筛选, 体胚同步性可达 70% 以上 (图版-4, 5), 而且以改良 MS⁽⁸⁾ 为基本培养基效果更好, 说明这种基本培养基中的维生素浓度及配比比 MS 中的更适合胚性细胞的繁殖与体胚的形成。

将胚性愈伤组织接入不同蔗糖浓度的 MSO 基本培养基中, 结果见表 2,

表1 不同基本培养基及不同附加物、激素的诱导结果

Tab.1 The influence of different basic mediums and hormone on the embryonic calli and somatic embryogenesis

编号	基本培养基	附加物及激素浓度 (mg/L)	蔗糖浓度(%)	胚性愈伤组织	体胚发生
I ₁	MS	谷酰胺400	6	-	+
I ₂	MS	硫酸腺嘌呤160 + NAA1+BA0.5 +GA ₃ 1	4	++	++
I ₃	改良MS	硫酸腺嘌呤160 + NAA1+BA0.5 +GA ₃ 1	4	+++	+++

注: -表示无继续产生愈伤组织, +表示一些愈伤组织表面产生少量体胚, ++表示能产生胚性愈伤组织及体胚, +++表示产生的量比++的多

表2 不同蔗糖浓度的基本培养基对诱导体胚的影响

Tab.2 The influence of the different concentrations of sucrous on somatic embryogenesis

编号	培养基	蔗糖浓度(%)	体胚产生	体胚生长结果
I ₁	MS	6	+++	体胚生长正常, 能形成苗, 但叶不具裂片。无胚轴无根系
I ₂	MS	8	+++	开始体胚发育正常, 但以后不产生正常苗, 叶聚生, 白色
I ₃	MS	10	+	仅产生少量体胚, 也不能成苗

注: +++产生大量体胚, +只有极少数体胚

从图版-5可见: I₁, I₂培养基均能产生大量的体胚, I₃培养基则只见极少数体胚。每4~5天换1次新鲜液体培养基, 继代培养发现在I₁中培养的体胚能正常发育产生苗, 但无根系, 不具胚轴, 叶子细长。而I₂培养基的体胚则发育成白色、似茉莉花状的聚生叶。

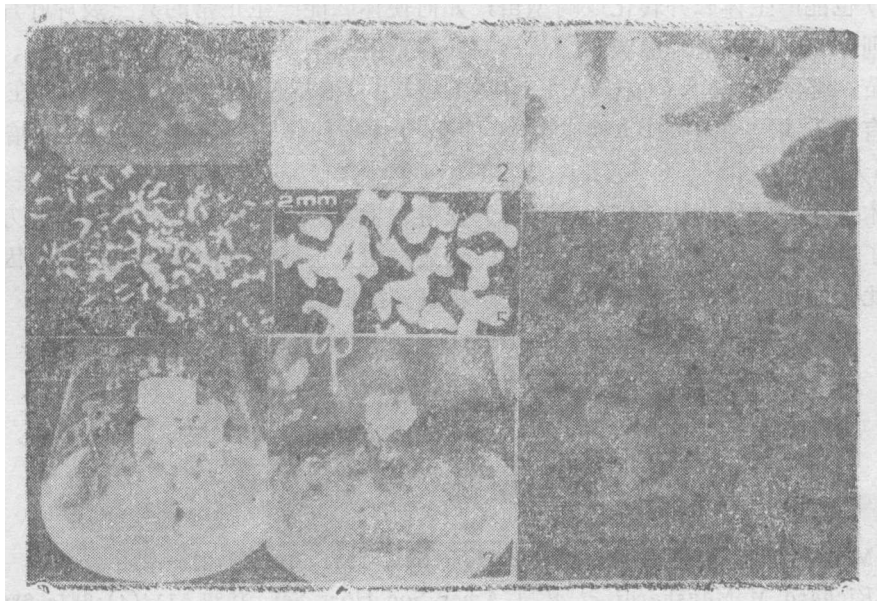
2.3 体胚诱导成苗的结果

从表3可见, I₁培养基使体胚脱分化产生愈伤组织, 这些愈伤组织又能产生体胚, I₁培养基含较高浓度外源激素(BA5mg/L, IAA1mg/L), 由此引起体胚的愈伤组织化; 而I_{2,3,4}培养基都含有较低的激动素(BA0.0025mg/L)和生长素(NAA0.02mg/L)有利于体胚发育成苗, 但下胚轴有膨大愈伤化现象, 蔗糖浓度4%时, 情况稍好, 蔗糖浓度为2%, 叶片不具三裂片。如果将I₃培养基中的BA换成KT而成表3中的I₅培养基, 体胚能发育成具胚轴、三裂片和根系的正常木瓜植株, 且发育一致(图版-6)。

表3 不同激素浓度对体胚成苗的影响

Tab.3 The influence of different hormones and concentrations on the mature somatic embryo transference to plantlet

编号	培养基(mg/L)	蔗糖浓度(%)	体胚成苗的结果
Ⅰ ₁	MS + BA5 + JAA1 + CH400	4	体胚脱分化成愈伤组织，愈伤组织形成体胚，体胚又脱分化形成愈伤组织
Ⅰ ₂	改良MS + BA0.0025 + NAA0.02	6	体胚能产生小苗，但根部有膨大愈伤化现象
Ⅰ ₃	改良MS + BA0.0025 + NAA0.02	4	体胚能产生小苗，根部稍膨大
Ⅰ ₄	改良MS + BA0.0025 + NAA0.02	2	根部无膨大现象，但整个小苗发育不好
Ⅰ ₅	改良MS + 硫酸腺嘌呤160 + NAA1 + KT0.5 + GA ₃ 1	4	产生正常具三裂片、胚轴、根系的小苗，发育一致



图版 1~8 1. 受精胚珠诱导产生的愈伤组织, 4、5. 示双子叶胚, 同步性达70%以上, 2. 示胚性愈伤组织, 6. 正常小苗, 3. 显微镜下观察到不同时期的胚 (放大倍数40×40), 7. 人工种子萌发, 8. 人工种子苗移栽成活, 获正常植株

Fig.1~8 1. Ovules calli was induced, 2. Emlisyonic calli, 3. Embryos in the different stages, 4、5. Dicotyledonous embryos and the syncheonism was over 70%, 6. Normal plantlets, 7、8. Artificial seeds had germinated and developed to plants

2.4 人工种子成苗及移栽

我们试验了少量体胚包埋制备人工种子(图版-7)人工种子萌发率在25%左右,将小苗移到土壤,已获得正常植株(图版-8)。

3 讨论

Litz and Conover报导^[6],诱导木瓜胚珠产生愈伤组织,需要有CW的存在。但在本实验中,在一定浓度IAA、BA、GA₃配合的特定环境下,即能诱导出愈伤组织。Litz and Conover^[7]和Richard E. Litz^[10]报导在含2,4-D的液培中能产生体胚,但本实验在含有2,4-D的培养基中没有观察到体胚发生,这与实验步骤、外植体、品种基因型等有关。我们在含有NAA、BA、GA₃和附加硫酸腺嘌呤的培养基中获得理想的胚性愈伤组织并产生体胚,将此培养基的BA换成KT即能使体胚发育成正常小苗。

本实验研究表明,只要产生了胚性愈伤组织,即使在不加任何外源激素的培养基(I_{2,3})也能产生体胚并转化成畸型苗;如何使体胚能产生正常的具三裂片叶片的完整植株,则依赖于培养基外源激素。从诱导胚珠愈伤组织及胚性愈伤组织的形成、体胚发生到成苗,都依赖NAA(或IAA)、BA(或KT)和GA₃的特定配比组合,在本实验中,只有将I₃培养基中的BA换成KT(即II₅)才能使体胚发育成正常苗。而培养基以改良MS为佳。

番木瓜受精胚珠的体外培养成功,为获得大量植株提供了一种简单快速的方法,而且解决了杂种优势F₁代的快速繁殖问题。通过产生大量胚性愈伤组织进行转基因工作,可得到比叶盘转化更高的转化率,为生产和研究提供更有效的途径。

参 考 文 献

- 1 Moore G A *et al.* J Amer Soc Hort Sci, 1984, 109(2):213~218
- 2 Richard M Manshardt *et al.* J Amer Soc Hort Sci, 1989, 114(4):684~689
- 3 Medhi A A *et al.* Hortscience, 1976, 11:311 (abstract)
- 4 Yie S T *et al.* In Vitro, 1977, 13:564~567
- 5 DeBruije E *et al.* Int Symp Fytoform Fytiat, 1974, 26:637~645
- 6 Litz R E *et al.* Plant Science Letters, 1982, 26:153~158
- 7 Litz R E *et al.* Ann Bot, 1983, 51:685~686
- 8 Chen M H *et al.* 热带作物译丛, 1989(2):36~38
- 9 Drew R A. Journal of Horticultural Science, 1987, 62(4):551~556
- 10 Litz R E *et al.* J Amer Soc Hort Sci, 1986, 111(6):969~972
- 11 Pang S Z *et al.* J Amer Soc Hort Sci, 1988, 113(2):287~291

High-frequency of Somatic Embryogenesis and Transference to Plantlets from *Carica papaya* L

Zou Yunxia* Guo Huishang

Abstract *Carica papaya* L. ovules calli was induced upon MS (MurashigeSkoog 1962) medium containing 1mg/L IAA, 2mg/L, 2mg/L GA₃ and 3% sucrose, and 1/2 MS medium containing 400mg/L glutamine, 20% filter-sterilized coconut milk (CM) and 6% sucrose. The calli was subcultured on MS medium supplemented with 20% CM, 6% sucrose and 2mg/L 2,4-D. High-frequency embryonic calli and somatic embryogenesis occurred on modified MS medium containing 160mg/L Adenine Sulfate, 1mg/L NAA, 0.5mg/L KT, 1mg/L GA₃ and 4% sucrose. Normal plantlets were obtained. *Carica papaya* L. artificial seeds had been formed and already germinated. Plants have been successfully established in the soil.

Keywords ovule, embryonic calli, somatic embryo, *Carica papaya* L.

· 简 讯 ·

中山大学学报论丛(物理学论文集)出版

由中山大学学报编辑部编辑的《中山大学学报论丛》1992年第2期(物理学论文集)将于近月出版发行。论文集收录了物理学系、无线电电子学系等单位的最新科研成果25篇。

邮购请与中山大学物理学系朱津裘联系。

(张 文)

* Biotechnology Research Center