

- [25] Bitters W P, Murashige T, *et al.* Investigations on established virus-free plants through tissue culture [A]. Calif. Citrus Nurserymen's Soc. , 1970, **9**: 27~30
- [26] Juavez J, Navarro L and Guardida J L. Obtention de plantes de divers cultivars de demontiniers au moyen de la culture de nucelle in vitro [J]. *Fruits*, 1976, **31**: 751~762
- [27] Navarro L, Juarez J, Pina J A and Ballester J F. The citrus quarantine station in Spain [A]. Riverside: Proc. 9th Conf. IOCV (in press).
- [28] Button J and Bornman C H. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of Washington navel orange in vitro [J]. *J. S. Afr. Bot.*, 1971, **37**: 127~134
- [29] Kochba J, Spiegel-Roy P and Safran H. Adventive plants from ovules and nucelli in Citrus [J]. *Planta*, 1972, **106**: 237~245
- [30] Kochba J, Button J, Spiegel-Roy P, *et al.* Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberelic acid and adenine sulphate [J]. *Ann. Bot.*, 1974, **38**: 795~802
- [31] Roistacher C N. Detection of citrus viruses by graft transmission: a review [A]. Riverside: In. Proc. 7th Conf. IOCV. 1975, IOCV, 175~185
- [32] Quak F. Meristem culture and virus-free plant, In. F. Reinert & Y. P. S. Bajaj (eds.). *Plant Cell tissue and organ culture* [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1977, 598~615
- [33] Robacker C D and Chang C J. Shoot-tip culture of Muscadine grape to eliminate pierce's disease bacteria [J]. *Hortscience*, 1992, **27**(5): 449~450.
- [34] 王际轩, 李淑珍, 隋世琴等. 苹果组织培养苗离体嫁接的研究 [J]. *园艺学报*, 1985, **12**(3): 151~157
- [35] 薛光荣, 杨振英, 洪 霓等. 茎尖培养等处理脱除梨病毒的技术研究 [J]. *中国果树*, 1996, **3**: 9~11
- [36] 洪 霓, 王国平, 张尊平等. 梨病毒脱除技术研究 [J]. *中国果树*, 1995, **4**: 5~7
- [37] Grum M, Camloh M, Rudolph K and Ravnika M. Elimination of bean seed-borne bacteria by thermotherapy and meristem culture [J]. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 1998, **52**: 79~82.
- [38] 陈菁瑛, 陈景耀. 龙眼茎尖离体培养及其脱毒效果 [J]. *植物生理学通讯*, 1996, **32**(2): 126~131
- [39] Navarro, L. . Roistacher. C. N. , and Murashige. T. , 1976. Effect of size and source of shoot-tips on psorosis-A and exocortis content of navel orange plants obtained by shoot-tip grafting in vitro [A]. Riverside: In. Proc. 7th Conf. IOCV. 1975, IOCV, 194~197
- [40] 高原利雄等. 简易茎尖嫁接法脱柑桔病毒 [J]. *果树试验场报告*, 1986, **8**: 13~24
- [41] Navarro L, Juarez J, Ballester J F and Pina J A. Elimination of some citrus pathogens producing psorosis-like leaf symptoms by shoot-tip grafting in vitro [A]. Riverside: In. Proc. 8th Conf. IOCV, 1975, 1980, 162~166
- [42] Mukhopadhyay S, Jaishree Rai, Sharma B C, *et al.* Micropropagation of Darjeeling orange (*Citrus reticulata* Blanco) by shoot-tip grafting [J]. *Journal of Hortscience*. 1997, **72**(3): 493~499
- [43] 李耿光, 胡兰娟, 黄群声等. 柑桔茎尖培养的初步研究 [J]. *植物生理学报*, 1978, **4**(2): 189~195
- [44] 赵学源, 蒋元晖, 李世菱等. 我国柑桔栽培品种的裂皮病的鉴定与脱除 [J]. *园艺学报* (*Acta Horticulture Sinica*), 1986, **13**(2): 91~94
- [45] 蒋元晖, 邱柱石, 苏维芳, 赵学源. 利用茎尖嫁接脱毒培养无裂皮病的脐血橙 [J]. *植物保护学报*, 1983, **10**(8): 166~168
- [46] 蒋元晖. 谈谈柑桔茎尖嫁接技术 [J]. *中国柑桔*, 1987, **2**: 15~16
- [47] 张秋胜, 舒广平, 宁顺华. 柑桔茎尖嫁接技术的改进 [J]. *中国柑桔*, 1991, **20**(2): 11~13
- [48] Fengtong Ma, Chunhui Guo, Yurong Liu, *et al.* In vitro shoot-apex grafting of Mulberry (*Morus alba* L.) [J]. *Hortscience*, 1996, **31**(3): 460~462
- [49] 王国平. 德国果树病毒病研究及防治考察 [J]. *中国果树*, 1991, **47**(1): 55~56

番木瓜叶片愈伤组织形成、分化 及再生植株移栽

朱西儒, 张云开

(中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650)

摘要: 研究了番木瓜的叶片愈伤组织的形成, 并进一步诱导分化, 离体培养成完整的试管植株, 这对深入进行体细胞突变育种, 以及抗病毒品系筛选和种质改良或耐贮藏等基因转化, 提供了有用的技术和方法。

关键词: 番木瓜 (*Carica papaya* L); 叶片; 愈伤组织形成; 植株再生

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)01-0059-04

The formation of callus from papaya leaf and its generation induced and transplanting the plantlets with roots

ZHU Xi-ru, ZHANG Yun-kai

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650, China)

Abstract: The formation of callus from papaya leaf and the generation induced the tube seedling plantlets were studied in this paper. It was one useful way and method of the gene transformation to papaya ring-spot virus (PRV) and to screening lines with storing for long time and good quality.

Key words: Papaya (*Carica papaya* L); leaf; formation of callus; generation induced the plantlets

番木瓜 (*Carica papaya* L) 是华南及台湾、福建和云南部分地区特有的一种热带、亚热带常绿果树^[3,4,9], 在我国, 大约已有 70 多年的栽培历史。其果产量高、色美味鲜, 而且富含糖和维生素, 尤其是木瓜蛋白酶 (Papaw), 营养价值较高。所以, 它既可以作为新鲜水果食用, 又能够入菜煲汤。重在益脾健胃和帮助消化, 治疗十二指肠胃溃疡病, 产妇多食可以增加乳汁。木瓜凝乳蛋白酶

(Chymopapaw) 的医用价值更高, 对人的“腰脊椎间盘突出症”疗效显著, 可避免动手术之疾苦^[3,6,8]。近年来, 我们已经分离、纯化上述两种酶, 还获得其中含有的“融菌酶”^[4]。对促进伤口愈合, 防止感染, 以及水果和食品保鲜都有重要意义。

番木瓜叶片愈伤组织的形成, 并进一步诱导分化, 离体培养成完整的试管植株, 对深入进行体细胞突变育种、以及抗病毒品系的筛选、种质

收稿日期: 2000-01-06

作者简介: 朱西儒 (1950-), 博士, 副研究员, 主要从事番木瓜、香蕉病毒病检测技术, 组织培养以及荔枝保鲜和生物防治等工作。

基金项目: 广东省“八五”攻关资助项目 (950645)

改良或耐贮藏基因转化,是一项有用的技术和方法^[9,10]。因为,目前国内外尚无抗番木瓜环斑病毒(Papaya ringspot virus, PRV)的品系资源,包括许多野生种也易感染此病^[1,7,13],唯一途径是依靠基因转化手段,利用病毒外壳蛋白基因(cp-gene)进行遗传转化,获得抗病毒植株已有成功的先例^[12,14]。

叶片作为转基因的受体,由于取材方便,特别是“叶圆盘法”基因转移方法的创立^[13],已得到广泛使用^[12,13]。番木瓜茎尖和侧芽的离体培养已获得成功^[2,11],但是,叶片诱导分化成植株,还未见报道。

1 材料和方法

1.1 材料

用番木瓜品种:“穗中红”无菌试管苗幼叶,作为离体培养的外植体。

1.2 方法

除去叶柄,将叶肉组织切成2~5 mm²小块,在不同培养基上诱导分化,观察其生长变化。

1.3 培养基制备

以MS培养基为基本培养基,经过改良(调节氮态比例),附加有椰子乳(CW)10%,以及2,4-D_{0.25,0.5,1.0,2.0},BA_{0.1,0.2,0.5}和NAA_{0.05,0.1},蔗糖或葡萄糖3%,琼脂0.6%。

1.4 培养条件

培养室温度25~28℃,光照(2 000~3 500 lx),除愈伤组织的诱导开始进行暗培养5~7 d以外,其余处理都是每天光照12~14 h。

2 试验结果

2.1 不同2,4-D浓度对愈伤组织形成的影响

每一试验处理用改良的MS基本培养基,添加不同浓度的激素比例,配制250 mL培养基,分装10个小三角瓶,每瓶接5~6块外植体。然后,培养3~6周,观察其愈伤组织的形成及生长势(图版1)。每批试验重复5~6次,统计试验结果见表1。

结果表明:使用2,4-D_{1.00}BA_{0.5}NAA_{0.05}比较理想,其形成的愈伤组织紧密,呈现绿色半透明状,

进而产生球形胚状体。当浓度达到2,4-D_{1.00}+BA_{0.5}+NAA_{0.05}时,则出现大量白色霜状组织块,很少产生球形胚状体。

2.2 不同碳源种类与浓度对愈伤组织形成的影响

使用不同种类与浓度的碳源,对愈伤组织形成会产生较大影响。因此,比较了蔗糖和葡萄糖对番木瓜叶片组织培养产生的效果,其中,使用2,4-D_{1.00}+BA_{0.5}+NAA_{0.05}配方,培养条件如上所述。结果见表2。

表1 不同2,4-D浓度对愈伤组织形成的影响¹⁾

Table 1 The influence of difference 2,4-D concentration to the callus formation

激素浓度 Hormor rate (mg·L ⁻¹)	培养组 织(块) Tissues (mass)	愈伤组 织(块) Callus (mass)	发生率 Rate (%)	生长势 ²⁾ Growth
2,4-D _{0.25} BA _{0.1} NAA _{0.05}	248	103	41.5	+
2,4-D _{0.50} BA _{0.1} NAA _{0.05}	256	116	45.3	+
2,4-D _{1.00} BA _{0.2} NAA _{0.05}	250	128	51.2	++
2,4-D _{1.00} BA _{0.5} NAA _{0.10}	258	150	58.1	+++
2,4-D _{2.00} BA _{0.5} NAA _{0.10}	260	145	55.8	+++

¹⁾ 污染数除外;“+”少量;“++”绿色,质地紧密;“+++”大量,表面有白色霜状组织层。

²⁾ Except polluted buds;“+” a little; “++” green, Inseparable quality of material; “+++” lot of callus like white frost.

表2 不同碳源种类与浓度对愈伤组织形成的影响¹⁾

Table 2 The influence of difference concentration sugar to the callus formation

碳源种类浓度(%)		外植体 数(块) Explants (mass)	愈伤组 织(块) Callus (mass)	发生率 Rate (%)	生长情况 ²⁾ (质地) Growth
蔗糖 Sucrose	葡萄糖 Glucose				
3.0	—	253	108	42.7	++
4.0	—	266	157	59.0	++
5.0	—	254	143	53.4	+++
—	2.0	268	155	57.9	+
—	3.0	245	179	73.1	++
—	4.0	237	126	53.2	+++

¹⁾ 污染数除外;“+”少量;“++”绿色,质地紧密;“+++”大量,表面有白色霜状组织层。

²⁾ Except polluted buds;“+” a little; “++” green, Inseparable quality of material; “+++” lot of callus like white frost.

试验表明:使用3%的葡萄糖或3%~4%蔗糖比较好。当提高使用浓度时,就会出现大量白色霜状愈伤组织层,不够结实,难以诱导产生球形胚状体。

2.3 不同BA浓度对愈伤组织诱导分化的影响

将上述培养获得的结构紧密,呈现绿色半透

明状的愈伤组织,进一步在含有 $BA_{0.5}$ 和 $NAA_{0.01}$ 的 MS 培养上,比较不同 BA 浓度对不定芽产生的影响。观察结果见表 3。

表 3 不同 BA 浓度对愈伤组织诱导分化的影响¹⁾
Table 3 The influence of difference concentration BA to buds induced from the callus

使用浓度 Concentration (mg/L)	愈伤组织 (块) Callus	分化不定芽 (个) Buds	分化率 Rate (%)
$BA_{0.05}$	156	102	65.4
$BA_{0.10}$	180	126	70.0
$BA_{0.15}$	188	130	69.1
$BA_{0.25}$	169	145	85.8
$BA_{0.50}$	175	98	56.0

¹⁾表内对污染数不作统计 Except polluted buds

从实验结果可以看出,BA 使用浓度在 0.5 时,其诱导分化率最高,达到 85.8%(图版 I)。多数从叶片与叶柄切口处形成胚状体,或者在叶缘直接产生不定芽。但是,凡是出现白色霜状组织,尽管生长比较快,始终不会产生球形胚状体。它也无不定芽的分化能力,随着培养时间的延长,发生褐变而枯死。

2.4 不同 NAA 浓度对愈伤组织诱导分化的影响

在固定 BA 使用浓度 0.5 时,比较不同 NAA 浓度对愈伤组织诱导分化的影响。结果发现在使用 $NAA_{0.10}$ 时,诱导分化率达到 73.9%(表 4,图版 I)。

表 4 不同 NAA 浓度对愈伤组织诱导分化的影响¹⁾
Table 4 The influence of difference concentration NAA to buds induced from the callus

使用浓度 Concentration (mg/L)	愈伤组织 (块) Callus	分化不定芽 (个) Buds	分化率 Rate (%)
$NAA_{0.02}$	146	73	50.0
$NAA_{0.05}$	145	98	67.6
$NAA_{0.10}$	138	102	73.9
$NAA_{0.25}$	150	104	69.3

¹⁾表内对污染数不作统计 Except polluted buds

2.5 番木瓜叶片愈伤组织不定芽的根系诱导分化

将诱导发生的不定芽,分别移植在 1/2 MS 培养基上,除去 2,4-D,添加有 1% 的活性炭和不同浓度 IBA,比较对试管不定芽根系发生的影响,结果见表 5。

从表 5 结果看出:使用 IBA0.10 的效果最

好,出根率达到 85.2%。当超过 IBA0.25 时,虽然出根率不低,但根系愈伤组织化,如同海绵状,松软、易烂,很难移栽成活。

2.6 番木瓜叶片愈伤组织诱导分化的小植株移栽

移栽成活是试管苗的主要难关,特别是番木瓜诱导分化的小植株。成功与否取决于根系的质地是否紧密,叶片愈伤组织诱导分化的小植株移栽成活,需要经过在营养液内保湿培养 3~7 d 练苗,最后,移栽到沙+泥炭土中,其成活率可以达到 71.3%(表 6,图版 I)。

表 5 番木瓜叶片愈伤组织不定芽的根系诱导分化¹⁾
Table 5 The differential roots of buds induced from the callus of papaya leaf

使用浓度 Concentration (mg/L)	不定芽 (块) Buds	根系分化 (个) Roots	分化率 Rate (%)	根系长势 ²⁾ Growth
$IBA_{0.05}$	180	123	68.3	+
$IBA_{0.10}$	176	150	85.2	++
$IBA_{0.15}$	185	146	78.9	+++
$IBA_{0.25}$	167	130	77.8	++++
$IBA_{0.50}$	193	137	71.0	++++

¹⁾污染数除外;²⁾+ 少量;++ 绿色,质地紧密;+++ 大量,表面有白色霜状组织层。

¹⁾ Except polluted buds; ²⁾ + a little; ++ green, inseparable quality of material; +++ lot of callus like white frost.

表 6 番木瓜叶片愈伤组织分化的小植株移栽¹⁾
Table 6 The survived plantlets induced from the callus of papaya leaf in transplantation

移栽方式 Transplant ways	移栽株数 (个) Plants	成活数(株) Survived plants	成活率 (%) Rate
沙+泥炭土	188	32	17.0
塘泥土	173	25	14.5
蛭石盆栽	125	19	15.2
营养液+沙+泥炭土	129	98	71.3

¹⁾试验重复 5 次 Test repeat 5 times

2 讨论

叶克难等(1991)研究过番木瓜悬浮培养的体胚发生以及植株再生^[10],但是未报道移栽成活率。本试验首次用叶片组织切块离体培养,诱导分化并再生植株。愈伤组织的质量与分化力关系密切,不仅必须是绿色,而且愈伤组织应紧密、结实,才可以诱导分化。同时发现先出根的,就难再生不定芽;相反,先出芽后出根的,就能够培养成完整小植株。

本研究初步获得较高的移栽成活率,认为番

木瓜再生小植株的根系质量是其关键因素。凡是根系生长不紧密,尽管诱导产生有大量根毛,仍然难以存活,最后会因根茎连接处愈伤组织容易感染病菌而死亡。为克服根系不正常,采用降低 IBA 浓度,添加一定量的活性炭,基本可以消除此种现象,提高小苗移栽成活率,在其它植物中也有成功的报道^[1]。这将对进一步深入研究抗 PRV 的 cp 基因转化,或利用遗传工程技术,培育出高产、优质番木瓜新品系有重要意义。

参考文献:

- [1] 卜学贤,陈维伦. 活性炭对培养基中植物生长调节物质的吸附作用[J]. 植物生理学报, 1988, 14(4): 401~405
- [2] 朱西儒,范怀忠,冯志萍等. 番木瓜茎尖哈侧芽的离体培养(简报)[J]. 植物生理学通讯, 1989, (5): 49
- [3] 朱西儒,张云开,张海保等. 番木瓜杂交座籽与了芽及 F1 代的环斑花叶病调查研究[J]. 广西热作科技, 1999, (2): 5~8
- [4] 刘 卫,朱西儒. 番木瓜酶动力学研究[D]. 《中国科学院华南植物研究所硕士学位研究论文》, 1997, PP. 1~53
- [5] 朱利显,吴显荣. 两种因化木瓜蛋白酶的研究[J]. 西南农业大学学报, 1983, 15(3): 262~268
- [6] 李潮生. 木瓜蛋白酶产业之开发[J]. 福建热作科技, 1988, (3): 18~21
- [7] 张云开,朱西儒,张海保等. 两个番木瓜品系的比较初报[J]. 广东农业科学, 1994, (2): 23~25
- [8] 广西重要研究所. 番木瓜[A]. 在《广西药用植物名录》, 南宁: 广西人民出版社, 1983, PP. 153
- [9] 陈枝楠,范怀忠. 番木瓜环斑病毒在番木瓜原生质体中复制的初步研究[J]. 中国病毒学报, 1993, 8(3): 263~270
- [10] 叶克难,马 蕾,李宝健. 番木瓜悬浮培养的体胚发生和植株再生[J]. 植物学报, 1991, 8(3): 263~270
- [11] 杨乃博. 几种母本植物的组织培养及器官发生[J]. 植物生理学通讯, 1982, (4): 23~27
- [12] Beachy R N. Coat protein-mediated resistance against virus infection[J]. *Ann. Rev. Phytopathology*, 28: 451~474
- [13] Conover R A, Lits R E. Breeding for resistance to papaya ring spot virus[J]. *Phytopathology*, 1983, 73(1): 121~124
- [14] Hoesch R B. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. *Science*, 1986, 227: 1229~1231
- [15] Powell Abel R. Delay of disease development in transgene plants that the tobacco mosaic virus coat protein[J]. *Science*, 1985, 232: 738~743
- [16] Shah D M. The introduction of foreign genes in plants[J]. *Biotechnology and genetics engineering reviews*, 1987, 5: 81~98

朱西儒等：番木瓜叶片愈伤组织形成、分化及再生植株移栽
ZHU Xi-ru, *et al.*: The formation of callus from papaya leaf and its
generation induced and transplanting the plantlets with roots

图版 I
Plate I



番木瓜叶片愈伤组织形成与不定芽的诱导分化
The callus formation and differential buds induced from papaya leaf
(箭头:球形胚状体;不定芽 Global embryo;buds)

朱西儒等：
ZHU Xi-ru, *et al.* :

图版 II
Plate II



番木瓜叶组织诱导分化的有根试管小苗及移栽成活

The survived plantlets transplanted the tube seedling with roots induced from the callus of papaya leaf

A. 试管小苗(愈伤组织化根)Callus roots seedling; B. 正常根系的诱导 Normal roots seedling;

C, D. 试管苗移栽成活 The survive of tube seedling transplanted.