

番木瓜抗病育种及其组培苗生产概述^①

陈春宝^② 黎小瑛 周 鹏^③(中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海口市 571101)
(热带作物生物技术国家重点实验室

摘 要 概述番木瓜抗病育种研究进展及发展趋势, 阐述番木瓜种苗组织快繁技术的优点及具体步骤, 为抗病、优质、高产番木瓜优良品种的遗传稳定性的保持及其种质的保存提供了一条有效途径。

关键词 番木瓜; 抗病育种; 组培快繁技术

分类号 S667.9

Review on Breeding and Selection of Disease Resistant Lines of Papaya and Their Tissue Culture

CHEN Chunbao LI Xiaoying ZHOU Peng

(State Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops / Institute of Tropical Bioscience
and Biotechnology, CATAS, Haikou 571101)

Abstract Papaya production has been hindered from Papaya Ring Spot Virus (PRSV) at all times. Genetic engineering for resistance breeding of papaya is a preferable way. The advances on breeding and selection of disease resistant papaya were reviewed. Micropropagation by tissue culture is an efficient way in maintaining stable heredity of high quality and conserving papaya germplasm.

Keywords papaya (*Carica papaya* Linn.); virus-resistance breeding; micropropagation

番木瓜 (*Carica papaya* Linnaeus) 是一种广泛分布于热带、亚热带地区的多年生常绿果树, 其果肉厚实, 香气浓郁, 含有丰富的木瓜蛋白酶、维生素、胡萝卜素、钙盐等, 具有重要的食用和工业价值, 它特有的木瓜酵素能清心润肺, 还可帮助消化和治疗胃病, 木瓜碱具有抗肿瘤功效, 对淋巴性白血病细胞具有强烈抗癌活性。常食用具有平肝和胃、舒筋活络、软化血管、抗菌消炎、抗衰养颜、防癌抗癌和增强体质之保健功效, 被营养学家誉为十种最好的食物之一。但番木瓜在生产过程中, 容易遭到病毒病特别是环斑花叶病毒病的侵害, 造成大量减产甚至绝收。因此培育具有广谱抗病毒的优良品种, 并将其进行规模化生产成为亟待解决的问题。

1 番木瓜抗病育种研究进展及发展趋势

在番木瓜生产中, 环斑病毒 (Papaya Ringspot Virus, PRSV) 和花叶病毒 (Papaya Mosaic virus, PMV) 是引起番木瓜病毒病的 2 种最主要病毒。PRSV 的病原是马铃薯 Y 病毒组的重要成员之一, 是单分体正链 RNA 病毒, 分为 P 型和 W 型, 其中 P 型普遍发生于热带、亚热带番木瓜产区, 是世界番木瓜生产的重要制约因素。多年来, 环斑花叶病毒病严重阻碍了国内外番木瓜生产, 一些重病地区甚至濒临灭绝。据周鹏等的病情调查, 2000~2001 年, 海南一些果农种植的几千亩番木瓜, 由于 PRSV 得不到有效的控制而造成了严重损失。生产实践证明若不能解决番木瓜生产上的 PRSV 病害问题就无法进行大规模生产。迄今, 还没有十分有效的化学药剂来控制

① 获国家“863”课题 (2002AA241141)、国家转基因专项 (JY04-B-02)、海南省自然科学基金项目 (30203) 资助。

收稿日期: 2006-06-06

责任编辑/孙继华

<http://rdnk.chinajournal.net.cn/> E-mail: rdnk@chinajournal.net.cn

② 陈春宝 (1981~), 男, 生物化学与分子生物学专业硕士生。E-mail: cbchen2004@126.com。

③ 通讯作者。联系电话: (0898) 6698 8564; E-mail: zhp6301@126.com。

这一病毒病害, 轮作等农业措施只能起到一定的减轻病害的作用; 常规的新品种选育效率较低, 且抗病品种由于病原菌株的快速更换, 其抗病性在较短的时间内就会丧失。

1.1 利用病毒核酸序列培育抗病转基因番木瓜植株

随着植物基因工程的快速发展, 植物抗病育种取得了突破性进展, 已有很多病毒的不同核酸序列被使用并证明转基因植物有不同程度的抗病毒效果。利用植物基因工程技术进行番木瓜抗环斑病毒工作始于 20 世纪 90 年代初, 主要是通过将 PRSV 外壳蛋白基因导入番木瓜, 从而获得抗病转基因植株^[1]。通过转 CP 基因在植株内表达, 干扰病毒的正常增殖, 从而达到抗病目的, 其抗病的机制为蛋白质介导的病毒抗性。采用这一策略, 美国夏威夷大学和中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室(“八五”期间与中国科学院微生物研究所合作研究)均已获得转 PRSV-CP 基因番木瓜株系, 这些转基因植株在大田试验时表现为对 PRSV 具有一定的抗性, 但其抗病性主要表现在生长前期, 对病毒的侵染只起到了延缓作用, 抗病能力不能达到理想效果^[2~8]。Katia 等的研究表明 CP 蛋白的完整性对于其与 RNA 的结合具有极其重要的作用, 当缺失 N 端 1~26 个氨基酸时, CP 失去与 RNA 结合的能力^[9]。Chu-Hui Chiang 等构建了含不同 CP 片段的 PRSV HA 重组子, 结果表明番木瓜 Rainbow 品种的致病性受不同 CP 片段在重组子中位置的影响^[10]。现有的分析表明, 这类转基因植株的抗性水平与转基因植物中的目的基因所表达的蛋白量呈正相关, 即蛋白表达量越大, 抗病能力较强, 反之, 抗病能力较弱; 同时这类转基因植株的抗性还存在地域差异性, 即由于 PRSV 病毒株存在差异而导致某一地区 PRSV-CP 的转基因植物在另一地区种植时表现出的抗病能力会很弱甚至抗性丧失, 这使所获得的转基因植株在生产上的应用受到限制^[11, 12]。因此, 培育出稳定、高抗、普抗且安全性好的新品种是发展番木瓜生产的当务之急。

1.2 RNA 介导的抗病毒番木瓜植株的研究

近年来, 随着对植物抗病机制深入研究发现,

植物对病毒的抗性不是由于过量表达外源基因的结果, 而是由于 RNA 分子介导的转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS), 通过序列特异性的相互作用来抑制基因表达, 因此称之为 RNA 介导的病毒抗性(RNA-mediated virus resistance, RmVR), 也即 RNA 沉默(RNA silencing)机制介导的病毒抗性, 它包括共抑制、压制作用和 RNA 干扰(RNAi) 3 种类型。植物具有高效的 PTGS 特征, 使得植物对病毒的防御机制更加有效。可见 RNA 介导的抗性与蛋白质介导的抗性有着明显的不同, 它仅依靠转基因的 RNA 转录, 而不需要病毒基因编码表达的蛋白质。与蛋白质介导的抗性相比较, RNA 介导的抗性具有明显的不同: ① 抗性表现型与接种物的剂量无关, 类似于免疫; ② 抗性表现型不受接种物性质的影响; ③ RNA 积累水平对病毒侵染的抗性水平之间没有直接的联系; ④ RNA 介导的抗性(RNA-mediated defense, RMD)只需病毒 RNA 序列与靶序列同源, 允许部分位点的突变, 甚至缺失, 并且伴随着 dsRNA(double strand RNA)的产生而产生, 这种 RNA 是与沉默基因的正义或反义 RNA 高度同源性的; ⑤ 以 RNA 介导的抗性最终不会产生病毒来源的蛋白质, 故具有较高的生物安全性, 容易被公众接受。由于 RNA 介导的抗性具有诸多的优势, 利用这一抗性方式来获得抗病植株的策略具有广阔的应用前景^[13~21]。Prins 等采用 RNA 介导的抗性方式, 在烟草、马铃薯等植物中导入了十多种 CP 基因, 获得了高抗番木瓜斑萎病毒、马铃薯 Y 病毒等多种病毒的转基因植株^[22]。这是 RNA 介导抗病毒转基因工作的成功典范, 为开展 RNA 介导番木瓜抗环斑病基因工程研究提供了依据; 在番木瓜抗 PRSV 研究方面, 夏威夷大学等的研究者们也做了类似的工作, 并取得了良好的效果。

目前, 我们正在采用新的 RNA 介导抗病毒基因工程策略, 对分离、克隆的我国海南、云南、广西和广东等 7 个不同番木瓜生产区的番木瓜环斑病毒全基因组序列同源性进行比较(同时与国内外其它 PRSV 株系的 CP 基因作比较)。结果表明, PRSV-CP 3' 端 UTR 278 bp 的同源性达 98.5%, 利用这一序列构建转基因植株有望培育高抗、普抗的番木瓜新品系。Wes-

ley等对如何构建效率高、效果好而且适合进行大规模转化的RNA沉默载体进行了系统的研究,发现对于大多数的植物而言,如果转入的载体T-DNA区在细胞内表达产生包含正反义靶基因片段发夹结构dsRNA,沉默效率会比其它类型的RNA高;单个靶基因片段的长度在98~853 nt之间不会对沉默效率产生明显影响,且在发夹结构dsRNA的单链环区引入内含子能够稳定提高沉默效果,由此产生的转基因株系有90%~100%发生了基因沉默^[23]。研究表明,PTGS受植物病毒抑制子抑制,多种病毒可通过编码特定的蛋白或以其它尚未明确的方式来对抗植物的PTGS,这种抑制在诱导植物产生病毒病方面居重要地位。鉴定和利用PTGS抑制子已成为PTGS研究的热点之一。Radhamani等首次鉴定报道了一个PTGS的细胞抑制子rgs-CaM,它是与HC-Pro互作的钙调蛋白,像HC-Pro本身一样能抑制基因沉默^[24]。Di Serio等研究发现,烟草中正义和反义基因介导的基因沉默被同样的病毒抑制子抑制,并且与smRNA的累积有关,可见病毒抑制子也是研究植物RNA沉默过程的一个有力工具^[25];Juricek分离克隆了番木瓜环斑病毒HC-Pro基因(AY162218),大小为1371 bp,通过构建HC-Pro基因反义载体,有望获得更强抗病性的番木瓜新品系,同时对研究植物RNA沉默机制具有重要的理论意义。考虑到转基因产品将来的安全性及应用,可利用Cre/Loxp重组酶转化系统构建除去抗生素或除草剂基因的安全载体。Cre重组酶催化2个34 bp的同源Loxp序列重组,克隆在两同源序列之间的选择标记基因便因重组而丢失。Hohn等认为,可直接将Cre重组酶导入植物细胞就可以使其作用于靶位点,从而达到剔除标记基因的目的。为加快去除标记基因,重组酶基因可与标记基因连接于同一载体的T-DNA区,通过特异启动子驱动重组酶基因表达,标记基因因其两边的同源序列重组而被剔除^[26]。

从我国不同番木瓜生产区的PRSV-CP及其3'端非编码区中寻找同源率高的DNA区段构建基因沉默载体及PTGS抑制子反义载体,用于转化番木瓜,以培育对PRSV广谱、高抗性的番木瓜新品系,这

在理论上是可行的,而且在实际生产中具有十分重要的经济意义;美国夏威夷大学研究者利用不同地区的PRSV-CP构建嵌合基因,获得了较为广谱抗性的番木瓜新品系,我们的工作主要利用PRSV-CP基因3'端序列-3'UTR同源区段构建包含正反义靶基因片段发夹结构dsRNA,而且在发夹结构dsRNA的单链环区引入内含子以便稳定提高沉默效果,同时引入PTGS抑制子反义基因,预计将获得对PRSV更具广谱抗性且稳定安全性好的更适合在我国栽培的番木瓜新品系。

2 组织快繁技术生产番木瓜种苗

2.1 组织快繁技术的优点

由于番木瓜株性复杂,有雄株、雌株和两性株3种株型,用常规种子繁殖不能保证株性一致,而且用种子繁育,苗期不易辨别株性,只有等到结果时才能分辨,容易造成浪费。在实生苗中两性株仅占55%左右,而两性瓜的市场价却是雌性瓜的2~3倍^[27];并且优良品种的种子昂贵,种源短缺。运用杂交制种成本较高,种子不耐贮藏,易受病虫害的侵害;采用扦插、嫁接等常规的无性繁殖技术成活率又低,不适合番木瓜的快速繁殖。因此,需要通过组织培养进行无性系的快速繁殖。1974年,De Bruijne等首次报道从叶柄诱导形成愈伤组织获得成功。随后,许多学者利用茎尖、侧芽、胚、子叶等不同材料进行研究,并相继获得再生植株。有关体细胞胚发生的报道也不少,但直到1982年,Litz等才从胚珠来源的愈伤组织诱导产生体细胞胚,并再生植株获得成功。邹韵霞等对番木瓜的受精胚珠进行培养,获得胚性愈伤组织、体细胞胚和正常小植株^[28]。周鹏等则用实生苗叶片为材料,通过愈伤组织诱导获得胚状体和再生植株^[29]。大量研究表明,用茎尖和侧芽进行番木瓜快繁是较理想的途径,具有许多优点:①保持优良品种的特性。以组织培养繁殖的种苗与母株有着相同的遗传基因,能获得抗病、优质、高产且同质的种苗;②生产无病毒种苗。即使优良的母株已被病毒感染,但其茎尖部分被感染的机率很小,利用茎尖组织可繁殖无病毒种苗;③种苗繁殖迅速。利用组织培养

可在短期间内迅速而且大量地繁殖出与母株性质相同的种苗。

2.2 外植体的脱毒处理

直接从田间采回的番木瓜的顶芽或侧芽,经消毒后污染率仍很高,可达 80% 以上,因此大多数的番木瓜快繁均以失败告终。污染问题成了番木瓜快繁中的一大障碍。外植体的污染主要由内生菌造成,酒精、漂白粉只能进行表面消毒,无法控制内生菌的污染。Reuveni 等用利福平来控制外植体的内生菌污染,先用 300 mg/L 利福平溶液处理侧芽,再按常规方法进行表面消毒,此法对减少外植体的污染很有效,而且对番木瓜的生长无副作用^[30]。周鹏等将从田间采回的成龄番木瓜侧芽先用饱和香皂水浸泡,然后用含有维生素 C、AgNO₃ 和 PVP 的溶液预处理,再分别用 70% 的酒精和 1.5 g/L 的升汞溶液消毒,经过预处理的外植体再用升汞消毒,其成功率可达 50% 以上^[31]。另外, Drew 等的研究发现通过对侧芽的再处理也能部分解决污染问题^[32]。

外植体的采集时间也很重要,最好在连续晴天的午后采集。采集的季节最好选在番木瓜快速生长的季节, Litz 等认为以 5~11 月份最适合建立番木瓜的组培体系。

2.3 外植体的催芽、继代培养及诱根

激素组合的诱导效果,因外植体器官组织来源不同而有差异。Yie、Litz 等报道, NAA 和 KT 同时存在时,番木瓜幼苗茎段、根的愈伤组织诱导均获成功^[33, 34];但番木瓜实生苗叶片、成龄树叶片使用 NAA 和 KT 组合进行愈伤组织诱导未获成功,而用 NAA 和 2,4-D 组合诱导番木瓜实生苗叶片、成龄树叶片产生了愈伤组织,同时发现单独使用 2,4-D 亦可诱导实生苗叶片、成龄树叶片形成愈伤组织^[31]。Mondal 等认为,用侧芽作外植体时不能将其直接接种于含 BA 和 NAA 的培养基中,应先在含有 GA₃ 和 KT 的培养基中培养至外植体开始生长再转入上述培养基,培养时间可缩短 6~10 d,又可打破侧芽休眠。Drew 等认为,在培养基中加入核黄素(VB₂)可以促进芽的生长,同时减少愈伤组织的形成。它还可以抵消高浓度生长素对芽生长的阻碍作用^[36]。Reuveni 等在增殖培养过程中加入硫酸腺嘌呤

(ADS) 和水解酪蛋白,发现水解酪蛋白抑制生长而 ADS 可以提高增殖率并增加鲜重^[28]。周鹏等认为,诱导实生苗叶片愈伤组织继代培养产生胚性愈伤组织的较佳激素组合为 NAA+BA+GA₃ 组合^[27]。叶长明等以顶芽和腋芽为外植体时则采用了 MS+BA+NAA+ADS 激素组合^[36]。叶克难等发现, NAA+KT+GA+活性炭不仅对愈伤组织的诱导极佳,而且对体胚诱导的效果也很好^[37]。Bhattacharya 等用 MS+TDZ (1.0 μmol/L) 在 30℃ 光照培养下,裸胚的平均发芽率达到 99.5%^[38]。Fredah 等采用 2 种方法对花药进行预处理: 35℃ 水中处理 1 d; 35℃ 添加蔗糖的 MS 溶液处理 3 或 5 d,转入添加 0.1 mg/L BA、0.1 mg/L NAA 的琼脂中培养,胚胎发生率可达 4%^[39]。

在番木瓜组培诱导生根过程中,若植株茎基出现大团愈伤组织块,则其生根的几率极低,而在茎基部无愈伤组织或愈伤组织块小,这样的苗长出的根通常质量较好,移栽后容易成活。因此在诱导生根过程中避免在茎基部形成愈伤组织是获得较好质量根系和提高移栽成活率的重要保证。窦敏等的研究发现,适当浓度的 IBA 的成根效果优于 NAA,其中以 IBA 0.2 mg/L 最好,诱根率为 70.0%^[40]。Drew 认为, 10 μmol/L IBA 最适合诱根; Litz 等认为, 5 μmol/L NAA 最适合诱根;而周鹏等认为, NAA 和 IBA 均适合催根,但使用的浓度不能太高,否则将影响成根的效果。KT 与 NAA 同时使用能促进成根作用, GA₃ 虽有诱根效果,但同时又促进愈伤组织的产生,使根的质量变劣。核黄素对番木瓜试管苗根系的正常生长发育有利,在诱根培养基中加入适当浓度的核黄素可以减少愈伤组织的形成,提高根的诱导率^[35]。

除了激素对根的诱导有重要作用外,还有多种因素影响根的诱导。光照、温度等条件都会影响根的数量和质量,无机盐的浓度对根的粗细及长短也会产生影响。活性炭也常作为有效成分被添加到根诱导培养基中。

3 结语

基因工程策略是番木瓜抗病育种的理想途径,转基因番木瓜植株使番木瓜抵抗包括环斑病毒病在

陈春宝 等 番木瓜抗病育种及其组培苗生产概述

内的各种病毒病成为可能;而番木瓜组培快繁技术不仅可以保持优良品种(抗病、优质、高产)的遗传稳定性,为其种质的保存提供有效途径,同时也方便国际间的种质交流。结合番木瓜转基因技术和组培快繁技术来筛选培育番木瓜抗病品种,为从根本上解决番木瓜病毒病打下基础,使其真正成为多年生草本果树,对番木瓜的商业化生产具有重要意义。

参考文献

- 1 Fitch Maureen M M, Manshardt Richard M, Gonsalves Dennis, et al. Stable transformation of papaya *via* microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports*, 1990, 9(4): 189~194
- 2 周 鹏, 郑学勤. 根癌农杆菌介导的环斑病毒外壳蛋白基因转化番木瓜的研究. *热带作物学报*, 1993, 14(2): 71~78
- 3 龚洁敏, 郑学勤, 潘乃瑾, 等. 番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因的 cDNA 克隆及全序列测定比较. *植物学报*, 1993, 35(6): 416~421
- 4 叶长明, 叶 寅, 骆学海, 等. 番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因的构建. *植物病理学报*, 1991, 21(3): 161~164
- 5 刘俊君, 彭学贤, 莽克强. 番木瓜环斑病毒分离物(SM)外壳蛋白基因克隆及序列分析. *微生物学通报*, 1991, 18(6): 350~351
- 6 周 鹏, 郑学勤. PRSV-CP 转基因番木瓜表达与抗病能力关系的研究. *热带作物学报*, 1996, 17(2): 77~83
- 7 周 鹏, 郑学勤. PRSV-CP-SN 转基因番木瓜表达与抗病能力的研究. *热带作物学报*, 1996, 17(2): 84~87
- 8 周 鹏, 郑学勤, 陈向民, 等. 转基因番木瓜小规模田间攻毒试验. *热带作物学报*, 1997, 18(1): 58~62
- 9 Lecours Katia, Tremblay Marie-Hélène, Laliberté Gagné Marie-Eve, et al. Purification and biochemical characterization of a monomeric form of papaya mosaic potexvirus coat protein. *Protein Expression and Purification*, 2006, 47(1): 273~280
- 10 Chu-Hui Chiang, Ju-Jung Wang, Fuh-Jyh Jan, et al. Comparative reactions of recombinant papaya ringspot viruses with chimeric coat protein (CP) genes and wild-type viruses on CP-transgenic papaya. *Journal of General Virology*, 2001, 82(Part 11): 2827~2836
- 11 Pang S Z, Sanford J C. Agrobacterium-mediated gene transfer in papaya. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1988, 113(2): 287~291
- 12 Dennis Gonsalves, Steve Ferreira, Richard Manshardt, et al. Transgenic Virus Resistant Papaya: New Hope for Controlling Papaya Ringspot Virus in Hawaii. APS net. <http://www.apsnet.org/education/feature/papaya/>. [Cited 2006-07-18]
- 13 Kawchuk L M, Martin R R, McPherson J. Sense and antisense RNA-mediated resistance to potato leafroll virus in Russet Burbank potato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1991, 4(3): 247~253
- 14 de Haan Peter, Gielen Jan J L, Prins Marcel, et al. Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants. *Bio/Technology*, 1992, 10(10): 1133~1137
- 15 van der Vlugt René A A, Ruiter René K, Goldbach Rob. Evidence for sense RNA-mediated protection to PVYN in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Molecular Biology*, 1992, 20(4): 631~639
- 16 Smith Holly A, Swaney Sherri L, Parks T Dawn, et al. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: Expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *The Plant Cell*, 1994, 6(10): 1441~1453
- 17 Swaney Sherri, Powers Heather, Goodwin Joel, et al. RNA-mediated resistance with nonstructural genes from the tobacco etch virus genome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1995, 8(6): 1004~1011
- 18 Mette M F, Matzke A J M, Matzke M A. Resistance of RNA-mediated TGS to HC-Pro, a viral suppressor of PTGS, suggests alternative pathways for dsRNA processing. *Current Biology*, 2001, 11(14): 1119~1123
- 19 Dougherty William G, Lindbo John A, Smith Holly A, et al. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1994, 7(5): 544~552
- 20 Goodwin Joel, Chapman Kelly, Swaney Sherri, et al. Genetic and biochemical dissection of trans-

- genic RNA-Mediated virus resistance. *The Plant Cell*, 1996, 8(1): 95~105
- 21 Pang Sheng-Zhi, Jan Fuh-Jyh, Gonsalves Dennis. Nontarget DNA sequences reduce the transgene length necessary for RNA-mediated tospovirus resistance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(15): 8261~8266
 - 22 Prins M, Goldbach R. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants. *Archives of Virology*, 1996, 141(12): 2259~2276
 - 23 Helliwell Chris A, Wesley S Varsha, Wielopolska Anna J. High-throughput vectors for efficient gene silencing in plants. *Functional Plant Biology*, 2002, 29(10): 1217~1225
 - 24 Anandalakshmi Radhamani, Marathe Rajendra, Ge Xin, et al. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 2000, 290(5489): 142~144
 - 25 Di Serio Francesco, Schöb Hanspeter, Iglesias Alejandro, et al. Sense- and antisense-mediated gene silencing in tobacco is inhibited by the same viral suppressors and is associated with accumulation of small RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(11): 6506~6510
 - 26 Hohn Barbara, Levy Avraham A, Puchta Holger. Elimination of selection markers from transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12(2): 139~143
 - 27 Litz Richard E, Conover Robert A. Effect of sex type, season, and other factors on in vitro establishment and culture of *Carica papaya* L. explants. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 1981, 106(6): 792~794
 - 28 邹韵霞, 郭惠珊. 番木瓜胚珠高频率体胚发生和植株再生. *中山大学学报(自然科学版)*, 1992, 31(3): 60~65
 - 29 周 鹏, 郑学勤, 曾宪松. 番木瓜叶片再生植株初探. *热带作物研究*, 1992(4): 35~42
 - 30 Reuveni O, Shlesinger D R, Lavi U. *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1990, 20(1): 41~46
 - 31 周 鹏, 黎小瑛, 沈文涛, 等. 番木瓜优质组培苗生产体系的建立. *热带作物学报*, 2005, 26(1): 43~46
 - 32 Drew R A, Miller R M. Nutritional and cultural factors affecting rooting of papaya (*Carica papaya* L.) *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, 1989, 64(6): 767~773
 - 33 Yie S T, Liaw S I. Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. *In Vitro*, 1977, 13(9): 564~568
 - 34 Litz R E, Conover R A. High-frequency somatic embryogenesis from *Carica* suspension cultures. *Annals of Botany*, 1983, 51(5): 683~686
 - 35 Drew R A, Smith N G. Growth of apical and lateral buds of papaw (*Carica papaya* L.) as affected by nutritional and hormonal factors. *Journal of Horticultural Science*, 1986, 61(4): 535~544
 - 36 叶长明, 魏祥东, 陈东红. 番木瓜无性繁殖技术的改进. *中国南方果树*, 2003, 32(5): 36~37
 - 37 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
 - 38 Bhattacharya J, Khuspe S S. *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. *Scientia Horticulturae*, 2001, 91(1-2): 39~49
 - 39 Rimberia Fredah K, Sunagawa Haruki, Urasaki Naoya, et al. Embryo induction via anther culture in papaya and sex analysis of the derived plantlets. *Scientia Horticulturae*, 2005, 103(2): 199~208
 - 40 窦 敏, 陈兆益. 番木瓜组培快繁试验. *西南园艺*, 2003, 31(4): 8~9