

番茄叶组织培养中愈伤组织形成和器官发生的细胞学和微形态学研究*

刘克斌

李曙轩

(杭州植物园, 杭州 310013) (浙江农业大学, 杭州 310029)

摘要 以番茄叶外植体为材料, 研究了不同的生长素和细胞分裂素及其浓度对比对叶外植体培养行为的影响; 同时, 利用细胞学和扫描电子显微镜技术观察了愈伤组织形成和器官发生过程。结果表明, 不同种类及浓度配比的生长素和细胞分裂素直接影响愈伤组织的物理状态、大小和形成的速度以及器官分化的频率和速度。叶外植体切口处的叶肉细胞, 维管薄壁细胞和维管束上方的少数叶肉细胞首先启动脱分化而开始分裂, 这些细胞的活跃分裂和分化导致在外植体表层形成由薄壁细胞、维管组织和无分化状态的表层分生细胞团组成的愈伤组织。而不定芽则通过愈伤组织的薄壁细胞再次脱分化和再分化活动而形成, 为“外起源”。认为存在由植物激素决定的“无分化活性”和“有分化活性”二种性质的愈伤组织。

关键词 番茄; 愈伤组织; 器官发生; 细胞学; 扫描电子显微镜

前言

我们在以往有关番茄组织培养^[1, 2]和原生质体培养^[8]工作的基础上, 对番茄叶外植体在培养过程中愈伤组织形成和不定芽的分化作了较为系统的细胞学观察, 并利用扫描电子显微镜观察了与之相应的微形态学的变化。

材料和方法

(一) 组织培养 试验材料为番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill), 品种为强力米寿。取材、培养基和培养方法同前^[1, 2]。在培养基中添加 IAA 1.0、3.0、5.0、7.0 mg/l; 2, 4-D 0.2, 0.4 mg/l; KT 0.3, 0.5 mg/l; ZT (玉米素) 0.1、0.5 mg/l 和 硫酸腺嘌呤 0.1、0.5 mg/l。利用 L₈ (4 × 2⁴) 正交设计, 观察多种激素对愈伤组织形成的影响。同时, 在先前试验的基础上^[1], 在培养基中添加不同浓度的 NAA, IAA, BA, KT, 进一步试验不同的生长素和细胞分裂素配合对愈伤组织形成和器官发生的影响。

(二) 细胞学和扫描电镜观察 培养在添加 NAA 2.0 mg/l + BA 1.0 mg/l、IAA 1.0 mg/l + AB 1.0 mg/l 和 IAA 0.2 mg/l + BA 2.5 mg/l 的 MS 培养基上的叶培养体, 每 3 天取样一次, 50% FAA 固定, 常规石蜡包埋切片, 切片厚 8 μm, 一部分切片用番红—固绿染色, 另一部分用甲基绿—吡罗红染色, 光镜检查并拍照。同时, 每 3 天取样一次, 用 2.5% 戊二醛 [磷酸缓冲液 (PBS), pH 6.8] 固定 48 小时, PBS 漂洗, 再用 1% 戊二醛固定 4 小时, PBS 漂洗, 系列乙醇脱水, 醋酸异戊酯置换, HCP-I 型临界点干燥器干燥, DM-200 型高真空镀膜台镀膜, TSM-2 型扫描电子显微镜观察并拍照。

*本试验一直得到裘文达先生的大力协助, 谨此致谢。

结果和讨论

一、植物激素对愈伤组织形成和器官发生的影响

在添加 NAA 0.5—10 mg/1+KT 0.3—0.8 mg/1, NAA 0.2—10 mg/1+BA 2.0—5.0 mg/1, 2,4-D 0.5 mg/1+KT 0.6 mg/1 和仅添加 2,4-D 0.5 mg/1 的培养基上, 番茄叶外植体均形成了愈伤组织。在添加 NAA+KT 的培养基上愈伤组织呈颗粒状, 较小, 延长培养时间时易自然变褐。在加 NAA+BA 的培养基上, 愈伤组织较大, 疏松, 当 NAA 浓度高于 5.0 mg/1 时, 表面呈褐色。在添加 2,4-D+KT 的培养基上, 愈伤组织很小。在仅添加 2,4-D 的培养基上, 愈伤组织小, 呈黑色水渍状。在 2,4-D, IAA, ZT 和 KT 这 4 种激素的正交试验的所有处理中, 愈伤组织均小而坚硬, 生长势差。在上述条件下形成的愈伤组织, 延长培养时间时均无器官发生。

在添加 IAA 0.2—5.0 mg/1+BA 1.0—4.0 mg/1, IAA 1.75 mg/1+ZT 0.04—2.0 mg/1 的培养基上, 番茄叶外植体在培养过程中均可分化不定芽。在添加 IAA+BA 培养基上, 还观察到芽形成后, 延长培养时, 从芽的基部或愈伤组织上可分化出根。而在加 IAA+ZT 的培养基上, 则无根的分化。表明番茄叶外植体愈伤组织的形成和不定芽的分化除了与基因型有关外^[1,2], 主要受培养基中植物激素的种类及其配比调控^[4]。

二、愈伤组织的建成

(一) 组织结构

番茄刚开展的幼叶的横切面结构, 为一层栅栏细胞和 4—5 层海绵细胞所组成, 二侧各有一层表皮细胞(上表皮和下表皮), 在叶肉组织中还分布有叶脉(维管束), 它们通常由韧皮部和木质部组成, 其周围有一些维管束鞘薄壁细胞(图版 I: 1)。

在添加 NAA 2.0 mg/1+BA 1.0 mg/1, IAA 1.0 mg/1+BA 1.0 mg/1 和 IAA 0.2 mg/1+BA 2.5 mg/1 这三种培养基上培养的叶外植体, 在开始培养的 2 周内, 在微形态上和细胞学上的变化并无十分明显的差异。在培养的第 3 天, 即可见叶外植体的切口边缘退绿, 稍膨大。此时, 近切口处的叶肉细胞、维管薄壁细胞及其顶端近表面的少数叶肉细胞开始增大, 细胞质浓缩、核变大, 表现为向分生细胞的回复变化。同时, 在少数切片中观察到近切口处的栅栏细胞开始分裂(图版 I: 2)。扫描电镜观察表明, 切口处最外层的叶肉细胞死亡, 出现破裂层(图版 I: 1)。其它部位的表皮细胞则完整。这一时期可称为起动机^[10,11]。到培养的第 6 天, 大量切片的观察表明, 切口处由于叶肉细胞的活跃分裂已形成一分裂的细胞团, 向外突起, 这些细胞体积明显减小, 形状多为多边形, 在近切口处这团分裂细胞的内层叶肉细胞中开始出现分生细胞团(图版 I: 3)。但未见明显的分层结构^[2,10,11], 而是紧挨破裂层的细胞起分裂^[2,5,6]。叶外植体近切口处的表皮细胞由于内部叶肉细胞的分裂向外生长而发生破裂和解体, 可见表皮下细胞外露(图版 I: 2)。近切口处细胞分裂突破表皮而露出表面, 从形态上看, 这些细胞紧密相连, 较小, 推测是上述切片所示的正在分裂的细胞或分生细胞团。由此可见, 即使是在外界激素的诱导下, 切口处的损伤效应在番茄叶外植体的启动和分裂中仍起着重要作用^[5-9]。另外, 在少数切片中还观察到, 中间维管束的薄壁细胞已经脱分化、和分裂而在局部形成了分生细胞团, 这一时期以细胞的活跃分裂为主要特征, 相当于先期报道中所称的分裂期^[10,11]。在继续培养过程中, 由于分裂细胞

和分生细胞团的旺盛分裂活动,叶外植体这些部位原有的组织结构和形态消失(图版 I: 5; 图版 II: 4)。此期相当于分化期或形成期^[10, 11]。在添加 NAA 2.0mg/1 + BA 1.0mg/1 的培养基上,到培养的第24天,叶外植体四周已长出一团团愈伤组织,整个培养体生长停顿下来,这些愈伤组织由薄壁细胞和分散的维管组织构成,其中还有一些分生细胞团(图版 I: 4)。从外观上看,为一团凸凹不平,表面多为球形细胞构成的细胞团(图版 II: 5)。

在形成愈伤组织的过程中,分生细胞团是培养体的生长中心。在上述三种培养基上,在培养的初期阶段,培养体的分生细胞团的生长方式无明显的差异。所不同的是在添加 NAA 2.0 mg/1 + BA 1.0 mg/1 的培养基上,分生细胞团仅分生薄壁细胞参与愈伤组织的增生,而在添加 IAA 1.0 mg/1 + BA 1.0 mg/1 和 IAA 0.2mg/1 + BA 2.5mg/1 的培养基上,分生细胞团不仅分化薄壁细胞,而且参与芽原基的分化。

在这三种培养基上观察到了愈伤组织形成过程中有二种类型的细胞分裂方式,一种是在培养初期叶外植体启动分裂部位的细胞(特别是栅栏细胞)脱分化后启动分裂和由之所形成的愈伤组织中的薄壁细胞重新脱分化而启动分裂,这些细胞进行典型的有丝分裂,经过多次分裂,形成由多边形细胞构成的细胞分裂区,参与培养体的生长(图版 I: 3)。在培养的初期,这种分裂方式是增加愈伤组织细胞数的主要方式。另一种是愈伤组织中薄壁细胞重新启动脱分化,回复到分生细胞状态,先核分裂,然后在核周围聚集较为稠密的原生质,再形成细胞壁分隔成二个细胞(图版 I: 2),由这种细胞继续分裂形成一团与周围薄壁细胞有明显界限的分生细胞团(图版 I: 4),后一种细胞分裂方式,在诱导分化的培养基上尤为明显。

在这三种培养基上,培养体中分生细胞团在继续发育过程中的另一差异在于在添加 NAA 2.0 mg/1 + BA 1.0 mg/1 的培养基上,培养体中分生细胞团一方面不断分裂增加自身的细胞数,另一方面不断分化薄壁细胞参与愈伤组织的形成,成为愈伤组织的生长中心(图版 I: 5, 7, 8)。分生细胞团以单向极性(图版 I: 5, 8)和周边生长(图版 I: 7)方式不断进行平周分裂向外增加细胞层数,垂周分裂增加周径的细胞数,单向极性生长的分生细胞团一侧不断分裂增加自身的细胞数,其相对的一侧则不断分化薄壁细胞参与愈伤组织的构成,因而分生细胞团的位置不断向愈伤组织表面移动(图版 I: 8)。周边生长的分生细胞团多位于愈伤组织的内部,其外层的分生细胞分化薄壁细胞参与愈伤组织的构成(图版 I: 7),这些外层的分生细胞一直保持在无分化状态^[8]。这样形成的愈伤组织我们称之为“无分化活性的愈伤组织”,无外源激素的重新诱导不会发生器官分化。值得注意的是,在分生细胞团的生长方向,靠近分生细胞的薄壁细胞多发生解体现象,因而使近表层的分生细胞团露出表层(图版 I: 8),也观察到中部的分生细胞团周围出现由于薄壁细胞解体而产生的空腔(图版 I: 7)。这与孙敬三等在水稻愈伤组织中观察的结果相似^[14]。我们推测,本实验中愈伤组织中的薄壁细胞的解体现象可能并不仅仅是一种细胞的新老交替现象,可能更重要的是细胞解体时细胞壁的组成成分多糖物质(寡糖素)^[12, 18]反过来诱导分生细胞团细胞的进一步分裂和分化,使分生细胞团得以更新和保持在无分化状态或诱导分生细胞团发生器官分化。

(二) 维管组织的分化

在上述三种培养基上,从培养的第12天开始,可观察到在愈伤组织的薄壁细胞中维管组

织开始分化。在加 NAA 2.0 mg/1+BA 1.0 mg/1 的培养基上,观察到了二种类型的维管组织的分化:一种是愈伤组织的薄壁细胞再次脱分化回复到分生细胞状态,这种分生细胞伸长分化为形成层状的细胞(图版 I: 9),形成层状细胞一方面向一侧分化薄壁细胞,另一侧则分化维管分子,形成线型的维管组织(图版 I: 9)。另一种维管组织呈团状,是由愈伤组织的薄壁细胞再次脱分化而启动分裂,形成分生细胞团(图版 I: 6),分生细胞团外周细胞作切线上伸长,形成层状细胞,中央的细胞不规则分裂,而形成维管组织结节(图版 I: 6)。还观察到维管组织结节中央细胞分化为管胞(图版 I: 10),而形成维管组织团。在加 IAA 1.0 mg/1+BA 1.0 mg/1 和 IAA 0.2 mg/1+BA 2.5 mg/1 的培养基上,愈伤组织中除上述二种维管组织外,还观察到了一种中间为维管分子,多为木质部的管胞,四周为维管形成层所包围的鸟巢状维管组织(图版 I: 1)。这类维管组织同上述团状的维管组织起源相同,也是由分生细胞分化形成^[2-4],可能是这类维管组织的进一步发育形态。但在本实验中未观察到,维管组织与器官发生有关^[11]。在愈伤组织中,未观察到这三种维管组织构成维管系统。推测这些维管组织可能仅作为细胞间物质运输的通道。

(三)芽的形成

在添加 IAA 1.0 mg/1+BA 1.0 mg/1 及 IAA 0.2 mg/1+BA 2.5 mg/1 的诱导芽的培养基上,叶外植体在培养过程中先形成愈伤组织,其变化如上所述,但当分生细胞团出现后,愈伤组织生长到一定阶段,即开始发生器官原基的分化。在添加 IAA 0.2 mg/1+BA 2.5 mg/1 的培养基上,到培养的第 15 天左右,即可观察到愈伤组织近表层的一部分分生细胞团分化为各种畸形突出物,突出于愈伤组织表面(图版 I: 6, 图版 II: 7、8),推测这些突出物可能是发育受阻的器官原基,它们先于正常的器官的分化。这些突出物有的为波浪形突起(图版 II: 7),有的类似芽原基的形状(图版 I: 6, 图版 II: 8),其表面几乎均为一层表皮组织所覆盖(图版 II: 7、8),这些表皮组织的细胞上可分化出表皮毛和腺毛(图版 II: 6)。在这种突出物分化以后,到培养的第 27 天,即可观察到培养基近表层的分生细胞团单向极性生长,有些分生细胞甚至以胚性细胞的方式分裂(图版 I: 5)。这些分生细胞团分化出正常的芽原基(图版 I: 9, 图版 II: 9),即芽原基为“外起源”。在芽分化的同时,在添加 IAA 1.0 mg/1+BA 1.0 mg/1 的培养基上还观察到了愈伤组织中部的分生细胞团分化类似根原基(图版 I: 7),也观察到中部分生细胞团分化畸形的器官原基(图版 I: 8),未观察到中部的愈伤组织形成正常的芽原基。在加 IAA 1.0 mg/1+BA 1.0 mg/1 的培养基上,芽分化比添加 IAA 0.2 mg/1+BA 2.5 mg/1 的培养基上的早,到培养的第 21 天可观察到叶,芽的分化(图版 I: 9)。叶、芽分化的途径也是“外起源”,即从近表层的分生细胞团分化。也就是说,在分生细胞团出现以后,分生细胞团一方面分化薄壁细胞参与愈伤组织的形成;但另一方面,在愈伤组织生长到一定阶段后则转向器官发生。愈伤组织中的薄壁细胞再次启动脱分化,分裂并进而形成分生组织进行器官分化。这就是“再分化”的具体内容^[11]。我们称这类愈伤组织为“有分化活性的愈伤组织”。

参 考 文 献

- [1] 刘克斌等, 1987: 番茄叶片、子叶、下胚轴离体培养再生植株的研究。浙江农业科学, 1: 43—49。
- [2] 刘克斌等, 1987: 三个野生番茄种的茎、叶外植体培养。浙江农业大学学报, 13(2): 190—196。
- [3] Liu Ke-Bin et al., 1988: Plantlet regeneration from mesophyll protoplasts of tomato. In: Li Shu-xuan et al. (eds) Application of Biotechnology in Agriculture Shnghai Sci. Tech. Pub. pp 92—99。
- [4] 崔·激, 1983: 植物激素与细胞分化及形态发生的关系。细胞生物学杂志, 5(2): 1—6。
- [5] 许智宏等, 1980: 烟草叶组织培养中愈伤组织和芽形成的细胞学观察。植物学报, 22(1): 1—5。
- [6] 桂耀林等, 1982: 猕猴桃离体茎段形态发生的组织学和组织化学研究。植物学报, 24(4): 301—306。
- [7] Yeoman, M. M., et al., 1973: Growth patterns in tissue (callus) cultures, In plant tissue and cell culture (Street, H. E. ed.), Blackwell scientific publication, Oxford, pp 240—268。
- [8] Yeoman, M. M., 1970: Early development in callus cultures. Int. Rev. Cyt. 29: 383—409。
- [9] Yeoman, M. M., 1968: Growth and differentiation of plant tissue cultures, II. The initiation and pattern of cell division in developing callus cultures, Ann Bot. 32: 301—313
- [10] 王凯基等, 1979: 油橄榄组织培养的细胞组织学研究, I. 愈伤组织的建成。植物学报, 21(2): 127—134。
- [11] 王凯基等, 1979: 油橄榄组织培养的细胞组织学研究, II. 组织分化和器官发生。植物学报, 21(3): 225—230。
- [12] Albershein, P., Darvill, A. G., 1986: 低聚糖素, 科学, (1): 19—26。
- [13] Kiem Tran Thank Van, Toubart, P., 1985: Manipulation of the morgenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharins. Nature, 314(8): 615—617。
- [14] 孙敬三等, 1982: 在分化条件下水稻花粉愈伤组织超微结构的变化。植物学报, 24(6): 493—498。

HISTOCYTOLOGICAL AND MICROMORPHOLOGICAL OBSERVATION OF CALLUS FORMATION AND ORGANOGENESIS OF TOMATO LEAF TISSUE CULTURED IN VITRO

Liu Kebin

(Hangzhou Botanical Garden, Hangzhou 310013)

Li Shuxuan (Lee Shu-hsien)

(Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Abstract Leaf explants of tomato were used to study the effects of auxin and cytokinin and their combinations on culture behavior of the leaf tissue. Meanwhile,

the processes of callus formation and organogenesis were observed by means of cytological and scanning electron microscopic techniques.

It was found that the physical texture, size and formation rate of callus, and the frequency and rate of organogenesis were controlled by the kinds and combinations of auxin and cytokinin added in the media directly. It was the mesophyll cells near the cut edges, vascular parenchyma and in few case the mesophyll cells above the vascular bundle of the explants that initiated to dedifferentiate to be meristematic cells, the active division and differentiation of these cells resulted in the formation of callus which consisted of parenchyma, vascular tissue and non-differentiation surface meristemoids. Adventitious buds came from the re-differentiation and redifferentiation activities of the parenchyma of the callus, and were "external origin". It was suggested that there existed two kinds of plant hormone-dependent calli, namely, "differentiation-inactive callus" and "differentiation-active callus".

Key words: Tomato; Callus; Organogenesis; Cytology; Scanning Electron Microscope

图版说明

图版 I: 1. 未培养的叶外植体的横切面。×90; 2—10. 在添加 NAA 2.0 mg/1 + BA 1.0 mg/1 的培养基上培养; 2. 培养 3 天叶外植体切口死亡细胞层下的栅栏细胞开始分裂。×250; 3. 培养 6 天, 切口端出现活的细胞分裂, 并出现分生细胞团。×90; 4. 培养 24 天, 叶外植体切口端形成愈伤组织。×25; 5. 培养体近表层的二种类型的分生细胞团。×180; 6. 培养 12 天, 维管组织结节开始形成 (↑)。×150; 7. 愈伤组织中部的薄壁细胞团, 旁边有薄壁细胞解体 (↑)。×125; 8. 图 7 所示分生细胞团在分化薄壁细胞参与愈伤组织生长的同时向愈伤组织表层移动, 近顶端有薄壁细胞解体 (↑)。×125; 9. 分布在愈伤组织中的线性维管组织和形成层状细胞 (↑)。×200; 10. 示维管分子的形成 (↑) 和团状维管组织。×100。

图版 II: 1—9. 在添加 IAA 1.0 mg/1 + AB 1.0 mg/1 或 IAA 0.2 mg/1 + BA 2.5 mg/1 的培养基中培养。1. 鸟巢状维管组织分化。×150; 2. 胚性细胞分裂的一种方式 (↑)。×500; 3. 胚性细胞分裂的另一种方式 (↑)。×150; 4. 图 2 所示的细胞分裂形成的一种分生细胞团。×150; 5. 愈伤组织近表层的分生组织。×75; 6. 愈伤组织表面的畸形器官原基。×38; 7. 维管组织旁的薄壁细胞起源的一种畸形器官原基, 可能是根原基。×38; 8. 愈伤组织中部的一种发育受止的芽原基。×150; 9. 图 5 所示分生组织形成的芽原基。×18。

图版 III: 1—5. 在添加 NAA 2.0 mg/1 + BA 1.0 mg/1 的培养基中培养。1. 培养 3 天, 示外植体切口处的死亡细胞层。×100; 2. 培养 6 天, 近切口处表皮组织被挤破, 解体 (↑)。×500; 3. 在图 2 所示部位露出表面的分生细胞团。×500; 4. 培养 15 天, 外植体切口处的形态变化。×25; 5. 一团愈伤组织的形态。×25; 6—9. 在添加 IAA 1.0 mg/1 + BA 1.0 mg/1 或 IAA 0.2 mg/1 + BA 2.5 mg/1 的培养基上培养。6. 愈伤组织表面分化的表皮组织及着生于其上的腺毛。×200; 7. 培养 15 天, 愈伤组织表面的波浪形突出物。×100; 8. 培养 15 天。畸形器官分化。×100; 9. 培养 21 天, 芽原基形成。×100。

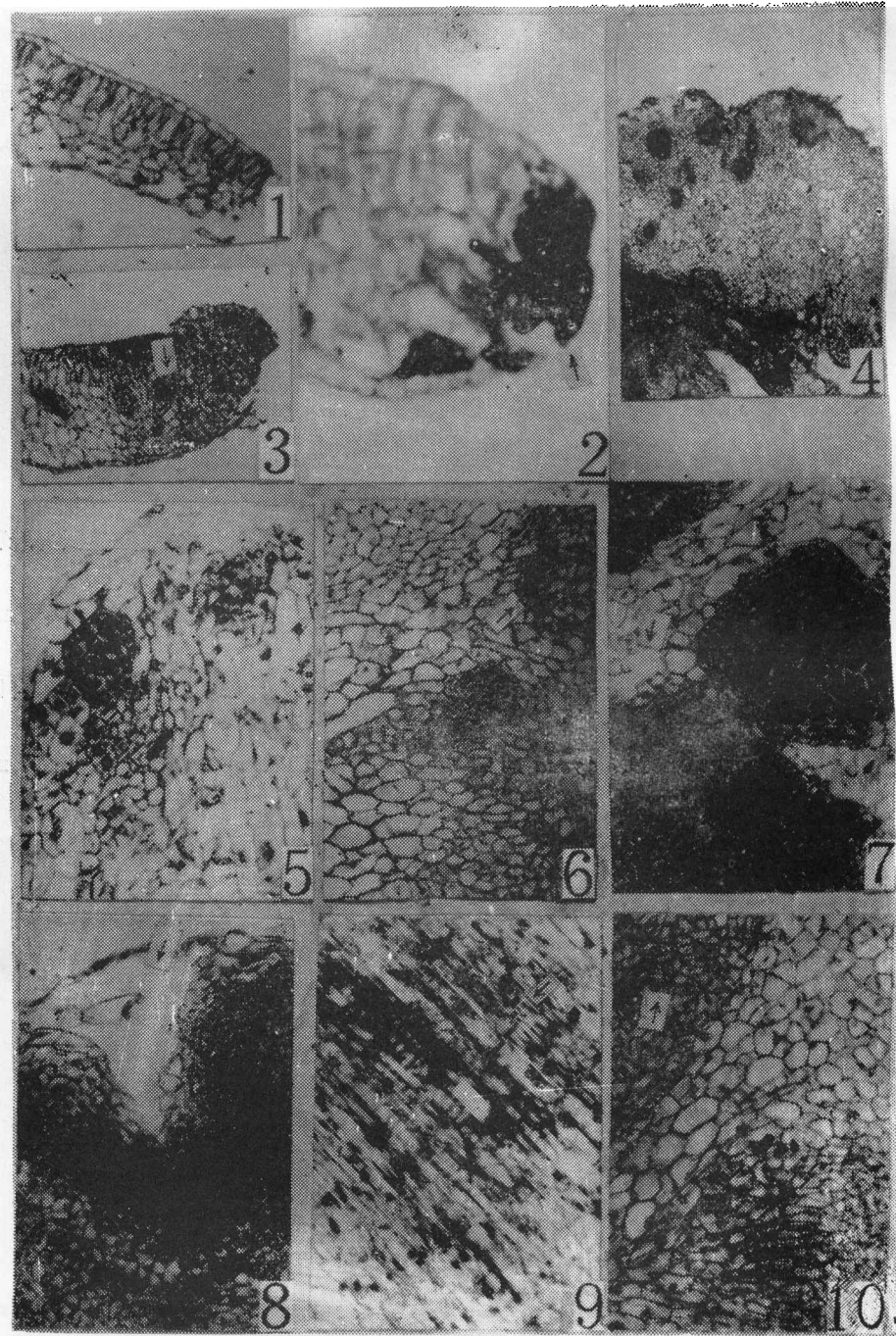
Explanation of Plates

Plate I: 1. Transverse section of uncultured leaf explant. ×90; 2—10. Leaf explants cultured on medium containing NAA 2.0 mg/1 + BA 1.0 mg/1; 2. After 3 days of culture, palisade cells beneath the dead cellular layer (arrow) of the cut edge begin to divide. ×250; 3. After 6 days of culture, active cell division appears in the cut edge and meristematic cellular masses (arrow) begin to form in the

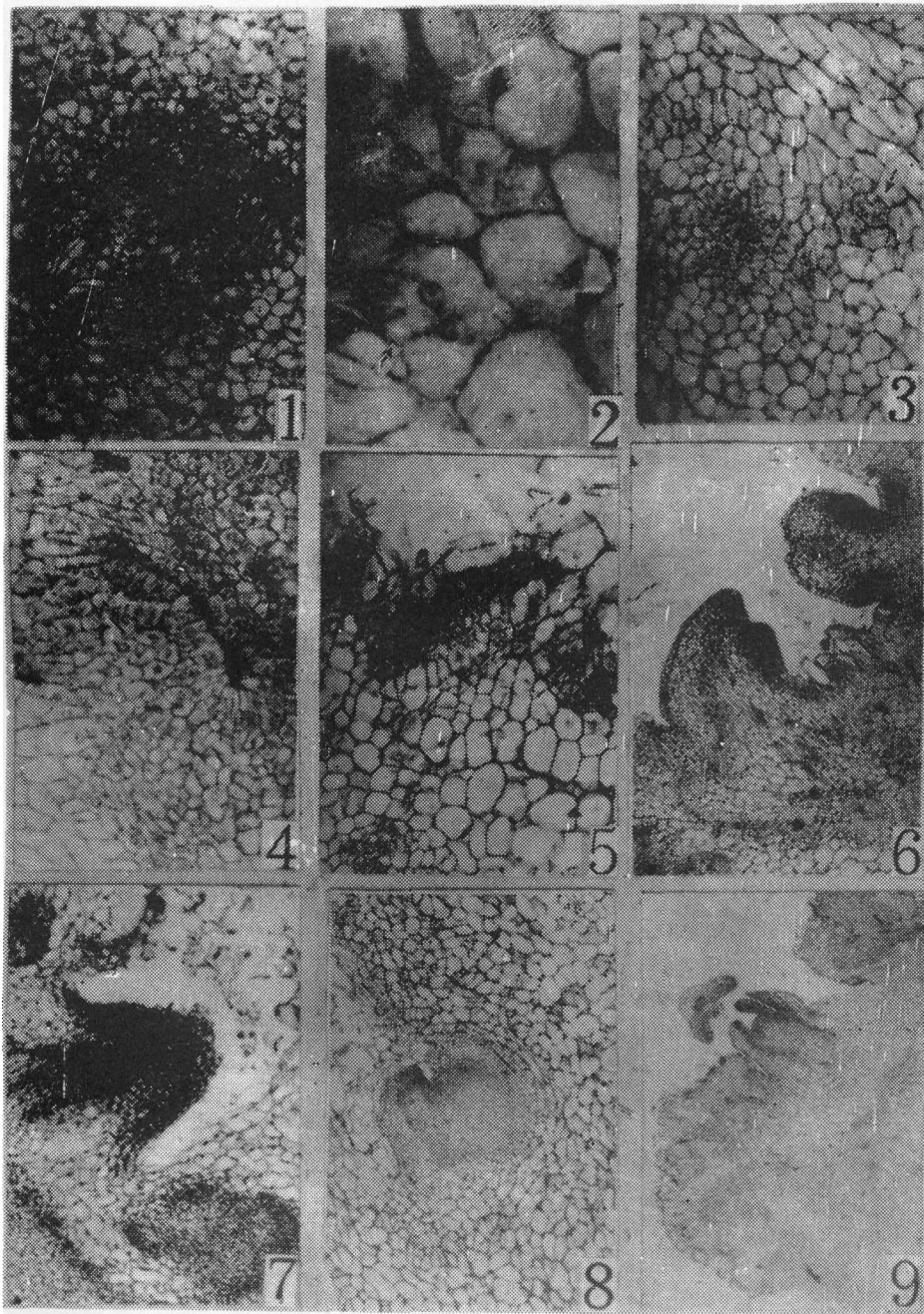
region of subdivided cells. $\times 90$; 4. After 24 days of culture, callus forms in the cut edge of the leaf explant. $\times 25$; 5. Two kinds of meristematic cellular masses in the subsurface of leaf explant. $\times 180$; 6. After 12 days of culture, vascular tissue nodule begins to form (arrow). $\times 150$; 7. Meristematic cellular masses in the central region of callus, not the disintegration of parencha(arrow). $\times 125$; 8. Meristematic cellular masses shown in Fig. 7 move towards the outer region of callus, while differentiating parenchyma to join the callus growth. note the integration of parenchyma (arrow). $\times 125$; 9. Linear vascular tissue and cambium-like cell (arrow) spreaded in parenchyma of the callus. $\times 200$; 10. Vascular melecule formation (arrow) and mass-shaped vascular tissue inside the callus. $\times 100$.

Plate I: 1—9. Leaf explants cultured on medium containing IAA 1.0mg/l+BA 1.0 mg/1 or IAA 0.2 mg/1+BA 2.5 mg/1. 1. Differentiation of nest-shaped vascular tissue in callus. $\times 150$. 2. A type of mitotic division of embryonic cell (arrow). $\times 500$. 3. Another type of mitotic division of embryonic cell (arrow). $\times 150$. 4. Meristematic cellular mass derived from cell division as shown in Fig. 2. $\times 150$. 5. Meristematic tissue in the subsurface of callus. $\times 75$. 6. Aberrant organ primordia in the surface of callus. $\times 38$. 7. Aberrant organ primordium, possibly the root primordium near the vascular tissue inside the callus. $\times 38$. 8. A type of aberrant bud primordium in central region of callus. $\times 150$. 9. Bud primordium forms from the meristematic tissue as shown in Fig. 5. $\times 18$.

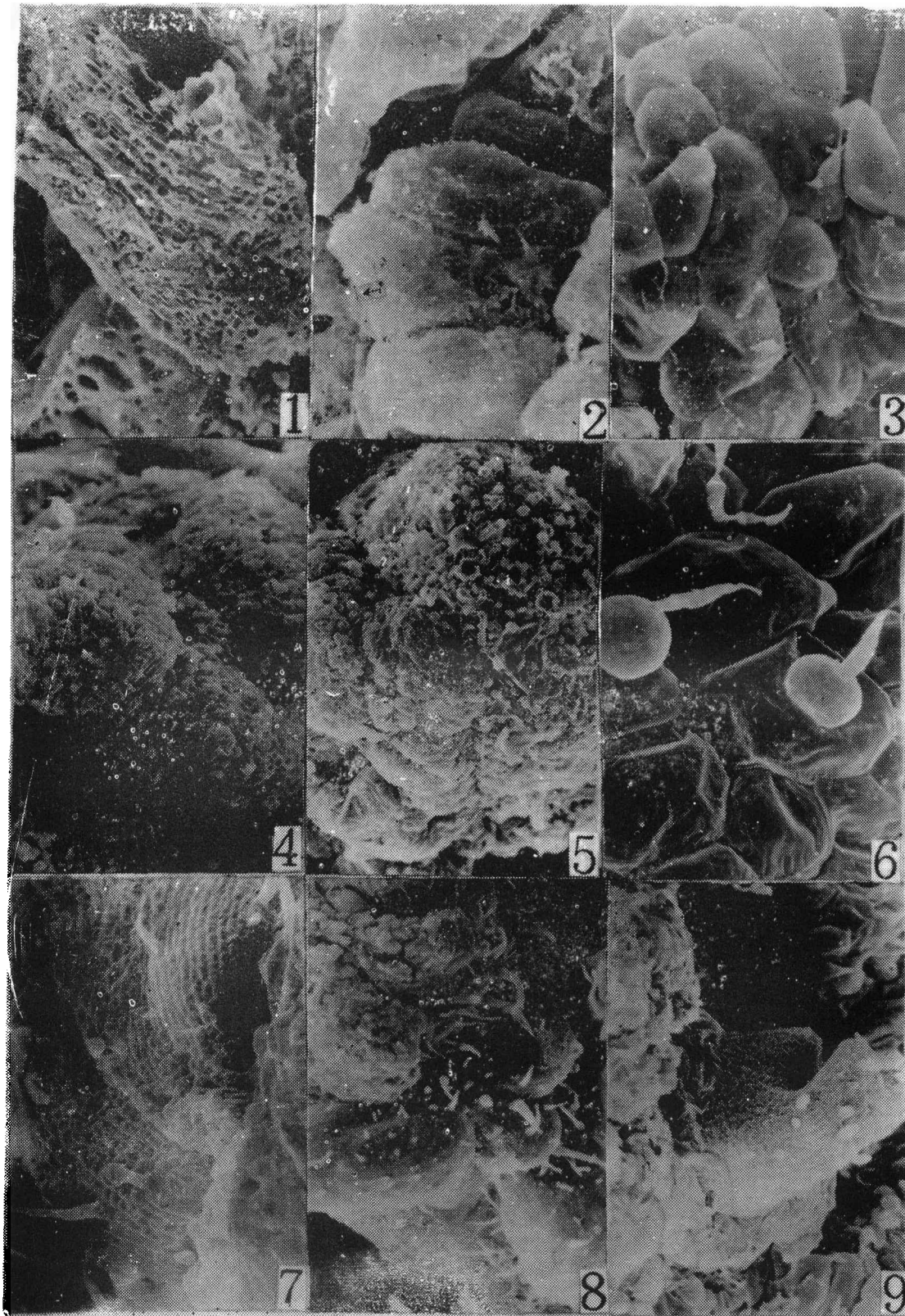
Plate II: 1—5. Leaf explants cultured on medium containing IAA 2.0 mg/1+BA 1.0mg/1. 1. After 3 days of culture, cut edge of leaf explants, showing dead cellular layer. $\times 100$. 2. After 6 days of culture, the epidermal cells near cut edge showing split of epidermal tissue and disintegration of epidermal cells (arrow). $\times 500$. 3. Naked meristematic cellular mass appears in the region shown in Fig. 2. $\times 500$. 4. After 15 days of culture, morphological change of cut edge of leaf explant. $\times 25$. 5. A mass of callus formed in the cut edge of leaf explant. $\times 25$. 6—9. Leaf explants cultured on medium containing IAA 1.0mg/1+BA 1.0mg/1 or IAA 0.2 mg/1+BA 2.5mg/1. 6. Differentiation of epidermal cells with gland hairs. $\times 200$. 7. After 15 days of culture, projecting wave-like tissue of callus surface. $\times 100$. 8. After 15 days of culture, aberrant organs appear in the surface of callus. $\times 100$. 9. After 21 days of culture, bud primordium appears in the surface of callus. $\times 100$.



See explanation at the end of text



See explanation at the end of text



See explanation at the end of text