

番茄离体培养过程中器官发生的 细胞组织学观察^{*}

陈火英^{1,2} 张建华¹ 俞俊棠² 钟建江² 倪德祥³

(1. 上海交通大学植物科学系, 上海 201101; 2. 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; 3. 复旦大学生物系, 上海 200040)

摘要: 对番茄下胚轴、子叶、茎段、叶片、叶柄不同类型外植体离体培养中有关细胞启动、分裂、分化以及器官发生作了细胞组织学观察。研究结果表明: 番茄不同类型外植体在同样的培养条件下, 愈伤组织生长表现出明显差异, 其中下胚轴、子叶诱导产生愈伤组织时, 细胞启动最早, 生长最快, 其分裂方式基本为无丝分裂, 未见有丝分裂, 因此我们认为以不定芽方式获得转基因植株时, 植株的所有性状变化, 是否纯属目的基因所为, 应该反复考察, 不能忽视不定芽产生过程中的种种变化; 下胚轴诱导愈伤组织形成时, 细胞不规则的无丝分裂少于子叶, 故下胚轴离体培养得到的正常芽的比例高于子叶的; 番茄离体培养中不定芽通常发生在愈伤组织的周边区, 也可起源于维管组织结节周围的形成层状细胞。不定根则由茎中柱鞘处发生。

关键词: 番茄; 外植体; 离体培养; 形态发生

中图分类号: Q 943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-470X (2001) 02-0091-05

Morphogenesis in *in vitro* Culture of *Lycopersicon esculentum* Mill

CHEN Huo-Ying^{1,2}, ZHANG Jian-Hua¹, YU Jun-Tang²,
ZHONG Jian-Jiang², NI De-Xiang³

(1. Department of Plant Science, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China;

2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering ECUST, Shanghai 200237, China;

3. Department of Biology, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract Hypocotyl, cotyledon, stem, leaf blade, leaf petiole explants of tomato were cultured on MS medium supplemented with 2 mg/L BA and 0.2 mg/L IAA for induction of calli and bud formation. Cytohistological observations on calli and bud formation were carried out. The results are as follows: there were significant differences in callus induction and growth among 5 kinds of explants

* 收稿日期: 2000-06-08, 修回日期: 2000-12-02。

基金项目: 上海市教委“曙光”基金资助项目(98SG47)。

作者简介: 陈火英(1962-), 女, 副教授, 从事萝卜、番茄育种工作。

mentioned above. Calli from hypocotyl and cotyledon explants were induced earlier than others, and had a faster growth rates than others. Buds differentiated from calli were adventitious ones. Adventitious buds were generally formed on the peripheral parts of the calli, and also originated from the cambium-like cells surrounded by the vascular nodules. Adventitious roots originated from the pericycle. The caryological observation on callus paraffin section showed that as compared to the calli from hypocotyl, in the course of callus formation from cotyledon there were more kinds of nuclear division modes, but all these were of amitosis.

Key words: Tomato; Explants; *in vitro* culture; Morphogenesis

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 属严格的自花授粉植物, 长期的人工驯化使其基因背景逐渐变窄, 在其栽培中已很难找到一些耐逆境的基因(如耐盐基因等), 而在利用其野生种或其它物种的基因方面, 传统的有性杂交有很大的局限性。研究证明通过生物技术来改良番茄商品价值有很大的潜力, 故有关番茄离体培养的研究一直在进行^[1-3], 但研究其形态发生的报道甚少。笔者以下胚轴、子叶、茎段、叶片、叶柄为材料, 对其诱导培养过程中细胞启动、脱分化、组织分化和器官(芽和根)发生, 进行了石蜡切片观察和分析, 结果可为番茄的离体繁殖、体细胞突变体筛选和遗传转化提供细胞和组织学的基本资料, 以利于番茄细胞工程育种和基因工程育种建立理想的实验体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

用番茄‘鲜丰’品种的种子培育无菌苗^[1]。苗龄 12 d 时, 切取下胚轴、子叶、茎段、叶片、叶柄作为外植体。

1.2 培养基及培养条件

以 MS 为基本培养基, 附加 BA 2.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L; 室温 (25 ± 1) °C、光强 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、每天 14 h 光/10 h 暗的光周期条件下培养。详细内容可参考文献[1]。

1.3 切片方法

5 种外植体均于培养 7 d 和 17 d 进行二次取样, 用 FAA 液固定, 按常规石蜡切片法制片, 切片厚 8 μm , 用代氏苏木精液染色。镜检后进行显微摄影。

2 结果

2.1 不同外植体的形态反应

外植体培养 2 d 时, 绿色开始变淡, 子叶和叶片与固体培养基不再紧贴, 局部肥厚增大, 略显不规则的卷曲; 轴状外植体也略显肿胀, 这表明已有愈伤组织产生。当培养 7 d 时, 不同外植体的愈伤组织分化程度各不相同, 下胚轴、茎段和叶柄皆呈黄白色, 切口处愈伤组织的发生尤为明显, 肿胀更突出, 局部呈瘤状突起, 子叶和叶片也变成黄绿色, 前者比后者肥厚和增大程度更明显(图版 I: 1a, 1b, 1c, 1d, 1e)。当培养 17 d 时, 外植体已基本失去其原有形状, 下胚轴、子叶和叶片的外植体上已出现了肉眼可见的绿色芽点(图版 I:

2a, 2b, 2d), 其中下胚轴上最多, 子叶次之, 叶片上较少, 茎段和叶柄上未见芽点。进一步培养观察发现, 这种绿色芽点有些成为小苗, 不断长出新叶, 但有些芽点只能长成叶状体或者成为畸形苗(图版 I: 3a)。轴状外植体的两端, 由于切口创伤, 愈伤组织的形成更明显, 呈哑铃状(图版 I: 2a, 2c, 2e)。

2.2 愈伤组织形成过程中的细胞和组织学观察

培养 7 d 后取材切片可见, 下胚轴纵切面(图版 I: 4)上, 在切口处的 1~3 层细胞枯死, 深处产生了大量愈伤组织, 下胚轴表皮细胞局部开始脱分化, 并分裂, 但大部分细胞无明显变化。子叶的局部(图版 I: 5), 表皮细胞部分破碎, 叶肉细胞和叶脉里的薄壁细胞都在诱导培养下全面启动、脱分化, 并产生愈伤组织。茎段纵切面愈伤组织分化程度没有下胚轴那样活跃(图版 I: 6)。叶片的直切面(图版 I: 7)的启动、脱分化程度也不及子叶活跃, 近轴面的表皮细胞尚完整, 但叶肉、叶脉里的薄壁细胞都开始启动、脱分化, 部分细胞已开始分裂。同样, 在叶柄纵切面(图版 I: 8)上可见到愈伤组织发生的不均衡性。无论哪种外植体, 在诱导培养的情况下, 那些启动、脱分化的薄壁细胞的特点是: 细胞质变得稠密, 细胞核在比例上增大, 趋向中央, 液泡化程度降低。这些细胞已失去了原来的结构和功能, 成为一个具有分生组织特性的细胞(图版 I: 9)。

凡已启动、脱分化的细胞, 都能进行分裂, 衍生增殖为一群薄壁细胞, 分裂时未见有丝分裂, 皆为无丝分裂, 且分裂方式多样, 呈劈裂、碎裂、串状分裂等多种式样(图版 I: 5 中箭头所示)。

启动、脱分化的细胞分裂若干次后, 形成的愈伤组织为均质的、活的薄壁细胞组成。但是, 其内的个别细胞会出现再次的启动、脱分化(图版 II: 10 中箭头所示), 形成分生细胞团(图版 II: 11); 进一步发育, 形成鸟巢状结构, 部分细胞明显伸长、弯曲, 细胞壁上出现不均等加厚现象, 似裸子植物里的管胞(图版 II: 12), 这种结构也叫维管结节^[6]。这表明在匀质的愈伤组织里产生了明显的组织分化。

2.3 器官的发生

2.3.1 芽的发生 在培养 17 d 的培养物上取材切片中, 可看到不同步形成的分生细胞团和大量的维管结节。尤其在愈伤组织近表面, 出现生长点, 且是不同步的(图版 II: 13 中 a, b, c 和箭头所示), 其中, 距生长顶端下方(箭头所示), 开始形成维管系统, 细胞呈伸长形、变小、两排平行状, 是不定芽的特征。这表明芽原基的发生是外起源的, 往往发生于愈伤组织的表面或近表面(图版 II: 13 中 a 所示)。开始时, 生长点是一团具有强烈分裂的细胞团, 细胞排列特别紧密, 核占细胞的比例大, 细胞质非常浓, 生长方向背离愈伤组织的中央。随着生长点的增大, 它的表面细胞出现垂周分裂(图版 II: 14 中箭头所示), 形成原表皮, 排列紧密有序, 有的形成正常苗, 也有的形成畸形苗(叶状体等)(图版 I: 3 中 a 所示)。

2.3.2 完整植株的诱导 诱导培养获得正常芽后, 分别切取芽体, 接种于 1/2MS 培养基上, 5~7 d 后即可肉眼见到根的产生。由切片(图版 II: 15)可见, 根原基的发生, 是起源于茎内的中柱鞘处。它的生长必须穿过茎的皮层和表皮细胞(图版 II: 16), 得到肉眼可见的不定根, 形成完整的小植株, 即可移栽于基质中, 生长健壮, 成活率达 100%。研究发现, 若诱导培养时, 生长素的浓度过大, 则在苗端切口处, 形成一团愈伤组织, 并也可产生许多不定根。但这种根发生于愈伤组织的内部, 根是内起源的。但是, 这种不定根由于与茎中的

维管组织之间被多层薄壁细胞相隔, 根里的维管系统不能与茎中的维管系统相通, 往往形成“假苗”, 移栽时不易成活。

3 讨论

基因工程实验的成功与否与转化系统有密切的关系, 农杆菌介导和基因枪转化等方法都离不开细胞和组织培养技术。

不同器官因其内在的生理与生化基础不同, 诱导器官再生的潜能有所区别而出现多种情况^[4]。研究表明: 番茄的下胚轴、子叶、茎段、叶片、叶柄作为外植体, 均能形成完整植株, 但成苗的早晚、正常苗的百分率有很大差异。下胚轴、子叶的成苗明显优于其它外植体。因此, 以下胚轴、子叶作为外植体建立转基因受体系统的研究较多^[1, 3], 本项研究也证实了此点。

在自然界植物发育中, 细胞分裂的趋向、细胞生长方向, 以及细胞分裂的速度和次数, 决定了胚胎发育中式样形成以及成熟器官的形态^[5]。这无疑也为在离体状况下的种种细胞分裂现象, 提供了理论依据。番茄组培过程中, 形成愈伤组织的细胞分裂方式为无丝分裂, 未见有丝分裂, 且分裂方式多样。可以设想, 分裂的结果不能保证每个母细胞中的遗传物质平均分配到 2 个或多个子细胞中去, 因而影响到细胞遗传的稳定性。因此, 番茄组织培养可产生体细胞突变体, 可为进一步培育出新品种提供条件。我们利用番茄组织培养技术, 以 NaCl 作为选择压力, 已初步筛选到耐盐植株, 现已进入大田试验。另外, 子叶作为外植体的愈伤组织, 分裂方式比下胚轴更不规则(图版 I: 5), 故更易出现畸形芽, 形成畸形苗(图版 I: 3 中 a 所示)。这提示我们, 开展以不定芽方式获得转基因植株时, 植株的所有性状变化是否纯属目的基因所致, 应该反复考察, 不能忽视不定芽产生过程中的种种变化。

诱导形态发生过程中, 物理创伤作用对启动愈伤组织有明显的作用, 但并不是伤口部分最先启动(图版 I: 4), 靠伤口的 1~3 层细胞不久会枯死, 紧接着的几层细胞最先启动。近几年来, 在植物组织培养中已逐步明确创伤刺激只是促使细胞增殖的原因之一, 在某些情况下可能不是主要原因, 导致细胞增殖的决定因素是外植体不再受整体植株对它的制约, 并给以合适的营养与生长调节物质^[6, 7]。本研究的结果论证了这种见解。另外, 本研究对番茄的各种外植体纵切面或横切面(直切面)的细胞组织学观察发现, 往往表皮细胞也并不最先发生细胞启动、脱分化和分裂。这表明能够真正导致形态发生的物质, 是在综合因子作用下, 经过一系列的生理生化反应而形成, 并通过传导才发生效应。这也说明, 这些物质既不是外植体本身固有的, 也不是外源可以直接加入的。我们的研究也表明, 引起形态发生的差异还与品种的遗传背景^[1]、材料的器官组织类型、生长发育状况和培养的理化环境条件等因子密切相关。

激素传导的途径一般为伤口直接传导或通过角质层传导^[7], 由于传导途径的局限性, 启动是不同的, 故我们能从同一张切片上观察到不同的生长发育过程, 在实验设计上并非一定需要进行系列切片。

在组织和细胞学观察中, 我们发现在匀质的愈伤组织中, 一旦出现细胞伸长、壁的不均衡加厚, 就意味着组织分化将发生。这也表明, 细胞壁对维管分化状态及决定细胞分化

方向有很大的影响。

植物组织培养中器官原基的起源,一般与完整植株上不定芽与不定根的形成情况相似。对于芽的起源,大多数为外起源,也有内起源^[8~10]。本研究证明番茄愈伤组织芽的起源属于外起源,根的起源为内起源。

参考文献:

- [1] 陈火英,张建华,庄天明,等.番茄下胚轴离体诱导成株的激素调控.上海农业学报,1999,15: 26~29.
- [2] Kartha K K, Champoux S, Gamborg OL, et al. *In vitro* propagation of tomato by shoot apical meristem culture. *J Amer Soc Hort Sci*, 1977, 102: 346~349.
- [3] 叶志彪,李汉霞,周国林.番茄子叶离体培养的植株再生.华中农业大学学报,1994,13(3): 291~295.
- [4] 中国科学院上海植物生理研究所细胞室.植物组织与细胞培养.上海:上海科技出版社,1978. 167, 180~181, 185.
- [5] 许智宏.植物生物技术.上海:上海科学技术出版社,1998. 108~126.
- [6] 王凯基,张丕方,倪德祥.几种木本植物组织培养的愈伤组织形成和器官再生.植物学报,1981,2: 97~101.
- [7] 倪德祥.植物生长调节剂在组织培养中的调控作用.自然杂志,1987,10(1): 35~40.
- [8] 倪德祥,易莹,张丕方,等.凹叶景天叶片离体培养的形态发生.上海:上海农业学报,1987,3(1): 73~78.
- [9] 许智宏,刘桂云.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,1980,22(1): 1~5.
- [10] Kato Y, Kawahara S. Bud formation in leaves, leaf fragments and midrib pieces of *Helianopsis orientalis* (Liliaceae). *Planta*, 1972, 107: 111~120.

图版说明

图版 I: 1. 培养 7 d 时,下胚轴(a)、子叶(b)、茎段(c)、叶片(d)、叶柄(e)的形态,示培养物的情况;2 培养 17 d 时,下胚轴(a)、子叶(b)、茎段(c)、叶片(d)、叶柄(e)的愈伤组织形成后,培养物的形态特征;3 由愈伤组织分化的正常芽(b)与畸形芽(叶状体)(a);4 培养 7 d 的下胚轴纵切面,示切口处的枯萎细胞和细胞启动、脱分化、分裂状况($\times 40$);5 培养 7 d 的子叶直切面,示明显启动、脱分化的局部和各种无丝分裂的方式()($\times 40$);6 培养 7 d 的茎纵切面,示切口处的枯萎细胞和细胞启动、脱分化、分裂状况($\times 40$);7 培养 7 d 的叶片直切面,示维管束的薄壁细胞、叶肉、表皮细胞都启动、脱分化,并开始分裂($\times 100$);8 培养 7 d 的叶柄纵切面,示切口一端的细胞启动、脱分化、分裂状况($\times 40$);9 培养 7 d 子叶的直切面,示细胞启动、脱分化,开始分裂($\times 200$)。

图版 II: 10 培养 7 d 的子叶直切面,示愈伤组织里的细胞再次启动、脱分化()($\times 200$);11 培养 7 d 的叶柄横切面,示分生细胞团($\times 400$);12 培养 17 d 的下胚轴纵切面,示鸟巢状结构——维管结节(),说明产生了组织分化($\times 200$);13 培养 17 d 的子叶直切面,示芽点的发生(a, b, c)和两排平行状的维管系统结构()($\times 40$);14 培养 17 d 的下胚轴纵切面,示芽点产生的生长锥,表皮发生垂周分裂()($\times 100$);15 不定芽扦插 5 d 形成的不定根纵切面,示根原基突起()($\times 40$);16 不定芽扦插 5 d 形成的不定根纵切面,示根伸长,穿过皮层,突破表皮()($\times 40$)。

Explanation of plates

Plate I: 1. Morphological differences of hypocotyl(a), cotyledon(b), stem(c), leaf blade(d), leaf petiole(e) explants, showing callus induction and formation cultured for 7 days; 2 Morphological differences of hypocotyl(a), cotyledon(b), stem(c), leaf blade(d), leaf petiole(e) explants, showing callus growth cultured for 7 days; 3 20 days after culture, showing normal bud and abnormal bud. 4 Longitudinal section of hypocotyl, showing cell initiation, dedifferentiation and division cultured for 7 days($\times 40$); 5 Sagittal section of cotyledon, showing significant division and various kinds of division modes() cultured for 7 days($\times 40$); 6 Longitudinal section of stem, showing cell initiation, dedifferentiation and division cultured for 7 days($\times 40$); 7 Sagittal section of leaf blade, showing cell initiation, dedifferentiation and division of parenchyma cell, mesophyll cell and epidermis cell within vascular bundle cultured for 7 days($\times 100$); 8 Longitudinal section of leaf petiole, showing cell initiation, dedifferentiation and division($\times 40$); 9 Sagittal section of cotyledon, showing cell initiation, dedifferentiation and division cultured for 7 days($\times 200$).

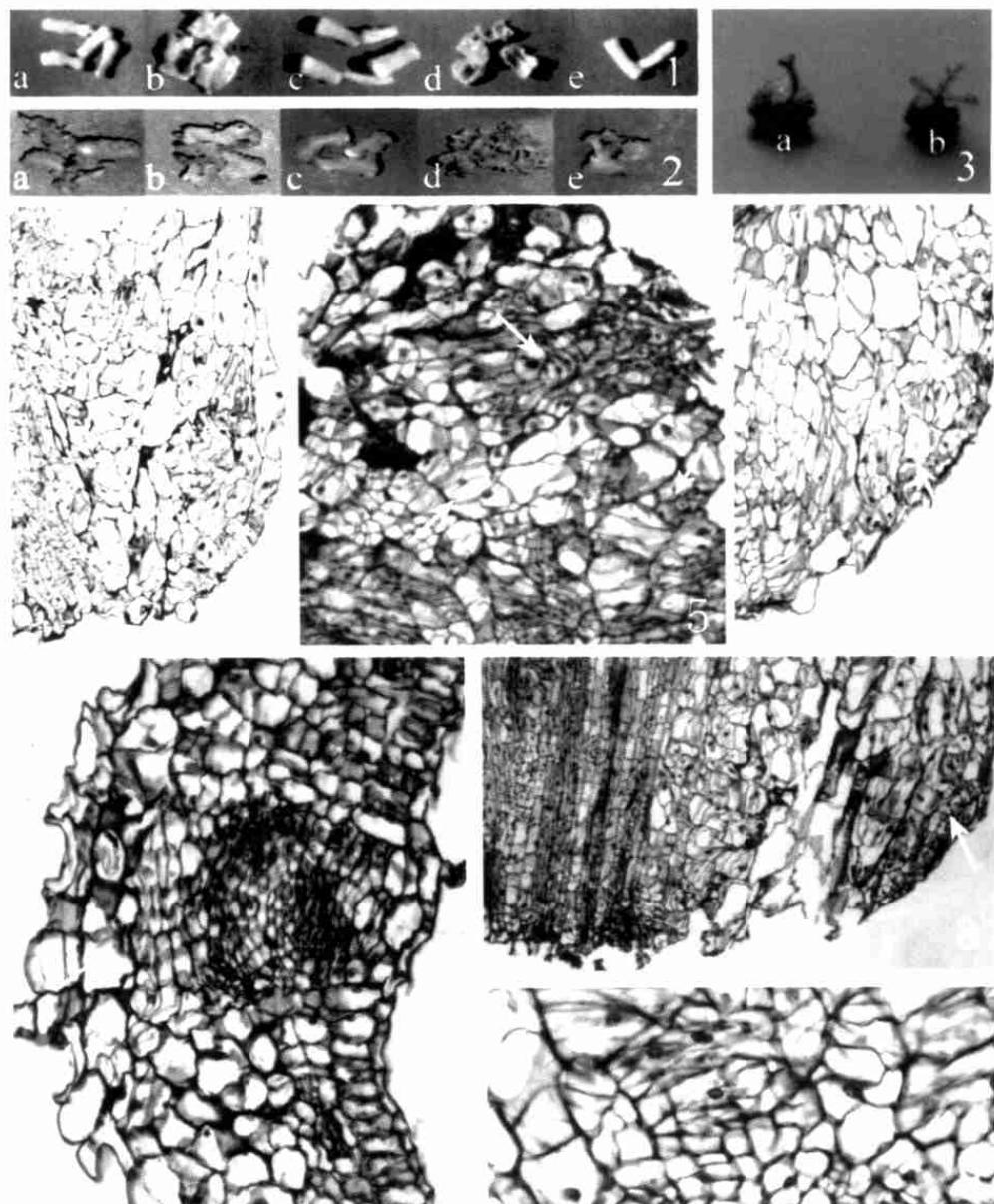
Plate II: 10 Sagittal section of cotyledon, showing cell initiation, dedifferentiation and division again within callus() cultured for 7 days($\times 200$); 11 Transverse section of stem, showing the meristematic packed cells cultured for 7 days ($\times 400$); 12 Longitudinal section of hypocotyl, showing the pitted vessel and the vascular nodules() cultured for 17 days($\times 200$); 13 Sagittal section of cotyledon, showing the formation of bud primordium (a, b, c) and vascular system () cultured for 17 days($\times 40$); 14 Longitudinal section of hypocotyl, showing the growing tip and the division of epidermis cell cultured for 7 days ()($\times 100$); 15 Longitudinal section of adventitious roots cut from adventitious buds rooted 5 days, showing root primordium ()($\times 40$); 16 Longitudinal section of adventitious roots cut from adventitious buds rooted 5 days, showing root growth ()($\times 40$).

陈火英等:番茄离体培养过程中器官发生的细胞组织学观察

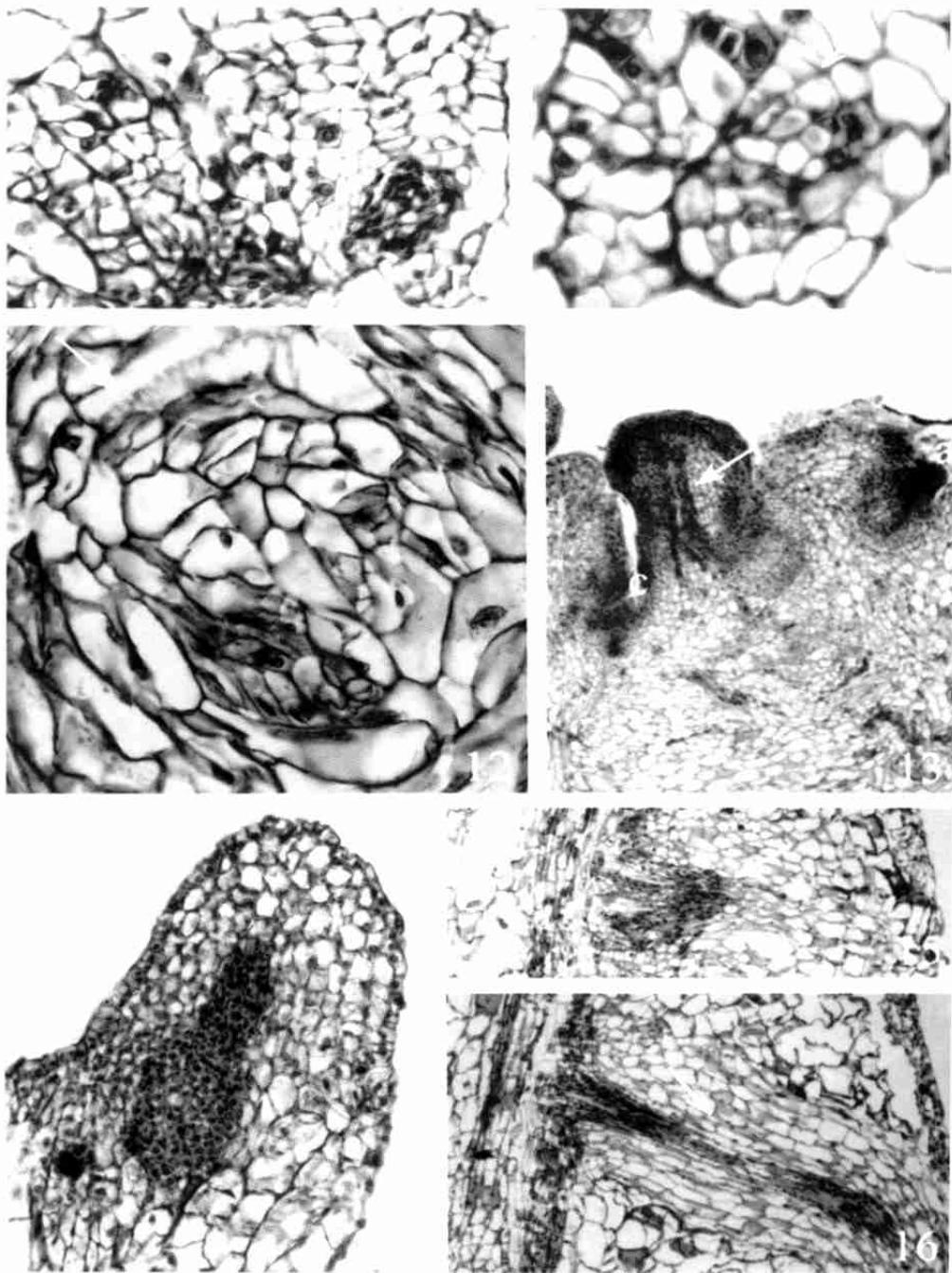
CHEN Huo-Ying et al.:Morphogenesis in *in vitro* culture of *Lycopersicon esculentum* Mill.

图版 I

Plate I



See explanation at the end of text



See explanation at the end of text