

·成果简介·

植物性细胞、受精及胚胎发生离体操作系统的创建与实验生物学研究

杨弘远* 周 嫦 孙蒙祥 赵 洁

(武汉大学生命科学院植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072)

[关键词] 离体操作, 实验生物学, 性细胞, 受精, 胚胎发生, 植物

我们从事植物生殖的实验研究已有近 30 年历史。20 世纪 80 年代中后期, 我们认识到实验胚胎学的发展趋势是由器官、组织操作向细胞、原生质体操作的水平提升, 同时加强研究的多学科性与综合性, 从而提出了植物实验生殖生物学与生殖细胞工程的研究思路。18 年来, 我们按照这个思路, 先后创建了性细胞的多种操作技术与实验系统, 并依靠这些操作技术与实验系统探索了植物生殖过程中若干环节的机理。本项研究先后受到国家自然科学基金“八五”重大项目与“九五”重点项目以及欧盟国际合作项目的资助, 倾注了 20 多名教师、研究生及博士后研究人员的心血, 共发表学术论文 113 篇, 其中 56 篇被 SCI 收录。阶段性研究成果获 1987 年国家教委科技进步奖一等奖, 2003 年湖北省自然科学奖一等奖。总体研究成果获 2004 年国家自然科学基金二等奖。

1 方法学的创新

植物性细胞操作是最近 20 年来逐渐兴起的研究领域, 我们除学习与借鉴前人的经验外, 更多依靠自己的创新。其中有两点主要经验:

1.1 针对不同性细胞的生物学特点摸索有效的操作技术

所谓植物性细胞原生质体, 广义而言包括花粉原生质体、雄配子原生质体(精细胞及其前身生殖细胞原生质体)、雌配子原生质体(卵细胞及中央细胞原生质体)、合子原生质体等类型, 他们在结构与生理上各有不同特点。即使同一类性细胞, 在不同植物和不同发育时期中也各有千秋。因而没有万灵的

操作技术可以奏效, 必须研究不同性细胞本身的生物学特点, 摸索出适宜的措施。

例如, 分离花粉原生质体曾是一些研究者在 20 世纪 70 年代初切望解决的课题, 但花粉外壁含不被酶解的孢粉素成分, 使这一尝试失败。我们注意到, 在一些百合科、石蒜科、鸢尾科植物中, 花粉具较长的萌发沟, 当吸水膨胀时, 萌发沟因内部压力作用而扩张, 致使外壁裂开, 从而使内壁暴露于酶液的面积增大。由此绕开了酶解外壁这一关, 建立了“水合-酶解”技术, 使原生质体由剥离的外壁中逸出。这一技术也成功地用于芸苔属植物花粉。但烟草花粉用上述方法难以促使外壁裂开, 因而又建立了分离烟草花粉原生质体的“萌动-酶解”技术。

又如花粉生殖细胞的分离。本项目针对各种植物花粉的特点, 先后在 6 科 11 种植物中分别建立了三种分离生殖细胞的技术, 即“一步渗击法”、“二步渗击法”与“低酶法”。

再如, 卵细胞与中央细胞分离方法亦因植物而异。本项目首次在水稻上报导了手工分离卵细胞与合子的“横断法”和分离中央细胞的“刺压法”, 在烟草上则研究出“酶解-渗击法”与“酶解研磨法”, 大大提高了以往分离烟草雌性细胞与合子的效率。

1.2 针对性细胞数量稀少的特点摸索操作技术的微量

分离的性细胞, 尤其是雌性细胞数量偏少, 难以采用通常体细胞操作中那样较大群体的培养、融合及转化方法, 而必须在操作技术的微量上下工夫。

例如, 离体受精要求在一对雌、雄细胞之间进行融合。这方面国外已有“微电融合”的成功先例。我

* 中国科学院院士。

本文于 2005 年 6 月 29 日收到。

们起初试图引进这一专用设备,未果,不得不另辟蹊径。最后终于建立了在PEG(聚乙二醇)微滴中诱导单对原生质体技术,实现了性细胞的“一对一”融合。该技术立足于将现有PEG诱导原生质体群体融合的常规方法加以微量化、精确化,并具有不依赖昂贵进口设备的优点。此项技术已被欧美研究者采用。

合子培养同样要求培养技术的微量化。我们吸取国外“微室培养”的成功经验,同时自行摸索匹配的饲养细胞,取得了由少量合子培养再生植株的成功。在此基础上又提出合子转化的任务。合子数量少,体积小,国外只有个别实验室采用显微注射外源基因进行合子转化,但技术难度大,效率很差。我们自行研制了一种简易装置安装于电激仪中,使常规的电激技术适应了微量细胞的操作,兼有合子不易流失和电激后易于培养的优点。

2 实验系统的创建

实验系统是研究发育机理和开展生殖工程的有力的技术平台,因而是本项目研究的重点。通过多年研究,我们创建了多个新的性细胞操作实验系统。

2.1 花粉原生质体与脱外壁花粉实验系统

花粉原生质体与脱外壁花粉分别是脱去花粉两重壁或仅脱去外壁的单位。花粉壁的剥脱有利于融合与转化。本项目创建了如下独特的实验系统:(1)幼嫩花粉原生质体与脱外壁花粉培养系统,分别培养出多细胞团与再生植株;(2)花粉原生质体与体细胞原生质体融合的“花粉-体细胞杂交”实验系统,培养出三倍体杂种植株;(3)脱外壁花粉人工授粉实验系统,可实现体外的受精、结实与出苗。以上均为国际首创。

2.2 离体受精实验系统

迄今为止,离体受精仅在以玉米为代表的单子叶植物中获得成功。本项目以烟草为材料,以自创的上述“PEG微滴融合”技术首次开展了双子叶植物中的离体受精研究,实现了离体的双受精(即卵细胞与中央细胞分别和精细胞融合)。

2.3 合子与幼胚培养及转化实验系统

合子培养是几十年来胚胎培养由成熟胚到幼胚再到合子操作技术不断发展的必然趋势。20世纪90年代以来,合子培养已在数种禾本科植物中取得成功,但在双子叶植物中尚无报道。本项目以烟草与水稻为材料,建立了如下实验系统:(1)烟草合子培养实验系统,获得了可育的再生植株(本期封面照

片);(2)水稻合子培养实验系统,达到了多细胞团;(3)水稻原胚培养实验系统,由开花后2—3d的幼小原胚培养出再生植株;(4)合子与幼胚电激转化实验系统。烟草合子表达了外源基因;水稻幼胚再生了转基因植株。此外,受精前后的中央细胞培养也产生了细胞团。

2.4 早期胚胎发生基因表达实验系统

建立了由分化前后幼胚构建cDNA文库筛选优势表达基因实验系统,及单胚与单细胞RT-PCR技术,为进一步研究单个卵细胞、合子及幼胚的基因表达奠定了基础。

3 生殖生物学探索

体外研究的优点是不仅可在一定程度上模拟体内发育过程,而且可以通过人工干预改变发育方向。体外与体内研究互相参照,有时能达到单凭体内研究难以企及的目的。本项目做了如下研究:

3.1 花粉生物学研究

(1)花粉两条发育途径的探索。花粉具有配子体发育与孢子体发育两种潜能,这已为花粉培养实验所证实。本项目通过花粉原生质体和脱外壁花粉实验进一步表明:脱壁花粉同样能通过孢子体发育启动胚胎发生,以至再生孢子体植株;在一定条件下,也能进行配子体发育萌发花粉管实现受精。证实了我们早先提出的花粉原生质体两条发育途径的设想。(2)花粉转化的探索。花粉壁,特别是外壁,是外源基因导入的障碍。通过脱外壁花粉与花粉原生质体的电激或基因枪实验,大大提高了外源基因的导入效率,提示花粉原生质体和脱外壁花粉是转化的良好受体系统。(3)花粉生殖细胞的研究。研究了生殖细胞微管格局与细胞形态变化的关系。应用离体培养技术,揭示出生殖细胞在离体后能保持一定的核分裂能力。

3.2 受精生物学研究

(1)受精过程生活动态的观察。体内方法难以观察受精过程的生活动态,离体受精系统为此打开了方便之门。本项目以显微录像方法观察记录了从雌、雄配子接触开始,到雄配子进入雌配子细胞质,再到雌、雄核融合的连续过程,揭示了若干新现象。(2)多精入卵机制的探索。以实验方法使两个雄配子同时或异时地与雌配子接触,对植物防止或容许多精入卵的条件提出了见解。(3)细胞体积在融合中作用的探索。对不同大小的细胞进行融合实验,研究细胞体积对融合速度与模式的影响,试图从新

的角度对进化过程中雌雄配子体积差异愈来愈大的趋势提出解释。

3.3 钙、钙调素与植物激素在受精与合子发育中的变化

(1) 钙与钙调素对花粉管生长与生殖核分裂的影响。应用外源钙、钙离子载体、钙离子通道阻滞剂、外源钙调素及其拮抗剂,分别研究了其对花粉管生长和花粉管中生殖核分裂的影响,其中对生殖核分裂的影响属首次报道。(2) 受精过程中钙、钙调素与植物激素的变化。应用超微细胞化学、免疫金

电镜、RNA 原位杂交等方法,揭示了由柱头经花柱到珠孔的整个花粉管生长轨道是富含钙的质外体系统;助细胞在授粉前后钙含量出现规律性变化;受精过程中胚囊内质外体中出现可能与雄配子运输有关的钙调素区带。在此基础上提出了雌蕊与胚囊中存在几类质外体系统,并论证了其受受精的关系。(3) 合子发育过程中钙的变化。受精后合子有一个发育过程,在这一过程中钙含量呈现有规律的增长,探讨了钙的变化与合子激活间可能存在的关系。

FOUNDING OF *IN VITRO* MANIPULATION SYSTEMS FOR EXPERIMENTAL STUDIES ON SEXUAL CELLS, FERTILIZATION AND EMBRYOGENESIS IN PLANTS

Yang Hongyuan Zhou Chang Sun Mengxiang Zhao Jie

(Key Lab of MOE for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Key words *in vitro* manipulation, experimental biology, sexual cell, fertilization, embryogenesis, plant

·资料·信息·

国家自然科学基金委员会工作人员公务活动八项规定

(2005年7月5日通过)

为进一步贯彻执行党中央、国务院关于党风廉政建设有关规定,加强国家自然科学基金委员会(以下简称自然科学基金委)的党风廉政建设,维护科学基金的公正性,维护自然科学基金委声誉,结合我委工作实际,特制定自然科学基金委工作人员公务活动八项规定(简称“八不准”)。

一、不准我委在编工作人员申请或者参加申请科学基金项目

二、不准接受来委办事的项目依托单位人员任何名义的宴请

三、不准我委工作人员(包括在编、兼职、兼聘人员)泄露同行评议人姓名、评审会发表意见人的姓名和审批决定未公布前的评审意见、评审结果等

四、不准在科学基金资助项目的评审、中期检查、鉴定、验收、考察调研以及到项目依托单位介绍科学基金管理工作等公务活动中收取报酬

五、不准在评审会议期间接受单位或个人与项目评审有关的邀请和来访

六、不准在项目依托单位报销任何费用及接受项目依托单位和受资助个人的任何礼品、礼金和各种有价证券

七、不准参加项目依托单位和受资助个人安排的旅游及各种娱乐活动

八、不准我委在编人员(兼职人员除外)兼任项目依托单位的专业技术职务和行政职务

以上规定,自然科学基金委各级工作人员均须严格遵照执行,并且接受科学基金项目依托单位及科技工作者的监督,对违反者,将按照党纪政纪的有关规定从严处理。

本规定自2005年8月12日起执行,原《国家自然科学基金委员会工作人员公务活动八项规定》同时废止,纪检监察审计局负责解释。