

ACHT 促使次生胞间连丝和胞间通道的形成 *

吴伯骥 谢明唐 崔亚亚 陈毅平 郭卫红 蒋 辉

(中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

郑国铝

(兰州大学细胞生物学研究室, 兰州 730000)

摘 要

在应用人工促使不同细胞间细胞质和染色质穿壁转移技术的共培养期间, 烟草和菠菜细胞间形成厚薄不均匀的隔离层, 逐渐被吸收、变薄、直至消失, 使不同的细胞直接联结嵌合在一起; 在继续共培养时, 相邻细胞壁上, 从一侧或两侧形成次生半胞间连丝、胞间连丝和胞间通道(细胞融合道), 从而把不同细胞联结成共质细胞团, 为进一步适时地操作细胞质和染色质的穿壁转移提供了细胞结构和细胞生理基础。本文描述了细胞间各种类型的联结和通道。

关键词 ACHT、共培养、胞间连丝、胞间通道、细胞融合道

植物体细胞和花粉母细胞间染色质穿壁转移现象早在 1900 年和 1901 年先后被发现, 10 年后 Gates(1911) 才把这一现象称为“Cytomixis”, 国际上一直沿用到现在。在我国将这一名词译为“细胞融合”, 并不很确切。1975 年郑国铝等^[1]在电子显微镜下观察百合花粉母细胞间不仅有染色质而且还有细胞质通过胞间通道穿壁转移到相邻细胞, 至此, “Cytomixis”一词才有了完整的意义。根据这一现象和郑国铝等的研究成果, 吴伯骥自 1986 年创建“人工促使不同细胞间细胞质和染色质穿壁转移技术”以来, 先后获得了烟草 + 菠菜^[2-5], 半夏 + 紫鸭跖草^[6], 籼稻 + 粳稻^[7] 再生植株及其后代, 并在细胞学^[5]、免疫化学和蛋白质等电聚焦^[4]、代谢^[8, 9]、染色体组型和行为^[10]、植物化学^[8, 11] 和分子生物学^[12] 等方面做了大量论证工作, 证明它们的后代是体细胞杂种(Somatic hybrids), 这些结果表明了这项技术是一项特殊的“杂交”技术, 可作为体细胞杂交(Somatic hybridization)方式之一, 因此将该技术正式定名为 ACHT(Artificial Cytomixis Hybridization Technique)。由于 60 年代末引进了 Cell fusion 一词, 也译为“细胞融合”或“细胞并合”, 两者的中文译名发生混淆, 因此在最近(1992)一次修订的《英汉细胞学词汇》将 Cytomixis 改译为“细胞混合”, Cell fusion 为“细胞融合”。为了避免混淆和误解, 我们将 ACHT 中的 Cytomixis 按它的实际含义写出来, 就把 ACHT 称为“人工促使不同细胞间细胞质

1992-04-22 收稿, 1993-06-16 收修改稿。

* 国家“863”高科技、国家计划委员会和中国科学院院长基金资助项目。

和染色质穿壁转移杂交技术”。过去曾用名“LB 技术”废除不再使用。这项技术通过共培养可促使两类细胞联结在一起,其间由胞间通道沟通,为进一步人工促使细胞质和染色质穿壁转移创造了条件^[5]。

近年来, Binding^[13] 等在不同植物和嫁接材料中,用电子显微镜观察到次生胞间连丝的形成和不同植物细胞共质体的建立。

本文就 ACHT 在对烟草和菠菜细胞共培养期间,不同细胞间次生胞间连丝和胞间通道的形成、演变进行了研究,探讨了它们的结构特点和分布,以期为此项细胞工程技术提供进一步的细胞学证据。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

培养的柳叶烟草(*Nicotiana tabacum*)胚性愈伤组织细胞和大圆叶菠菜(*Spinacia Oleracea*)拟分生组织细胞。

1.2 方法

1.2.1 ACHT 的共培养处理 按照前法^[2,9]对烟草胚性细胞和菠菜拟分生细胞进行共培养;用同样的方法对两类细胞分别进行单独培养,作为对照。

1.2.2 电子显微镜超薄切片的制备 培养 25—35 天后,分别用戊二醛(1%)、锇酸(2%)、固定液(pH 7.2 磷酸缓冲液配制)固定烟草、菠菜以及两类细胞共培养细胞团,酒精系列脱水,EPON 812 树脂包埋,LKB 切片机制备超薄切片,用醋酸铀和柠檬酸铅染色,JEM-100 CX 电子显微镜观察,照相。

2 结 果

2.1 烟草胚性细胞团次生胞间连丝和共质体的形成

经 ACHT 操作后培养处理,分散的烟草胚性细胞联结成细胞团。电子显微镜观察表明,细胞中无明显造粉质体结构,细胞质稀薄,结构较为细致,细胞间形成密度较高的次生胞间连丝(图版 I-1, 2);随着细胞生长,发育和液泡化,胞间连丝数目锐减或消失。在次生胞间连丝分布丰富的细胞壁上,每 10 μ m 胞间壁区段上,胞间连丝的密度可达 4—10 条,直径大约在 20—80 nm 左右,从而使培养的同类烟草细胞形成共质体。

2.2 菠菜拟分生细胞团次生胞间连丝和共质体的形成

应用 ACHT 操作获得的菠菜拟分生细胞联结的细胞团,细胞内具大量造粉质体或前质体,细胞质较浓稠,内膜系统丰富,与烟草细胞有明显的差别(图版 I-3);在相邻细胞间,形成较多次生胞间连丝,在每 10 μ m 胞间壁区段上,胞间连丝的密度有的可多达 12 条,直径大约 40—75 nm 左右,从而形成共质体(图版 I-4, 5)。随着细胞的生长、发育,在显著液泡化的细胞间,胞间连丝大大减少或消失。

2.3 烟草和菠菜细胞间次生胞间连丝和胞间通道的形成、分布和结构

2.3.1 次生胞间连丝和胞间通道的形成 在 ACHT 操作后共培养初期,相邻的不同细胞之间,形成电子密度较高的隔离层,然后不均匀地被吸收,消失,不同细胞逐渐直接接触,仍能分辨出不同细胞的形态学特征和壁的交界面(图版 I-6, 7)。各细胞的细胞壁本身的次生长也

在继续进行,因而观察到不同细胞间的胞壁不规则增厚,形成明显的次生壁层。

在共培养 25—35 天后,细胞壁上出现电子密度较高的区带,从宽 100nm 左右,一直到宽 1000nm 左右,在这些区带内可观察到与细胞内相联系的膜系结构(图版 II-1, 2);进而在不同细胞间形成次生胞间连丝、半胞间连丝和胞间通道多种类型的胞间联结方式和通道(图版 II-3—6)。次生胞间连丝大部分是不分支的,少数分支,有时形成丛生的互相联结的半胞间连丝(图版 II-4)。胞间连丝和各类胞间通道贯穿细胞壁,把不同植物的细胞联结沟通,使细胞成为一个相互开放的系统,从而形成一个原生质沟通的共质细胞团。

2.3.2 次生胞间连丝和胞间通道的分布和大小 在共培养 25—35 天后,大部分的次生胞间连丝和胞间大小通道已经初步形成,它们在细胞壁上分布极不均匀,在分布密度高的壁区段上,每 10 μ m 壁上可达 8—12 条;在分布稀疏的壁区段上,每 10 μ m 壁上仅有 2—4 条;有的细胞壁上,在此期间甚至不形成次生胞间连丝和胞间通道。按其结构和大小,将细胞间的各种联结分为胞间连丝和胞间通道两种类型,它们的直径分别是:胞间连丝 20—80nm,胞间通道 200—1500nm。同一胞间连丝和通道,直径也是不均匀的,大多向细胞开口处的直径较大,壁中部的直径较小,并在进一步发育演变中发生不同形式的变化。

2.3.3 次生胞间连丝和胞间通道的形态结构 关于胞间连丝的结构,形式多样,其模式图已有不少报道^[14]。在光学显微镜下,难以分辨胞间连丝和胞间通道的精细结构和类型。我们制作的电子显微镜超薄切片和观察表明:(1)次生胞间连丝主要由膜系结构和细胞质组成,横跨细胞壁,把相邻两细胞沟通。整个胞间连丝的外围是质膜,它贯穿到两个相邻细胞;通道的中轴由内质网组成,形成所谓的连丝微管(或链样管, desmotubule)和“中心杆”(Centralrod);外侧的质膜与内侧的连丝微管之间为胞间连丝腔,腔内充填着细胞质,其电子密度较低,它也贯穿到两侧的细胞,又叫胞间连丝通道;连丝微管和“中心杆”电子密度较高,它们之间的界面清楚,向相邻细胞开口处呈散开状,可观察到与内质网和核糖体相联(图版 II-7)。从这一点上可以看出所谓“中心杆”,实质上不是特有的结构,仅是内质网膜紧靠在一起形成电子密度较高的杆状而已。这些结构与最近 Olesen 和 Robards^[14]绘制的胞间连丝模式图十分类似。此外,还观察到另一种类型的胞间连丝,它的中央无连丝微管,为中空的孔道。这与 Robards 1976 年绘制的胞间连丝变异图式的第一种类型相似^[15]。(2)扩大的胞间通道(即细胞融合道^[16]或原生质通道^[17]),这些通道是在相邻两细胞壁上贯穿的小道,外侧为质膜,小道中无胞间连丝,它们的直径宽度大,从 200—1500nm 范围内,是一类很宽的胞间通道,比胞间连丝的直径大十多倍(图版 II-6)。

这些细胞间的联结和通道把不同植物细胞组成一个开放的共质体,为 ACHT 操作进一步促使细胞质和染色质的穿壁转移提供了细胞结构的条件。

至于这些联结和通道形成和演变的机理,尚待进一步研究。

3 讨 论

自 Tangle 1879 年发现胞间连丝以来,胞间连丝的初生和次生形成以及动态变化一直就是一个令人感兴趣的课题。一些研究者在植物发育过程中细胞壁上胞间连丝的发生和变化,在嫁接中接穗和砧木细胞间、在嵌合体细胞间,细胞壁上次生胞间连丝的形成和演变等方面进行了观察和研究^[14]。这些研究表明,在相同和不同植物细胞间,在一定生长发育时期,细胞壁

上都能形成次生胞间连丝。有些研究还表明,胞间连丝的形态结构不是固定不变的。Kitajima^[18]观察到大丽花花叶病毒通过百日草(*Zinnia*)细胞的胞间连丝侵染时,胞间连丝的直径从 25—36nm 扩展到 60—80nm;Goodwin^[19]报道植物自身在某种情况下能实现大分子的胞间转移;娄成后等^[20]观察到各种原生质组分可以通过胞间连丝通道向相邻细胞转移,通道直径可达 300nm;郑国铝等^[1]观察到百合花粉母细胞在减数分裂凝线期,胞间通道直径一般达 280nm,有的更宽大,形成细胞融合道,细胞质和染色质可以通过这些扩大的胞间通道在细胞间主动穿壁转移。

应用 ACHT 操作,将不同植物的细胞共培养形成共质体,对共培养不同时期细胞间联结和通道的观察表明,不同细胞间的胞间联结和通道不是单一类型和统一结构的,而是具有多样性和不同的形态结构,这些可能都是细胞生长、发育和细胞壁次生变化的产物,并可能与它们的功能密切相关。

目前大量的文献指出,胞间连丝是一种动态的结构,植物自身能改变它的胞间连丝^[1, 19, 20]。上面提到的病毒与胞间连丝相互作用的结果,就能改变胞间连丝的宽度,使病毒顺利通过到达相邻细胞。我们所观察到的由胞间连丝演变成胞间通道,可能就是 Robards 等^[14]所设想的由于纤维素酶的激活作用,使细胞壁物质分解掉而增大了胞间连丝的直径成为扩大的胞间通道所致。

胞间连丝的功能是在共质体中使物质在细胞间通过连丝能相互交流。从胞间连丝通道的直径来说,它只能让小分子物质通过,只有胞间连丝演变成为扩大的胞间通道之后,才能使大分子物质的交流顺利进行。根据我们过去的工作^[1]和经 ACHT 操作的材料可知,细胞质和染色质主要是通过胞间通道穿壁转移的。由此看来,ACHT 的操作,只有在不同细胞间形成胞间通道后,才能完成大分子物质交流的任务。因此,在不同植物细胞间能否形成次生胞间连丝和胞间通道,对 ACHT 来说具有十分重要的意义,也是本技术成功与否的关键。

参 考 文 献

- [1] 郑国铝等,植物学报,1975, 17(1): 60—69.
- [2] 吴伯骥等,中国科学, B 辑, 1987, (10): 1068—1075.
- [3] Wu Boji *et al.*, *Genome*, 1988, 30(1): 482.
- [4] 谢明唐等,科学通报, 1990, 35(20): 1591—1594.
- [5] 吴伯骥等,中国科学, B 辑, 1991, (2): 146—150.
- [6] 崔亚亚等,科学通报, 1991, 36(14): 1120.
- [7] Guo Weihong *et al.*, in *The Second Sino-Japanese Symposium on Plant Chromosomes 1992 Reports and Abstracts*, Nankai University, Tianjin, 1992, 91.
- [8] 谢明唐等,中国化学会第四届全国农副产品综合利用化学学术会议论文集,中国化学会应用化学委员会、中国科学院成都生物研究所,成都, 1991, 114—117.
- [9] 崔亚亚等,遗传, 1992, 14(2): 1—3.
- [10] Guo Weihong *et al.*, in *The Second Sino-Japanese Symposium on Plant Chromosomes 1992 Reports and Abstracts*, Nankai University, Tianjin, 1992, 90.
- [11] 吴伯骥等,中国化学会第四届全国农副产品综合利用化学学术会议论文集,中国化学会应用化学委员会、中国科学院成都生物研究所,成都, 1991, 106—110.
- [12] 崔亚亚,中国化学会第四届全国农副产品综合利用化学学术会议论文集,中国化学会应用化学委员会、中国科学院成都生物研究所,成都, 1991, 111—113.

- [13] Binding, H. *et al.*, *Protoplasma*, 1987, **141**(1): 64—73.
- [14] Robards, A. W., Lucas, W. J., *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1990, **41**: 369—419.
- [15] Robards, A. W., in *Intercellular Communication in Plants: Studies on Plasmodesmata* (eds. Gunning, B. E. S., Robards, A. W.), Heidelberg Spring-Verlag, 1976, 15—80.
- [16] Heslop-Harrison, J., *Ann. Bot.*, 1966, **30**(4): 221—229.
- [17] Weiling, F., *Planta*, 1965, **67**(5): 182—212.
- [18] Kitajima, E. W. *et al.*, *Virology*, 1969, **37**(6): 681—684.
- [19] Goodwin, P. B., *Planta*, 1983, **157**(2): 124—130.
- [20] 娄成后等, 植物生理生化进展, 1983, (2): 1—19.