

小立碗藓愈伤组织诱导和培养

潘一廷^{1,2,3} 施定基^{2,*} 杨明丽² 吴鹏程² 杜桂森³

¹北京石油化工学院, 北京 102617; ²中国科学院植物研究所, 北京 100093; ³首都师范大学生物系, 北京 100037

提要 小立碗藓已经成为植物功能基因组学的模式系统, 其材料的大量培养是所有工作的基础。文章探讨了小立碗藓愈伤组织诱导和组织培养的基本条件, 并观察了小立碗藓愈伤组织的亚显微结构。

关键词 小立碗藓; 愈伤组织; 电镜观察

Callus Induction and Culture of *Physcomitrella patens*

PAN Yi-Ting^{1,2,3}, SHI Ding-Ji^{2,*}, YANG Ming-Li², WU Peng-Cheng², DU Gui-Sen³

¹Beijing Institute of Petrochemical Technology, Beijing 102617, China; ²Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ³Department of Biology, Capital Normal University, Beijing 100037, China

Abstract The moss, *Physcomitrella patens* has recently been used as a model system in studies on the functional genomics of plants. Its callus induction and observation of the callus ultrastructure of *Physcomitrella patens* has been reported in this paper.

Key words *Physcomitrella patens*; callus; ultrastructural observation

小立碗藓是葫芦藓目(Funariales)葫芦藓科(Funariaceae)小立碗藓属(*Physcomitrium*)的藓类^[1]。1997年, Schaefer和Zryd^[2]发现这种藓类的核DNA可高频率发生同源重组, 使其成为研究植物功能基因组学的模式系统。自从1960年Ward首次诱导了金发藓(*Polytrichum commune*)和仙鹤藓(*Atrichum undulatum*)原丝体愈伤组织以来, 迄今已有50多种苔藓获得了愈伤组织。不管是苔类还是藓类, 每种材料的愈伤组织诱导所需要的培养基和添加的激素都不同, 因此, 每种材料愈伤组织诱导都需要经过大量的摸索实验。由于小立碗藓已广泛应用于植物分子生物学的研究^[3, 4], 所以, 如何获得这种材料显得尤为重要。在小立碗藓基因打靶实验中, 要求其转化材料——原丝体是同一发育阶段^[5, 6], 转化材料的大量获得和发育阶段同一性是实验成功的关键。一般采用液体培养基注入式发酵罐培养^[7, 8], 这种方法操作费用和技术要求较高, 一般实验室难以实现; 而小立碗藓愈伤组织的诱导则可提供另一条获得基因打靶转化实验材料的方法。本文就此做探讨。

材料与方 法

小立碗藓(*Physcomitrella patens*)原丝体由日本M Hasebe教授(National Institute for Basic Biology)赠

送。材料表面消毒后无菌接种到BCD^[5]固体培养基上, 温度(25±1)℃, 在光照度为40 μmol·m⁻²·s⁻¹培养箱中持续光照培养。

小立碗藓基本培养基(BCD, 单位: mmol·L⁻¹): KNO₃ 10、MgSO₄ 1、FeSO₄ 0.045、KH₂PO₄ (KOH调pH 6.5) 1.8、CaCl₂ 1、酒石酸氨(AT) 5。TES(微量元素, 单位: μmol·L⁻¹): CuSO₄ 0.22、ZnSO₄ 0.19、H₃BO₃ 10、Na₂MoO₄ 0.1、MnCl₂ 2、CoCl₂ 0.23、KI 0.17。

取无菌小立碗藓愈伤组织, 用磷酸缓冲液(pH 6.5)冲洗3次, 将愈伤组织分离成单个颗粒。冲洗后, 用2.5%的戊二醛固定, 按材料与固定液之比为1:5于室温下固定20 min, 换1次固定液, 4℃下固定24 h。用磷酸缓冲液冲洗3次, 每次15 min, 然后用1%锇酸固定。脱水, SUPRR树脂包埋。用HITACHI H-6000透射电镜(TEM 75 V)观察、照相。

实验结果

苔藓植物愈伤组织的诱导一般以MS为基础

收稿 2004-06-28 修定 2005-02-03

*通讯作者(E-mail: cyanoshi@public.bta.net.cn, Tel: 022-66880322)。

培养基, 加2%~4%的葡萄糖, 而不加植物生长调节物质, 只有少数物种需要低浓度水平的生长调节物质存在。我们的实验表明, 葡萄糖是影响小立碗藓愈伤组织产生的一个重要因素, 在无生长调节物质的BCD培养基中不产生愈伤组织。加0.5%~4% (W/V) 葡萄糖, 同时加1 mg·L⁻¹的6-BA或2, 4-D, 取配子体茎尖, 接种到培养基上, 在温度(25±1)℃, 持续光照, 光照度40 μmol·m⁻²·s⁻¹下诱导出愈伤组织。诱导的愈伤组织每个星期继代1次, 培养基为BCD+4%葡萄糖+1 mg·L⁻¹ 6-BA, 愈伤组织生长稳定。

茎叶体在含有2, 4-D培养基上培养一段时间后, 不形成愈伤组织, 仍为茎叶体, 且茎叶体出现异常现象, 其茎上面出现瘤状物。在含2, 4-D培养基上培养2个星期后茎叶体周围产生新生原丝体(图1), 在此种培养基上生长的原丝体不产生芽体, 说明2, 4-D抑止芽的发生。

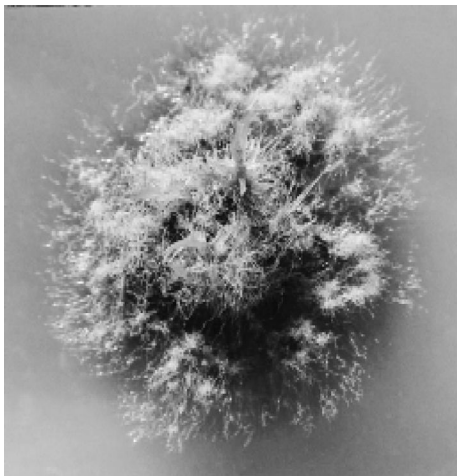


图1 在含2, 4-D的培养基上生长的小立碗藓
Fig.1 Culturing of *P. patens* on the medium with 2, 4-D

小立碗藓配子体茎尖在含1 mg·L⁻¹ 6-BA培养基上培养20 d左右出现疏松的绿色愈伤组织(图2), 继代培养3次后形成稳定的愈伤组织培养体系, 并可进一步扩大培养。在含4%葡萄糖的培养基上诱导愈伤组织较快, 15 d就有愈伤组织出现。诱导出的愈伤组织在含4%葡萄糖+1 mg·L⁻¹ 6-BA的BCD培养基上扩大培养, 生长迅速, 并能维持脱分化状态。愈伤组织转到无生长调节物质的BCD培养基上培养15 d以后又可以再分化,

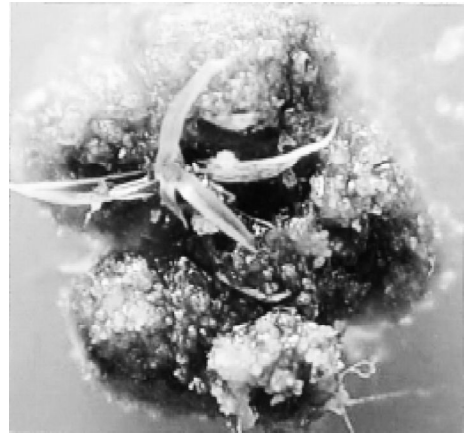


图2 小立碗藓愈伤组织
Fig.2 The callus of *P. patens*

长出绿色的原丝体。

在愈伤组织诱导的过程中, 葡萄糖超过4%时, 愈伤组织严重褐化(图3)。大多数苔藓植物中都含有多酚化合物, 容易产生褐变, 从而阻碍愈伤组织的继代和再分化。这是诱导苔藓愈伤组织需要注意的一个问题。

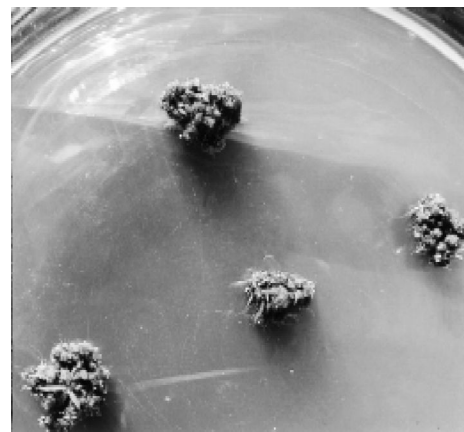


图3 褐化严重的小立碗藓愈伤组织
Fig.3 The browned callus of *P. patens*

透射电子显微镜观察(图4)表明, 愈伤组织细胞比正常细胞体积增大, 细胞壁薄, 细胞质减少, 液泡变大, 细胞中含有叶绿体。叶绿体内有少量类囊体弯曲环绕在淀粉粒之间, 淀粉粒含量多, 而且大。基粒类囊体和基质类囊体受大的淀粉粒压缩, 界限不明显。叶绿体附近有大量的

线粒体存在(图5)。

讨 论

苔藓在无生长调节物质作用下, 不管是孢子体、配子体, 还是哪个组织都可通过相似的发育途径再生: 由绿丝体和轴丝体产生芽体, 然后发育成配子体^[9], 是再分化过程, 而没过去分化, 也就是说, 苔藓的再生是没有经过未分化的愈伤组织细胞。通过这种方式产生的原丝体处于

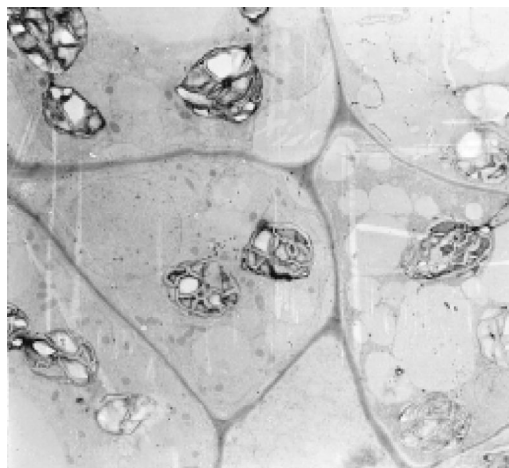


图4 小立碗藓的愈伤组织细胞
Fig. 4 Cells of *P. patenscallus*

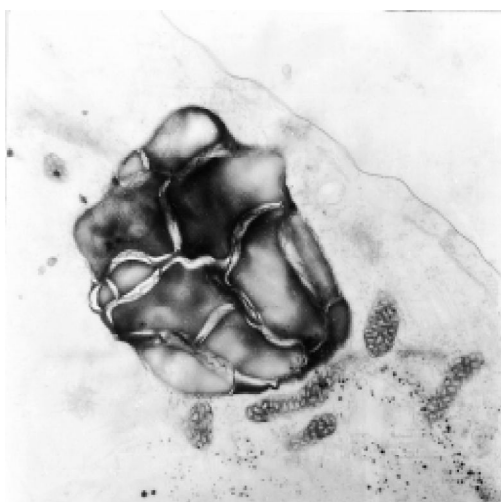


图5 小立碗藓愈伤组织叶绿体及其周围的线粒体
Fig. 5 A chloroplast and mitochondria nearby the chloroplast in *P. patenscallus*

不同的发育阶段, 这对于进行基因打靶的同源重组试验不利。愈伤组织诱导成功地解决了这个问题, 可以在实验室进行探索性基因打靶试验, 形成另一个培养小立碗藓途径(图6)。

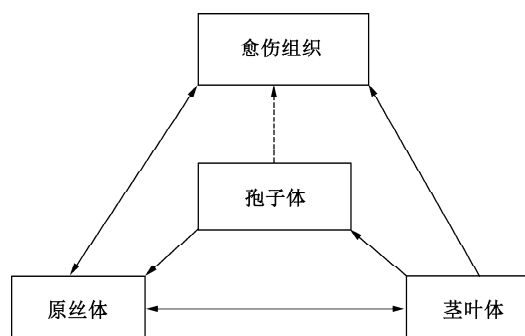


图6 小立碗藓的培养途径
Fig. 6 Culture ways of *P. patens*

大多数苔藓植物愈伤组织诱导培养基为含4% (或6%) 葡萄糖和 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D 的MS培养基, 并且发现培养基的高糖和高渗透压是影响愈伤组织诱导的主要因子, 添加生长素对诱导愈伤组织没有直接关系。我们尚未见到国内外已发表有关诱导小立碗藓愈伤组织的报导。在本试验中, 培养基的高糖和高渗透压是愈伤组织诱导的一个影响因子, 但是只有在含有不同浓度的6-BA培养基上才能诱导出愈伤组织, 并能重复继代培养、维持脱分化状态和正常生长, 而在2, 4-D培养基上并未诱导出愈伤组织。6-BA促进细胞分裂, 诱导愈伤组织在维管植物和苔藓植物中的应用很广泛, 在小立碗藓组织培养中的促分裂作用也很明显。

小立碗藓愈伤组织诱导培养基中葡萄糖含量超过4%时, 褐变现象严重。褐变现象的发生与外植体中所含酚类化合物的多少和多酚氧化酶活性有直接关系^[10]。这些酚类化合物在完整的组织和细胞中与多酚氧化酶分隔存在, 比较稳定, 在外植体建立时, 受伤细胞的分隔效应被打破, 酚类化合物外溢, 与多酚氧化酶接触迅速氧化成褐色的醌类物质, 醌类物质又会在一些酶的作用下与外植体组织的蛋白质发生聚合, 引起细胞内其他的酶系统失活, 从而导致组织代谢活动紊乱, 生长停滞, 最终死亡。这说明小立碗藓细胞含有较

多的多酚化合物, 在高葡萄糖的培养基上培养, 细胞的多酚化合物会增加, 这在以后的总 DNA 提取中也表现出来。在培养条件不适时, 多酚化合物在细胞内积累较多, 在多酚氧化酶的作用下发生氧化, 组织逐渐变成褐色或黑色, 最后细胞死亡。在小立碗藓愈伤组织诱导实验中, 为了减轻褐化, 外植体——原丝体培养基中不加葡萄糖, 同时, 通过减少继代天数降低褐化程度和维持其脱分化状态, 效果明显。

从小立碗藓透射电镜观察中发现, 小立碗藓愈伤组织细胞中含有叶绿体。叶绿体是对外界环境反应最敏感的细胞器, 正常情况下, 叶绿体成梭形或椭圆形, 内膜系统结构清晰。在小立碗藓愈伤组织细胞内, 叶绿体为大量淀粉粒充塞, 含有少量但正常的内膜系统, 这说明愈伤组织细胞内叶绿体也出现脱分化现象。Vannini^[11]发现在培养基中添加乙酸、葡萄糖等碳源可诱导单细胞眼虫藻中叶绿体退化。小立碗藓愈伤组织细胞电镜观察结果进一步说明高葡萄糖使叶绿体发生退化。

参考文献

- 1 Li DK, Wu PCH. *Physcomitrella* new to China. *Acta Phytol Sin*, 1995, 33(1): 103~104
- 2 Schaefer DG, Zryd JP. Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J*, 1997, 11: 1195~1206
- 3 施定基, 冉亮, 宁叶等. 苔藓分子生物学的一些进展. *贵州科学*, 2001, 19: 1~5
- 4 Ralf R. Molecular genetics of *Physcomitrella*. *Planta*, 1999, 208: 301~309
- 5 Nishiyama T, Hiwatashi Y, Sakakibara K et al. Tagged mutagenesis and gene-trap in the moss, *Physcomitrella patens* by shuttle mutagenesis. *DNA Res*, 2000, 7: 9~17
- 6 Schaefer DG. A new moss genetics: Targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 477~501
- 7 Boyd PJ, Hall J, Cove DJ. An airlift fermentor for the culture of the moss *Physcomitrella patens*. In: Glime JM, Iwatsuki Z, Hartmann E(eds). *Methods in Bryology*. Tokyo: Proc Bryol Meth Workshop, Mainz Hattori Botanical Laboratory, 1988. 41~45
- 8 Sargent ML. A guide to the axenic culturing of a spectrum of bryophytes. In: Glime JM, Iwatsuki Z, Hartmann E (eds). *Methods in Bryology*. Tokyo: Proc Bryol Meth Workshop, Mainz Hattori Botanical Laboratory, 1988. 17~24
- 9 Martin B. Developmental physiology bryophytes. *New Mann Bryol*, 1984, 2: 276~324
- 10 Billings WD, Godfrey PJ, Chabot BF et al. Metabolic acclimation to temperature in arctic and alpine ecotypes of *Oxyria digyna*. *Arctical Alpine Res*, 1971, 3: 277~289
- 11 Vannini GL. Degeneration and regeneration of chloroplasts in *Euglena gracilis* grown in the presence of acetate: Ultrastructural evidence. *J Cell Sci*, 1983, 61: 413~422