

综述与专论

植物分子生物学研究极具前景的模式系统——小立碗藓^①

赵 奂 赵晓刚 何奕昆 刘祥林^②

(首都师范大学生物系 北京 100037)

摘要 小立碗藓作为植物分子生物学研究极具前景的模式系统已日益受到人们的重视, 它的生活史周期短, 易于培养, 转基因植株易于分析, 核基因组容易和外源DNA发生同源重组, 这些特点使它成为研究基因功能的良好材料。一些成功的基因敲除和基因破坏已经在小立碗藓中实现, 这些基因的功能也通过小立碗藓转化植株的特点得以证实。小立碗藓标签突变文库已经建立, 其应用为小立碗藓基因的进一步研究打下了基础。关于小立碗藓的ESTs数据库已经建立, 已有67 000条ESTs信息。

关键词 小立碗藓, 分子生物学, 模式植物, 基因重组, 转化

Physcomitrella patens, a Potential Model System in Plant Molecular Biology

ZHAO Huan ZHAO Xiao-Gang HE Yi-Kun LIU Xiang-Lin^②

(Department of Biology, Capital Normal University, Beijing 100037)

Abstract The moss *Physcomitrella patens* is now often used as a model system in plant molecular biology. Its short life cycle, easy to culture, transformant analysis and allele replacement make it an excellent material for studying plant molecular biology. Some gene targetings have succeeded and the function of these genes has been proved. Tagged mutant library has been established for the further researches of *Physcomitrella patens*. The ESTs database on *Physcomitrella patens* which contains almost 67 000 ESTs has been established.

Key words *Physcomitrella patens*, Molecular biology, Model system, Gene recombination, Transformation

小立碗藓(*Physcomitrella patens*)在分类上属于葫芦藓科, 小立碗藓属, 分布于欧洲、亚洲、非洲及大洋洲, 我国湖南省张家界地区有分布(李登科和吴鹏程, 1995)。小立碗藓植物体矮小, 黄绿色, 有光泽, 稀疏丛集。其茎细而短。叶片呈卵形或披针形, 茎基部的叶较小,

① 北京市自然科学基金重点资助项目 (5021001)。

② 通讯作者。Author for correspondence.

作者简介: 赵奂, 男, 1979年1月生, 首都师范大学生物系硕士研究生。刘祥林, 男, 1952年9月生, 副教授, 从事植物分子生物学研究。

收稿日期: 2003-03-18 接受日期: 2003-07-15 责任编辑: 白羽红

中肋单一、细长。蒴柄短粗,孢蒴呈圆球形或梨形,对称、不伸出叶丛,无蒴盖分化,孢蒴成熟后不规则开裂,蒴齿缺如,蒴帽极小,呈钟形。成熟后基部四瓣浅裂。孢子呈球状肾型(高谦和张大成, 2000)。

小立碗藓是一种非常理想的植物分子生物学研究材料。它生长所需营养简单,容易培养;其配子体在生活史中占优势,对其突变体的表型可以进行直接研究;其核基因组易于与有同源片段的外源DNA发生高频率的同源重组,从而使得精确的基因破坏和基因敲除成为可能,为基因功能的研究提供了良好的材料。小立碗藓与高等陆生植物有很多相似特点,而小立碗藓的一些特性使得它比其他植物更易于进行分子生物学的研究。小立碗藓在国外已经成为植物分子生物学研究的模式植物。在我国,研究小立碗藓的工作也已开始。

1 小立碗藓的研究历史

对小立碗藓较早的研究始于20世纪60年代。Engel(1968)成功的分离出小立碗藓的硫胺素和烟酸的营养缺陷型突变株。随后,一些科学家对小立碗藓的发育遗传学作了深入的研究,他们利用化学诱变诱导出几种生化突变体和发育突变体(Engel, 1968; Ashton and Cove, 1977; Ashton *et al.*, 1979; Abel *et al.*, 1989)。在此期间,小立碗藓的杂交实验也在进行,小立碗藓虽然是自交系统,但其营养缺陷型,在缺乏营养条件下是自交不育的,不同营养缺陷型杂交可以通过互补作用产生可育孢子体(Engel, 1968; Ashton and Cove, 1977; Courtice *et al.*, 1978)。这一时期的另一个重要成果是利用PEG介导原生质体融合试验成功(Grimsley *et al.*, 1977)。1992年,Cove和Knight(1993)完成了对小立碗藓生活史各个阶段的培养。这些工作为小立碗藓的研究打下了良好的基础。

对小立碗藓分子水平上的研究始于20世纪90年代。Schaefer等(1991)利用PEG成功地将抗性基因转入小立碗藓,使小立碗藓成为第一例转基因成功的苔藓。接着,利用基因枪法对小立碗藓的转化又获得成功(Knight *et al.*, 1995)。小立碗藓核DNA被证明极易与外源片段发生同源重组(Kammerer and Cove, 1996; Schaefer and Zr?d, 1997),这是小立碗藓研究史上的重大突破,为日后多种基因在小立碗藓中的敲除奠定了理论和实践基础。在这之后,科学家纷纷开始以小立碗藓为试验材料,对所研究的基因进行敲除,以研究该基因的功能,其中所研究的基因有:调节叶绿体分裂的*ftsZ*(Strepp *et al.*, 1998),26S蛋白酶体的一个亚基*MCB₁*基因(Girod *et al.*, 1999),一种保守的叶绿素结合蛋白*Cab*基因(Hoffman *et al.*, 1999),细胞外蛋白*Expansins*基因(Schipper *et al.*, 2002),D6-延长酶*PSE1*基因(Zank *et al.*, 2002),腺苷5'-磷酸硫酸盐降解酶基因(Koprivova *et al.*, 2002),一种在蛋白质折叠过程中重要的酶*PID-like*基因(Meiri *et al.*, 2002)以及一种与蓝光接受有关的隐花色素*Cryptochrome*基因(Imaizumi *et al.*, 2002)。

20世纪90年代末,生物学的一些新技术开始在小立碗藓的研究中得到应用,这其中包括小立碗藓ESTs数据库的建立(Machuka *et al.*, 1999; Nishiyama *et al.*, 2003)和利用半连续式光合自养生物反应器(semi-continuous photoautotrophic bioreactor)对原生质体进行大量的培养(Reutter and Reski, 1996; Hohe *et al.*, 2002; Schween *et al.*, 2003b)。

小立碗藓的研究在世界上已受到普遍的重视。在2001年的日本苔藓国际会议上,一半以上都是关于小立碗藓的文章,其中很多文章是关于新基因的获得及功能的初步鉴定。

我国对小立碗藓的研究是从中国科学院植物研究所开始的。1995年,李登科和吴鹏程报道

了在湖南张家界发现有小立碗藓。2000年,施定基等(2001)在全国苔藓植物学会上介绍了国外关于小立碗藓分子生物学研究的进展。2001年初,我国从日本Hasebe教授得到小立碗藓的植株,并开始培养;同年又从日本和德国得到研究小立碗藓分子遗传学有关的质粒¹⁾。

2 小立碗藓的生活史

在苔藓植物的生活史中,配子体世代占优势,孢子体细胞经减数分裂形成孢子,孢子萌发形成原丝体。原丝体是由顶端细胞经一系列分裂形成的绿丝体细胞组成的,绿丝体细胞含有大量叶绿体,顶端细胞的分裂周期大约为24 h。绿丝体的次顶端细胞经过有限次数的分裂形成侧枝。顶端细胞经过转变,继续分裂形成轴丝体。轴丝体是另外一种原丝体,其细胞内容物较少,叶绿体数量较少。像绿丝体一样,轴丝体的延伸也需要顶端细胞的不断分裂,但其顶端细胞的分裂周期只有6 h。而且,其线性延伸的速度也很快,可达40 μm/h,而绿丝体只有2 μm/h。这使得它可以在土壤或琼脂中快速生长(Cove and Knight, 1993)。轴丝体的次顶端细胞进行有限次数的分裂形成侧枝。很多侧枝在强光条件下发育成绿丝体,其他发育成轴丝体和芽。芽的发生是植物生长从二维原丝体生长转变成三维的植物体生长的转化过程。芽产生配子和配子囊,小立碗藓为雌雄同株,但雌雄生殖器官即颈卵器和精子器分别在不同的枝上。精子器成熟后顶端裂开,精子溢出体外,借助水游到颈卵器附近,进入颈卵器,与卵接合,形成合子,合子不经休眠,即在颈卵器内发育成胚。胚逐渐分化形成蒴柄和孢蒴。蒴柄深入母体形成基足,基足吸收养料,蒴柄上长有孢蒴,小立碗藓孢蒴的结构比其他苔藓植物简单,没有帮助孢子释放的结构。每个孢蒴中大约产生4 000个孢子。小立碗藓在培养条件下,大约8周完成一次生活史(贾渝,1998; Cove, 2000)。

小立碗藓几乎所有的细胞,不管是孢子体的还是配子体的,都可以再生为原生组织。孢子体产生的原生组织可再生为配子体,这说明孢子体与配子体表型上的差异并不是由核型产生的。原生质体很容易从幼嫩的原生组织中分离获得,在没有激素的介质中,原生质体也能长得很快。原生质体可直接形成绿丝体,这个过程类似于孢子发育过程(Cove and Knight, 1993)(图1)。

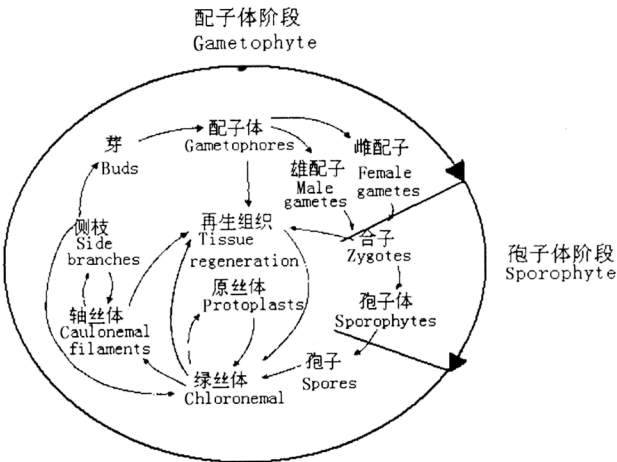


图1 小立碗藓生活史

Fig.1 The life cycle of *Physcomitrella patens* (Cove,2000; Schaefer and Zrýd, 2001)

1) 潘一廷, 2000. 小立碗藓培养、结构观察及基因打靶. 硕士学位论文.

3 小立碗藓的培养方法

小立碗藓生长所需营养较简单,容易培养。可以用水培或用只含无机盐的培养基培养。通常情况下,用铺有琼脂的培养皿或盛有水的锥形瓶培养即可(Cove *et al.*, 1997)。小立碗藓再生能力强,从配子体取下的任何组织都可以继续培养,而新生的原生组织生长最快(Cove and Knight, 1993)。

一个得到原生组织的简单方法是将原生组织匀浆并接种于新鲜琼脂培养基上。在上面覆盖一层玻璃纸可以减缓组织的生长速度,简化最终得到的组织。一周后,培养得到的组织大部分由绿丝体细胞组成,是获得原生质体良好材料。一个标准培养皿(直径90 mm)接种一周可得到干重50 mg的组织(25℃,白光)。用纤维素酶消化可以得到 5×10^6 个原生质体。小立碗藓在22~27℃的环境中,生长最迅速,15℃时生长缓慢,但这个温度可以诱导配子体产生。植物体在连续光照条件下生长良好,16 h光照、8 h黑暗的周期处理可以诱导原丝体组织的分化(Cove, 2000)。

培养小立碗藓的原生质体可以利用半连续式光合自养生物反应器(semi-continuous photoautotrophic bioreactor),使用这种方法不但可以获得用于转化的大量原生质体,并且可以利用小立碗藓的原生质体生产蛋白。利用添加2.5 mmol/L酒石酸铵的Knop培养液,通入含2%CO₂的空气,pH值控制在4.5~7.0,可得到最大比生长速率(specific growth rate)为0.57/d。利用5 L的生物反应器每天可得到1 100 mL的悬浮培养物,稀释率为22%(Hohe *et al.*, 2002)。在培养基中添加一些微量元素和一些辅酶、维生素等可以提高原生质体培养的最大成活率(Schween *et al.*, 2003b)。

利用生物反应器培养的目的之一是培养用于转基因的原生质体,因此,保证原生质体的同步生长和减少细胞分化显得尤为重要,目前的方法是加入酒石酸铵促使细胞同步生长(Hohe *et al.*, 2002)。酒石酸铵能够阻止轴丝体的形成(Hohe and Reski, 2002)。进一步的实验证明,绿丝体细胞处于G₂期的细胞占多数,而轴丝体细胞处于G₁期的细胞占多数,酒石酸铵阻止轴丝体形成的原因可能是其对细胞周期的影响(Schween *et al.*, 2003a)。

得到的小立碗藓突变体可以保存在液氮里,但是其组织在冷冻和解冻过程中可能死亡,如果不进行继代培养,将组织密封于培养皿中,置于15℃条件下,则至少可保持一年(Grimsley and Withers, 1983)。

4 小立碗藓的分子生物学特点

与其他苔藓植物相比,小立碗藓的染色体较多,有27条(Reski *et al.*, 1994)。利用流式细胞仪(flow cytometry, FCM)分析得到的小立碗藓核基因组大约为511 Mb (Schween *et al.*, 2003a),比一般开花植物的基因组低。Southern杂交表明:小立碗藓基因组中至少含有一个高度重复序列的基因家族。温度变性试验表明:基因组中G+C含量为34.6%(Reski, 1998)。

小立碗藓的基因组与其有同源序列的外源DNA片段易于发生同源重组。在某个小立碗藓的转基因品系中,用相同的质粒对其进行再次转化,结果发现,原来转入的基因发生沉默,基因分析表明:第二次质粒的插入位点在第一次获得该转基因品系的质粒的插入位点上或在其附近(Kammerer and Cove, 1996)。这表明在第二次转化过程中转入的质粒与重组品系的基因组之间

发生了同源重组。这就使基因打靶技术在小立碗藓中成为可能。对高等陆生植物进行转基因，含有同源序列的质粒与基因组发生同源重组的几率很小，只有0.01%~0.1%(Hoffman *et al.*, 1999)。而在小立碗藓中，同源重组率大得多。表1归纳了一些近年来发表的在小立碗藓中发生同源重组的结果。

5 小立碗藓的转化

植物转化常用的方法有农杆菌介导法、电激法、PEG介导法、基因枪法等，效果较好的是

表 1 转化植株的同源重组结果
Table 1 The result of homologous recombination in the transformed plant

同源重组基 因位点 Locus of the homology	转化使用 Transformation with	同源序列长度 Length of homology		分析的转基 因个体数 Number of transgenics analyzed	同源重 组个数 Number of homology	使用的 DNA DNA used	同源重组率 Percent of homology (%)	参考文献 Reference
		1	2					
转基因位点 Transgenics	质粒 Plasmid	1.8 kb		3	3	基因组 DNA Genomic DNA	100	Kammerer and Cove, 1996
转基因位点 Transgenics	质粒 Plasmid	3.0 kb		7	6	基因组 DNA Genomic DNA	86	Kammerer and Cove, 1996
基因组随机序列 Random genomic sequence	质粒 Plasmid	3.6 kb		6	6	基因组 DNA Genomic DNA	100	Schaefer and Zrýd, 1997
基因组随机序列 Random genomic sequence	质粒 Plasmid	2.7 kb		4	4	基因组 DNA Genomic DNA	100	Schaefer and Zrýd, 1997
基因组随机序列 Random genomic sequence	质粒 Plasmid	2.3 kb		6	4	基因组 DNA Genomic DNA	67	Schaefer and Zrýd, 1997
Cab	质粒 Plasmid	1 kb		9	3	基因组 DNA Genomic DNA	33	Hoffman <i>et al.</i> , 1999
CRY1a	质粒 Plasmid	4.6 kb		2	2	基因组 DNA Genomic DNA	100	Imaizumi <i>et al.</i> , 2002
CRY1b	质粒 Plasmid	4.3 kb		2	2	基因组 DNA Genomic DNA	100	Imaizumi <i>et al.</i> , 2002
Aps	片段 Fragment	847 b	771 b	8	8	基因组 DNA Genomic DNA	100	Koprivova <i>et al.</i> , 2002
Des 6	片段 Fragment	900 b	900 b	5	5	基因组 DNA Genomic DNA	100	Girke <i>et al.</i> , 1998
Exp	片段 Fragment	412 b	841 b	10	0	cDNA	0	Schipper <i>et al.</i> , 2002
Exp	片段 Fragment	432 b	263 b	10	1	cDNA	10	Schipper <i>et al.</i> , 2002
Exp	片段 Fragment	430 b	494 b	5	4	cDNA	80	Schipper <i>et al.</i> , 2002
Exp	片段 Fragment	387 b	408 b	4	4	cDNA	100	Schipper <i>et al.</i> , 2002
Exp	片段 Fragment	616 b	282 b	5	4	cDNA	80	Schipper <i>et al.</i> , 2002
Fts Z	片段 Fragment	247 b	685 b	51	7	cDNA	14	Strepp <i>et al.</i> , 1998
Mcb	片段 Fragment	435 b	420 b	55	2	cDNA	4	Girod <i>et al.</i> , 1999

农杆菌介导法,但由于农杆菌不侵染苔藓植物而无法使用。对小立碗藓进行转化的方法主要是PEG介导法和基因枪法。第一例对小立碗藓的成功转化是利用PEG法转入抗性基因(Schaefer *et al.*, 1991),基因枪法转化小立碗藓于1995年获得成功(Knight *et al.*, 1995)。两种转化方法的转化效率是不同的,使用两种方法每次得到的转基因植株的数量基本相等。但是,PEG介导法每次需要更多的DNA(20 μg),基因枪法每次需要对材料喷射两次,每次需要1 μg 。因此,就每微克DNA的转化效率而言,基因枪法的转化率比PEG介导法的高。

利用抗性质粒转化的小立碗藓,不管通过上述两种转化方法中的那一种,得到的转基因植株一般都有3种表型:暂时抗性、弱抗性和强抗性。转基因后,有些转化株的抗性会逐渐消失;在抗性持续的转化株中,很多只能显示弱抗性,把这些突变株移到非选择型培养基中,14 d后转化株的抗性便消失,这种转化株属于非整合型,由外源DNA构建的重组体以质粒的形式存在于细胞染色体外;有很少一部分显示出强抗性,转入非选择性培养基后,抗性不消失,分子生物学分析证明:外源DNA已与基因组整合(Ashton *et al.*, 2000)。通常多拷贝的质粒插入染色体的相同位点。

6 小立碗藓基因的同源重组

基因打靶技术是研究基因功能的实用方法,它是利用同源重组将细胞的某一特定基因破坏或敲除,得到的突变型失去该基因的功能,通过这种方法,基因的功能就可以得到确定。基因打靶技术在酵母和细菌以及小鼠细胞的研究中取得了很好的效果,但是在植物中,外源DNA片段与基因组发生同源重组的频率很小,所以通常植物的基因打靶很难实现。而小立碗藓基因组很容易与外来片段发生同源重组,这就使精确的基因打靶技术在植物中的应用成为可能(Schaefer, 2002)。通过同源重组技术已获得了一些缺失某一特定功能基因的突变株。

Strepp等(1998)破坏了小立碗藓的*ftsZ1*基因。*ftsZ*是控制原核生物分裂的基因,它编码的FtsZ蛋白与微管蛋白结构上有相似的特点。在小立碗藓中*ftsZ1*存在于核基因组中,控制叶绿体的分裂。野生型小立碗藓每个细胞中大约有50个叶绿体,而敲除了*ftsZ1*的小立碗藓细胞中含有一个大的叶绿体,从而证明了*ftsZ1*在叶绿体分裂过程中的作用。

由腺苷5'-磷酸硫酸盐降解酶催化的腺苷5'-磷酸硫酸盐(APS)的降解是高等植物中硫酸盐消化的关键步骤。有人提出,在植物中还存在着磷酸腺苷5'-磷酸硫酸盐(PAPS)支路,但其相关酶磷酸腺苷5'-磷酸硫酸盐降解酶是否在植物体中存在并不能确定。Koprivova等(2002)利用同源重组技术将小立碗藓中编码腺苷5'-磷酸硫酸盐降解酶的基因破坏,使其不能正常转录,酶活性完全丧失。结果发现,转化得到的植株仍可利用硫酸盐作为惟一硫源。结果证明了PAPS支路在小立碗藓中的存在。

26S蛋白酶体是泛素介导的蛋白质降解途径中的主要蛋白酶,MCB₁是蛋白酶体的一个亚基。26S蛋白酶体存在于所有真核生物,而其功能尚待阐明。敲除MCB₁基因的酵母并不表现出表型上的突变,而小鼠则表现出胚胎阶段致死(Kawahara *et al.*, 2000)。Girod等(1999)敲除了小立碗藓的MCB₁基因,结果表现为其轴丝体不能发育成芽和配子托。

7 表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)在小立碗藓中的应用

表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)是通过对随机挑选的cDNA克隆进行3'端或5'端

的测序鉴定出该cDNA中一单边的序列,一般长度为300~500 bp。近年来,ESTs数据库的发展十分迅速,公共数据库中可查到的关于小立碗藓的ESTs已达67 000条,来自不同组织的cDNA代表了小立碗藓整个生活史的基因表达情况(Rensing *et al.*, 2002)。

利用小立碗藓的ESTs数据库一方面可以寻找其新基因,另一方面可以通过与其他植物ESTs数据的对比,探索基因的同源性。经ABA处理的小立碗藓cDNA文库的ESTs中,有69%与已知序列有同源性,61%与植物起源的序列有明显的同源性,其中11个基因与ABA诱导基因有同源性(Machuka *et al.*, 1999)。对经生长素、细胞分裂素处理的以及未经处理的小立碗藓的富集cDNA文库进行测序,得到的ESTs表明:在15 883个可能的基因中,有9 907个与已知维管植物基因高度相似,占所分析基因总数的62%。分析还表明,66%的拟南芥基因与小立碗藓有同源性(Nishiyama *et al.*, 2003)。

ESTs数据库的建立和使用是基因组学研究的重要方法,它的特点是每次检测的基因数量大,并且可以与所作的相应处理对应起来,推测基因功能。但ESTs数据库要与其他基因组学方法(如基因芯片技术、基因全序列分析等)相结合使用才能发挥更大的作用。在小立碗藓中,很多基因组学的方法还没有得到应用。

8 小立碗藓标记突变文库(tagged mutant library)的建立

近年来,标记突变文库(tagged mutant library)已经建立,小立碗藓的基因功能可以利用标记突变文库进行研究。其主要步骤是,首先,要在大肠杆菌中构建一个小立碗藓的基因文库。小立碗藓文库是构建在适于穿梭突变的细菌质粒载体上的,插入片段大约3.5~6 kb。其次,将小转座子随机插入到小立碗藓文库,从而获得标记突变文库。通过这种处理,就可能在小立碗藓的基因内部插入片段,从而使该基因失活。最后,用突变标记文库对小立碗藓进行转化,方法是将标记突变文库中的质粒提出,并对小立碗藓的原生质体进行转化,如果转座子插入到小立碗藓的基因中,那么,转座子两端就是原来小立碗藓的基因序列,这样,转化后,同源重组就容易发生,而该基因也随之被破坏(Egener *et al.*, 2002)。

标记突变文库的建立有两种策略,一种是利用小立碗藓的基因组文库获得标记突变文库,另一种是通过cDNA文库构建标记突变文库。利用基因组文库获得标记突变文库方法的缺点是:转座子插入所破坏的并不一定是功能基因,而有可能是功能基因以外的DNA序列,这样,利用突变标记文库转化的小立碗藓突变株许多是无效的。反之,如果利用cDNA文库构建标记突变文库,由于cDNA文库同源序列的连续性差,转化效率也会降低(Cove, 2000)。表1所列的一些转化植株的同源重组率也证明了这一点。

目前,已经利用标记突变文库对小立碗藓进行转化,Egener等(2002)用转座子Tn1000对小立碗藓低频重复cDNA文库进行诱变,用所得的基因标记文库转化小立碗藓,在16 203株转化个体中有2 636株与野生型不同,占总数的16.2%。

9 展望

小立碗藓作为植物分子生物学的研究材料,有着其他材料无法比拟的优势。它容易培养,突变型易于分析,基因组容易和外源基因发生同源重组,这些特点使它成为研究基因功能的良好材料。一些成功的基因敲除和破坏也从实践上证明了这一点。小立碗藓标记突变文库的建

立为小立碗藓基因的进一步研究打下了基础。但是,由于小立碗藓是新兴的植物分子生物学模式系统,对它的研究还有很多不足之处。

首先,小立碗藓的研究平台还不完善。在国际上,并没有小立碗藓核基因组物理图谱的发表,由此可见,小立碗藓核基因组的测序工作尚未进行。核基因组包含整个植物体的全部信息,一些不转录的信息(如启动子、内含子),通过ESTs是无法研究的,但都可以在序列图中得到反映,所以,对基因组的测序是对小立碗藓基因组进行高通量研究的基础。在国内,一方面,建立分子生物学研究所必要的小立碗藓cDNA文库和基因组DNA文库是非常迫切的;另一方面,随着小立碗藓研究的广泛进行,需要利用半连续式光合自养生物反应器获得大量原生质体。

其次,对小立碗藓同源重组率高的机理的研究工作不够。现在科学家往往把精力集中在通过基因敲除研究某一基因的功能上。然而,小立碗藓的基因组只能代表所有陆生植物基因的一部分,而大量的基因并不能通过基因敲除进行研究。那么是否可以通过研究并应用小立碗藓基因同源重组率高的机理来解决这一问题呢?科学家已经开始研究小立碗藓同源重组的机理,一种与同源重组有关的蛋白RAD51的基因已经从小立碗藓的基因组中分离出来(Markmann-Mulisch *et al.*, 2002)。有的观点认为,小立碗藓的同源重组率高与其特殊的细胞周期有关(Schween *et al.*, 2003a),但这方面的工作还很有限,距离同源重组机理的说明还有相当的差距。

最后,对小立碗藓特有基因的研究较少。小立碗藓这一系统的诱人之处在于其核基因组能够高频率地与外源片段发生同源重组,实现基因打靶,这就为研究未知基因功能提供了良好的条件。但是,现在所进行的基因打靶多数集中在已知功能的基因中,对功能未知的基因进行得较少,从小立碗藓的ESTs文库的信息中,我们了解到,这种植物有很大一部分基因是特有的(Nishiyama *et al.*, 2003),与已知基因没有同源性,这些基因无疑可以丰富植物基因资源,对于植物分子生物学的发展和應用都是极有益的。

小立碗藓本身所表现出的分子生物学特点是非常诱人的,它与高等陆生植物基因的相似性更成为解决在高等植物中难以解决问题的有利工具。随着对小立碗藓这一系统的研究,小立碗藓有望成为新的分子生物学模式植物并对植物分子生物学的发展起到促进作用。

参 考 文 献

- 李登科, 吴鹏程, 1995. 小立碗藓属在中国的纪录. 植物分类学报, 33: 103~104
- 施定基, 冉亮, 宁叶, 邵宁, 杨明丽, 吴鹏程, 2001. 苔藓分子生物学的一些进展. 贵州科学, 19(4):1~5
- 贾渝, 1998. 苔藓植物的生殖生物特性. 见: 吴鹏程主编. 苔藓植物生物学. 北京: 科学出版社, 210~219
- 高谦, 张大成, 2000. 小立碗藓属. 见: 黎兴江主编. 中国苔藓志(第三卷). 北京: 科学出版社, 113
- Abel W O, Knebel W, Koop H U, Marienfeld J R, Quader H, Reski R, Schnepf E, Spörlein B, 1989. A cytokinin-sensitive mutant of the moss, *Physcomitrella patens*, defective in chloroplast division. *Protoplasma*, 152:1~13
- Ashton N W, Champagne C E M, Weiler T, Verkoczy L K, 2000. The bryophyte, *Physcomitrella patens* replicates extrachromosomal transgenic elements. *New Phytol*, 146:391~402
- Ashton N W, Cove D J, 1977. The isolation and preliminary characterization of auxotrophic and analogue resistant mutants in the moss *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet*, 154:87~95
- Ashton N W, Grimsley N H, Cove D J, 1979. Analysis of gametophytic development in the moss *Physcomitrella*

- patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants. *Planta*, **144**:427~435
- Courtice G R M, Aston N W, Cove D J, 1978. Evidence for the restricted passage of metabolites into the sporophyte of the moss, *Physcomitrella patens*. *J Bryol*, **10**:191~198
- Cove D J, 2000. The moss, *Physcomitrella patens*. *J Plant Growth Regul*, **19**:275~283
- Cove D J, Knight C D, 1993. The moss *Physcomitrella patens*, a model system with potential for the study of plant reproduction. *Plant Cell*, **5**:1483~1488
- Cove D J, Knight C D, Lamparter T, 1997. Mosses as model system. *Trends Plant Sci*, **2**:99~105
- Egener T, Granado J, Guitton M C, Hohe A, Holtorf H, Lucht J M, Rensing S A, Schlück K, Schulte J, Schween G, Zimmermann S, Duwenig E, Rak B, Reski R, 2002. High frequency of phenotypic deviations in *Physcomitrella patens* plants transformed with a gene-disruption library. *MBC Plant Biology*, **2**:52~61
- Engel P P, 1968. The induction of biochemical and morphological mutants in the moss *Physcomitrella patens*. *Am J Bot*, **55**:438~446
- Girke T, Schmidt H, Zähringer U, Reski R, Heinz E, 1998. Identification of a novel D6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant J*, **15**:39~48
- Girod P A, Fu H Y, Zr?d J P, Vierstra R D, 1999. Multiubiquitin chain binding submit MCB1 (RPN10) of the 26S proteasome is essential for developmental progression in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, **11**:1457~1471
- Grimsley N H, Ashton N W, Cove D J, 1977. Complementation analysis of auxotrophic mutants of the moss, *Physcomitrella patens*, using protoplast fusion. *Mol Gen Genet*, **155**:103~107
- Grimsley N H, Withers L A, 1983. Cryopreservation of culture of the moss, *Physcomitrella patens*. *Cryoletters*, **4**: 251~258
- Hohe A, Decker E, Gorr G, Schween G, Reski R, 2002. Tight control of growth and cell differentiation in photoautotrophically growing moss (*Physcomitrella patens*) bioreactor cultures. *Plant Cell Rep*, **20**:1135~1140
- Hohe A, Reski R, 2002. Optimisation of a bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. *Plant Sci*, **163**:69~74
- Hoffman A H, Codon A C, Ivancus C, Russo V E A, Knight C D, Cove D J, Schaefer D G, Chakparonian M, Zr?d J P, 1999. A specific member of the Cab multigene family is efficiently targeted and disrupted in the moss, *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet*, **261**:92~99
- Imaizumi T, Kadota A, Hasebe M, Wada M, 2002. Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, **14**:373~386
- Kammerer W, Cove D J, 1996. Genetic analysis of the effects of the moss, *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet*, **250**:380~382
- Kawahara H, Kasahara M, Nishiyama A, Ohsumi K, Goto T, Kishimoto T, Saeki Y, Yokosawa H, Shimbara N, Murata S, 2000. Developmentally regulated, alternative splicing of the Rpn10 gene generates multiple forms of 26S proteasomes. *EMBO J*, **19**: 4144~4153
- Knight C D, Sehgal A, Atwal K, Wallace J C, Cove D J, Coate D, Quatrano R S, Bahadur S, Stockley P G, Cumming A C, 1995. Molecular responses to abscisic acid and stress are conserved between moss and cereals. *Plant Cell*, **7**: 499~506
- Koprivova A, Meyer A J, Schween G, Herschbach C, Reski R, Kopriva S, 2002. Functional knockout of the adenosine 5'-Phosphosulfate reductase gene in *Physcomitrella patens* revives an old route of sulfate assimilation. *J Biol Chem*, **277**: 32195~32201
- Machuka J, Bashiardes S, Ruben E, Spooner K, Cumming A, Knight C D, Cove D J, 1999. Sequence analysis of expressed sequence tags from an ABA-treated cDNA library identifies stress response genes in the moss *Physcomitrella*

- patens*. *Plant Cell Physiol*, **40**:378~387
- Markmann-Mulisch U, Hadi M Z, Koepchen K, Alonso J C, Russo V E, Schell J, Reiss B, 2002. The organization of *Physcomitrella patens* RAD51 genes is unique among eukaryotic organisms. *Proc Nat Acad Sci USA*, **99**:2959~2964
- Meiri E, Levitan A, Guo F, Christopher DA, Schaefer D, J P, Danon A, 2002. Characterization of three PDI-like genes in *Physcomitrella patens* and construction of knock-out mutants. *Genet Genomics*, **267**:231~240
- Nishiyama T, Fujita T, Shin-I T, Seki M, Nishide H, Uchiyama I, Kamiya A, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K, Kohara Y, Hasebe M, 2003. Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: Implication for land plant evolution. *Proc Nat Acad Sci USA*, **100**: 8007~8012
- Rensing S A, Rombauts S, Peer Y V, Reski Ralf, 2002. Moss transcriptome and beyond. *Trends Plant Sci*, **7**:535~538
- Reutter K, Reski R, 1996. Production of a heterologous protein in bioreactor cultures of fully differentiated moss plants. *Plant Tissue Cult Biotechnol*, **2**:142~147
- Reski R, 1998. Development, genetics and molecular biology of mosses. *Bot Acta*, **111**:1~15
- Reski R, Faust M, Wang X H, Wehe M, Abel W O, 1994. Genome analysis of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw) BSG. *Mol Gen Genet*, **244**:352~359
- Schaefer D, 2002. A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annu Rev Plant Biol*, **53**: 477~501
- Schaefer D, Zr?d J P, 1997. Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J*, **11**:1195~1206
- Schaefer D, Zr?d J P, 2001. The moss *Physcomitrella patens*, now and then. *Plant Physiol*, **127**:1430~1438
- Schaefer D, Zr?d J P, Knight C D, Cove D J, 1991. Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet*, **226**:418~424
- Schipper O, Schaefer D, Reski R, Flemin A, 2002. Expansins in the bryophyte *Physcomitrella patens*. *Plant Mol Biol*, **50**: 789~802
- Schween G, Gorr G, Hohe A, Reski R, 2003a. Unique tissue-specific cell cycle in *Physcomitrella*. *Plant Biology*, **5**:1~9
- Schween G, Hohe A, Koprivova A, Reski R, 2003b. Effects of nutrients, cell density and culture techniques on protoplast regeneration and early protonema development in a moss, *Physcomitrella patens*. *J Plant Physiol*, **160**:209~212
- Strepp R, Scholz S, Kruse S, Speth V, Reski R, 1998. Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc Nat Acad Sci USA*, **95**: 4368~4373
- Zank T K, Zahringer U, Beckmann C, Pohnert G, Boland W, Holtorf H, Reski R, Lerchl J, Heinz E, 2002. Cloning and functional characterisation of an enzyme involved in the elongation of Delta6-polyunsaturated fatty acids from the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J*, **31**:255~268