

新疆大学

硕士学位论文

两种短命植物与典型的C₃和C₄植物在结构及光合关键酶
定位方面的比较研究

姓名：刘彭

申请学位级别：硕士

专业：生物化学与分子生物学

指导教师：张富春

20070602

英文缩略语

BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BSC	Bound Sheath Cell	维管束鞘细胞
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide	十六烷基三乙基溴化铵
DAB	Diaminobenzidine	二氨基联苯胺
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附试验
GST	Glutathione S-transferases	谷胱甘肽-S-转移酶
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
IPTG	Isopropyl-beta-D- thiogalactoside	异丙基硫代半乳糖苷
OD	Optical Density	光密度值
ORF	Open Read Fragment	开放阅读框
PBS	Phosphate Buffer Solution	磷酸缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
RT-PCR	Reverse transcriptase-PCR	反转录 PCR
Rubisco	Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase	1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶
SDS-	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺
PAGE	Polyacrylamide gel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺
TPB	Tryptose Phosphate Broth	胰蛋白-磷酸盐

学位论文独创性声明

本人声明，所呈交的学位论文系本人在导师指导下独立完成的研究成果。文中依法引用他人的成果，均已做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

本人如违反上述声明，愿意承担由此引发的一切责任和后果。

论文作者签名：刘毅 日期：2007年5月30日

学位论文知识产权权属声明

本人的学位论文是在学期间在导师指导下完成的，知识产权归属学校。学校享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为新疆大学。

本学位论文属于：

保密 ，在 年解密后适用于本声明。

不保密 。

(请在以上方框内打“√”)

论文作者签名：刘毅 日期：2007年5月30日

导师签名：张宇 日期：2007年5月30日



中 文 摘 要

早春短命植物 (Ephemeral Plant) 因充分利用早春融雪水及春末夏初充足的光热资源快速生长, 并于干热季节来临之前, 在短短的 60-90 天内迅速完成生活史而得名。在我国仅分布在新疆北部的天山北麓和准噶尔盆地及其周围干旱的荒漠地区, 对降低沙尘暴危害、防风固沙、保护和改造生态环境起到重要作用, 并且在此类植物中蕴涵着大量具有饲用、药用及观赏价值的种类, 构成了新疆独特的、具有很高潜在利用价值的生物资源库。近年来, 短命植物光合作用效率高, 生长周期短, 生长发育快等特性, 成为科学家们研究的重点。

本文以两种典型的短命植物: 禾本科—东方早麦草 (*Eremopyrum orientale*), 十字花科—独行菜 (*Lepidium apetalum*) 作为研究对象, 同时以两种典型的 C₃ 植物: 禾本科—小麦 (Wheat), 十字花科—油菜 (*Brassica napus*) 作为对比参照, 通过制作石蜡切片观察叶片形态解剖结构、制作超薄切片观察光合作用细胞器结构、免疫胶体金技术定位光合作用关键酶——1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (ribulose-1, 5-bisphosphosphate carboxylase/oxygenase, 简称 Rubisco), 分析比较了四种植物在叶片解剖结构、光合作用细胞器、光合作用关键酶的定位等方面特征的异同, 讨论了短命植物的光合作途径。

通过石蜡切片, 在显微镜下观察叶片细胞水平, 显微结构结果显示: 东方早麦草、独行菜叶脉的导管腔大, 有利于在短时间内快速吸收和传输水分; 叶中有大型、特大型贮水薄壁细胞, 有利于贮水保水; 叶片的横切面上, 一层大型薄壁细胞整齐排列在维管束周围, 组成维管束鞘; 维管束鞘细胞内含有数量多、体积小的叶绿体, 沿维管束鞘细胞外缘呈离心分布, 形成类似 C₄ 植物的“花环结构”。这些特殊的保护结构, 是短命植物长期适应于干旱、风沙侵袭特殊的环境, 而逐渐演化形成的生理结构。

通过超薄切片, 在透射电镜下观察叶片细胞内水平, 超微结构结果显示: 东方早麦草、独行菜维管束鞘细胞中细胞器丰富; 叶绿体沿维管束鞘细胞边缘呈离心分布, 叶绿体小且基粒片层不发达; 维管束鞘细胞内含有大量淀粉粒。

这些亚细胞结构特征与 C_4 植物相似。

Rubisco 是光合作用的关键酶，本实验通过对该酶的免疫组化定位以区别 C_3 与两种短命植物的光合作用途径。

本实验应用基因工程技术制备 DNA 疫苗，免疫小鼠获得 Rubisco 大亚基抗体，与以往从植物中纯化 Rubisco 蛋白免疫动物制备抗体的方法不同。Rubisco 大亚基 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit, rbcL) 为叶绿体编码基因，序列保守且无内含子，根据已发表的早麦草 rbcL 基因序列设计引物，从东方早麦草基因组 DNA 中直接扩增 rbcL 基因，并构建到真核表达载体 pcDNA3 上制备 DNA 疫苗。同时为了提高抗体效价，将该基因构建到原核表达载体 pGEX4T-1 上制备蛋白疫苗，加强免疫小鼠。对抗体进行 ELISA 和 Western 检测，结果表明抗体效价高、特异性强，可以用作后续免疫组化研究。

用已获得的抗体对四种植物叶片中的光合作用关键酶 Rubisco 进行免疫组化定位，观察四种植物叶绿体中胶体金颗粒的标记情况：东方早麦草、独行菜维管束鞘细胞叶绿体中有胶体金颗粒标记的 Rubisco，而叶肉细胞叶绿体中几乎没有；在小麦和油菜叶肉细胞叶绿体中观察到了 Rubisco 的胶体金颗粒。结果表明：东方早麦草、独行菜两种短命植物光合作用关键酶 Rubisco 的分布与 C_3 植物不同，更接近于 C_4 植物。

关键词：东方早麦草，独行菜，显微结构，超微结构，免疫胶体金定位，Rubisco，rbcL 基因

Abstract

Ephemeral plant is a special plant species which is able to make full use of melting snow water and spring rainwater, as well as the illumination and heat resources, to start and soon finish a life cycle within 60-90d before hot summer season is coming. They distribute only in the north of Tianshan mountain, Jungar Basin and the surrounding arid desert area of Xinjiang province, China, and therefore play important role in reducing sand storm, wind-breaking and sand-stabilizing, protection and improving ecological environment. Moreover, there have a large amount of species which are valuable in feeding, medicinal and decorative purpose, so ephemeral plants consist of the biological resource pool with unique and very high potential value for utilization. Recently, the characteristics of high photosynthesis efficiency, short life cycle, fast growth and development of the ephemeral plants have already become a hot research field for biologists.

We choose two ephemeral species and two C₃ plant species as materials: *Eremopyrum orientale*, *Lepidium apetalum*, *Brassica napus* and Wheat cultivar. Several experiments and research work on microstructure, ultrastructure and immunogold localization showed the characters of the four plants on anatomical structure, photosynthetic cellular organelle and the localization of photosynthetic key enzyme, then compared the differences between ephemeral plants and C₃ plants, finally discussed the pattern of photosynthetic carbon metabolism of ephemeral plants.

The cellular structure of leaves was observed under light microscope by using paraffin section technique. The results showed that the tracheary element in vein of *Eremopyrum orientale* and *Lepidium apetalum* are bigger than another two C₃ plant species, and this wide tracheary element is available for rapid absorption and transportation water in short time. The major water-storing parenchymatous cells

which are making for keeping water can be observed in mesophyll of ephemeral plant. There are lots of small chloroplasts in bundle sheath cells(BSC) around vascular bundle. For these chloroplasts distributing along the edge of BSC, it looks like a wreath, so called "Kranz type" which is the typical structure of C₄ plant. Above-mentioned special physiological structure of ephemeral plant is formed for adapting to the environments in arid and wind-striking area in long period of evolution.

The anatomic structure was observed under transmission electron microscope (TEM) by using resin ultra-thin cross-section technique. The results of ultrastructure indicated that the cellular organelle in BSC of two ephemeral plant species were more abundant than that of another two C₃ plants. The grana lamellae in chloroplast in BSC of ephemeral plants are underdevelopment. And a lot of starch grains are presented in BSC of ephemeral plants.

Because Rubisco is a key enzyme in photosynthesis, immunolocalization of Rubisco in C₃ plants and two ephemerals was determined to distinguish their difference.

Difference from the way reported previously to obtain antiserum with which ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (Rubisco) is purified from plant and then immune animal, eukaryotic expression vector of genetically engineered gene was used for preparation of antiserum against Rubisco in present study. Because Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcL) which is encoded by chloroplast genes has high homology with other close-related species and have no intron, so it can be directly amplified from *Eremopyrum orientale* genomic DNA based on published sequence of *Eremopyrum rbcL*. *RbcL* was constructed in eukaryotic expressed vector-pcDNA3 to prepare DNA vaccine, and was constructed in prokaryotic expressed vector-pGEX4T-1 to prepare purified protein for strengthening effect. ELISA and Western results showed that the potency and

specificity of antiserum were high and suitable for immunolocalization.

The above antiserum against *rbcl* was used to locate the Rubisco in leaves of four plants through immunogold localization. Inspection under ultramicroscope showed that the distribution of immunogold particles was markedly difference between C_3 plants and ephemerals. In *Brassica* and Wheat, stroma of mesophyll chloroplasts was densely labeled with immunogold particles for Rubisco. In *Eremopyrum orientale* and *Lepidium apetalum*, stroma of mesophyll chloroplasts was scarcely labeled with immunogold particles, indicating a low Rubisco content in mesophyll chloroplasts, but the stroma of chloroplasts of BSC was densely labeled with immunogold particles for Rubisco. These results showed that the distribution of key photosynthetic enzyme-Rubisco in two ephemeral plants is different from C_3 plant but similar with C_4 plant.

Key Words: *Eremopyrum orientale* , *Lepidium apetalum* , microstructure ,
ultrastructure, immunogold localization, Rubisco, *rbcl*

第一部分 文献综述

第一章 C₃与 C₄植物光合作用代谢途径研究进展

绿色植物的光合作用是将 CO₂ 和 H₂O 合成为有机物（主要是糖）。这一过程中 CO₂ 的固定还原即碳的同化，主要有 C₃ 途径（卡尔文循环）和 C₄ 途径^[1]。具有 C₃ 途径和 C₄ 途径的植物就分别叫做 C₃ 植物和 C₄ 植物。从植物体的解剖构造、生理活动、区别碳代谢途径的方法等方面来阐述 C₃ 植物和 C₄ 植物的差别，结合当前对 C₃ 植物与 C₄ 植物的研究进展，进一步分析 C₄ 植物具有较强光合效率的内在因素及其在生产、科研中的合理利用。

1. C₃与 C₄植物的概念

植物在光合作用中仅以卡尔文循环固定同化碳素（CO₂），最初产物是 3-磷酸甘油酸，这种 CO₂ 的固定还原途径叫做 C₃ 途径^[1]。在这条途径中植物以叶绿体中的 1, 5-二磷酸核酮糖（简称 RuBP）为 CO₂ 受体，在 RuBP 羧化酶催化下合成为 3-磷酸甘油酸。所生成的 3-磷酸甘油酸再经还原再生等一系列反应，最终合成为有机物（糖）并重新生成 RuBP^[2]。

具有这种途径进行光合作用同化碳素的植物就叫 C₃ 植物，如小麦、水稻、大豆等大多数植物。

另一类植物在固定同化碳素时，除卡尔文循环以外，还有一条以草酰乙酸（四碳化合物）为最初产物的碳素同化途径。在这条途径中植物是以叶绿体中的磷酸烯醇式丙酮酸（简称 PEP）作为 CO₂ 受体，在 PEP 羧化酶催化下，将 CO₂ 固定并合成为草酰乙酸^[2]。

具有这种途径固定同化碳素的植物就叫 C₄ 植物，如玉米、高粱、甘蔗等植物。

2. C₃与 C₄植物的区别

2.1 C₃与 C₄植物的解剖特征

C₄植物叶脉维管束都有发达的维管束鞘，外侧密接一层成环状或近于环状排列的叶肉细胞，组成明显的内外两层，内层是维管束鞘细胞，其外层是整齐排列的叶肉细胞。C₄植物叶片的维管束鞘薄壁细胞较大，其中含有许多较大的叶绿体，特称为“花环结构”(Kranz type)，这种结构是C₄植物的特征^[2]。维管束鞘薄壁细胞中叶绿体比叶肉细胞的叶绿体大，常没有基粒或基粒发育不良，光系统 II 较少，主要可进行环式光合磷酸化反应。而 C₃植物叶脉维管束鞘不发达、维管束鞘薄壁细胞较小、细胞小、不含叶绿体或含有很少叶绿体，维管束鞘周围的叶肉细胞松散，没有“花环结构”。C₄植物的叶绿体除维管束鞘细胞的较特殊外，其一般叶肉细胞内的叶绿体与 C₃植物叶细胞内的叶绿体结构类同(但化学组成有差异)^[3]。

C₄植物和 C₃植物叶绿体中，叶绿素 a 和叶绿素 b 的比例不同，C₄植物约为 4:1，而 C₃植物约为 3:1。所以 C₄植物光合作用中心及光能利用率都比 C₃植物为高^[4]。

另外 C₄植物鞘细胞和叶肉细胞间有发达的胞间连丝，得以保持细胞间频繁的物质交流。

2.2 C₃与 C₄植物的生理特征

2.2.1 C₃与 C₄植物固定 CO₂的羧化酶不同

C₄植物叶肉细胞中有一些特有酶，如磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、天冬氨酸转氨酶、苹果酸脱氢酶、磷酸丙酮酸双激酶、腺苷酸激酶、苹果酸酶等。这些特有酶的存在，是因为 C₄植物通过磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的催化作用，固定 CO₂，形成了草酰乙酸后，要进一步转移到维管束鞘薄壁细胞中脱羧放出 CO₂，在维管束鞘薄壁细胞中再经 C₃途径合成糖，并可就近输入维管束，增加了效率和 CO₂的利用率^[5]。

植物的上述脱羧过程也有三种类型：第一种类型，是草酰乙酸在叶肉细胞的叶绿体中被还原为苹果酸，再运至维管束鞘薄壁细胞叶绿体中脱羧，放出 CO_2 进入卡尔文循环（玉米、高粱、甘蔗）。

第二种类型，是草酰乙酸先通过转氨作用转变为天冬氨酸，运至维管束鞘细胞中，再通过天冬氨酸转氨酶作用，重新形成草酰乙酸。草酰乙酸在 PEP 羧激酶作用下脱羧。

第三种类型，即在叶肉细胞内形成的天冬氨酸转移到维管束鞘细胞后，经天冬氨酸转氨酶的作用形成草酰乙酸，草酰乙酸在 NAD-苹果酸脱氢酶作用下形成苹果酸，苹果酸在 NAD-苹果酸酶作用下脱羧放出 CO_2 。

而 C_3 植物没有上述酶所催化的反应，仅在叶肉细胞中通过 RuBP 羧化酶催化固定 CO_2 ，合成糖，再运至维管组织，因此运输效率比 C_4 植物低^[6]。

C_4 植物叶片的维管束鞘薄壁细胞中含有许多叶绿体，它比叶肉细胞的叶绿体大，在许多 C_4 植物中，叶肉细胞与维管束细胞中的叶绿体也不同，如野牛草、玉米、甘蔗维管束鞘细胞叶绿体内没有基粒或没有发育好的基粒，大的类囊体平行贯穿在整个叶绿体中。有些 C_4 植物维管束鞘细胞的叶绿体中有基粒，含淀粉粒，在嵴处有发达的线粒体。鞘细胞叶绿体含有正常的卡尔文循环所需要的酶。在维管束外面有排列紧密的叶肉细胞，叶肉细胞叶绿体有基粒，含有它所特有的各种酶。维管束鞘薄壁细胞与其相邻的叶肉细胞之间有大量的胞间连丝相连。现在已经明确，叶肉细胞中固定 CO_2 ，产生四碳酸，但不形成淀粉。四碳酸运至鞘细胞中发生脱羧作用，产生 CO_2 ， CO_2 再通过卡尔文循环形成 PGA 及其它光合产物。这些光合产物或是以淀粉的形式暂时贮藏在鞘细胞中，或以蔗糖的形式运至维管束中^[7, 9]。

此外， C_4 途径的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的 k_m （米氏常数）是 7 微摩尔，而 C_3 途径的二磷酸核酮糖羧化酶的 k_m 是 450 微摩尔。说明前者比后者对 CO_2 的亲合力大的多，活性较强可达后者的 60 倍。所以 C_4 植物与 C_3 植物相比在强光下光合速度增大，可积累较多光合产物，并可利用较低浓度 CO_2 。 C_4 途径与 C_3 途径的结合有力解释了 C_4 植物光合效率为什么很高。 C_4 植物最适温度为

30-40℃；而 C₃ 植物为 15-25℃^[11, 12]。

2.2.2 C₃ 与 C₄ 植物 CO₂ 补偿点不同

植物在光照下光合作用吸收的 CO₂ 量与呼吸作用释放的 CO₂ 量达动态平衡时，环境中的 CO₂ 浓度为 CO₂ 补偿点。C₄ 植物 CO₂ 补偿点是 0-10ppm CO₂，表观上没有显示出光呼吸；而 C₃ 植物 CO₂ 补偿点是 50-100ppm CO₂，表现出显著的释放 CO₂。这进一步说明 C₄ 植物可以利用低浓度的 CO₂，甚至气孔关闭时可利用细胞间隙的 CO₂ 继续生长，而 C₃ 植物则不能^[13]。

2.2.3 C₃ 与 C₄ 植物的光呼吸速率不同

C₄ 植物光合作用速度不受气相氧的浓度的影响，但是 C₃ 植物光合作用因氧存在而受到抑制。原因是 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶的双重催化反应。在 CO₂/O₂ 比率低时进行氧化反应，起加氧酶的作用，产生较多的乙醇酸使光呼吸速率增高；而在 CO₂/O₂ 比率高时催化羧化反应，抑制了乙醇酸的产生，光呼吸降低。C₄ 植物的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性较强，对 CO₂ 亲和力大，并以草酰乙酸形式将 CO₂ 运输到维管束鞘薄壁细胞中，从而增加了维管束鞘细胞的 CO₂/O₂ 的比率，有利于 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶的羧化反应，乙醇酸的产生受到抑制，光呼吸速率就非常低。而 C₃ 植物没有这方面的作用，光呼吸速率也就较高，可耗损光合新形成有机物的四分之一至三分之一。但是 C₄ 植物的光呼吸消耗很少，只占光合新形成有机物的 2-5%^[14, 15]。

农业实践和科学研究中经常需要判断某种植物是 C₃ 植物还是 C₄ 植物，结合现代的科学技术手段，检测植物的生理特征及生化指标等，从而达到区分二者的目的。

总结以上所述 C₃ 植物、C₄ 植物在光合作用以及生理各方面的差异，列表如下：

C₃植物、C₄植物的某些光合、生理特征表^[1]

特征	C ₃ 植物	C ₄ 植物
1.植物类型	温带植物	热带或亚热带植物
2.生物产量[t干重/(hm ² a)]	22 ± 0.3	39 ± 17
3.是否具有 Kranz 结构	无, 一种叶绿体	有, 两种叶绿体
4.叶绿素 a/b	2.8 ± 0.4	3.9 ± 0.6
5.主要 CO ₂ 固定酶	RuBP 羧化酶	PEP 羧化酶 RuBP 羧化酶
6. CO ₂ 固定途径	卡尔文循环	C ₄ 途径 卡尔文循环
7. 最初 CO ₂ 受体	RuBP	PEP
8. CO ₂ 固定最初产物	PGA	草酰乙酸
9. PEP 羧化酶活性 [umol/(mgChl/min)]	0.30-0.35	16-18
10.光合速率[mgCO ₂ /(dm ² ·h)]	15 - 35	40 - 80
11.CO ₂ 补偿点 (mg/L)	30 - 70	<10
12.饱和光强	全日照 1/2	无
13.光合最适温度 (°C)	15 - 25	30 - 47
14.蒸腾系数 (g 水分/g 干重)	450 - 950	250 - 350
15.气孔张开	白天	白天
16.光呼吸	多, 易测出	很少, 难测出
17.同化产物再分配	慢	快
18.干物质生产 (g 干重/ dm ² ·天)	0.5-2	4-5

3. 判断 C₃ 与 C₄ 植物光合作途径的方法

随着人类对光合途径的研究的深入, 对于不同光合碳同化途径的鉴别手段也日渐完善, 目前主要从以下几个方面来加以鉴别: 形态解剖、稳定性碳同位素、酶学研究以及 ¹⁴CO₂ 示踪。

3.1 形态解剖法

即用石蜡切片法镜检观察叶片的解剖结构, 看是否有 Kranz 结构。叶片解剖结构中不存在“花环结构”的为 C₄ 植物, 不存在的为 C₃ 植物^[16]。

3.2 稳定性碳同位素方法

用碳同位素方法鉴别 C_3 和 C_4 植物是基于这样一个原理：植物的光合途径不同，同化过程对大气碳同位素的分馏效应也不同，根据此，可以通过测定植物的 $d^{13}C$ 值来鉴别 C_3 和 C_4 植物， C_4 植物的 $d^{13}C$ 在 - 8‰ - 16‰ 之间而 C_3 植物的 $d^{13}C$ 在 - 22‰ - 35‰ 之间^[17]。

3.3 酶学研究

C_4 途径有关的酶磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶，NAD (P) 苹果酸酶，NAD (P) H 苹果酸酶，丙酮酸磷酸双激酶，碳酸酐酶等，与 C_3 植物体内的同工酶比较，活性较高^[18]。

由于 C_4 植物叶片细胞内有两种叶绿体：维管束鞘细胞叶绿体和叶肉细胞叶绿体，造成了光合作用途径中关键酶，在 C_3 和 C_4 植物叶片细胞内的分布也有所不同。例如，RuBP 羧化酶在 C_4 植物中分布于维管束鞘细胞内，在 C_3 植物中却分布在叶肉细胞中。是以造成了 C_4 植物的光呼吸只发生在维管束鞘细胞内，其叶肉细胞却不能进行光呼吸。而 C_3 植物所有的叶肉细胞都能进行光呼吸。因而通过对酶的定位的方法，也可以判断光合作用途径^[19, 20]。

3.4 $^{14}CO_2$ 示踪

$^{14}CO_2$ 示踪试验是看 CO_2 羧化的最初产物是否为 C_4 酸，即苹果酸和天门冬氨酸，如果是则为 C_4 植物^[7]。

但从环境条件对光合途径的影响来看， C_3 植物中 C_4 途径的出现，以及 C_3 - C_4 中间型的出现使得对光合途径的判断出现了复杂性，这也是用不同鉴别方法得到不同结果的原因所在。例如大萹苳菊 (*Artemisia sieversiana*) 用酶学方法为 C_3 植物^[8]，但用解剖方法则为 C_4 植物^[9]。类似的还有芨芨草 (*Achnatherum splendens*) 和白茅 (*Imperata cylindrical*)，用酶学判断为 C_4 植物^[10-11]，但用稳定性碳同位素方法鉴别则为 C_3 植物^[12]；羊柴 (*Hedy sarum fruticosum*) 根据 $d^{13}C$ 值为 C_3 植物，但在叶片中却发现有很高的 C_4 酶活性。因此今后在判断植物光合类型时一定要慎重，尽量用多种手段来验证同时综合考虑其生长环境条件。

4. C_3 与 C_4 植物光合作用的研究进展

在判断 C_3 和 C_4 植物光合作用途径方面, 已有几十年的研究历史了。近 20 年来, 免疫胶体金^[5]、荧光抗体技术^[6]由于可以进行组织定位、细胞乃至亚细胞水平定位的研究, 被应用于高等植物叶片内酶的定位, 通过判断光合作用中关键酶的位置, 以此来区别 C_3 和 C_4 植物。由于其免疫反应的试验结果又具有形态学特征, 这就显著提高了结果判断的可靠性。

了解 C_3 和 C_4 植物光合作用途径的地理分布, 对于研究植物的自然分布和生态学特性很有帮助, 也有利于开发牧草资源^[21]。对某一地区植物的光合作用途径作全面调查将有助于植物生理生态学研究 and 了解生境变化对植物群落结构和功能的影响。对于 C_3 和 C_4 植物地理分布的研究也可以为探索全球大气变化对植物种的分布的影响提供本底资料^[2]。

环境因子对 C_3 和 C_4 光合类型的地理分布、光合潜能的发挥以及光合途径之间的相互转换起着重要的调节作用, 在这些方面, 国外做了大量的研究^[22-25]。但是, C_4 光合途径有其适宜的环境条件和地理分布范围, 表现出极大的环境调控性, 其只适应于特定的环境条件, 否则高光效就消失。另外, 植物的光合碳代谢途径并不是一成不变的, 而是受环境条件的影响, 甚至在同一地点的不同生长时期, 光合途径都会发生转变, 或者不同类型光合酶的表达强度因环境因子的变化而改变^[26-28]。

明确环境因子对光合类型的调控可以帮助理解不同光合类型植物之间出现的差异。研究认为 C_4 光合作用应发生在气候炎热、光照强烈的干旱环境下^[13-14]。但 Sage 等^[15]认为这种观点过分强调了干旱的控制作用, 他认为 C_4 植物生长有两个最基本的要求: 即温暖的生长季节和适宜或者是强烈的光照, 干旱则是次要的因素。

在高光强、高温(如 25-35℃) 及干旱的气候条件下, C_4 植物的光合速率远高于 C_3 植物, 这主要是由于在这种环境下 C_3 植物光呼吸显著加强的结果^[29]。但这只是一般的规律, 从 C_4 植物的地理分布可以看到, 具有 C_4 途径的植物可以生长在范围很宽的生境中, 并且表现出相当大的光合速率差异, 它们对高温、

水分胁迫的忍耐，低蒸腾比以及潜在的高生长速率无疑是一个优点^[30]，但这些优点的显现不仅仅取决于其自身的生理生化特性，同时还受到环境因子的限制。一般来讲， C_4 植物比 C_3 植物的光合速率可以高出50%^[16]，但这种比较是不考虑其它影响光合速率因素的，包括特殊生境下的限制因子。如果考虑到环境因子的影响，其情况就变得比较复杂。

一般来说，大部分植物只利用一种光合模式，水稻和玉米的叶片分别是 C_3 和 C_4 途径的典型^[17, 18]。但环境因子影响着一些植物光合装置的表达，一个很好的例子就是CAM途径在一些普通浆液型植物中的出现，例如松叶菊属的 *Mesembryanthemum cryostallinum*；以及一些淹水植物，例如轮叶水草(*Hydrilla verticillata*)。在前者，由 C_3 途径向CAM途径的转变是由NaCl胁迫引起的^[19]，而在后者，从 C_3 途径向 C_4 途径的转变则是由于水环境使 CO_2 受到限制^[20, 21]。因此，对于某些植物种来说，在 C_3 、 C_4 光合途径之间是很难找到一条截然分明的界限。

长期以来，人们一直希望能通过分子生物学和基因工程的方法，将 C_4 光合特性导入 C_3 植物以提高它们的光合效率，传统的有性杂交是首选的方法，但成功的例子很有限^[22]，而且都不是农作物。在研究中发现， C_3 植物与 C_4 植物杂交后代中， C_4 光合作用的生化途径与Kranz解剖结构并非紧密连锁^[23]。许多研究结果都表明 C_4 光合作用的关键不是Kranz解剖结构，而是酶^[24, 25]。将 C_4 光合途径的关键酶转移到 C_3 植物中，有可能提高 C_3 植物的光合效率。

5. 展望

全球气候变暖和大气中 CO_2 浓度升高，成为如今环境讨论的热点，而在这一环境变化下， C_3 和 C_4 植物会在许多生理方面做出不同的反应^[31, 34]。从 C_3 和 C_4 植物中，筛选出更具有竞争优势、抗高温、耐干旱以及对 CO_2 浓度反应敏感的优良植物品种，以适应21世纪大气 CO_2 浓度及温度升高的环境，已成为未来研究的重要方面^[35, 38]。

目前 C₄ 光合途径的基因工程已取得了很大的进展, 但要真正达到将 C₄ 光合途径转移到 C₃ 植物的目的还有很长的路要走^[26, 28]。当前主要存在 3 个问题, 第一, 目前大多数转基因植株的 C₄ 酶活性还远低于 C₄ 植物中的酶活性^[29, 31]。第二, 目前转基因植株都只携有单个 C₄ 基因, 在今后的工作中, 需要将不同的 C₄ 基因聚合在一起, 目前在水稻中利用有性杂交等方法聚合 PEPC 和 PPDK 两个 C₄ 基因的工作已在进行。第三, 要克服 NADP-ME 的转基因植株很快死亡的问题, 以扫除 C₄ 光合途径基因工程的最后一道障碍^[32]。

由于光合作用反映了植物的基本生理活性, 它越来越引起生理生态学界的关注, 对此的研究也将继续向更深的层次和更广的范围发展^[39, 40]。

为了攻克这些难关, 需要进一步加强植物生理学、植物分子生物学、植物基因工程和植物遗传育种等多学科的密切合作。相信在不久的将来, 对 C₃ 和 C₄ 植物光合作用途径的深入研究, 将成功地解决世界所面临的物质经济以及环境问题, 并将科学研究局面提高到一个前所未有的新水平。

第二章 早春短命植物研究进展

1. 早春短命植物生物学特性

1.1 早春短命植物生活史

早春短命植物 (Ephemeral Plant) 是一类生长在干旱区, 以早春融雪水启动其新的生活周期, 利用冬季融雪水及春季雨水提供的土壤湿度和一定的温度生长发育, 在炎热夏季来临之前迅速完成生活史, 并以种子形式渡过不良环境的一年生草本植物^[41, 42]。新疆特殊的内陆荒漠气候造就了这样一类具有特殊生态型的植物类群——新疆早春短命植物, 它们生活于极端干旱严酷的自然环境中, 但具有生长发育快、光合效率高、繁殖率、结实性极强、利用早春融雪水启动萌发、生长周期短等特性^[43, 44]。

短命植物又称短营养期植物、短期生植物。短命植物又分为两种, 它包括当年完成其生活周期、整个植株干枯死亡, 来年春季再由种子形成新个体的一年生短命植物; 也包括植株当年生地上部分枯死, 而地下器官别处于休眠状态, 到第二年春天既可由种子繁殖新个体, 也能从地下芽生长出新植物体的多年生短命植物。前者称为短命植物, 后者叫做类短命植物^[42]。

早春短命植物因充分利用早春融雪水及春末夏初充足的光热资源快速生长, 并于干热季节来临之前迅速完成生活史而得名。生活周期一般只有两个月左右, 更短的约一个半月, 最多的也仅仅两个半月。它们常常是新疆北部乍暖还寒的早春三月底到四月初发芽生长, 四月到六月花开果熟, 随即植株枯死而完成生活史。早春短命植物一般都较矮小, 株高往往是 5-30cm。它们花果繁多, 即使某些植株高度仅 2-5cm 的矮小植物也是结果累累。多年早春类短命植物中, 多数种都具鳞茎、根茎、块根等地下器官。在同一地区, 不同年份则有截然不同的景观, 如冬春雨雪风声年份, 早春短命植物生长茂密, 季相鲜明, 五彩缤纷, 能形成层片; 相反遇到干旱年份, 种群多度则大为降低, 季相也单调贫乏, 总之, 各种生态因子对早春短命植物生长发育的影响十分敏感, 这是长营养期植物远远不能比拟的^[45]。

1.2 早春短命植物的地理分布

早春短命植物是古地中海退却以后,在其南部裸出地区,由干热植物区系衍生出来的植物群^[45, 47]。是第三世纪末第四世纪初,适应干热环境才大量发育成的较为年轻的植物群。它们主要分布于中亚、准噶尔、地中海沿岸地区、西亚、前亚及北非等地,并以中亚为分布中心。而我国只新疆北部分布,也即是这个类群分布区的最东端,准噶尔盆地东缘即是其最东的界线^[48, 49]。

新疆北部的天山北麓和准噶尔盆地及其周围地区,因主要受西风带、其次是北冰洋水汽这两个气团的影响,形成冬春多雨雪、夏季干热的自然环境,是早春短命植物在该地区比较集中分布的主要原因^[50, 53]。

新疆短命植物区系的组成共有短命植物和类短命植物 232 种,短命植物 152 种,类短命植物 80 种^[54, 55]。隶属于 97 属 27 科,分别占新疆植物区系总科数的 25%,总属数的 14%以上,几占全部种类的 6.5%。其中,双子叶短命植物有 153 种,约为单子叶种类的 3 倍;一年生短命植物的多样性高于多年生的种类,前者约为后者的 1.5 倍,是构成新疆短命植物物种多样性的主体。以科论,物种多样性最大的科依次是百合科、十字花科、紫草科、菊科、伞形科及禾本科。这 6 个大科所含物种约占新疆全部短命植物的一半以上,成为这类植物区系物种多样性的重要支柱^[56]。从属、种数和所涉及的科数不难看出,短命植物不仅是新疆植物区系的重要组成,它本身也是一类物种多样性比较丰富的独特植物类群^[57]。

尽管短命植物的分布地域有限而且生活周期短暂,但它们其中的很多种类是早春的优良牧草、观赏花卉和药用植物,为分布区的早春带来了繁荣的地貌特征。

2. 新疆早春短命植物的生物学意义

在此类植物中蕴涵着大量具有饲用、药用及观赏价值的种类,构成了新疆独特的、具有很高潜在利用价值的生物和基因资源库^[63]。对于此类植物的及早

研究和开发利用将对提高干旱区农业生产效率，以及生态环境的保护和改造具有重要意义^[64]。

2.1 群落学意义

新疆的短命植物总是或多或少地出现在某些植物群落之中，所以我们更加强调它的群落学意义^[64]。在新疆北部的莫索湾沙区，短命植物种类占白梭梭群落全部种类组成的35%，占梭梭柴群落的45%。白梭梭群落的春季投影盖度中，短命植物占25%至30%；在梭梭柴群落的草本层盖度中，短命植物的分盖度通常大于50%，最高达80%至90%。在黄土母质上的蒿类荒漠和草原化蒿类荒漠中，短命植物的盖为35%至45%，高者可达45%至55%。春季，白梭梭群落地上部分绿色产量的风干重，每亩为21.9公斤，其中短命植物的产量有12.7公斤，占地上部分绿色总产量的58%。在天山北坡低山带蒿类和草原化蒿类荒漠的春季产量中，短命植物的产量分别可占42%和75%。可见，短命植物在某些植被中的群落学意义是十分重要的。

2.2 资源价值

短命植物的资源价值至少有以下几个方面。

2.2.1 饲用 有关分析资料表明，短命植物中的营养比较丰富^[65]。短命植物的粗蛋白质含量平均为10%左右，无氮浸出物50%左右。其中，豆科短命植物的营养价值最高，9种豆科植物的粗蛋白质平均含量达11%以上。乌兹别克斯坦的资料介绍，一公斤丝叶芥、菘蓝、蝎尾菊等短命植物的干草中，含可吸收蛋白131—151克。充分证明，短命植物是一类富含营养的饲用植物资源。同时适口性良好。短命植物均系草本，质地柔软、营养价值较高。除毛茛科、大戟科、唇形科和十字花科等少数植物具有异味或有毒外，其它绝大多数种类均为各类家畜所喜食，是荒漠区天然草地中的一类优良牧草。特别是早春季节，当其它牧草植物尚未萌发、返青，天然草地可饲草严重贫乏、家畜日不饱腹时，短命植物的率先登场，更倍受家畜的青睐。在家畜季节轮牧中占有重要地位。新

疆60%至70%的家畜完全或主要依赖在天然草地上采食野生牧草，获得生长发育所必需的营养物质，进行动物性生产，是一个以季节轮回利用天然草地为基本特征的草原畜牧业地区。然而，在新疆北部地区，天然草地资源的季节分配不平衡，特别是冬草资源严重不足，与漫长的冬季构成明显反差。家畜的夏壮、秋肥、冬瘦、春死现象，即是对这种不利自然条件的客观反应。经过漫长冬季的煎熬之后，家畜带着消瘦的躯体来到春场时，适逢短命植物萌发、吐绿之时，它们便成为家畜的主要采食对象，对恢复家畜体膘和提高幼畜的成活率具有重要意义。试验证明，在短命植物发育良好的春场上放牧的羔羊，成活率高达100%，对照仅有85%；试验群母畜的体重较对照平均增重5公斤，羔羊平均增重3公斤。短命植物在新疆畜牧业和季节草地轮牧中的重要性是显而易见的。

2.2.2 药用 新疆的短命植物中有许多能够治病或含有药用成分的种类，如郁金香、菘蓝、阿魏、元胡、小天仙子、贝母、遏蓝菜等。其中，贝母是新疆一种重要的中药材，现已知有9种贝母，年收购量高达200多吨。其个体大、有效成分高、未受污染，在国内外中药材市场上享有很高的声誉。另外，阿魏是新疆独具特色的药用植物，有6种阿魏被《新疆药用植物志》(1997)记载，其中新疆阿魏和阜康阿魏已收录于我国的药典之中^[66]。

2.2.3 观赏 3月下旬的新疆北部，寒意未尽，绝大多数植物还没有完全从冬眠中苏醒的时候，少数短命植物即顶冰而出，成为拥抱春天最早的植物。它们之中的多种郁金香、鸢尾蒜、疏齿千里光、婆罗门参、角茴香、贝母、顶冰花、阿魏等，花期早、颜色鲜艳、花型美观，颇具观赏价值，可引种栽培，有助于解决干旱地区早春陆地花卉短缺的状况。其中，开有多花的郁金香，垂吊且花大的贝母和花型别致、花色蓝紫的鸢尾蒜等，则可直接引种扩繁，在城镇绿地、居民庭院和公园花圃中栽种，把人类的生活环境装点得更加美丽^[67]。

2.2.4 育种 短命植物是一类光合效率高、物质积累快、营养周期短的植物资源。一种大型阿魏的茎生长，一昼夜可以伸长17厘米，在酷热的夏季到来之前，它

的花期业已结束，株高1米以上，直径达到10厘米即其例。人类可以应用高科技手段研究、利用这一潜在遗传资源，培育生长期短的粮食作物、蔬菜、牧草、花卉新品种，在育种上具有很大价值^[66]。

3. 早春短命植物研究现状

短命植物类群具有很多独特而鲜明的生物学、生理生化及分子生物学方面的优异性状，但目前还未见这些方面的研究报导，这在某种意义上正阻碍着短命植物的开发利用。

受到短命植物在分布上的局限性，近年来国内外的研究仅限于以下领域：短命植物的区系成分、生态习性的研究^[66, 68]；某些短命植物种子萌发特性及种子分布的时空格局^[69, 70]；果实多态性的研究^[71, 74]；不同播期和水分胁迫对短命植物的影响^[75]；营养器官的解剖结构^[76, 81]；几种短命植物的胚胎学研究^[82, 84]；花蜜腺的解剖结构^[85, 86]；豆科短命植物结瘤固氮特性的研究^[87]等方面。

一年生早春短命植物的生活周期一般只有两个月左右，每年3月底或4月初开始萌发生长，4-6月开花、结果，随即完成生活史^[41, 42]。由于它们常常利用荒漠在早春较多的雨雪水迅速完成生活史以避免夏季干热的环境，因此一些学者通过研究认为短命植物基本上不具备或少有典型旱生植物的结构特点，属于逃避干旱和严酷生境的植物类型^[44, 46]，但通过前人的研究发现，短命植物在某些生理生化途径有自己非常独特的一面。

周桂玲和于喜凤等^[77, 81]对大量短命植物营养器官的解剖学研究发现，有多种短命植物叶片为等面叶，上下叶面均含栅栏组织，而且在其维管束鞘中含有大量的叶绿体，具有C₄高光效植物的结构，这些结构特征为其高光效性提供了物质基础。

短命植物长期适应早期湿润、后期干旱的特殊生境，即演变成为这种结构简单、光合效率高、生长发育快，具有一定耐旱结构特征的植物^[88, 89]。这种独特的生理结构和它独特的生理机能之间到底有着怎样的关系，引起了科学家们

的广泛注意。

关桂兰等^[87]对豆科短命植物弯果葫芦巴根瘤菌固氮特性的研究发现：弯果葫芦巴的根瘤生存于荒漠贫瘠土壤中，在低温（低于 9°C，其它的根瘤菌在低于 20°C 时活性急剧下降）、干旱（土壤湿度 10%左右）条件下仍能有效固氮，而在适宜条件下则表现出更高的固氮活性。不仅如此，在该菌体中还存在着吸氢酶体系（多数其它种类无此体系），能够使固氮过程中释放的 H₂ 循环再利用，增加蛋白质的含量。

由于短命植物必须在很短的时间内完成生活史，因此它的结构相对较简单，分化程度浅，木质化程度较低，相对的蛋白质含量较高，因此多种短命植物均为早春牧草的优良后选草种。

种子萌发习性及其结构特点反映出一种植物的生存环境及种群繁衍的特性，而短命植物的种子的萌发特点在此方面的更为突出。根据前人的研究结果已部分揭示出早春短命植物在种子萌发特性方面与其生存环境及种群繁衍之间的相关性。

4. 新疆早春短命植物的研究前景

近年来专家们发现，生长在准噶尔盆地的 200 多种“短命”植物能明显降低当地沙尘暴发生的频率和强度。多年来一种很奇怪的现象引起了生态专家们的注意：同样是荒漠地带，可新疆准噶尔盆地无论沙尘暴发生的频率还是强度，都要比我国其他沙尘暴源区小得多。经专家研究发现，准噶尔盆地沙尘暴危害降低的一个主要原因是短命植物生活在那里。在沙漠化日益严重的今天，短命植物有望成为治沙前线的主力，利用短命植物解决沙尘暴危害，无疑为人类带来了福音。因此，必须要彻底摸清短命植物的生态适应机制与生态效应，才能更好的利用短命植物改造环境^[90, 94]。

短命植物的快速生长及高光效等性状是对当前短命植物研究的一个热点，所以很多研究人员首先都对短命植物的生理解剖结构进行研究，发现很多短命

植物的叶片解剖结构非常类似于 C_4 植物,这给今后的研究方向一个很好的提示^[95, 97]。从目前的研究结果来看,还不能确切的判断短命植物到底属于哪一种光合代谢途径,到底是属于 C_3 植物, C_4 植物,还是居间种类,都有待于进一步的研究,摸清短命植物的光合代谢途径为研究其生长机制奠定基础^[98, 100]。

深入研究短命植物的快速生长及高光效等性状的及分子生物学机理进行,最终寻找到控制这些过程的相关基因,从分子角度和基因水平探讨生命内部原因,为新疆早春短命植物的开发利用提供进一步的理论依据,并对短命植物这一优异基因资源库的深层次的利用奠定坚实的基础。

第三章 本研究的目 的及意义

早春短命植物作为新疆独特的生物资源受到了科学家们的注意，成为研究热点。十字花科、禾本科、百合科、紫草科、菊科及伞形科这 6 个大科所含短命植物的物种约占新疆全部短命植物的一半以上。本研究选择十字花科、禾本科中典型的两种短命植物——独行菜和东方早麦草作为实验材料进行研究。独行菜分布非常广泛，其茎、叶营养丰富，含有丰富的 V_A 、 V_C 、 V_{B2} 、铁和钙；种子含脂肪油、芥子油甙、蛋白质、糖类、生物碱、黄铜类、挥发油等。在中药上称为葶苈子，有止咳平喘、行水消肿的功能。常作为香辛料和药用栽培。东方早麦草在准噶尔荒漠盆地中分布广、可形成单优层片，单位面积生物量高，粗蛋白、粗脂肪含量与其它植物相比含量高而居突出地位，因而在早春短命植物群中，可以作为荒漠区畜牧业解危济困的理想牧草资源。

前人对短命植物的营养器官解剖研究结果表明，短命植物具有“花环结构”的叶片生理形态解剖结构特性与 C_4 植物非常相似，这种高光效的营养结构特征，为植物个体在短期内，快速、大量、有效生成和运输有机产物及生长物质提供了物质条件及合理结构，从而造成了短命植物能在 1-2 个月的时间内迅速完成生长、开花、结果的生活周期。但是从外表形态来看，短命植物植株低矮、弱小，与典型的高大并枝繁叶茂的 C_4 植物——如玉米、甘蔗又有很大的差异。短命植物所特有的抗旱能力强、生长周期短、生长发育快、光合效率作用高等显著性状成为目前研究的热点。

本研究的目的是：通过对短命植物光合作用特性方面进行研究，从生理结构和酶学两个方面入手，比较分析短命植物与 C_3 植物、 C_4 植物的异同，探讨短命植物的光合作用途径。

本研究的意义在于：从分子学角度研究短命植物，深入探讨其异速生长机理，并为 C_3 植物中转入 C_4 基因奠定基础。

参考文献

- [1] 潘瑞炽, 董恩得. 植物生理学[M]. 北京人民教育出版社. 1979.
- [2] Downton WJS, Tregunna EB. Carbondioxide compensation its relation to photosynthetic carboxylation reaction, systematics of Gramineae, and leaf anatomy[J]. *Can. J. Bot.*, 1968, 152 (46): 207-215.
- [3] Bender MM. Mass spectrometric studies of carbon-13 variation in corn and other grasses[J]. *Radiocarbon*, 1968, 143 (10): 468-472.
- [4] Hatch MD. C₄ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, and tomy and ultrastructure[J]. *Biochimistry Biophysiology Acta*, 1987, 895 (12): 81-106.
- [5] Wang NY, Jiang DA, Hong J, Zhang F, Weng XY. Diurnal changes of Rubisco and RCA activities and their cellular localization in rice[J]. *Acta Bot Sin*, 2003, 45 (9): 1076-1083.
- [6] Hattersley PW, Waton L, Osmond CB. Insituimmunofluo rescent labelling of RuBPCase in leaves of C₃ and C₄ plants[J]. *Aust J Plant Physiology*, 1977, 175 (4): 523-539.
- [7] Craig H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide[J]. *Geochem Cosmochem Acta*, 1957, 189 (12): 133-149.
- [8] Yin LJ, Zhu L. A preliminary study on C₃ and C₄ plants in the area of Northeast Steppe and their ecological distribution[J]. *J. A ppl.E col.*, 1990, 1 (3): 237-242.
- [9] Li MR. A list of C₄ photosynthesis plants dicotyledon[J]. *Plant Physiology Community*, 1993, 29 (2): 221-240.
- [10] Yin LJ; Li MR. A study on the geographic distribution and ecology of C₄ plants in China I. C₄ plant distribution in China and their relation with regional climate condition[J]. *Acta Ecolo ica Sinica*, 1997, 17 (2): 350-363.
- [11] Yin LJ, Zhu L. A preliminary study on C₃ and C₄ plants in the area of Northeast Steppe and their ecological distribution[J]. *J.Appl.Ecol*, 1990, 1 (3): 237-242.
- [12] Wang YJ, Lu HY, Wang GA. C₃ and C₄ plants and the analyses of carbon isotopic in silicis acid of modern soil[J]. *Science Bulletin*, 2000, 45 (9): 978-982.
- [13] Taiz L, Zeiger E. *Plant Physiology*[M]. Redwood: Benjam in Cummings Publ Co. Inc, 1991.
- [14] Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. *Biology of Plants*[M]. New York: Worth Publicashers Inc, 1992.
- [15] Sage RF, Wedin DA, Li MR. The biogeography of C₄ photosynthesis patterns and controlling factors[M]. In: Sage RF, Monson RK. *C₄ Plant Biology*, San Diego: Academic Press, 1999: 313-373.
- [16] Osmond CB, Winter K, Ziegler H. Functional significance of different pathways of CO₂ fixation in photosynthesis[M]. In: *Ency clopedia of Plant Physiology. New Series, Vol 12B*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. New York, 1982, 480-547.

- [17] Imaizumi N, Usuda H, Nakamoto H, Ishihara K. Changes in the rate of photosynthesis during grain filling and the enzymatic activities associated with photosynthetic carbon metabolism in rice panicles[J]. *Plant Cell Physiol*, 1990, 124 (31): 835-843.
- [18] Langdale JA, Nelson T. Spatial regulation of photosynthetic development in C_4 plants[J]. *Trends Genet*, 1991, 114 (7): 191-196.
- [19] Winter K, Smith JAC. Crassulacean acid metabolism: current status and perspectives. In: Winter K, Smith JAC. *Crassulacean Acid Metabolism: Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*. Springer-Verlag, Berlin, 1996: pp389-426.
- [20] Bowes G, Salvucci ME. Plasticity in the photosynthetic carbon metabolism of submerged aquatic macrophytes[J]. *Aquat Bot*, 1989, 134 (34): 233-266.
- [21] Reiskind JB, Madsen TV, van Ginkel LC. Evidence that inducible C_4 -type photosynthesis is a chloroplastic CO_2 -concentrating mechanism in *Hydrilla*, a submersed monocot[J]. *Plant Cell Environ.*, 1997, 420 (20): 211-220.
- [22] Cameron RG, Bassett CL, Bouton JH, Brown RH. Transfer of C_4 photosynthetic character through hybridization of *Flaveria* species[J]. *Plant physiology*, 1989, 673 (90): 1538-1545.
- [23] Osmond CB, Björkman O, Anderson DJ. Physiological Processes in Plant Ecology. In: *Ecological Studies*[M], Springer-Verlag, New York, 1980: pp66-110.
- [24] Ernst K, Westhoff P. The phosphoenolpyruvate carboxylase (ppc) gene family of *Flaveria trinervia* (C_4) and *F. pringlei* (C_3): molecular characterization and expression analysis of the ppcB and ppcC genes[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 34 (3): 427-443.
- [25] Magnin NC, Cooley BA, Reiskind JB, Bowes G. Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranzless, C_4 -type photosynthesis in *Hydrilla verticillata*[J]. *Plant Physiology*, 1997, 115 (4): 1681-1689.
- [26] Björkman O, Nobs M, Pearcy R. Characteristics of hybrids between C_3 and C_4 species of *Atriplex*. In: Hatch MD, Osmond CB, Slatyer RO, eds. *Photosynthesis and Photorespiration*[M]. New York: Wiley-Interscience, 1971: pp105-119.
- [27] Björkman O. Adaptive and genetic aspects of C_4 photosynthesis. In: Burris R H, Black CC, eds. *CO_2 Metabolism and Plant Productivity*[M]. Baltimore: University Park Press, 1976: pp287-309.
- [28] Leegood RC. C_4 photosynthesis: principles of CO_2 concentration and prospects for its introduction into C_3 plants[J]. *Exp. Bot.*, 2002, 653 (53): 581-590.
- [29] Hudspeth RL, Grula WJ, Dai Z, Edwards G, Ku MSB. Expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic tobacco[J]. *Plant Physiology*, 1992, (98): 458-464.
- [30] Kogami H, Shono M, Koike T, Yanagisawa S, Izui K, Sentoku N, Tanifuji S, Uchimiya H, Uchimiya H, Toki S. Molecular and physiological evaluation of transgenic tobacco plants expressing a maize phosphoenolpyruvate carboxylase gene under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter[J]. *Transgenic Research*, 1994, 265 (3): 287-296.

- [31] Tanabe M, Izui K, Toriyama K. Production and analysis of transgenic C₃-C₄ intermediate *Mricandia arvensis* expressing a maize C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase gene[J]. *Plant Biotechnology*, 2000, 17 (2): 93-98.
- [32] Mann CC. Genetic engineers aim to soup up crop photosynthesis[J]. *Science*. 1999, 28(3): 314-316.
- [33] Shoichi S, Nobuhiko M, Keisuke K. Carbon metabolism in transgenic rice plants that express phosphoenolpyruvate carboxylase and/or phosphoenolpyruvate carboxykinase[J]. *Plant Science*. 2006, 283 (4): 314-316.
- [34] Zhang J, Yao FM. Simulating leaf net CO₂ assimilation rate of C₃ & C₄ plants and its response to environmental factors[J]. *Journal of Forestry Research*, 2001, 12 (1): 9-12.
- [35] Ji BH, Zhu SQ, Jia DM. A Limited Photosynthetic C₄-Microcycle and Its Physiological Function in Transgenic Rice Plant Expressing the Maize PEPC Gene[J]. *Acta Botanica Sinica*. 2004, 46 (5): 542-551.
- [36] Maria GE, Ricardo BF, Artur RT. Protein degradation in C₃ and C₄ plants subjected to nutrient starvation. Particular reference to ribulose biphosphate carboxylase: oxygenase and glycolate oxidase[J]. *Plant Science*, 2000, 153 (14): 15 - 23.
- [37] Antony B, Emmanuelle IB, Manuella C. Integration and expression of Sorghum C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase and chloroplastic NADP⁺-malate dehydrogenase separately or together in C₃ potato plants[J]. *Plant Science*. 2001, 653 (160) : 1199 - 1210.
- [38] Sakae A, Akiko M, Reina S. Overexpression of C₄ PEPC caused O₂-insensitive photosynthesis in transgenic rice plants[J]. *Plant Science*, 2002, 162 (24): 257 - 265.
- [39] 张立运. 新疆天然草场上的短命植物和类短命植物及其饲用评价[J]. *中国草原*, 1983, 8(2): 27—30.
- [40] 蒋瑞芬. 乌鲁木齐附近早春植物生物学和生态学特性的初探[J]. *植物生态学与地植物学学报*, 1992, 16(4): 354—362.
- [41] 张立运. 新疆莫索湾地区短命植物的初步研究[J]. *植物生态学与地植物丛刊*, 1985, 9 (3): 213-221.
- [42] 李学禹, 马森, 崔大方, 崔乃然. 新疆植物物种多样性的特点分析[J]. *石河子大学学报 (自然科学版)*, 1998, 2 (4): 289-303.
- [43] 任珺, 陶玲. 新疆北部短命植物的特征分析[J]. *草业科学*, 2005, 22 (5): 19-24.
- [44] 毛祖美, 张佃民. 新疆北部早春短命植物区系纲要[J]. *干旱区研究*, 1994, 11(3): 1-26
- [45] 毛祖美, 冯惠兰. 新疆短命植物区系的研究[A]: *新疆植物学研究文集*[C]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [46] 毛祖美. 早春短命植物区系特点[J]. *干旱区研究*, 1991, 9(1): 11-12.
- [47] 黄培佑. 准葛尔盆地荒漠生态类群与环境的关系[J]. *生态学杂志*, 1991, 10 (1): 6-10.
- [48] Mao ZM, Zhang DM. The Conspectus of Ephemeral Flora in Northern Xinjiang[J]. *Arid Zone Research*, 1994, 11 (3): 1-26.
- [49] Pan WB, Huang PY. The ecology of four ephemeral plants[J]. *Acta Phytoecologica Sinica*,

- 1995, 19 (1): 85-91.
- [50] 潘伟斌, 黄培佑. 四种短命植物若干生态学特性的研究[J]. 新疆环境保护, 1991, 13(3): 22-27.
- [51] 潘伟斌, 黄培佑. 四种短命植物若干生物学生态学特性的研究[J]. 植物生态学报, 1995, 19(1): 85-91.
- [52] 黄培佑. 准葛尔盆地荒漠生态类群与环境的关系[J]. 生态学杂志, 1991, 10 (1): 6-10.
- [53] 王焯. 新疆早春短命及类短命植物的物候观测[J]. 干旱区研究, 1993, 10(3): 34-39.
- [54] 李向义. 新疆短命植物根系特征与立地条件的关系[J]. 干旱区研究, 2000, 17(3): 28-34.
- [55] 吕自力, 黄培佑, 刘立等. 莫索湾 150 团沙区短命植物与小地形的关系[J]. 新疆环境保护, 1995, 17(3-4): 7-10, 27.
- [56] 中国科学院新疆综合考察队. 新疆植被及其利用[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [57] 初雨, 潘晓玲. 新疆药用资源植物及其开发利用现状[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(1): 21-23.
- [58] 李学禹, 阎平, 吴玲. 新疆沙生药用植物资源[J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(1): 54-56.
- [59] 郝金标, 张福锁, 毛达如, 等. 新疆药用盐生植物及其利用潜力分析[J]. 中国农业科技导报, 2003, 5(1): 43-48.
- [60] 潘晓玲, 皮锡铭, 高淑兰. 新疆野生花卉资源植物的研究[J]. 干旱区研究, 1995, 12(1): 48-52.
- [61] 潘晓玲, 买买提·伊明, 高淑兰, 等. 新疆野生花卉资源植物调查及引种栽培的初步研究[J]. 干旱区资源与环境, 1997, 14 (3): 90-93.
- [62] 袁萍, 姚宇红. 新疆野生花卉植物类群及其开发利用现状[J]. 新疆农业科技, 2002, 29(4): 245-246.
- [63] 崔乃然. 新疆主要饲用植物志[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1994.
- [64] 赵万羽. 新疆草地资源的劣化原因及治理对策[J]. 草业科学, 2002, 19(2): 19-22.
- [65] 满苏尔·沙比提, 阿布拉江·苏莱曼, 周俊菊. 新疆草地资源合理利用与草地畜牧业可持续发展[J]. 草业科学, 2002, 19(4): 11-15.
- [66] Amm VB, Leeuwen BV. The seed bank of three short-lived monocarpic species, *Cirsium vulgare* (Compositae), *Echium vulgare* and *Cynoglossum officinale* (Boraginaceae) [J]. *Acta Bot. Neerl*, 1983, 32 (4): 245-246.
- [67] Amm VB. Comparative germination ecology of three short-lived monocarpic Boraginaceae [J]. *Acta Bot. Neerl*, 1984, 33 (3): 283-305.
- [68] Schenkeveld AJM, Verkaar D. The distribution in space and time of Viable Seeds of some short-lived forbs on two chalk grasslands in S. Limburg[J]. *Acta Bot. Neerl*, 1983, 32 (4): 244-245.
- [69] Margaretha KB, Van RW, Theron GK. Fruit polymorphism in ephemeral species of Namaqualand: III. Germination differences between the polymorphic diaspores[J]. *Arid environ*, 1993, 24 (2): 333-344.

- [70] Margaretha KB, Van RW, Theron GK. Fruit polymorphism in ephemeral species of Namaqualand: IV. Growth analyses of plants cultivated from the dimorphic diaspora[J]. *Arid environ*, 1993, 24 (2): 345-360.
- [71] 庄重. 短命植物舟果芥形态学的研究[J]. *新疆八一农学院学报*, 1990, 13(1): 47-54.
- [72] 曲荣明, 谭敦炎, 姚红. 两种短命植物果实二型性的初步观察. 第七届全国系统与进化植物学青年学术研讨会论文集, 广州, 2002, 11: 52.
- [73] 曲荣明, 谭敦炎. 种子(果实)异型性的研究进展. *中国植物学会 70 周年学术年会论文摘要汇编*, 北京: 高等教育出版社, 2003: 215.
- [74] Steyn HM, Van RN, Van Rooyen MW and Theron GK. The phenology of Namaqualand ephemeral species: the effect of sowing date[J]. *Journal of Arid Environments*, 1996, 32 (3): 407-420.
- [75] Steyn HM, Van RN, Van RMW and Theron GK. The phenology of Namaqualand ephemeral species: The effect of water stress[J]. *Journal of Arid Environments*, 1996, 33 (4): 49 - 62.
- [76] 刘长娥, 蒋瑞芬. 短命植物三种旱麦草形态学研究——营养器官的解剖构造[J]. *新疆畜牧业*. 1995, 24 (4): 16-19.
- [77] 周桂玲, 魏岩, 阿衣吐尔汉·热依木, 谭敦炎. 8 种短命植物营养器官的解剖学观察[J]. *新疆农业大学学报*, 2004, 27 (2): 12-18.
- [78] 于喜凤, 李进. 短命植物小甘菊营养器官解剖学研究[J]. *西北植物学报*, 1997, 17 (5): 123-126.
- [79] 于喜凤, 刘瑗清. 新疆短命植物独行菜营养器官的解剖学研究[J]. *新疆师范大学学报(自然科学版)*, 1997, 16 (2): 34-38.
- [80] 于喜凤, 周志强, 焦若薇. 新疆禾本科短命植物旱麦草的营养器官解剖学研究[J]. *新疆师范大学学报(自然科学版)*, 1996, 15 (2): 51-54.
- [81] 于喜凤. 新疆菊科短命植物异喙菊的解剖学研究[J]. *生物学杂志*, 1987, (3): 8-14.
- [82] 谭敦炎, 田允温, 艾合买提. 短命植物条叶车前小孢子发生与雄配子体发育研究[J]. *西北植物学报*, 1996, 16 (2): 51-54.
- [83] 谭敦炎, 于喜凤, 田允温. 短命植物蝎尾菊的胚胎学研究: I、大孢子发生、雌配子体发育及多糖动态[J]. *新疆农业大学学报*, 1996, 19 (1): 8-14.
- [84] 于喜凤. 短命植物异喙菊胚胎学研究[J]. *新疆师范大学学报(自然科学版)*, 1997, 16 (4): 43-46
- [85] 邓彦斌, 胡正海. 十字花科植物花蜜腺的比较形态学研究[J]. *植物分类学报*, 1995, 33 (3): 209-220.
- [86] 王虹, 张富春. 药用类短命植物新疆阿魏花蜜腺的发育解剖学研究[J]. *植物研究*, 2004, 24 (4): 406-409.
- [87] 关桂兰. 新疆干旱区短命植物弯果葫芦巴结瘤固氮的研究[J]. *干旱区研究*, 1998, 5 (4): 1-6.
- [88] Steyn HM, Rooyen NV, Van RMW. The phenology of Namaqualand ephemeral species: the effect of sowing date[J]. *Journal of Arid Environments*, 1996, 179 (32): 407-420.

- [89] Steyn HM, Rooyen NV, Van RMW. The phenology of amaqualand ephemeral species. The effect of water stress[J]. *Journal of Arid Environments*, 1996, 33 (9): 49-62.
- [90] Ge XJ, Liu GJ. Studies on the Pollen Shape of *Atraphaxis* L. in China[J]. *Arid Zone Research*, 1994, 11 (4): 13-18.
- [91] Deng X, Li XM, Zhang XM. The studies about the photosynthetic response of the four desert plants[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23 (3): 598-605.
- [92] Zheng WJ, Wang S, Zhang CL. A Study on the Leaf Structure of Four Reed Ecotypes[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41 (6): 580-584.
- [93] Li RS, Yin GT, Xu HC. Photosynthetic Pathway of Three Rattan Species in South China[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46 (5): 560-564.
- [94] Wang NY, Jiang DA, Hong J, Zhang F, Weng XY. Diurnal changes of Rubisco and RCA activities and their cellular localization in rice[J]. *Acta Bot Sin*, 2003, 45 (9): 1076-1083.
- [95] Hattersley PW, Waton L, Osmond CB. Insituimmunofluorescent labelling of RuBPCase in leaves of C_3 and C_4 plants[J]. *Aust J Plant Physiology*, 1977, (12) 4: 523-539.
- [96] Osmond CB, Bjorkman O, Anderson DJ. Physiological Processes in Plant Ecology[J]. In *Ecological Studies*, Springer-Verlag, New York, 1980: pp66-110.
- [97] Ernst K, Westhoff P. The phosphoenolpyruvate carboxylase (ppc) gene family of *Flaveria trinervia* (C_4) and *F. pringlei* (C_3): molecular characterization and expression analysis of the ppcB and ppcC genes[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 34 (3): 427-443.
- [98] Magnin NC, Cooley BA, Reiskind JB, Bowes G. Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranzless, C_4 -type photosynthesis in *Hydrilla verticillata*[J]. *Plant Physiology*, 1997, 115 (4): 1681-1689.
- [99] 牛书丽, 蒋高明, 李永庚. C_3 与 C_4 植物的环境调控[J]. *生态学报*, 2004, 24(2): 308-314.
- [100] 滕胜, 钱前, 黄大年. C_4 光合途径的分子生物学和基因工程研究进展[J]. *农业生物技术学报*, 2001, 9 (2): 198-201.

第二部分 实验结果

第一章 独行菜、东方早麦草种子萌发特性及生物量初探

早春短命植物 (Ephemeral Plant, 下文简称为 EPs) 因充分利用早春融雪水及春末夏初充足的光热资源快速生长, 并于干热季节来临之前迅速完成生活史而得名^[1]。它是一类具有特殊生态型的植物类群, 主要分布于中亚、准噶尔、地中海沿岸、西亚及北非等地, 我国只新疆北部分布^[2]。尽管短命植物的分布地域有限且生活周期短暂, 其中的很多种类却是早春的优良牧草和观赏花卉^[3], 而且为分布区的早春带来了繁荣的地貌特征。

早春短命植物以独特的方式, 在夏季干早期来临之前结束生活史以逃避逆境, 这种对生境的适应性是一个非常重要的特点。而在植物的生活周期中, 种子是渡过不良环境条件的重要载体, 因此, 种子阶段对环境的反应, 是植物对环境适应性的最重要的体现^[4]。在自然生境中短命植物种子在适宜的条件下只有少部分萌发, 且在一年中具有多次萌发的现象^[5], 这是短命植物的种子长期适应环境的结果。

独行菜 (*Lepidium apetalum* Wild.)、东方早麦草 (*Eremopyrum orientale*), 均为新疆绿洲内常见的短命植物种类, 常见于路旁、沟边分布。尽管植株矮小, 但结实率极高, 分布极广。尤其东方早麦草粗蛋白、粗脂肪等生物量含量较其它早春植物高出很多, 因此作为优良的早春牧草而受到重视。

为了研究环境因素 (光、温、水等) 对早春短命植物生长、种子萌发以及后代繁衍的影响, 并最终探索其内在的生理生化及分子机制, 本实验以上两种短命植物为实验材料, 对不同生境下两种短命植物的生物学特性, 以及不同条件下两种短命植物的种子萌发特性进行了初步研究, 讨论外界环境对短命植物的影响, 试图为进一步研究短命植物光合速率相关机制提供依据。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

独行菜 (*Lepidium apetalum* Wild.)、东方早麦草 (*Eremopyrum orientale*) 种子由新疆农业大学谭敦炎教授惠赠。

对分布于新疆大学校园内的独行菜进行结实性的统计；参照黄培祐教授对东方早麦草的研究结果讨论其生物量特性。

1.2 实验方法

1.2.1 东方早麦草、独行菜种子萌发

设置三种光照条件 (0h、12h、24h)、四种温度条件 (10℃、15℃、20℃、25℃) 交叉组合，将种子放入铺有两层定性滤纸的培养皿中，用蒸馏水饱和，置于人工气候箱中，进行萌发试验。每种处理设置 3 个重复，每重复 50 粒种子。自播种日起记录两种短命植物种子：起始萌发的天数；萌发持续的天数；7d 后的萌发率。种子的萌发以胚根的出现为标志。

1.2.2 独行菜生长特性及结实性分析

在新疆大学校园内选取生长有独行菜的两种不同生境：①阳光直射、水分充足的砂石质土壤；②背光的阴坡或林荫带砂石质土壤。统计每平方米内独行菜植株的总数，并对植物的株高、分枝数、果枝长、果实数等指标进行统计。

具体测定方法：每组生境中随机选取独行菜植株五十株，测量植株的整体高度、每株分枝数、果枝长度、角果数/果枝、种子数/果实，取平均值，并计算标准误。

1.2.3 数据统计分析

应用 Excel 统计分析软件中单因素方差分析和成组数据 T 检验，对以上实验数据结果进行差异显著性分析，P 值小于 0.05 时差异性显著。比较讨论外界环境条件对两种短命植物的影响。

2. 实验结果

2.1 不同条件下的种子萌发特性

早春短命植物种子萌发时节在春季 3 月末，昼夜温差在 10~25℃之间，我们模拟春季自然环境设置了不同的温度梯度：10~25℃，以及不同的光照时间：0h、18h、24h，对两种短命植物——独行菜和东方旱麦草的种子萌发特性进行研究。

统计结果如表 1-1 所示，光照和温度对两种短命植物种子萌发的作用有着明显的差异。

相同温度下，不同光照时独行菜种子的萌发率和萌发齐性均无显著差异，即温度相同时，有无光照对独行菜种子的萌发并无影响。而在四种不同温度下，独行菜的萌发特性则表现较显著差异。当温度在测定范围内逐渐升高时，独行菜种子萌发速度加快，萌发齐性也随之提高，种子萌发率有大幅度的提高（图 1-1. a）。

东方旱麦草种子萌发情况则与独行菜不同。无论光照时间的长短，升高温度可以提高种子的萌发齐性，使种子能够在较短时间内迅速的同时萌发，但对总萌发率影响并不显著。然而即使是种子萌发的温度不同，但随着光照时间的逐渐延长，东方旱麦草种子萌发率也得到显著的提高，光照的时间越长，萌发率也就越高些（图 1-1. b）。

表 1-1 和图 1-1 结果初步看出，独行菜种子萌发率受温度影响较为显著，提高温度可以增加萌发率，受光照影响不大；而东方旱麦草种子萌发率则会随着光照时间的延长有一定的提高，却不会受到温度的影响。

虽然温度和光照的改变对两种种子的萌发影响各有差异，但是升高温度可以缩短两种种子萌发时间，提高种子萌发的齐性。

表 1-1. 两种短命植物在不同温度和光照下种子萌发特性

Table 1-1. Characteristics of Germination of Two EPs in Different Temperature and Illumination conditions.

种类	温度 ℃	光照 0h			光照 18h			光照 24h		
		始萌发 d	持续 d	萌发率 %	始萌发 d	持续 d	萌发率 %	始萌发 d	持续 d	萌发率 %
独行菜	10	4	8	72±8	4	8	76±8	4	8	78±8
	15	3	5	84±6*	3	5	86±2*	3	7	86±6*
	20	3	1	90±4*	3	4	92±6*	3	5	94±4*
	25	2	2	98±2*	2	2	98±2*	2	2	100±0*
东方旱麦草	10	6	9	30±4	6	9	56±6*	6	9	64±6*
	15	5	7	34±4	4	5	58±4*	4	7	66±6*
	20	3	7	32±2	3	5	54±8*	3	7	66±4*
麦草	25	3	5	34±6	2	9	56±8*	2	10	68±0*

*: 5%显著水平 *: 5% significant level

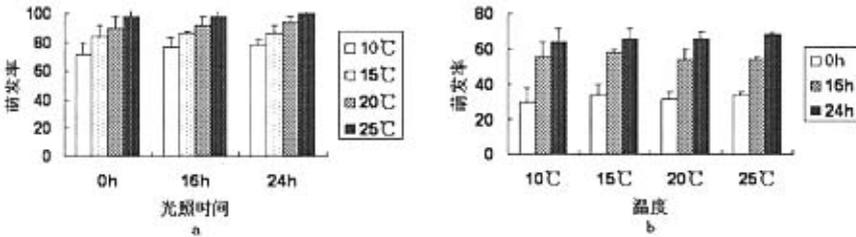


图 1-1. 不同光照和温度条件下种子萌发率。 a. 独行菜； b. 东方旱麦草

Figure 1-1. Germination Rate of Two EPs in Different Temperature and Illumination conditions. a. *Lepidium apetalum* Wild. b. *Eremopyrum orientale*

2.2 不同生境下独行菜的分布特点

在新疆大学校园内选取的两种不同的微环境：阴坡的水分状况较好，但温度和光照都要弱一些；而阳坡的光照时间长、光线充足、温度较高，同时水分的蒸发量比较高。正午 12:00 时，初步测定两种环境温度差为 3-5℃。调查结果下图所示。

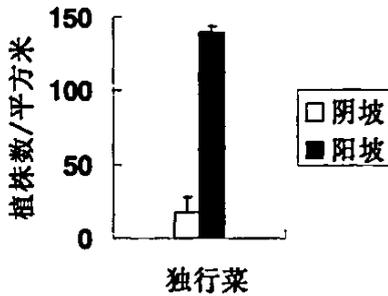


图 1-2. 独行菜在样方内的分布情况。
Figure 1-2. Plant numbers in 1m² of *Lepidium apetalum* Wild.

如图 1-2, 独行菜在两种不同生境下的分布表现出明显的差异。在个体形态方面, 阴坡植株生长状态较差, 而阳坡植物十分茂盛。

表 1-2 显示了两种不同生境中独行菜的生长状态及结实性的比较。对阴阳坡两组数据进行成组数据 t 检验的结果表明, 两种生境下植株的各检测指标差异都非常显著。在阴坡短命植物只零星分布, 平均株高偏低, 分枝少, 果枝较短, 生长状况欠佳; 而阳坡的植株生长相对繁茂, 株型较高大, 分枝数、果枝数、果实数等均远远超出阴坡植物, 发育也更加完善。

表 1-2. 两种生境中独行菜生长特性及结实性比较

Table 1-2. Characteristics of Growth and Fecundity of *Lepidium apetalum* Wild. under Two Habitats.

种类	生长环境	植株数 /m ²	株高 (cm)	分枝数	果枝长 (cm)	角果数 /果枝
独行菜	阴坡	18±5	34.4±3.1	28±4	5.9±1.1	34±13
	阳坡	140±10*	52.2±7.1*	88±8*	9.2±3.2*	49±16*

*: 5%显著水平 *: 5% significant level

2.3 东方早麦草的自然分布及其生物量

根据黄培祐教授对准噶尔盆地南缘东方早麦草分布的调查研究结果显示^[6], 东方早麦草的产草量很大, 容易形成优势的草丛, 在准噶尔盆地具有较高的饲草生产能力, 而且与其它早春短命植物相比, 含有丰富的蛋白, 是具有较高价值的早春牧草 (如表 1-3)。

表 1-3. 东方早麦草生长特性及生物量^[6]Table 1-3. Characteristics of Growth and Product of *Eremopyrum orientale*^[6].

种类	株数 /m ²	株高 (cm)	水分 (%)	占干物质含量 (%)						
				粗蛋白	粗脂肪	粗纤维	无氮 浸出物	粗灰分	钙	磷
东方 早麦草	60	30	6.24	13.46	2.04	27.25	43.78	7.23	0.26	0.23

3. 讨论

3.1 短命植物种子萌发特性与环境适应性的关系

在植物种子萌发阶段，水分起着非常重要的作用。通常新疆北部地区春季 3-4 月间的平均温度为-1.6-11.3℃，而此间的融雪水与降水量为全年最高^[10]，这一时段为短命植物萌发最集中的时间。此时的土表蒸发量较低，冬季融雪水和春季降雨提高的水分相对充沛，为短命植物的正常萌发及随后的顺利生长发育提供了自然环境的保障。从 4 月中下旬起温度不断升高，光照时间和强度不断增加，短命植物利用土壤中存留的水分快速进行生长和发育，在干旱季节来临之前迅速大量结实，完成生命周期。

本文实验中为两种短命植物——东方早麦草和独行菜的种子萌发供应充足的水分条件，在此前提下讨论温度和光照对种子萌发率的影响。由以上的结果初步分析得出：①短命植物在萌发期的主要影响因素为水分状况；②延长光照时间及升高温度会缩短种子萌发的持续时间，提高种子萌发齐性；③升高温度可以提高独行菜的种子萌发率；④延长光照时间可以提高东方早麦草的种子萌发率。

以上结果与自然条件下的情况相吻合。短命植物的高结实率和种子萌发特性适应了早春生境，又为逆境的繁衍提供了大量的种子。

3.2 短命植物结实率及生物量与生态适应性的关系

近年来许多相关研究报导：大多数短命植物具有类似于 C₄ 植物的“花环结

构”^[7-9]。这种高光效的营养结构为短命植物个体充分利用日照，短期内快速、大量、有效生成和运输有机产物及生长物质提供了物质条件及合理结构，从而造成了短命植物能在 1-2 个月的时间内迅速完成生长、开花、结果的生活周期，为短命植物在短期内完成生活史以避开干旱生境提供了物质基础^[7-8]。

从独行菜的分布和生长生殖特性的差异显著可知，短命植物种子萌发随后的幼苗生长及成株发育主要受到温度和光照的促进。尽管短命植物植株相对矮小，但每株的结实率非常高。以独行菜为例，平均株高为 40-50cm 的植株能结 2-5 万粒种子。如此大量的种子数，为种子越冬并度过逆境以供来年萌发，提供了基础。

我们在对东方旱麦草、独行菜的生长、结实特性及生物量的调查分析中发现：4 月中旬到 5 月底之间，是短命植物生长发育及植株成熟的重要阶段，此时降雨量降低，日光照射、蒸发造成土壤水分蒸发大幅度，日照时间明显延长、光照强度明显增加、温度明显升高，可见，在短命植物种子萌发后的生长及成熟时期，水分状况在其生长环境中不占主导作用，充足且长时间的日照和较高的温度条件对植物生长有非常明显的促进作用。对短命植物这种高光效及异速生长特性的探究将为提高植物光合作用效率的研究提供素材。

第二章 短命植物显微结构与超微结构研究

早春短命植物 (Ephemeral Plant) 通常被定义为一类生长发育周期短暂、利用冬春雨雪水在春末夏初迅速完成生活周期, 并以种子形式渡过不良环境的一年生草本植物^[1-3]。由于它们常常利用荒漠在早春较多的雨雪水迅速完成生活史以避免夏季干热的环境, 因此一些学者通过研究认为短命植物基本上不具备或少有典型旱生植物的结构特点, 属于逃避干旱和严酷生境的植物类型^[4-6]。

于喜风和周桂玲等^[7-9]对大量短命植物营养器官的解剖学研究发现, 有多种短命植物叶片为等面叶, 上下叶面均含栅栏组织, 而且在其维管束鞘中含有大量的叶绿体, 具有 C_4 高光效植物的结构, 这些结构特征为其高光效性提供了物质基础。短命植物长期适应早期湿润、后期干旱的特殊生境, 即演变成为这种结构简单、光合效率高、生长发育快, 具有一定耐旱结构特征的植物。这种独特的生理结构和独特的生理机能, 引起了科学家们的广泛注意。

本文以两种典型的短命植物: 禾本科——东方旱麦草 (*Eremopyrum orientale*), 十字花科——独行菜 (*Lepidium apetalum*) 作为研究对象, 同时以两种典型的 C_3 植物: 禾本科——小麦 (Wheat), 十字花科——油菜 (*Brassica*) 作为参照对象, 与以上两种短命植物作为比较。通过制作石蜡切片在显微镜下观察叶片细胞水平, 制作超薄切片在透射电镜下观察叶片细胞内水平, 进行显微结构和超微结构的解剖学研究。探讨短命植物与 C_3 植物在叶片解剖结构方面的差异。在叶片的细胞排列结构上发现: 与 C_3 植物不同, 短命植物表现出一些与 C_4 植物类似的结构特点——具有花环结构, 即, 在维管束鞘细胞中含有丰富的叶绿体。探讨细胞内水平的实验结果表明: 短命植物维管束鞘细胞中, 细胞器丰富, 叶绿体呈离心分布, 叶绿体小且基粒片层不发达, 更接近于 C_4 植物的细胞结构。

1. 材料和方法

1.1. 实验材料

1.1.1 植物材料

2005年4月底,于新疆大学校园内土壤基质、光照水分、温度都相同的生长环境条件下,采集两种短命植物——东方旱麦草、独行菜,两种C₃植物——小麦、油菜,以上四种成熟植株的叶片,作为供试材料。

1.1.2 实验试剂

切片刀,切片机,恒温箱,温台,熔蜡炉,蜡杯,酒精灯,蜡铲,展片台,解剖刀,解剖针,解剖剪,解剖盘,培养皿,吸管,镊子,单面刀片,台木,毛笔,酒精灯,包埋纸盒,染色缸,盖玻片,载玻片,玻片盘,树胶,树胶瓶,显微镜,温度计,脸盆,水浴锅。

四氧化钇、戊二醛、乙醇、各级丙酮(70%、80%、90%)、柠檬酸铅、醋酸铀、蒸馏水、环氧树脂。

PBS、BSA-PBS 封闭液。

① FAA 固定液: 福尔马林 5ml; 70%乙醇 90ml; 冰醋酸 5ml

② 1%番红: 番红 1g 溶于 100ml 水

③ 1%固绿: 固绿 1g 溶于 100ml 95% 酒精

④ PBS 缓冲液: 8g NaCl、0.2gKCl、1.44gNa₂HPO₄、0.24gKH₂PO₄, 用 HCl 调节 pH 至 7.4, 定容至 1L

⑤ 1%BSA-PBS 封闭液: pH7.0 PBS, 含 1% BSA

1.1.3 实验仪器

切片机,切片刀,温台,恒温箱,解剖刀,镊子,剪刀,解剖针,单面刀片,小台木,酒精灯,包埋纸盒,染色缸,烧杯,水盆,熔蜡炉,蜡杯。

钻石刀,镍网,蜡板,透射电镜。

1.2 实验方法

1.2.1 制作石蜡切片

取以上四种成熟植株（东方旱麦草、独行菜、小麦、油菜）的叶片，用刀片沿叶脉剪下长 3cm 宽 1.5cm 的小段，用于制作石蜡切片，观察显微结构。

① 固定 将已剪得的植物叶片材料放于针管中，吸入一定量的FAA固定液，堵住针管来回抽气，直至叶片可以沉到固定液底为止，最后连同FAA固定液放入小玻璃瓶中，静置固定24h。

② 冲洗 用70%乙醇冲洗叶片表面的固定液，换洗3次，每次0.5-2h。目的是为了将叶片材料上的FAA固定液全部冲洗掉，不影响下一步实验。

③ 脱水 80%、90%乙醇各1-2h→无水乙醇（中间换一次）1-2h。脱水的目的是由于石蜡和水是互不相溶的，使植物叶片组织材料中的水全部失掉，石蜡便可以完全浸透组织。

④ 透明（1/2无水乙醇+1/2二甲苯）中1-2h→二甲苯（中间换一次）1-2h。透明的目的在于：因为乙醇和石蜡是互不相溶的，而它们都可以和二甲苯互溶，二甲苯充当了媒介的角色。

⑤ 透蜡 放入（1/2二甲苯+1/2石蜡）的混合液中过夜，温度保持在39℃。第二天，将温度升高至60℃，再将材料放入石蜡 I、石蜡 II、石蜡 III 中透蜡各 1h。透蜡的目的是除去组织中的透明剂（如二甲苯等），使石蜡渗透到组织内部达到饱和程度以便包埋。透蜡时间根据组织的透蜡时间较长，约需1-2d。透蜡应在恒温箱内进行，并保持箱内温度在55-60℃左右，注意温度不要过高，以免组织发脆。置于恒温箱0.5h。

⑥ 包埋 将已经透蜡好的组织连同石蜡，一同倒入事先折好的纸盒中；平稳的提住纸盒的两端，放入冷水盆中，等待石蜡凝固。

⑦ 切片 将包埋的蜡块，根据其中组织材料修整，固着在木块上；在切片

机上切出连续的蜡带，厚度为8-10um。

⑧ 贴片 在载玻片中央涂少量的粘片剂，防止蜡带脱片；再粘片剂上滴一滴蒸馏水，将切下来的蜡带轻轻放在水面上，注意光面朝下；放在37℃展片台上烘烤，使蜡带服帖的粘在载玻片上，注意温度不要抬高，防止蜡带溶化。

⑨ 番红-固绿对染 切片在二甲苯中脱蜡，约30min，视切片脱蜡的程度而定→（1/2无水乙醇+1/2二甲苯）5min→经无水乙醇，95%、90%、80%、70%各级酒精各5min→1%番红水溶液染色过夜→70%、80%、90%、95%各级酒精脱水10min→1%的固绿（用95%酒精配制）染色10-40s→95%酒精洗一下→纯酒精脱水5min→（1/2无水乙醇+1/2二甲苯）5min→二甲苯5min

⑩ 中性树脂胶封藏 中性树脂胶封片，在B5 professional series(Motic)光学显微镜下观察、照相。

1.2.2 制作超薄切片

超薄切片的制作过程基本上和石蜡切片相似，需要经过取材、固定、脱水、浸透、包埋聚合、切片及染色等步骤。

取四种成熟植株（东方旱麦草、独行菜、小麦、油菜）的叶片，用刀片沿叶脉剪下长1cm宽0.3cm的小段，用于制作石蜡切片，观察显微结构。

① 取材 将取出的组织放在洁净的蜡版上，滴一滴预冷的固定液，用两片新的、锋利的刀片成“拉锯式”将组织切下并修成1mm×1mm×2mm大小长条形，然后用牙签或镊子将组织块移至盛有冷的固定液的小瓶中。如果组织带有较多的血液和组织液，应先用固定液洗几遍，然后再切成小块固定。

② 固定 固定的目的是尽可能使细胞中的各种细胞器以及大分子结构保持生活状态，并且牢固地固定在它们原来所在的位置上。组织块固定常规采用戊二醛—锇酸双重固定法。分预固定和后固定，中间用磷酸缓冲液漂洗。前固定用2.5%戊二醛固定2小时以上、后固定用1%锇酸固定液固定1-2小时，

pH7.3-7.4。固定完毕，用缓冲液漂洗 20 分钟后进行脱水。

③ 脱水 为了保证包埋介质完全渗入组织内部，必须事先将组织内的水分驱除干净，即用一种和水及包埋剂均能相混溶的液体来取代水，常用的脱水剂是乙醇和丙酮。急骤的脱水会引起细胞的收缩，因此，脱水应梯度进行：70% 丙酮 15 分钟，80% 丙酮 15 分钟，90% 丙酮 15 分钟，100% 丙酮 10 分钟（二次）。游离细胞可适当缩短脱水时间。过度脱水不仅引起更多物质的抽提，而且会使样品发脆，造成切片困难。

④ 浸透 就是利用包埋剂渗入到组织内部取代脱水剂，这种包埋剂在单体状态时（聚合前）为液体，能够渗入组织内，当加入某些催化剂，并经加温后，能聚合成固体，以便进行超薄切片。

⑤ 包埋 常规将组织块包埋多孔橡胶包埋模板中，然后置烤箱烘干，在 45℃（12 小时）、60℃（36 小时）烤箱内加温，即可聚合硬化，形成包埋块。

包埋操作中应注意：所有试剂要防潮，最好存放在干燥器中；所用器皿应烘干；）配包埋剂时，每加入一种试剂要搅拌均匀；包埋时动作要轻巧，防止产生气泡；）皮肤尽量不要接触包埋剂，以免引起皮炎；盛放过包埋剂的容器要及时用丙酮清洗干净。

⑥ 切片 超薄切片的步骤包括：安装包埋块→安装玻璃刀→调节刀与组织块的距离→调节水槽液面高度与灯光位置→调节加热电流及切片速度，切片→将切片捞在有支持膜的载网上。

⑦ 超薄切片的染色 预先取一个清洁的培养皿，将石蜡溶解制作成蜡板，然后滴数滴染液于蜡板上，用镊子夹住载网的边缘，把贴有切片的一面朝下，使载网浮在液滴上，盖上培养皿，染色 10-20 分钟。载网从染液中取出后，必须尽快用蒸馏水清洗干净。在染色过程中要尽量减少与空气的接触。

⑧ 电镜观察、拍片、记录 在透射电镜下做好观察记录，选好范围拍片。

2. 结果

2.1 显微结构比较

植物叶片结构由三部分组成：表皮、叶肉、叶脉。表皮覆盖在叶片的外表，分为上、下、表皮。叶肉，位于叶的上、下、表皮之间，叶肉细胞内部含有大量椭圆形叶绿体。上、下表皮之间的叶肉组织中的叶绿体绿色组织是光合作用的场所。叶脉，中间一个最大的为主脉。

两种 C_3 植物小麦、油菜（图 A、E）的上、下表皮以内含有栅栏细胞层数相差较大，上表皮含有 5 层细胞，下表皮含有 2 层细胞，并且栅栏组织和海绵组织有明显的分化，是典型的异面叶。

两种短命植物（图 C，图 G）上、下表皮以内均含有 1-3 层栅栏细胞，形成栅栏组织，栅栏组织和海绵组织没有明显的分化，为等面叶。

四种植物的叶绿体主要分布在植物叶肉细胞中，叶绿体沿叶肉细胞边缘分布，散布于栅栏细胞内部。不同的是，短命植物的上、下栅栏组织之间，有疏松、结构简单的类似海绵组织的细胞结构，细胞内也含有叶绿体，形状、大小和栅栏细胞中的叶绿体无多大差别。

另外这四种植物组成主脉的维管束的大小也不相同。东方早麦草、独行菜（图 D、H）叶脉外周的维管束都比较大，而小麦、油菜（图 B、F）要小一些。

短命植物东方早麦草、独行菜区别于两种 C_3 植物小麦、油菜的最重要的差异在于：植物维管束鞘细胞是否发达，其中是否含有叶绿体。

图 K、L 是典型的 C_4 植物——玉米的叶片解剖结构。图中明显可见维管束鞘细胞内含有数量多、体积大的叶绿体，为典型的“花环结构”。在东方早麦草、独行菜（图 D、H）的维管束周围，也有一层发达的维管束鞘细胞，内含较大的叶绿体，叶绿体沿细胞外缘离心排列，与 C_4 植物典型的“花环结构”类似。但是比较东方早麦草（图 I）、小麦（图 K）的叶片解剖结构，小麦叶片中的花环结构更加突出明显一些，即小麦维管束鞘细胞中叶绿体的数目更多，体积更大一些，短命植物的“花环结构”还是与典型的 C_4 植物略有不同。

显而易见， C_3 植物小麦（图 B）和油菜（图 F）维管束鞘细胞中不含有叶绿体，并无此“花环结构”。

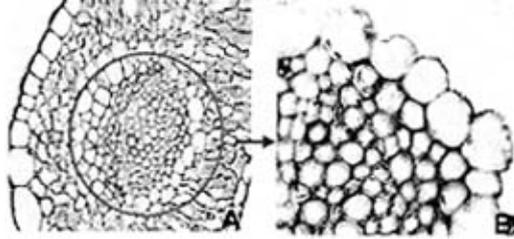


图 A. 小麦叶片横切 (10×40)

图 B. 小麦维管束横切 (10×100)

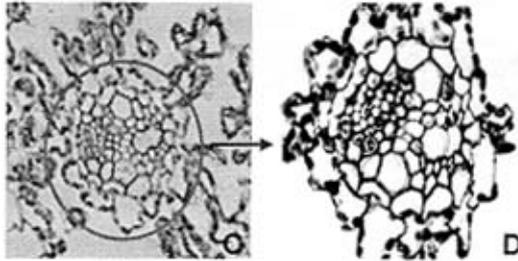


图 C. 东方早麦草叶片横切 (10×40)

图 D. 东方早麦草维管束横切 (10×100)

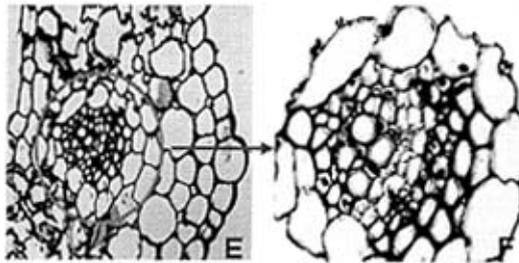


图 E. 油菜叶片横切 (10×40)

图 F. 油菜维管束横切 (10×100)

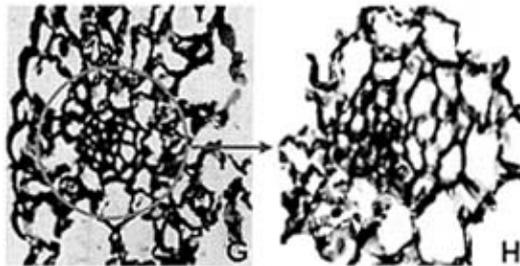


图 G. 独行菜叶片横切 (10×40)

图 H. 独行菜维管束横切 (10×100)

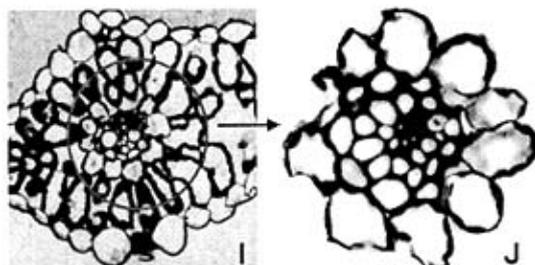


图 I. 东方早麦草叶片横切 (10×40) 图 J. 东方早麦草维管束横切 (10×100)

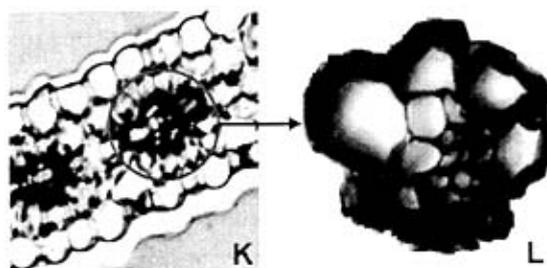


图 K. 玉米叶片横切 (10×40) 图 L. 玉米维管束横切 (10×100)

图 2-1. 植物叶片解剖结构石蜡切片

Figure 2-1. Paraffin Sectioning of Leaves of Plants.

2.2 超微结构比较

如图 2.2 所示, 透射电镜观察超微结构时, 再现了短命植物东方早麦草、独行菜 (图 A、G) 的“花环结构”。即一层大型的薄壁细胞将维管束外周包围起来, 称之为维管束鞘细胞, 细胞内含数量较多的叶绿体, 叶绿体沿维管束鞘细胞外缘呈离心排列。 C_3 植物小麦、油菜 (图 B、H) 维管束外周细胞内不含叶绿体, 并无这一特殊的结构。这一结果与图 2.1 显示的石蜡切片结果相同。

东方早麦草维管束鞘细胞、独行菜维管束鞘细胞 (图 C、I) 非常发达, 含有丰富的细胞器, 如高尔基体、核糖体、粗面内质网、光面内质网、桥粒。

另外, 东方早麦草维管束鞘细胞、独行菜维管束鞘细胞 (图 C、I), 和周围相邻的叶肉细胞间有发达的胞间连丝, 为维管束鞘细胞与叶肉细胞间进行频繁的物质交流提供了运输通道。

图中叶绿体上还分布有淀粉粒。C3 植物没有维管束鞘细胞, 小麦叶肉细胞、油菜叶肉细胞 (图 D、J) 和以上两种短命植物的维管束鞘细胞相比起来, 所含细胞器似乎并不发达。

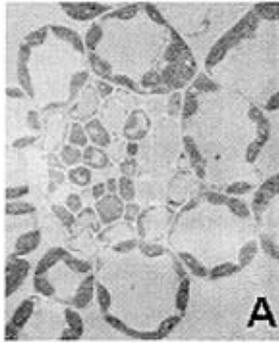


图 A. 东方早麦草维管束

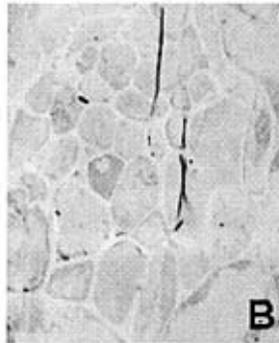


图 B. 小麦维管束



图 C. 东方早麦草维管束鞘细胞



图 D. 小麦叶肉细胞

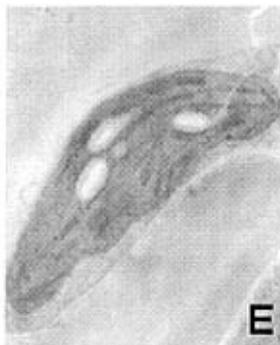


图 E. 东方早麦草维管束鞘细胞叶绿体

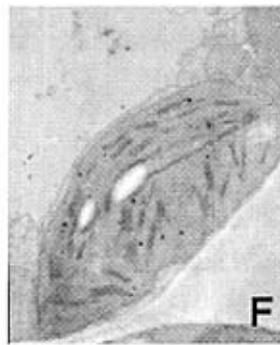


图 F. 小麦叶肉细胞叶绿体

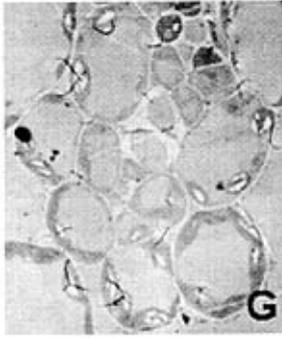


图 G. 独行菜维管束



图 H. 油菜维管束



图 I. 独行菜维管束鞘细胞

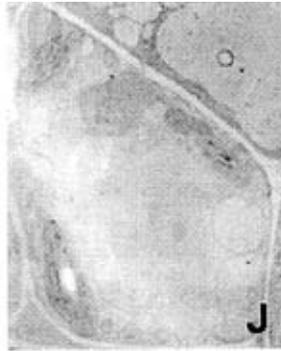
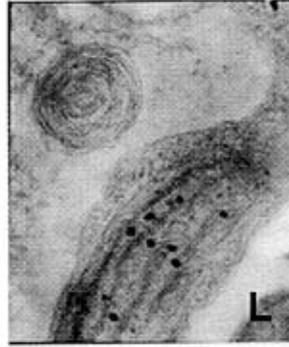


图 J. 油菜叶肉细胞



图K. 独行菜维管束鞘细胞叶绿体



图L. 油菜叶肉细胞叶绿体

图2-2. 东方旱麦草、小麦、独行菜、油菜叶片超薄切片

Figure 2-3. Ultrastructure of Leaf and Chloroplast Anatomy of *Eremopyrum orientale*, Wheat, *Lepidium apetalum* Wild. and *Brassica*.

虽然东方早麦草和独行菜的维管束鞘细胞中含有丰富发达的细胞器，并且含有叶绿体，但是东方早麦草维管束鞘细胞中的叶绿体（图 E）和独行菜维管束鞘细胞中的叶绿体（图 K）不仅体积小，而且基粒和片层都不完整、不发达。与此相比，小麦叶肉细胞中的叶绿体（图 F）和油菜叶肉细胞中的叶绿体（图 L），体积要大一些，也比较发达，叶绿体中的基粒和片层也比较完整。

3. 讨论

3.1 短命植物的结构特性与生态环境适应性的关系

新疆北部荒漠边缘的莫索湾地区属于典型的严酷的荒漠气候，但在春季及春末夏初季节，其气候条件对于一类独特的植物类群——短命植物却是十分有利的^[10]。

3月下旬到5月上旬之间，春季来临，冬季积累的雪水逐渐融化，春季降雨量增大，使得水份供应比较集中；太阳向北回归线移动，每天日照时间增长，日照强度也随之增加；同时温度也开始回升。这一时段的水分、光照、温度等条件较初春时有所升高，为短命植物在这一季节得到大量的繁衍创造了充分的环境条件，使得此时的荒漠呈现出最繁荣的景象。但到5月中旬以后，荒漠中的温度很快上升，阳光强烈，干旱少雨，在各种环境因素的胁迫下，短命植物迅速进入生殖生长期，并很快结实枯萎^[11, 14]。

以新疆莫索湾地区1959-1980年的以来平均气温和平均降水量为例，如下表 2-1. 所示：3月下旬起，月平均温度大幅度开始升高，能够提供短命植物种子萌发的条件；冬季过后积雪融化，同时加之初春的降雨也有显著的增加，使得这一季节有充足的水分提供短命植物在前期的萌发以及营养生长；随着温度升高，此间沙漠中的光照强度也达到一个很高的水平（表中未显示），据报道显示，短命植物是一类高光效的植物，它们特殊的解剖结构可以充分的利用日照，合成营养物质以供生长，并快速完成生活史。

表2-1. 莫索湾气象站1959-1980年的气温和降水情况*

Table 2-1. Temperature and precipitation condition of Mosuowan (1959-1980)

月份 Month	月平均气温 (°C) Average temperature of month (°C)	降水量 (mm) Precipitation (mm)		
		平均 Average	最大 Maximum	最小 Minimum
1	-19.2	4.0	10.1	0
2	-15.9	5.1	13.7	0
3	-1.6	8.7	23.4	0.1
4	11.3	14.1	41.5	0
5	18.8	13.9	34.2	2.4
6	24.0	10.9	32.6	0.8
7	25.6	17.6	55.5	1.8
8	23.4	12.7	25.9	0.6
9	16.8	7.6	19.9	0.8
10	7.3	8.8	28.6	0
11	-3.9	7.6	25.2	1.2
12	-14.2	6.0	17.1	0.3

*: 参考潘伟斌等 (1995) [11]。

东方旱麦草、独行菜叶脉的导管腔相应地比小麦、油菜的导管腔大, 这种结构有利于在短时间内快速吸收和传输水分^[7]。叶中有大型、特大型贮水薄壁细胞, 叶表皮细胞的外切向壁均有加厚现象, 角质层较厚。这种结构有利于贮水保水^[8]。等面叶的中央有一层疏松类似海绵组织的结构, 内部叶绿体沿细胞边缘排列。初步分析近下表皮的栅栏组织是由原来的海绵组织转化成的, 转化过程中遗留下部分海绵组织, 位于等面的两栅栏组织之间, 这种特殊结构, 在十字花科中生植物叶中实为罕见, 独行菜的叶肉结构由异面叶转化为等面叶结构, 这是适应短命植物光合作用效率高的生理要求, 导致于叶内部结构变化, 也是长期适应特殊环境而产生的特异结构^[9]。

叶片表皮细胞具有一定厚度的角质层; 有大型或特大型的薄壁细胞; 叶表面有泡状细胞; 有发达导管腔, 这些结构, 具有机械支持作用, 及具有贮水、保水、抗旱、抗风沙、减少蒸腾及吸水的特有功能。这是长期生活在荒漠环境

而与之相适应的结构。

东方旱麦、独行菜的叶片的横切面上维管束周围由一层大型薄壁细胞组成的维管束鞘内含有数量多体积大的叶绿体，为 C_4 植物型。维管束鞘细胞在进行光合作用时，可以将叶肉细胞中由四碳化合物所释放出的二氧化碳再行固定还原，这样，就提高了光合效率，这种高光效光合作用为快速制造和运输有机产物提供了物质条件及合理结构。所以，短命植物能在 1-2 个月的时间内完成开花、结果的生活周期。这些特征是由于短命植物在生长后期长期适应于干旱、有风沙侵袭特殊环境的结构，特殊的保护结构和高光效营养结构，是短命植物的显著特点。

从透射电镜观察短命植物维管束鞘细胞与 C_3 植物叶肉细胞中的叶绿体的差异来看，短命植物维管束鞘细胞叶绿体小、基粒与片层均不发达，这些特征在亚细胞结构上与 C_4 植物类似。

综上所述，东方旱麦草、独行菜是结构较简单，光合作用效率高、生长发育快，具有一定耐旱能力的早春短命植物，在叶片形态解剖结构方面，具有与 C_4 植物类似的“花环结构”^[15]，是短命植物对于干旱、有风沙侵袭特殊环境而形成的长期适应。

3.2 短命植物的结构特性与高光效的关系

3.2.1 结实率

据前人的报道以及本实验室对短命植物结实率的统计，都一致表明短命植物结实率都非常高。例如独行菜，每株结实率都可以达到上万粒。远观独行菜的植株，几乎看不到叶片，整株植株都被果实覆盖。短命植物结实率如此之高，与其高效的光合效率是分不开的。短命植物结构特殊，能够充分利用强烈的阳光日照和荒漠干旱区的高温，快速生长，迅速积累营养物质。

另外，短命植物的生殖分配比率也相当高，这和短命植物能够高效利用光能的特点也是分不开的。从 3 月底开始，短命植物种子萌发，到 4 月中旬植物基本成苗，经历了大约二十余天的营养生长期，而从 4 月中下旬开始抽苔，延

续到5月底6月初，植株结实成熟这一段生殖生长期就很长，大约有五十天左右。这表明短命植物的生长后期，在光照、温度、水分都比较充足适宜的条件下，植株充分利用光照，积累大量生长物质以完成生活史，最大程度结实度过逆境以续繁衍。

3.2.2 叶片解剖结构

与于喜凤等^[8, 9]的研究结果相同，东方早麦草与独行菜是等面叶（图 2.1-C、G）。等面叶没有栅栏组织与海绵组织的分化，上、下表皮均为栅栏组织，与海面组织相比，栅栏组织中的叶绿体，体积大、数量多、分布密度大。叶绿体是光合作用的主要场所，因此栅栏组织的光合效率要明显高于海面组织。短命植物东方早麦草、独行菜是等面叶，含有数量多、密度大的叶绿体的这一特征，为其提高光合效率奠定了物质基础和结构条件。

此外，两种短命植物的维管束鞘薄壁细胞与其相邻的叶肉细胞之间有胞间连丝（图 2.2-C、I），为维管束鞘细胞与叶肉细胞间进行频繁的物质交流提供了运输通道。正是通过这种通道，得以将叶肉细胞中固定 CO_2 初产物运输至维管束鞘细胞再行合成光合终产物，短命植物就是通过卡尔文循环与 C_4 途径相结合的方式，最终提高光合作用效率。

3.2.3 维管束鞘“花环结构”

石蜡切片、超薄切片在显微结构和超微结构上揭示了东方早麦草、独行菜叶片细胞水平与细胞内水平（如图 2.1, 2.2），与 C_3 植物相比，短命植物在叶片解剖结构方面表现出一些独特的接近 C_4 植物的特征。

C_4 植物具有两种叶绿体：叶肉细胞叶绿体中主要进行 C_4 途径，维管束鞘细胞叶绿体中主要进行卡尔文循环。两种光合作用途径相结合的方式，可以将 CO_2 再固定以提高 CO_2 利用率，最终提高光合作用效率^[21-24]。

和于喜风和周桂玲等对大量短命植物营养器官的解剖学研究结果相同^[7-9]，短命植物——东方早麦草、独行菜维管束鞘细胞中含有大量的叶绿体（图 2.1-C、G，图 2.2-A、G），我们称之为——“花环结构”，这与 C_4 高光效植物的“花环

结构”很相似。另外，短命植物维管束鞘细胞中细胞器丰富，叶绿体沿细胞边缘呈离心分布，叶绿体小，且片层不发达，没有基粒或没有发育好的基粒（图 2.2-C、I、E、K），等等特征都与 C₄ 植物类似。

如图 2.2 所示，短命植物维管束鞘细胞叶绿体内分布有大量的淀粉粒，这说明在维管束鞘细胞内进行了固定 CO₂ 并最终合成有机物的反应，而维管束鞘细胞叶绿体正是进行卡尔文循环的场所，而这些光合作用产物就以淀粉的形式贮藏在维管束鞘细胞中。短命植物长期适应生长后期干旱的特殊生境，即要在干热季节来临之前的短时期内，积累大量有机物质以供生长并快速完成生活史，最终演变成为这种结构简单、光合效率高、生长发育快，具有一定耐旱结构特征的植物，“花环结构”为个体在短期内，快速、大量、有效生成和运输有机产物及生长物质提供了物质条件及合理结构，从而造成了短命植物能在 1-2 个月的时间内迅速完成生长、开花、结果的生活周期。短命植物的这种“花环结构”以及高光效的特征，都与 C₄ 植物非常相似。

但不同之处在于，两种短命植物维管束鞘细胞叶绿体和叶肉细胞叶绿体的体积大小、数量多少比较相近，而 C₄ 植物维管束鞘细胞叶绿体却要比叶肉细胞叶绿体大并多，如图 2.1-I、K 所示。

这两种短命植物与 C₃ 植物相比，优势在于维管束鞘细胞中含有叶绿体，可以进行 C₄ 途径和卡尔文循环相结合的光合作用途径，为高效利用 CO₂ 以积累大量有机物质提供了基础，所以和大多数 C₃ 植物相比，短命植物能够高效利用光能来快速、大量合成生长产物，以迅速完成生活史。但是其叶绿体从体积和数量上都无法与典型的 C₄ 高光效植物相媲美，因此大多数 C₄ 植物植株高大茂盛，而短命植物植株却低矮弱小。使得短命植物处在了 C₃ 与 C₄ 植物之间的一个中间地位，关于这三者光合作用的机理关系，仍需要深入探究。

第三章 短命植物光合作用关键酶 Rubisco 的免疫组化定位

绿色植物的光合作用是将 CO_2 和 H_2O 合成为有机物（主要是糖）。这一过程中 CO_2 的固定还原即碳的同化，主要有 C_3 途径（卡尔文循环）和 C_4 途径^[21]。鉴别不同光合碳同化途径的手段主要有：形态解剖、稳定性碳同位素、酶学研究以及 $^{14}\text{CO}_2$ 示踪^[22]。许多研究结果都表明： C_4 光合作用的生化途径与花环结构并非紧密连锁^[23]。 C_4 光合作用的关键不是花环结构，而是酶^[24, 25]。本文采用目前广泛应用的免疫胶体金技术^[26, 28]，通过对 Rubisco（1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶）在细胞器中的定位，区分两种短命植物东方早麦草、独行菜与 C_3 植物小麦、油菜的差异。

C_3 、 C_4 植物叶片细胞中定位 Rubisco 常用的方法，有免疫胶体金定位^[31]、免疫荧光定位^[32]等免疫组化的方法，而免疫组化中所用的抗血清，一般是采用生化方法从植物中提取 Rubisco，并将粗酶液经分离、纯化后，得到纯度较高的蛋白免疫动物，然后得到抗血清^[31, 34]。本实验采用制备基因疫苗注射，蛋白免疫加强的方法得到抗原，免疫小鼠，进一步得到抗血清^[35, 36]。

大多数真核和原核生物 Rubisco 由 8 个大亚基（50-60 KD）和 8 个小亚基（12-18 KD）组成（ L_8S_8 ）^[37]。已经从很多植物中克隆出编码 Rubisco 大亚基（*rbcL*）的基因，发现 *rbcL* 基因的同源性很高，不同科属之间可以达到 70% 以上，最高的可以达到 90% 以上^[38, 39]，且无内含子。这就为克隆 *rbcL* 基因并进行免疫定位提供了依据。

C_3 植物进行光合作用的酶主要是 Rubisco，分布在叶肉细胞叶绿体基质中； C_4 植物的同化途径，具有 2 种羧化酶：PEPC（磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶）主要存在于叶肉细胞，用于 CO_2 的固定；Rubisco 主要存在于维管束鞘细胞，使 CO_2 转化为有机物。本实验利用免疫胶体金技术对两种短命植物中 Rubisco 进行定位，比较与 C_3 植物的区别。

1. 材料和方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 实验材料

选取野外环境中生长条件相同的——东方旱麦草，独行菜，小麦，油菜生长良好的植株，取发育完全的叶片作为实验材料。E.coli DH5 α 、E.coli BL21、pCNA3、pGEX4T-1由笔者所在实验室保存；克隆载体 pMD18-T为天为时代公司产品。

1.1.2 主要试剂

DNA gel Extraction Kit、T4 DNA 连接酶、DNA Marker、限制性内切酶和 Ex Taq酶均购自大连宝生生物工程有限公司；IPTG为promega公司产品；羊抗鼠IgG-HRP为华美生物有限公司产品，GST Bind Resin为Novagen公司的产品。常规化学试剂为国产分析纯产品。

1.2 实验方法

1.2.1 制备东方旱麦草 *rbcL* 鼠抗血清

1.2.1.1 提取东方旱麦草基因组DNA

CTAB法提取东方旱麦草基因组DNA^[38, 39]。

1.2.1.2 设计引物

参考Genbank上已经发表的旱麦草*rbcL*基因序列AY836165，利用引物设计软件primer 5设计一对特异性引物，用于扩增东方旱麦草*rbcL*基因。上游引物含有BamH I酶切位点，下游引物含有Xho I酶切位点，引物由上海生工合成。引物序列如下：

上游引物P1：5'-CTCGGATCCATGTCACCACAAACAGAAAC-3'，

下游引物P2：5'-CCGCTCGAGTTAATCAATAGTATCTACCG—3'。

1.2.1.3 东方早麦草 *rbcL* 基因的 PCR 扩增

以提取得到的东方早麦草基因组 DNA 作为模板，用上述引物进行 PCR 扩增，PCR 反应体系为：

模板 1ul，Ex-Taq buffer 5ul，dNTP 5ul，上游引物 1ul（10pmol/ul），下游引物 1ul（10pmol/ul），Ex-Taq 酶 0.5ul，灭菌去离子水 36.5ul。

反应条件为：95℃预变性 5min；95℃变性 30s；57℃退火 30s；72℃延伸 1min；共进行 35 个循环；最后 72℃延伸 9min。

经 0.7%琼脂糖凝胶电泳，分析 PCR 扩增产物。并用 DNA 凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行切胶回收纯化。

1.2.1.4 *rbcL*基因序列分析

将上步回收得到的东方早麦草*rbcL*基因 PCR产物连接到pMD18-T载体的EcoRV多克隆位点，将连接产物转化大肠杆菌DH5 α ，首先经抗性培养基筛选得到抗氨苄的阳性重组质粒——pMD18-T-*rbcL*。

该重组质粒再经BamH I和XhoI酶切鉴定，最后送样品到上海生工进行核苷酸序列测定。将测得序列与已发表的早麦草的基因序列比较同源性。

1.2.1.5 *rbcL* 基因真核、原核表达载体的构建

用 BamH I 和 XhoI 双酶切重组质粒 pMD18T-*rbcL* 和载体 pcDNA3、pGEX4T-1，用 DNA 凝胶回收试剂盒分别回收 1430bp 的目的基因片段，和 5400bp、4900bp 左右的两个载体片段，并对回收产物进行纯化，得到 pGEX4T-1、pcDNA3 和 *rbcL* 基因的线性片段。用 T4 DNA 连接酶将目的基因片段，分别与两个载体片段连接，构建重组真核表达载体 pcDNA3-*rbcL*，原核表达载体 pGEX4T-1-*rbcL*，并且将重组原核表达载体转化大肠杆菌 BL21。

碱裂解法小量提取真核、原核表达载体质粒，用 BamH I 和 XhoI 双酶切重组质粒，酶切产物经 0.7%的琼脂糖凝胶电泳后鉴定。

1.2.1.6 rbcL 基因在大肠杆菌中的表达

将含阳性重组质粒 pGEX4T-1-rbcL 的转化菌菌液 50ul 接种于 5 ml LB 培养基(含氨苄青霉素 50ug/ml), 在摇床 37℃ 培养 2-3h 直到 $OD_{600} \approx 0.5$, 加 IPTG 至终浓度 0.3mM 后在 37℃ 诱导 3-4h, 取 1ml 诱导产物分析蛋白表达情况, 8000rpm, 5 min 收集菌体, 弃上清, 沉淀用 1 ml PBS 缓冲液洗涤 3 次, 8000rpm, 5 min 收集沉淀, 用 200ul PBS 重悬沉淀, 在冰浴的条件下超声菌体悬液直至澄清透亮, 12000rpm 10min, 分别取上清 30ul 加等体积的蛋白上样缓冲液, 混匀后于 100℃ 煮 10min, 12000rpm 10min, 取 10ul 经 12% 的 SDS-PAGE 胶分析, 蛋白以包涵体形式表达。

1.2.1.7 融合蛋白的纯化

离心收集诱导后的 *E.coli* BL21 菌体, 用 PBS 洗涤后, 用细胞裂解液[1/10 原培养体积的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、2 mmol/L EDTA、溶菌酶至终浓度 100 mg/L 和 1/10 体积的 1% TritonX-100]重悬细菌沉淀, 冰浴 15 min 后, 超声裂解细菌至菌液不再粘稠。然后 4℃, 12 000 g 离心 10min 去杂质, 收集沉淀获得初制的 RBCL 包涵体蛋白。将初制包涵体蛋白用洗涤液 50 mmol/L Tris-HCL (pH 8.5) (含 5 mmol/L EDTA, 2% 脱氧胆酸)、50 mmol/L Tris-HCL (pH 8.5)、0.15 mmol/L NaCl 依次搅拌洗涤, 每次 1 h, 离心得到的沉淀为初级纯化的包涵体蛋白。

以不同 pH 值 (pH 4-13) 共 10 个 pH 值的 100 mmol/L Tris-HCl 溶解包涵体蛋白, 经不同浓度 (2 mol/L - 8 mol/L) 的尿素优化溶解条件。在各种条件下溶解包涵体蛋白 30 min 后, 8 000 rpm 离心 10 min, 用 Bradford 测定上清中蛋白含量, 确定最适溶解条件。

以最适溶解条件室温溶解 30 min。冰浴下, 将包涵体蛋白裂解液逐滴加入搅动的含 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5) 50 倍体积的复性液, 至蛋白质终浓度为 0.1 mg/mL, 并调 pH 到 8.5。选择透析复性, 用含 β 巯基乙醇 (10 mmol/L), 还原型谷胱甘肽 GSH (1 mmol/L), 氧化型谷胱甘肽 GSSG (0.1 mmol/L),

20 mmol/L Tris-HCL (pH 8.5), 10%蔗糖复性缓冲液透析 48 h, 每 6 h 换液 1 次。0.45 μm 滤膜过滤后用 Bradford 测定蛋白含量。

1.2.1.8 真核表达载体的小鼠尾静脉注射

提取重组真核质粒 pcDNA3-rbcL, 注射 1ml 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 质粒至小鼠尾静脉。8h 后杀死小鼠, 解剖后取得肝脏, 提取 RNA, 反转录 PCR 检测质粒是否表达。

1.2.1.9 抗血清的制备

大量提取重组真核质粒 pcDNA3-rbcL, 注射免疫小鼠, 每两周免疫一次, 每次每只小鼠注射质粒 100 μl , 质粒浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。共免疫三次。从第四次起, 用纯化出的大肠杆菌表达的 RBCL 蛋白抗原, 加强免疫小鼠。

1.2.1.10 抗体的检测

① ELISA 检测抗体效价 采用常规间接 ELISA 法。以纯化的 GST-RBCL 融合蛋白作为标准抗原蛋白(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 包被 96 孔酶标反应板(100 $\mu\text{l}/\text{孔}$)。以 HRP 标记的羊抗小鼠抗体(作 1: 1000 稀释)作为第二抗体, 酶标仪测各孔 OD_{450/650} 值显示抗体水平。

② Western 检测检测抗体特异性 将纯化的 RBCL 蛋白样品, 经 SDS-PAGE 分离后再电转移至硝酸纤维素膜上。以 5 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h, 依次滴加免疫 42 d-56 d 的小鼠的血清(室温 2h、PBS 洗 3 次)及山羊抗鼠 IgG-HRP (室温反应 1 h、PBS 洗涤 3 次), 最后加底物 DAB 显色, 拍照。

1.2.2 胶体金技术对 Rubisco 的免疫组化定位

1.2.2.1 样品低温包埋和超薄切片制备

切片制备方法参照第一章。

1.2.2.2 胶体金标记超薄切片及 Rubisco 的免疫定位

胶体金标记操作过程在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。以省却一抗孵育步骤的样品作为阴性对照。

- ① 粘有切片的镍网在 5 %双氧水中浸泡 10min。目的是为了用双氧水溶解包埋材料的环氧树脂，使抗原能够充分的暴露在外。
- ② PBS 缓冲液清洗切片 3-5 次，将切片上的双氧水洗干净。
- ③ 5 %BSA-PBS 封闭液 (pH 7.0 PBS, 含 1 % BSA), 封闭切片 30min。
- ④ PBS 缓冲液清洗切片 3-5 次，将切片上的包被液洗干净。
- ⑤ 1%BSA-PBS 稀释制备的东方早麦草 RBCL 鼠多抗血清，一抗孵育 30min。
- ⑥ PBS 缓冲液清洗切片 6 次，尽量将未结合的抗体冲洗掉。
- ⑦ 1%BSA-PBS 稀释胶体金标记羊抗鼠 IgG, 用直径为 15nm 的胶体金 A 蛋白探针标记的二抗孵育 30min。
- ⑧ PBS 缓冲液清洗切片 6 次，尽量将未结合的二抗冲洗掉，并等待切片干燥。
- ⑨ 4%醋酸铀染色 15min, PBS 缓冲液清洗切片 5 次;
2%柠檬酸铅染色 30min, PBS 缓冲液清洗切片 5 次。
- ⑩ 在透射电镜下观察、照相。电镜下观察拍照。

2. 结果

2.1 东方早麦草 Rubisco 大亚基——rbcL 基因抗血清的制备

2.1.1 rbcL 基因的 PCR 扩增

rbcL 基因由叶绿体基因编码，非常保守并无内含子，因此可以从东方早麦草基因组 DNA 中直接 PCR 扩增该基因。扩增产物经 0.7%琼脂糖凝胶电泳分析，如下图所示，在第 2 泳道中可见一条清晰的大小约为 1430bp 的 DNA 条带，与已发表的早麦草 rbcL 基因大小相近。

2.1.2 rbcL 基因克隆载体的鉴定及序列分析

以 BamH I、Xho I 双酶切鉴定重组质粒 pMD18-T—rbcL，如图 3-2.所示，得到约 3000bp 的 pMD18-T 线性片段和 1400bp 左右的插入片段。

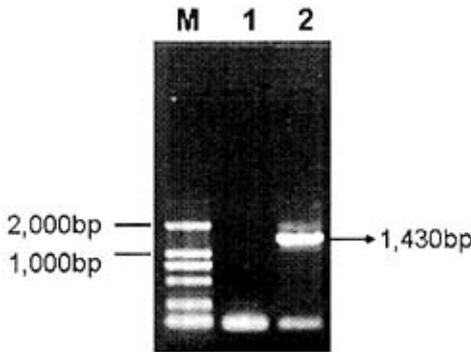


图 3-1. PCR 扩增东方早麦草 *rbcL* 基因。
Figure 3-1. PCR Amplification of *rbcL* gene from *Eremopyrum orientale* genomic DNA.
M: DL2000 Marker
1: Negative Control 2: *rbcL*

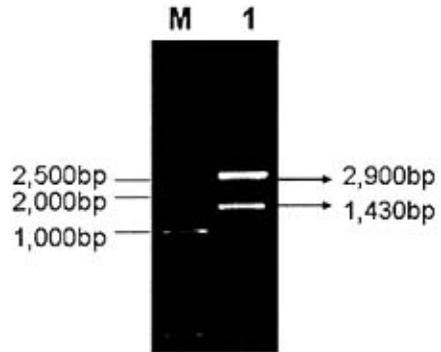


图 3-2. *rbcL* 重组 T 载体酶切鉴定。
Figure 3-2. Identification of recombinant plasmid by Digest pMD18-T-*rbcL*.
M: DL2000 Marker
1: Digested pMD18-T-*rbcL* by BamHI and XhoI

该重组质粒送样品到上海生工进行核苷酸序列测定（图 3-3），序列分析证实该 DNA 片段大小为 1430bp，中间没有出现终止密码子，这与预期的结果相一致。

将该序列与已发表的早麦草 *rbcL* 基因序列进行了同源性比较。在 GenBank 上 Blast 显示，该 *rbcL* 基因片段与已经发表的早麦草序列同源性高达 99.79%（图 3-4）。其中有两个碱基不同，将这两个不同的位点对应的碱基翻译成氨基酸后发现，第一处发生了氨基酸的改变：早麦草中为 Val，而东方早麦草为 Gly，但这两种氨基酸都属于非极性、疏水氨基酸，呈中性；第二处碱基不同，但编码的氨基酸却相同。

```

1 ATGTCCACCAC AAACAGAAAC TAAAGCAGGT GTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTAT 60
61 AAATTGACTT ACTACACCCC AGAGTATGAA ACTAAGGATA CTGATATCTT GGCAGCATTG 120
121 CGAGTAAGTC CTCACGCTGG GTTCCGCCCC GAAGAAGCAG GGGCTGCAGT AGCTGCCGAA 180
181 TCTTCTACTG GTACATGGAC AACTGTTTGG ACTGATGGAC TTACCAGTCT TGATCGTTAC 240
241 AAAGGACGAT GCTATCACAT CGAGCCTGTT GCTGGGGAAG ACAACCAATG GATCTGTTAT 300
301 GTAGCTTATC CATTAGACCT ATTTGAAGAG GGTCCCGTTA CTAACATGTT TACTCCATT 360
361 GTGGGTAAAG TATTTGGTTT CAAAGCCCTA CGTGCTCTAC GTTTGGGAAG TCTACGAAT 420
421 CCCCTACTT ATTCAAAAAC TTTCCAAGGC CGGCTCATG GTATCCAAGT TGAAGAGAT 480
481 AAGTTGAACA AGTATGGTCG TCCTTTATRG GGATGACTA TTAAACCAAA ATTTGGGATTA 540
541 TCCGCAAAAA ATTATGGTAG AGCGTGTAT GAGTGTCTAC GTGGTGGACT TGATTTTACC 600
601 AAAGATGATG AAAACGTAAA CTCACAACCA TTTATGGCGT GGAGAGACCG TTTTGTCTTT 660
661 TGTGCCGAAG CTATTATAAA ATCACAGGCC GAAACTGGTG AAATCAAGGG GCATTACTTG 720
721 AATGGGACTG CGGCTACATG TGAAGAAATG ATTAAGAGAG CTGTATTTGC GAGAGAATTA 780
781 GGGTTCCTTA TTTGATGCA TGACTACTTA ACCGGGGGAT TCACCGCCAA TACTAGTTTG 840
841 GGTCAITATC GCGCGACAAA TGGCCTACTT CTTACATTC ACCGGCAAT GACTGCAGTT 900
901 ATTGATAGAC AGAAAAATCA TGGTATGCAT TTCCGTGTAT TAGCTAAAGC ATTCCGTATG 960
961 TCTGGGGGAG ATCATATCCA CTCGGTACA GTAGTAGGTA AGTTAGAAGG GGAACGCGAA 1020
1021 ATGACTTTAG GTTTTGTGA TTTATTGCGC GATGATTTA TTGAAAAGA TCGTGTCCGC 1080
1081 GGTATCTTTT TCACCTCAGG CTGGGTATCC ATGCCAGGTG TTATACCGT AGCTTCAGGT 1140
1141 GGTATTCATG GTTGGCATAI GCCAGCTCTG ACCGAAATCT TTGGGGACGA TTTGTGATA 1200
1201 CAATTTGGTG GAGGAACITT AGGACATCCT TGGGAAATG CACCTGGTGC AGCAGCTAAT 1260
1261 CGAGTGGCTT TAGAAGCCTG TGTACAAGCT CGTAACGAAG GCGCGCATCT TGCTCCGCGAA 1320
1321 GGTAAATGAAA TTATCCGAGC AGCTTGCAAA TGGAGTCTG AACTAGCCGC AGCTTGTGAA 1380
1381 GTATGGAAGG CGATCAAATT CGAGTTCGAG CCGTAGATA CTTTGATTAA 1430
    
```

图 3-3. 东方早麦草 rbcL 基因序列。

Figure 3-3. The sequence of rbcL in *Eremopyrum orientale*.

```

Eremopyrum orientale ATGTCACCAATCAAAATTAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 120
Eremopyrum ATGTCACCAATCAAAATTAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 120
Consensus ATGTCACCAATCAAAATTAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT

Eremopyrum orientale TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 240
Eremopyrum TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 240
Consensus TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT

Eremopyrum orientale TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 360
Eremopyrum TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 360
Consensus TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT

Eremopyrum orientale TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 480
Eremopyrum TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 480
Consensus TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT

Eremopyrum orientale TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 600
Eremopyrum TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 600
Consensus TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT

Eremopyrum orientale TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 720
Eremopyrum TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 720
Consensus TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT

Eremopyrum orientale TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 840
Eremopyrum TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 840
Consensus TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT

Eremopyrum orientale TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 960
Eremopyrum TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 960
Consensus TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT

Eremopyrum orientale TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 1080
Eremopyrum TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 1080
Consensus TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT

Eremopyrum orientale TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 1200
Eremopyrum TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 1200
Consensus TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT

Eremopyrum orientale TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 1320
Eremopyrum TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 1320
Consensus TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT

Eremopyrum orientale TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 1440
Eremopyrum TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT 1440
Consensus TAAAGCAGGTGTGTTGGATTTC AAGCTGGTGT TAAAGATTATTTGCAACATT
    
```

图 3-4. 东方早麦草 rbcL 基因与早麦草 rbcL 基因的同源性比较。

Figure 3-4. Homology analysis of rbcL of *Eremopyrum orientale* with *Eremopyrum*.

2.1.3 rbcL 基因的原核与真核表达

2.1.3.1 rbcL 基因原核、真核重组表达载体的鉴定

原核重组质粒 pGEX4T-1-rbcL、真核重组质粒 pcDNA3-rbcL，分别以 BamH I 和 Xho I 双酶切鉴定，如图 3-5、6 所示，分别得到约 5400bp 的原核载体 pGEX4T-1 线性片段、4900bp 的真核表达载体 pcDNA3 线性片段和 1430bp 的目的基因 rbcL 插入片段。

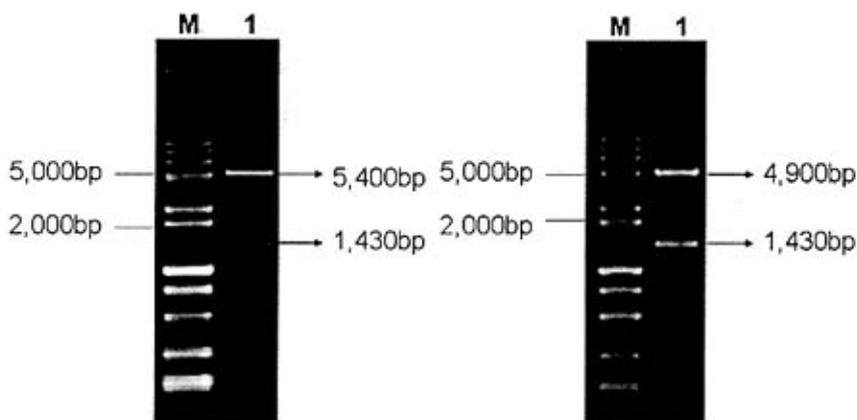


图 3-5. 重组 pcDNA3-rbcL 酶切鉴定。
Figure3-5. Identification of pcDNA3-rbcL
M: DNA Marker/DL15000+2000
1: pcDNA3-rbcL 酶切产物

图 3-6. 重组 pGEX4T-1-rbcL 酶切鉴定。
Figure3-6. Identification of pGEX4T-1-rbcL
M: DNA Marker/DL15000+2000
1: pGEX4T-1-rbcL 酶切产物

2.1.3.3 rbcL 基因的原核表达及蛋白的纯化

如图 3-9 所示，SDS-PAGE 分析重组原核重组表达载体表达蛋白的结果表明：加诱导剂 IPTG 的 *BL21* 空菌在 26KD 处有一条融合蛋白 GST 表达的条带，而与未加诱导剂 IPTG 的重组菌相比，经过 0.5mM IPTG 诱导 4 小时的重组菌，在 82kDa 处有一特异的蛋白条带——带有 GST 标签的重组蛋白 GST-RBCL。第 4、5 道蛋白显示，重组菌表达的融合蛋白主要表达存在于超声沉淀中，上清中只含有少量，即融合蛋白以包涵体的形式表达。

参照高永贵^[45]等方法, 改善蛋白溶解温度、尿素浓度、pH 值等条件, 从菌液中分离纯化带有 GST 标签的重组融合蛋白 GST-RBCL, 如图 3-10 所示, 在 82kDa 处有一特异的蛋白条带。即 GST 标签分子量为 26kDa, RBCL 蛋白大小为 56kDa 左右。

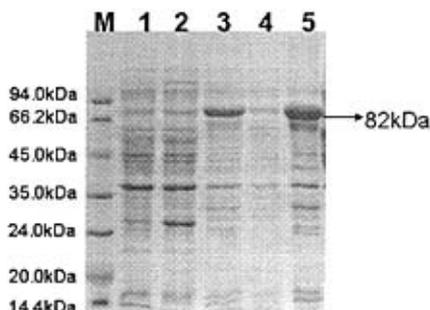


图 3-9. SDS-PAGE 分析蛋白表达。
Figure3-9. SDS-PAGE Analysis Expression of Protein of GST-RBCL

M: Protein Marker

- 1: 重组载体 pGEX4T-1-RBCL/BL21 未经 IPTG 诱导
- 2: 原核表达空载体 pGEX4T-1/BL21 经 IPTG 诱导
- 3: 重组载体 pGEX4T-1-RBCL/BL21 经 IPTG 诱导总蛋白
- 4: 重组载体 pGEX4T-1-RBCL/BL21 经 IPTG 诱导超声后上清
- 5: 重组载体 pGEX4T-1-RBCL/BL21 经 IPTG 诱导超声后蛋白

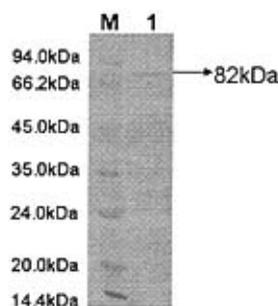


图 3-10. GST-RBCL 融合蛋白的纯化。
Figure3-10. Purification of GST-RBCL

M: Protein Marker

- 1: 纯化融合蛋白 GST-RBCL

2.1.3.2 rbcL 基因的真核表达——小鼠尾静脉注射

用重组真核质粒 pcDNA3-rbcL 注射小鼠后 8h, 取得肝脏提取 RNA (如图 3-7 所示), 反转录 PCR 检测到重组真核质粒的表达 (如图 3-8 所示), 在第一泳道中有一条明显的约 1,430bp 的 DNA 特异条带。

图 3-8 中第二、三泳道为注射生理盐水、空质粒小鼠反转录 PCR 结果作为阴性对照, 并未出现相应的条带。

以重组真核质粒 pcDNA3-rbcL 免疫小鼠三次, 每次 100ul 1ug/ul。第四次以纯化的融合蛋白 GST-RBCL 免疫小鼠。

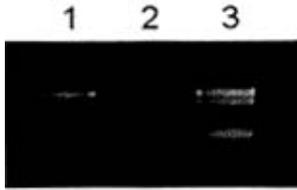


图 3-7.小鼠总 RNA 的提取。
Figure3-7. Total RNA of Mice
1: 注射 DNA 疫苗小鼠总 RNA
2: 注射生理盐水小鼠总 RNA
3: 注射空质粒小鼠总 RNA

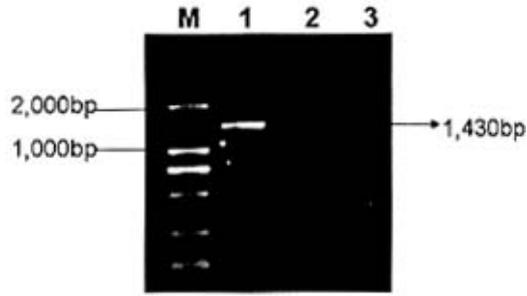


图 3-8.RT-PCR 检测真核表达载体。
Figure3-8.Identification of Recombinant by RT-PCR
1: 注射 DNA 疫苗小鼠
2: 注射生理盐水小鼠
3: 注射空质粒小鼠

2.1.4 抗体检测

2.1.4.1 ELISA 检测抗体效价

用 RBCL 小鼠抗血清进行 RBCL 的 ELISA 检测，结果表明 RBCL 小鼠抗血清稀释 1: 500 时，效价可以达到 1.299，可以用于后续免疫组化实验。

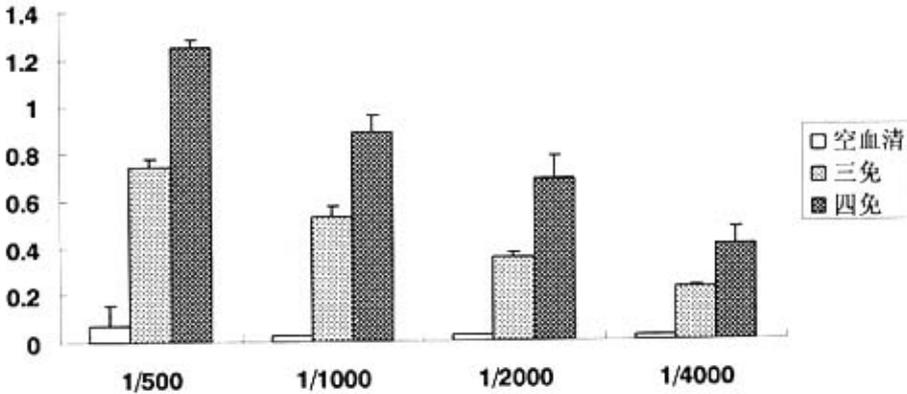


图 3-11.ELISA 检测注射 DNA 疫苗，蛋白疫苗加强后小鼠抗体水平。
Figure3-11. ELISA analysis of serum titer from Kunming White mice immunized by rbcL.

2.1.4.2 Western 检测抗体特异性

用 RBCL 小鼠抗血清进行 RBCL 的 Western blot 检测, 在为 82 *kDa* 处出现 1 条特异的蛋白带(图 3-12.), 表明 RBCL 可以特异性地和抗 RBCL 抗体结合。

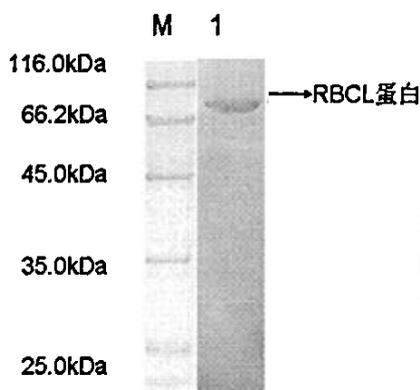


图 3-12. Western 检测抗血清特异性.

Figure 3-12. Western blot of recombinant expression

M: Protein Marker

1: 以抗 RBCL 抗体标记的纯化后 RBCL 蛋白

2.2 免疫胶体金定位四种植物中光合作用关键酶

以上方法获得的抗血清经效价和特异性检测后, 用于胶体金标记四种植物——东方旱麦草、独行菜、小麦、油菜的免疫组化实验, 观察结果如图 3-13。

两种典型的 C_3 植物——小麦(图 I)、油菜(图 J)中, Rubisco 标记的胶体金颗粒主要分布在叶肉细胞叶绿体的间质区域。

而两种短命植物——东方旱麦草(图 C)、独行菜(图 D)叶肉细胞叶绿体中没有发现金颗粒的分布, 胶体金颗粒主要分布在两种短命植物的维管束鞘细胞叶绿体的间质区域内(图 E、F)。这表明: 即 Rubisco 主要分布在短命植物维管束鞘细胞叶绿体中, 而叶肉细胞叶绿体中此酶很少或没有。

以空白小鼠的血清孵育的超薄切片小麦(图 A)、油菜(图 B), 几乎没有发现有胶体金颗粒的分布。

为了方便观察胶体金颗粒在叶绿体的分布, 将图 E、F、I、J 的局部图形分别放大为图 G、H、K、L, 图中的金颗粒几乎都分布在叶绿体的间质区域内, 而不分布在基粒上。

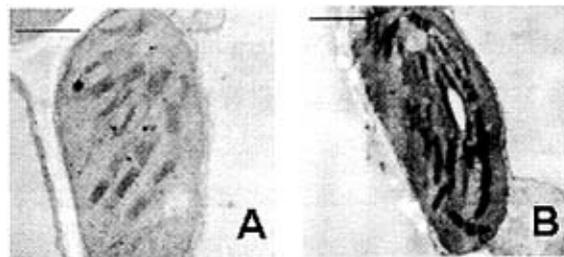


图 A. 空白血清孵育小麦叶肉细胞 图 B. 空白血清孵育油菜叶肉细胞

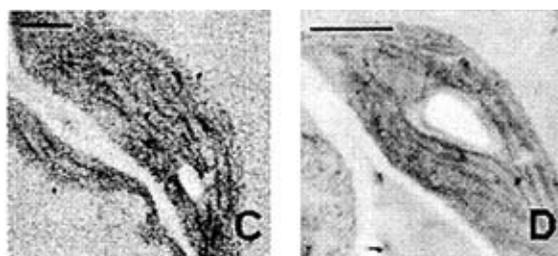


图 C. 东方旱麦草叶肉细胞叶绿体 图 D. 独行菜叶肉细胞叶绿体

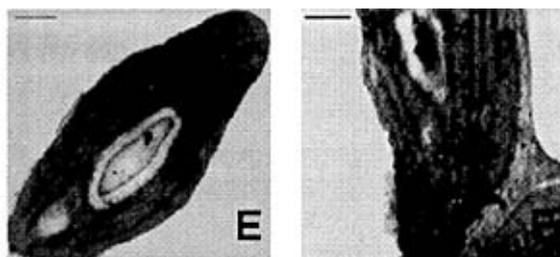


图 E. 东方旱麦草维管束鞘细胞叶绿体 图 F. 独行菜维管束鞘细胞叶绿体

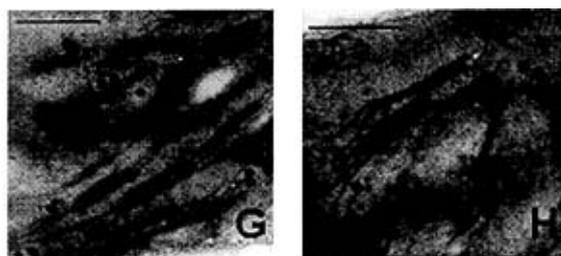


图 G. 东方旱麦草维管束鞘细胞叶绿体放大图 H. 独行菜维管束鞘细胞叶绿体放大

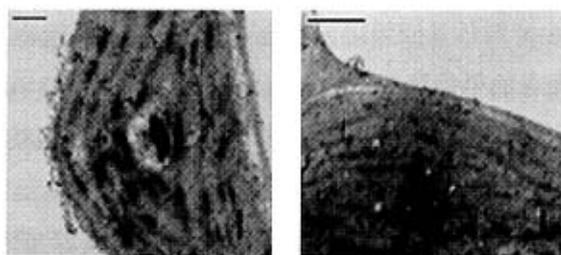


图 I. 小麦叶肉细胞叶绿体 图 J. 油菜叶肉细胞叶绿体

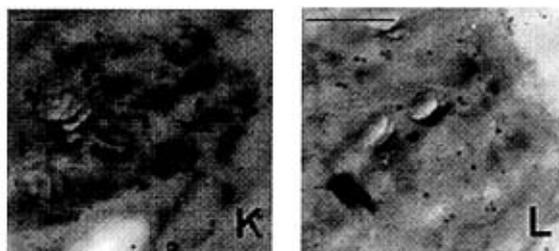


图 K. 小麦叶肉细胞叶绿体放大 图 L. 油菜叶肉细胞叶绿体放大

图 3-13. 东方早麦草, 独行菜, 小麦, 油菜叶片免疫胶体金定位 Rubisco. Bar = 500nm.
Figure 3-13. The Immunogold Localization of Rubisco in Chloroplasts of Four Plants.

3. 讨论

3.1 东方早麦草 Rubisco 抗体的制备

关于 *rbcL* 基因抗血清的制备, 一直以来采用的方法是采用生化手段从植物中提取 Rubisco 粗酶液, 经分离纯化后得到纯度较高的蛋白, 免疫动物后得到抗血清^[23, 25]。这种方法的优点在于效价高, 缺点在于步骤繁琐、成本太高。

本实验采用注射核酸疫苗免疫动物的方法获得抗体。核酸疫苗既可以不断表达抗原蛋白、又可方便的精选所需基因片段、而且性质稳定、成本较低, 近年来, 已成为疫苗研究领域的一大热点。核酸疫苗的真核表达质粒载体大多选择 pCDNA 3.1 系列, 是一种常用的非融合蛋白类型的高效真核表达载体。

核酸免疫的方法从一定程度上降低了成本、减少了工序、并且抗体比较纯, 但是缺点在于效价太低, 所以在核酸免疫之后还采用了蛋白免疫加强的方法, 以较低的成本, 制备出效价高、比较纯的抗血清^[27, 28]。

Rubisco 大亚基由叶绿体基因编码无内含子, 在不同种属植物之间的同源性很高, 因此根据已发表的早麦草的 *rbcL* 基因序列设计引物^[38, 39], 从东方早麦草基因组 DNA 中直接 PCR 扩增得到 *rbcL* 基因, 构建真核表达载体, 大量提取质粒作为 DNA 疫苗免疫小鼠三次, 可以得到东方早麦草 *rbcL* 基因小鼠多抗血清。构建了重组原核表达载体 pGEX4T-1/*rbcL*, 使其在 *BL21* 菌中大量表达, 纯化得到融合蛋白。

这种方法遇到了一个难题——大肠杆菌表达的 RBCL 以包涵体蛋白的形式存在, 这就增加了纯化的难度。本研究在处理 RBCL 包涵体蛋白时, 采用极端 pH 和低浓度的无机盐溶解包涵体蛋白, 使用稀释和透析复性, 并通过还原型和氧化型的谷胱甘肽氧化还原产生二硫键, 以使重组蛋白具有正常生物学活性。

经 Western blot 和 ELISA 检测, 用这种方法制备得到的 *rbcL* 抗血清, 和 RBCL 蛋白结合特异, 免疫反应效价高, 可用于免疫分析检测, 为在植物叶片中进行 *rbcL* 基因的免疫胶体金定位研究提供了重要的抗体。

3.2 通过免疫组化定位光合作用关键酶 Rubisco 探讨植物光合作用途径

在 C_3 植物里 Rubisco 主要分布在叶肉细胞叶绿体的间质区域, 而在 C_4 植物里则主要分布于鞘细胞叶绿体的间质区域^[29, 30]。通常利用 Rubisco 在植物叶片细胞叶绿体中分布不同这一特点, 判断植物光合作用类型途径^[31]。许多研究结果都表明 C_4 光合作用的生化途径与 Kranz 解剖结构并非紧密连锁^[43], 关键是酶^[45, 47]。

小麦、油菜与其它 C_3 植物一样, 只有一种叶肉细胞叶绿体可以作为光合作用的场所, 而光合作用的关键酶——Rubisco 则分布在叶肉细胞叶绿体的间质区域 (图 3.13-I、J), 和前人研究结果一致^[48, 50]。

而东方早麦草、独行菜存在维管束鞘细胞和叶肉细胞两种类型叶绿体, 胶体金颗粒主要分布在维管束鞘细胞叶绿体的间质区域 (图 3.13-E、F), 同时在上一章实验中 (图 2.2-G) 发现短命植物维管束鞘细胞叶绿体内分布有大量的淀粉粒, 这说明维管束鞘细胞叶绿体内含有 Rubisco, 并由 Rubisco 进行了固定

CO₂并最终合成有机物的反应，这种光合作用方式与 C₄ 植物相似。

虽然确定在这两种短命植物维管束鞘细胞叶绿体内含有 Rubisco，但是根据金颗粒的密度和数量判断，该酶在其中的分布以及数量并没有典型的 C₄ 植物那么多^[37, 38]。相应的，该酶的活性、甚至其它酶的活性也应该比 C₄ 植物略低一些，推测这是造成短命植物与典型的 C₄ 植物在植株形态等方面有所差异的重要因素。

两种短命植物酶的定位方面与 C₃ 植物相差很大，表现出与 C₄ 植物相近的一些特性，但是与 C₄ 植物又略有不同。本文仅选择了光合作用途径关键酶的一种——Rubisco 作为重点研究，而且只研究其在叶绿体中的不同分布，对其活性以及其它酶（如 PEPC 等）的定位、活性都没有进行探讨，还有很多因素都是研究光合作用、判断光合途径的重要标准。

结论与展望

第一,通过石蜡切片,在显微镜下观察叶片细胞水平,显微结构结果显示:东方旱麦草、独行菜叶脉的导管腔大,有利于在短时间内快速吸收和传输水分;叶中有大型、特大型贮水薄壁细胞,有利于贮水保水;叶片的横切面上,一层大型薄壁细胞整齐排列在维管束周围,组成维管束鞘;维管束鞘细胞内含有数量多、体积小的叶绿体,形成类似 C_4 植物的“花环结构”。短命植物与 C_4 植物的差异表现在,维管束鞘细胞叶绿体的体积和数量上都要弱一些。这些特殊的保护结构,是短命植物在生长后期长期适应于干旱、有风沙侵袭特殊的环境,而逐渐演化形成的适应环境的生理结构。

第二,通过超薄切片,在透射电镜下观察叶片细胞内水平,超微结构结果显示:进一步在东方旱麦草、独行菜叶片横切面上观察到与 C_4 植物相同的“花环结构”,维管束鞘细胞中细胞器丰富,叶绿体沿维管束鞘细胞边缘呈离心分布,叶绿体小且基粒片层不发达,这与 C_4 植物的结构特征非常相似。

第三,为了对光合作用关键酶 Rubisco 进行免疫定位,我们采取了一种与以往不同的制备抗体的方法——核酸免疫。即构建原、真核表达载体,以重组真核质粒与原核表达蛋白的方式免疫小鼠制备抗血清,这种方法的优点在于成本低,抗体纯度高,缺点在于效价不高。

第四,通过免疫组化实验,胶体金标记结果表明:东方旱麦草、独行菜维管束鞘细胞中观察到 Rubisco 免疫金标记的胶体金颗粒,而叶肉细胞中并未发现。而 C_3 植物小麦与油菜中,只叶肉细胞中有金颗粒分布。由于叶片在进行光合作用时,维管束鞘细胞叶绿体中的 Rubisco 可以将叶肉细胞中所释放出的 CO_2 再行固定还原,这样就提高了光合效率,所以,这种高光效光合作用为快速制造和运输有机产物提供了物质条件及合理结构,也就造成了短命植物能在 1-2 个月的时间内完成开花、结果的生活周期。这种高光效营养结构,是短命植物的显著特点。

最后,基于以上的实验结果并结合前人的研究,我们可以初步得出结论:

东方旱麦草、独行菜是具有一定耐旱能力、光合作用效率高、生长发育快的早春短命植物。它们在植株形态上类似 C_3 植物，但在生物量、解剖结构、酶学方面更接近 C_4 植物，是居于 C_3 、 C_4 植物之间的一种类型。

此外，在酶学方面还需要进一步研究除 Rubisco 之外的其它酶，如 PEPC、NADP、PPDK 等 C_3 和 C_4 植物光合途径关键酶的定位，以及这些酶的活性，这些因素都是研究光合作用、判断光合途径的重要标准。

C_3 和 C_4 植物光合作用途径的研究已有几十年的历史了，由于光合作用反映了植物的基本生理活性，它越来越引起生理生态学界的关注，对此的研究也将继续向更深的层次和更广的范围发展。长期以来，人们一直希望能将 C_4 光合特性导入 C_3 植物以提高它们的光合效率，虽然也取得了一定的成果，但并不显著。短命植物作为一种 C_3 植物向 C_4 植物演化过渡的中间类型，以短命植物作为桥梁和纽带，有望解决 C_3 向 C_4 植物光合作用途径转化的难题。

为了攻克这些难关，需要进一步加强植物生理学、植物分子生物学、植物基因工程、植物遗传育种、细胞生物学等多学科的密切合作，以深入研究短命植物特殊的生理结构、光合作用功能、快速生长的机理。

参考文献

- [1] 任珺, 陶玲. 新疆北部短命植物的特征分析[J]. 草业科学, 2005, 22(5): 19-24.
- [2] 毛祖美, 张佃民. 新疆北部早春短命植物区系纲要[J]. 干旱区研究, 1994, 11(3): 1-26.
- [3] 张立运. 新疆的短命植物(三)群落学意义和资源价值[J]. 植物杂志, 2002, (3): 4-5.
- [4] 黄振英. 鄂尔多斯高原固沙禾草沙鞭种子休眠和萌发与环境的关系[J]. 西北植物学报, 2003, 23(7): 1128-1133.
- [5] 潘伟斌, 黄培佑. 四种短命植物若干生物学生态学特性的研究[J]. 植物生态学报, 1995, 19(1): 85-91.
- [6] 潘伟斌, 黄培佑. 四种短命植物若干生物学生态学特性的研究[J]. 植物生态学报, 1995, 19(1): 85-91.
- [7] 周桂玲, 魏岩, 阿衣吐尔汉·热依木, 谭敦炎. 8种短命植物营养器官的解剖学观察[J]. 新疆农业大学学报, 2004, 27(2): 12-18.
- [8] 于喜凤, 刘璠清. 新疆“短命植物”独行菜营养器官的解剖学研究[J]. 新疆师范大学学报. 1997, (6): 34-38.
- [9] 于喜凤, 周志强, 焦若薇. 新疆禾本科短命植物早麦草的营养器官解剖学研究[J]. 新疆师范大学学报(自然科学版), 1996, 15(2): 51-54.
- [10] Mao ZM, Zhang DM. The Conspectus of Ephemeral Flora in Northern Xinjiang[J]. *Arid Zone Research*, 1994, 11(3): 1-26.
- [11] Pan WB, Huang PY. The ecology of four ephemeral plants[J]. *Acta Phytocologica Sinica*, 1995, 19(1): 85-91.
- [12] 张立运. 新疆莫索湾地区短命植物的初步研究[J]. 植物生态学与地植物丛刊, 1985, 9(3): 213-221.
- [13] 黄培佑. 准葛尔盆地荒漠生态类群与环境的关系[J]. 生态学杂志, 1991, 10(1): 6-10.
- [14] 王焯. 新疆早春短命及类短命植物的物候观测[J]. 干旱区研究, 1993, 10(3): 34-39.
- [15] 刘长娥, 蒋瑞芬. 短命植物三种早麦草形态学研究——营养器官的解剖构造[J]. 新疆畜牧业. 1995, 11(4): 16-19.
- [16] Wang NY, Jiang DA, Hong J, Zhang F, Weng XY. Diurnal changes of Rubisco and RCA activities and their cellular localization in rice[J]. *Acta Bot Sin*, 2003, 45(9): 1076-1083.
- [17] Hattersley PW, Waton L, Osmond CB. Insituimmunofluorescent labelling of RuBPCase in leaves of C₃ and C₄ plants[J]. *Aust J Plant Physiology*, 1977, (4): 523-539.
- [18] Osmond CB, Bjorkman O, Anderson DJ. Physiological Processes in Plant Ecology. In *Ecological Studies*[M]. Springer-Verlag: New York, 1980, 66-110.
- [19] Ernst K, Westhoff P. The phosphoenolpyruvate carboxylase (ppc) gene family of *Flaveria trinervia* (C₄) and *F. pringlei* (C₃): molecular characterization and expression analysis of the ppcB and ppcC genes[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 34(3): 427-443.
- [20] Magnin NC, Cooley BA, Reiskind JB, Bowes G. Regulation and localization of key

- enzymes during the induction of Kranzless, C_4 -type photosynthesis in *Hydrilla verticillata*[J]. *Plant Physiology*, 1997, 115 (4): 1681-1689.
- [21] Rowan FS, Athena DMK. Is C_4 photosynthesis less phenotypically plastic than C_3 photosynthesis? [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57 (2): 303-317.
- [22] Rainer EH, Hirsch HJ, Fritz K, Christoph P. Overexpression of C_4 -cycle enzymes in transgenic C_3 plants: a biotechnological approach to improve C_3 -photosynthesis[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, (369): 591-607.
- [23] Hong J, Wang WB, Jiang DA, Hu DW. The Immunogold Localization of Rubisco and Its Activase in Chloroplasts of Barley and Maize Leaves[J]. *Journal of physiology and Molecular Biology*, 2004, 30 (5): 561-568.
- [24] 张江洪, 杨汉金, 林梅馨, 潘廷国. 巴西橡胶两品系叶片 RuBP 羧化酶的免疫荧光定位[J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2002, 31 (2): 234-237.
- [25] Jiang DA, Weng XY, Lu Q. Quantitation of Rubisco activase by single radial immunodiffusion[J]. *Journal of Zhejiang University (Agricultural Life Science)*, 2001, 27 (3): 255-258.
- [26] Miao YG, Li LR. Purification of Rubisco from Rice and Its Properties Compared with Those of Tobacco[J]. *Acta Phytophysiological Sinica*, 1991, 17 (2): 183-191.
- [27] Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo[J]. *Science*, 1990, 247 (4949): 1465-1468.
- [28] Tang DC, Devit M, Johnston SA. Genetic immunization in a simple method for eliciting an immune response[J]. *Nature*, 1992, 356 (6365): 152-154.
- [29] Wang NY, Jiang DA, Hong J, Zhang F, Weng XY. Diurnal changes of Rubisco and RCA activities and their cellular localization in rice[J]. *Acta Bot Sin*, 2003, 45 (9): 1076-1083.
- [30] Hattersley PW, Waton L, Osmond CB. Insituimmunofluorescent labelling of RuBPCase in leaves of C_3 and C_4 plants[J]. *Aust J Plant Physiology*, 1977, 4: 523-539.
- [31] Andersson I, Knight S, Schneider G. Crystal structure of the active site of ribulose biphosphate Carboxylase[J]. *Nature*, 1989, 337 (19): 229-234.
- [32] Zhao YS, Qiao XY, Wu NH, Wu XY. Nucleotide Sequence of Ribulose-1, 5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large Subunit Gene from Millet (*Setaria Italica*) [J]. *Acta Botanica Sinica*. 1996, 38 (9): 719-724.
- [33] Osmond CB, Bjorkman O, Anderson DJ. Physiological Processes in Plant Ecology[M]. *In Ecological Studies*, Springer-Verlag, New York, 1980, pp66-110.
- [34] Ernst K, Westhoff P. The posphenolpyruvate carboxylase (ppc) gene family of *Flaveria trinervia* (C_4) and *F.pringlei* (C_3): molecular characterization and expression analysis of the ppcB and ppcC genes[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 34 (3): 427-443.
- [35] Magnin NC, Cooley BA, Reiskind JB, BowesG. Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranzless, C_4 -type photosynthesis in *Hydrilla verticillata*[J]. *Plant Physiology*, 1997, 115 (4): 1681-1689.

- [36] 王卫兵, 洪健, 胡东维等. Rubisco 及其活化酶定位于豌豆和蚕豆叶绿体中[J]. 电子显微学报. 2005, 24 (2): 146-150.
- [37] 洪健, 何黎平, 王卫兵等. C₃ 和 C₄ 植物叶细胞中 Rubisco 和 RCA 的免疫金标记定位[J]. 电子显微学报. 2004, 23 (4): 351-352.
- [38] 洪健, 王卫兵, 蒋德安等. 大麦和玉米叶片叶绿体中 Rubisco 及其活化酶的免疫金标记定位[J]. 植物生理与分子生物学学报. 2004, 30 (5): 561-568.
- [39] Andersson I, Knight S, Schneider G. Crystal structure of the active site of ribulose biphosphate Carboxylase[J]. *Nature*, 1989, 337 (19): 229-234.
- [40] Zhao YS, Qiao XY, Wu NH, Wu XY. Nucleotide Sequence of Ribulose-1, 5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large Subunit Gene form Millet(*Setaria Italica*) [J]. *Acta Botanica Sinica*. 1996, 38 (9): 719-724.
- [41] Zhao YS, Jiang T, Wu NH, Wu XY. PCR Amplification, Cloning and Sequencing of RbcL Coding Region in Mesophyll Cell and Bundle Sheath Cell of Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) [J]. *Developmental and Reproductive Biology*. 1994, 3 (1): 23-28.
- [42] Hassett DE, Whitton JL. DNA immunization[J]. *Trends Microbiol*, 1996, 4(8): 307-312.
- [43] 阳菊华, 赵丽, 杨爽, 吴双庆, 张杰, 朱天慧. 重组人骨形态发生蛋白-6 的表达、纯化及其活性分析[J]. 生物工程学报, 2003, 19 (5): 556-560.
- [44] Maachupalli RJ, Kelley BD, De Bernardez CE. Effect of inclusion body contaminants on the oxidative renaturation of hen egg white lysozyme [J]. *Biotechnol.Prog*, 1997, 13 (2): 144-150.
- [45] 高永贵, 关怡新, 姚善泾. 包涵体蛋白的变复性研究[J]. 科技通报. 2003, 19 (1): 10-15.
- [46] Shoichi S, Nobuhiko M, Keisuke K. Carbon metabolism in transgenic rice plants that express phosphoenolpyruvate carboxylase and/or phosphoenolpyruvate carboxykinase[J]. *Plant Science*, 2006, 12 (3): 102-133.
- [47] Sakae A, Akiko M, Reina S. Overexpression of C₄ PEPC caused O₂-insensitive photosynthesis in transgenic rice plants[J]. *Plant Science*, 2002, 162 (11): 257-265.
- [48] Miyake H, Nishimura M, Takeoka Y. Immunogold labeling of Rubisco in C₄ plant for scanning electron microscopy[J]. *Plant Prod Science*, 2001, 4: 41-49.
- [49] Nishioka D, Miyake H, Taniguchi T. Suppression of granal development and accumulation of Rubisco in different bundle sheath chloroplast of C₄ succulent plant[J]. *Protulaca grandiflora*. *Ann Bot*, 1996, 77 (4): 629-637.
- [50] Anderson LE, Gibbons JT, Wang XW. Distribution of ten enzymes of carbon metabolism in pea (*Pisum sativum*) chloroplast[J]. *Int Plant Science*, 1996, 157 (12): 525-538.

致 谢

光阴荏苒，时光飞逝，终于结束了实验，提交了论文，三年的研究生学习生活画上了句号。此际我思绪万千，心情久久不能平静，似乎所有的语言都不能表达我的感受，在这里，谨向所有关心过我、帮助过我的师长及同学们，表示深深的谢意。

首先，我衷心感谢导师张富春教授、兰海燕教授在这三年中对我精心的培养，指导我完成学业。导师张富春教授的学者风范和高尚品德，是我一生中学习的楷模；他“先做人，再做事”的谆谆教诲，言犹在耳；他对科学研究的远见和独到见解，为我们指明了方向；深切感谢他对我们的严格要求，让我们没有虚度光阴。三年里，我在理论学习、实验操作和生活上遇到过很多困难，是兰老师言传身教帮助我解决了难题，是她悉心的指导拨开了我道路上的迷雾，是她和风细雨的关心给了我克服困难的勇气。真诚的祝愿二位导师身体健康，生活美满。

衷心感谢实验室的诸位老师，感谢马纪副教授指导我解决了统计分析中的难题，此间还得到了马振海老师、李江伟老师、曾幼玲老师、刘忠渊老师、李轶杰老师的许多建议和指导，感谢梁永海老师和阿力木老师辛勤的劳动，为我们创造良好的实验条件。对各位老师三年来无私的帮助表示诚挚的感谢！

衷心感谢和我一起走过研究生三年的同窗好友们，三年里，相互倾诉、彼此帮助、共同努力和不懈的奋斗建立了我们之间深厚的感情，毕业之际的千言万语都融汇在我对你们最真诚的祝福中；衷心感谢给过我建议和帮助的师兄师姐以及师弟师妹，向你们送上我最美好的祝福！

衷心感谢新疆大学生命科学与技术学院王虹老师、新疆大学理化测试中心骆建敏老师，在实验过程中给予了我很多帮助，在这里向她们表示衷心的感谢！

衷心感谢新疆大学研究生处和生命科学与技术学院的各级领导！

个人简历

刘彭 女 汉 1982/11/16

生物化学与分子生物学专业 硕士学位

联系方式: 0991-8583259; jtlppy@163.com



教育经历:

2000年9月-2004年7月 新疆大学生命科学与技术学院 学士

2004年9月-2007年7月 新疆大学生命科学与技术学院 硕士

发表论文:

1. 刘彭, 张海波, 秦丽, 蒋刚强, 兰海燕, 张富春. 新疆四种早春短命植物结实性及种子萌发特性初探. 新疆农业科学. 已接收.
2. 张海波, 刘彭, 刘立鸿, 兰海燕, 张富春. 新疆短命植物小拟南芥(*Arabidopsis pumila*)种子萌发特性与其生态适应性研究. 生态学报. 已接收.
3. 张海波, 刘彭, 刘立鸿, 兰海燕, 张富春. 新疆短命植物小拟南芥(*Arabidopsis pumila*)耐盐性的初步研究. 西北植物学报. 已接收.