

摘要

预计到本世纪末, 大气 CO₂ 浓度将会增加到 540~970ppm, 大气 CO₂ 浓度升高所引起的全球气候变化已经受到广泛的关注。植物生长依赖 CO₂, 并且对大气 CO₂ 浓度升高在结构和生理上产生响应。目前已有大量报道, 从生态系统、群落、种群、个体、器官、组织、生理以及生化等水平上研究高浓度 CO₂ 所对植物产生的影响。但是有关高浓度 CO₂ 对植物有性生殖影响的报道却很少, 同时多数实验均建立在短期的生殖响应, 忽视了植物在长期高 CO₂ 浓度下具有的反馈作用和 CO₂ 浓度变化对植物的驯化作用。植物有性生殖与其生态适应性和农作物籽粒产量的关系极为密切; 同时, 植物有性生殖特性的变化, 也可作为预测植物对全球气候变化响应的重要指标之一。为此, 利用高浓度 CO₂ 对植物进行长期选择实验将很有必要。研究结果将为预测未来大气 CO₂ 浓度增加的条件下降地生态系统的演变趋势、全球变化对植物有性生殖响应的方式和机制提供新的思路 and 有效方法。

在本研究中, 我们以模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)作为实验材料, 利用 370 和 700ppm CO₂ 对其进行连续 8 个世代处理, 首先研究高浓度 CO₂ 对每一个世代的拟南芥有性生殖特性的影响, 然后比较各个世代中各种生殖特性指标变化的规律, 从细胞、组织和个体尺度上揭示拟南芥有性生殖对全球变化的响应模式。此外, 在 700ppm CO₂ 处理下, 我们对拟南芥叶片生理、生化以及结构的变化进行了相关研究。两部分研究结果及主要结论如下:

首先, 在每一个世代中, 与 370ppm CO₂ 相比较, 700ppm CO₂ 处理显著促进了拟南芥开花, 缩短生长周期, 增加花、角果及种子等生殖的产量, 降低种子 N 含量, 提高种子 C/N 比、种子千粒重以及生殖生物量所占总生物量的比例等, 而对种子萌发率、角果所含种子数目以及角果长度则无显著影响。但是, 通过对相同 CO₂ 浓度处理条件下, 不同世代之间的研究结果比较发现, 不同世代之间相关的生殖生物学指标并无显著差异。

其次, 高浓度 CO₂ 显著降低叶片气孔密度、气孔指数、气孔导度以及蒸腾速率。在高浓度 CO₂ 处理下, 叶肉细胞中叶绿体数目、叶绿体宽度和表观面积、淀粉粒大小和数量、叶片和细胞壁厚度等都显著增加, 但是基粒内囊体膜的数量却显著下降。叶片中碳水化合物如可溶性总糖、淀粉以及纤维素含量在高浓

度 CO₂ 下分别显著增加 71.9%、78.7% 和 22.3%。此外, 在高浓度 CO₂ 处理下, 叶片中多数激素如吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、赤霉素(gibberellin, GA)、玉米素核苷(zeatin riboside, ZR)、二氢玉米素核苷(dihydrozeatin riboside, DHZR)和异戊烯基腺苷(isopentenyl adenosine, iPA)均都显著地增加, 而脱落酸(abscisic acid, ABA)含量却有所下降。最后, 叶片中各种矿物质元素含量如 N、P、K、Ca 和 Mg 等含量在高浓度 CO₂ 处理下也都显著下降, 而 C/N 比增加 24.8 %。

以上结果表明:

(1) 在每一个世代中, 700ppm CO₂ 处理对拟南芥各种有性生殖特性具有显著的影响, 但是高浓度 CO₂ 处理对植物所引起的效应在多个世代以内并不能够传递给后代, 所以在多个有性生殖世代内, 高浓度 CO₂ 处理对植物生长、生殖没有驯化作用。

(2) 在高浓度 CO₂ 处理下, 拟南芥叶片中叶绿体超微结构的变化, 可能主要是由于叶绿体中淀粉粒数量和体积大小显著增加而引起。

(3) 在高浓度CO₂处理下, 由于拟南芥叶片内与促进细胞分裂与伸长的激素含量显著增加, 从而对拟南芥植株生长发育速率的提高起了重要的作用。

(4) 拟南芥生长在高浓度CO₂条件下, 其叶片中各种矿质元素含量(如N、P、K、Ca和Mg)均显著降低, 究其原因可能是, 第一由于叶片中碳水化合物含量的显著增加而对矿物质元素具有稀释作用; 第二由于蒸腾速率下降, 引起矿质元素从根部随着蒸腾流运输到地上部分的含量相应减少。

关键词: 拟南芥; 高浓度CO₂; 有性生殖; 叶片超微结构; 矿物营养; 植物适应性; 植物激素; 蒸腾速率.

Abstract

Atmospheric CO₂ concentration is expected to rise from current levels of about 370ppm to between 540 and 970ppm by the end of this century and the effects of rising atmospheric CO₂ concentrations on the global climate have attracted considerable attention. Because CO₂ is one of raw materials of plant photosynthesis, thus plant growth responds both physiologically and anatomically to elevated CO₂. So far, a great number of studies have investigated plant responses to elevated CO₂ at different scales ranging from ecosystem, community, population, plant, organ, tissue, physiological, biochemical to molecular levels, nevertheless few studies have focused on the effects of elevated CO₂ on plant reproductive characteristics and nearly no studies have reported the effects of long-term CO₂ on plant reproductive characteristics. It has been accepted that plant reproductive characteristics are key traits for predicting the response of communities and ecosystems to global change and are also closely related to its ecological fitness and production of crops. Furthermore, investigation on the long-term response of plant to elevated CO₂ under a completely man-controlled environment can increase our capacity to predict the properties of populations adapted to rising atmospheric CO₂ in the near future. Therefore, it is essential to carry out CO₂ selection experiments to investigate effects of long-term CO₂ on plant reproduction and adaptation of plant reproduction to elevated CO₂.

In the present study, *Arabidopsis thaliana*, a model plant widely used in molecular, genetic, and developmental biology, was continuously grown under both elevated (700ppm) and ambient (370ppm) CO₂ for eight generations. The changes in various reproductive characteristics of an individual generation were determined and their overall changes in eight generations were further investigated. In addition, the changes in physiological, biochemical, and cytological traits of leaves of *Arabidopsis* grown under both elevated and ambient CO₂ condition were compared. The main results and conclusions in this paper are listed as follows:

Within an individual generation, elevated CO₂ advanced the flowering time of *Arabidopsis* through increasing relative growth rate and accelerating developmental process, and resulted in more flowers, more fruits, more seeds, more mass allocated

to reproduction as well as an increase in seed C/N ratio, whereas the treatment had no significant effects on silique length, seed number per silique, seed germination rate. When all the generations were compared, there were no significant differences in their reproductive responses to elevated CO₂ among different generations of *Arabidopsis* grown under the same CO₂ concentration.

Elevated CO₂ reduced stomatal density and index of leaves, accompanied with reductions in stomatal conductance and transpiration rate. Elevated CO₂ increased average chloroplast number per mesophyll cell, chloroplast width and profile area, starch grain size and number, cell wall and leaf thickness, but decreased the number of grana thylakoid membranes. Under elevated CO₂, the concentrations of carbohydrates including soluble sugars, starch and cellulose in leaves significantly increased by 71.9%, 78.7% and 22.3%, respectively. In addition, there was a significant increase in the levels of indole-3-acetic acid (IAA), gibberellins A3 (GA₃), zeatin riboside (ZR), dihydrozeatin riboside (DHZR) and isopentenyl adenosine (iPA) and a remarkable decrease in abscisic acid (ABA) concentration in the leaves of plants grown at elevated CO₂. It was further found that N, P, K, Ca and Mg levels in leaves were reduced by elevated CO₂, while C/N ratio significantly increased by 24.8% under CO₂ enrichment.

The results suggested that (1) elevated CO₂ had a positive effect on sexual reproduction of *Arabidopsis* in each generation, but sexual reproduction of *Arabidopsis* failed to evolve specific adaption to elevated CO₂ treatment; (2) the increased starch accumulation in chloroplasts in leaves grown in elevated CO₂ may be responsible for the changes in chloroplast ultrastructure; (3) the significant increase in plant hormone levels in leaves grown in elevated CO₂ could be an important factor in the accelerated growth and development of *Arabidopsis*; (4) the reductions in mineral nutrition in leaves grown in elevated CO₂ were mainly attributable to the dilution of carbohydrates and the decrease in leaf stomatal conductance and transpiration rate.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; elevated CO₂; leaf ultrastructure; mineral nutrition; plant adaptation; plant hormones; sexual reproduction; transpiration rate.

关于学位论文使用授权的说明

本人完全了解中国科学院植物研究所有关保留、使用学位论文的规定，即：植物研究所有权保留送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以提供目录检索以及公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

(保密的论文在解密后遵守此规定)

学位论文作者签名：

2006 年 5 月 11 日

-----经指导教师同意，本学位论文属于保密，在-----年解密后适用本授权书。

指导教师签名：		学位论文作者签名：	
解 密 时 间：	年 月 日		

各密级的最长保密年限及书写格式规定如下：

内部 5 年（最长 5 年，可少于 5 年）
秘密★10 年（最长 10 年，可少于 10 年）
机密★20 年（最长 20 年，可少于 20 年）

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师指导下，进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本学位论文的研究成果不包含任何他人创作的、已公开发表或者没有公开发表的作品的内容。对本论文所涉及的研究工作做出贡献的其他个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本学位论文原创性声明的法律责任由本人承担。

学位论文作者签名：滕得

2006 年 5 月 11 日

第一章 前言

1.1 植物有性生殖对高浓度 CO₂ 响应的研究进展

自 18 世纪工业革命以来,随着化石燃料消耗的不断增加以及伐木毁林的加剧,全球大气 CO₂ 浓度从当时的 280 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ (ppm)增加到目前的 370 ppm 左右,并且还在以每年 1.5 ppm 的速率递增,预计到本世纪末,大气 CO₂ 浓度将会增加到 540~970 ppm (IPCC 2001)。自 20 世纪 70 年代以来,有关大气 CO₂ 浓度增高及其全球变化,一直为全世界关注的研究热点之一(张新时等 1997; 方精云 2000)。近十多年来,关于大气 CO₂ 浓度升高对植物的影响,国内外学者曾从分子、细胞、器官、物种、种群直至生物圈等不同层次分别做了大量的研究工作,发表的学术论文已达数千篇之多,在这些文章中,主要涉及 CO₂ 浓度升高对植物光合与呼吸强度、叶绿素含量、营养器官各种生长参数和结构、气孔导度与密度、水分利用效率、生物量与产量、植物化学成分以及主要酶系统含量等方面的影响,但植物有性生殖对 CO₂ 浓度升高响应的研究相对较少(滕年军等 2006)。然而值得注意的是,植物有性生殖与其生态适应性,以及与农作物籽粒产量的关系极为密切。此外,植物有性生殖特性的变化,也可作为预测植物对全球气候变化响应的重要指标之一(Ziska and Caulfield 2000; Jablonski et al. 2002)。为此,本文将全面综述近十多年来,有关大气 CO₂ 浓度升高对植物有性生殖变化特点的国内外报道,以期国内正在或即将开展这方面的研究工作提供参考。

1.1.1 对植物开花时间的影响

通常在高浓度 CO₂ 条件下,大多数植物开花会提前数天到 2 周不等(Garbutt and Bazzaz 1984; Murray 1997)。一些重要农作物如小麦、水稻、大豆等在高浓度 CO₂ 条件下,均比对照提前数天开花(Migletta et al. 1998; Uprety et al. 2003; Johannessen et al. 2005)。Wagner 等(2001)研究发现,优质牧草白三叶(*Trifolium repens*) 在 600ppm CO₂ 浓度条件下,开花时间比正常的提前 10 天,作者认为可能由于其花芽分生组织在发育过程中获得了更多的营养物质,使发育速度加快,从而开花时间提前。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 在 1000ppm CO₂ 浓度处理下,32 天时抽苔,而在 360 ppm CO₂ 浓度下 37 天时才抽苔;通常在播种后的 3 周内,

正是拟南芥幼苗生长发育的关键阶段,它对 CO₂ 浓度升高的反应最为敏感,生长明显加快,而 3 周以后其相对生长速率则无明显变化(Gibeaut et al. 2001)。相反地,有些植物开花时间对高浓度 CO₂ 处理反应不明显,甚至会推迟。如黑麦草(*Lolium perenne*)开花时间不受高浓度 CO₂ 处理的影响(Wagner et al. 2001);而菊花(*Dendranthema grandiflora*)随着 CO₂ 浓度的增加则延长了开花时间(Reekie et al. 1994)。由上可见,在大气 CO₂ 浓度升高条件下,各种植物的开花时间均存在明显差异,这可能与物种的光周期特性密切相关。如长日照植物个体发育、花芽的诱导和发育均受到高浓度 CO₂ 的影响相应提前开花;而短日植物的花芽诱导则被推迟,或延缓花芽发育的时间(Reekie et al. 1994; Ellis et al. 1995; Rusterholz and Erhardt 1998; LaDeau and Clark 2001; Wagner et al. 2001; Lewis et al. 2003)。Reekie 等人(1994)曾报道了 CO₂ 浓度加倍分别对菊花、长寿花(*Kalanchoe blossfeldiana*)、裂叶牵牛(*Pharbitis nil*)和苍耳(*Xanthium pensylvanicum*)等 4 种短日照植物,以及 4 种长日照植物欧蓍草(*Achillea millefolium*)、疗喉草(*Trachelium caeruleum*)、意大利风铃草(*Campanula isophylla*)和翠菊(*Callistephus chinensis*)开花时间的影响,结果发现,长日照植物均相应提早 5~14 天进入开花期,而与长日照植物相比,短日照植物则推迟 1~4 天开花。更有趣的是, Mortensen(1985)认为,即使同一种植物,对 CO₂ 浓度的增加也有不同响应。譬如短日照植物一品红(*Euphorbia pulcherrima*),当 CO₂ 浓度升高到 1000 ppm 时,可提前 4.6 天开花;如果在此基础上再增加 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光合光子通量(photosynthetic photon flux),则开花还可提前 6.6 天。

植物生殖的起始期,是其生活史中的关键参数,在成熟时对应年龄或植株大小均反映了生活史的适合度(fitness)(Wesselingh et al. 1997)。通常,植物生殖起始期的提前可通过两种机制来实现:第一是在植物有性生殖开始时所需最小形体大小保持不变情况下,通过提高植物相对生长速率,以加快个体发育,使得植株在较短时间内达到有性生殖所需的形体大小(Reekie et al. 1994; Ladeau and Clark 2001; Wagner et al. 2001);第二是通过改变植物开花时所需的形体大小(Reekie et al. 1994; He and Bazzaz 2003)。而大多数研究者认为,植物形体大小是影响植物开花的首要因素,而植物开花的时间与其年龄关系不大(Reekie et al. 1994; Ladeau and Clark 2001; Wagner et al. 2001; He and Bazzaz 2003)。高浓度 CO₂ 通过提高美国商陆(*Phytolacca americana*)相对生长速率来加快个体发育,使得该植物提前一周开花,但该物种在有性生殖开始时的形体大小并未受

到高浓度 CO₂ 的影响(He and Bazzaz 2003)。1000 ppm CO₂ 虽然使得拟南芥提前 5 天抽苔,但此时植株形体大小与生长在 360 ppm CO₂ 浓度条件下植株抽苔时形体大小无多大差异;高浓度 CO₂ 并不影响拟南芥开花时植株形体大小,而主要是通过提高个体相对生长速率来促进植株提前开花(Gibeaut et al. 2001)。另外,Reekie 等(1991)通过对 *Guara brachycarpa*、天人菊(*Gailardia pulchella*)、月见草(*Oenothera laciniata*)和羽扇豆(*Lupinus texensis*)等 4 种植物的研究结果证实,在 CO₂ 浓度增加的条件下,植物生长和开花起始期都将受到影响,即植物开花可能处于不同年龄,而此时植株形体大小或多或少基本一致。因此,一些学者认为,植物在高浓度 CO₂ 生长条件下提前开花,可能是由于在植株开花时形体大小保持不变的情况下,光合速率增加使得相对生长速率加快,加速个体发育进程,促使生殖起始期所需植株的最小形体时间变短,从而提前开花,这属于间接效应(Ladeau and Clark, 2001; Wagner et al. 2001; He and Bazzaz 2003)。但也有一些学者则认为,可能是诱导开花激素浓度的改变,似与生长速率的加快无直接联系,尤其是当温度、光周期等参数基本一致时,CO₂ 浓度也可能成为一种直接诱导的因子(Reekie and Bazzaz 1991)。

1.1.2 对花、果实与种子产量的影响

通常,植物花部的发育对CO₂浓度变化的响应相当敏感,如在高CO₂浓度条件下,大多数植物的开花数量增多(Jablonski et al. 2002)。Thurig等(2003)通过对 61种植物在高浓度CO₂下开花影响的研究时发现,这些植物在群体水平上,其花枝数目平均提高24%左右。Jablonski等(2002)对已发表的159篇论文,涉及79个物种的相关资料进行整合分析(meta-analysis)后表明,在500~800 ppm CO₂浓度下,所有植物的开花数量平均增加19%。花数量增加与质量提高对农牧作物和园艺植物来说尤为重要,特别是农牧作物开花数量的增加是籽粒增产的前提条件,如水稻在CO₂浓度升高情况下,其分蘖和开花数量均有显著增加(Costa et al., 2003)。同样对一些园艺植物来说,花器官数量增加与质量改善,不仅可增加园艺植物果实产量,而且还可提高一些花卉植物观赏效果和切花品质,从而获取较高的经济效益。又如以收获果实为目的草莓(*Fragaria ananassa*)(Chen et al. 1997)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)(Prasad 2002)、西红柿(*Lycopersicon esculentum*)(Reinert et al. 1997)等园艺植物,其开花数量都有明显增加,同时盛花期间以及开花持续时间均得到延长,最终果实产量也相应地得到显著增加。而

对生长在高浓度CO₂条件下的一些观赏植物, 如百合(*Lilium dauricum*)(魏胜林等 2001)、蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)(Endo and Ikushima 1997)以及唐菖蒲(*Gladiolus hybridus*)(张效平 1995)等, 高浓度CO₂不仅能够增加鲜花产量, 而且还明显延长了切花瓶插的寿命, 进而提高了切花的经济价值。切花瓶插寿命的提高, 可能与花卉组织中一些抗衰老物质的增加有关, 如在高浓度CO₂条件下百合叶片中脯氨酸、可溶性糖以及氨基酸含量明显增加, 这些物质是细胞渗透调节与代谢所必需, 同时还能提供更多能量物质来延长鲜切花的寿命(魏胜林等 2001)。

关于 CO₂ 浓度升高对植物有性生殖产量的影响, 多见于对农作物的研究报道。在通常情况下, CO₂ 浓度升高主要是通过增加农作物果实或种子数量来提高产量, 而对其大小却影响不大(Ainsworth et al. 2002; Jablonski et al. 2002)。Kimball(1983)对 430 篇有关农作物的研究报道进行了分析后发现, 农作物平均产量增加约为 34%, 而籽粒平均大小几乎没有变化。Ainsworth 等(2002)采用整合分析方法, 将 1980 年到 2000 年的 20 年间, 在国际期刊上发表的 111 篇论文中有关 CO₂ 浓度升高对大豆生长影响作了全面分析, 结果表明, 大豆种子产量平均增加 24%, 主要是豆荚数目平均增加 19%所致, 而单粒种子的平均重量并无显著变化。最近, Jablonski 等(2002)也发现, 在高浓度 CO₂ 处理下, 水稻、大豆、小麦以及玉米等农作物果实、种子数量、以及产量平均分别增加了 18%、16%和 25%, 而单粒种子平均重量仅增加为 4%。除农作物以外, 如白三叶等一些重要牧草, 在 CO₂ 浓度升高条件下, 其种子数量增加 18%以上, 但种子千粒重却未受到 CO₂ 的影响(Wagner et al. 2001)。为何 CO₂ 浓度变化对种子数量的影响程度大于种子大小呢? 通常认为, 植物子代的适合度与亲代投入的资源量成正相关, 但是种子变大将会使得种子数量下降, 因为植物投入到有性生殖的资源是有限的, 即种子大小与数量之间存在着权衡关系(trade-off)(Smith and Fretwell 1974; Lloyd 1987)。经典的 Smith—Fretwell 模型成功地解释了为何种子大小往往保持恒定值, 该模型认为, 植物子代个体的适合度曲线与其最优种子大小(optimal seed size)密切相关。在一个种群内, 其种子适合度曲线往往受生境条件影响较小, 这样, 种子大小就不易发生改变。如果该种群投入到种子生产的资源增加, 由于种子适合度曲线变化不大, 使得种子大小变化也不大, 因此, 种子数量将会增加(Smith and Fretwell 1974; 张大勇 2004)。CO₂ 浓度升高通常会提高植物绝对生殖产量, 由于最优种子大小一般受环境条件(包括 CO₂ 浓度变化)影响较小, 所以种子数量就会相应增加。

因此,在高 CO₂ 浓度条件下,通常大多数植物的生殖生物量,如花、果实与种子数量等均会显著增加,而种子平均大小的增加幅度却相对较少。此外,一些花卉植物的观赏效果和切花品质也可得到明显提高。

1.1.3 对不同类型植物有性生殖的影响

虽然高浓度 CO₂ 能提高植物生殖生物量的产量,但由于各种植物(如农作物与野生植物,豆科植物、C₃ 与 C₄ 植物,定型植物与不定型植物等)存在类型上的差异,这就使得其生殖产量的变化幅度产生明显的变化。一般认为,农作物产量增加幅度要远远高于野生植物(Evans 1993; Hall and Ziska 2000)。Jablonski 等(2002)通过对 159 篇文献进行整合分析发现,高浓度 CO₂ 对农作物与野生植物的总生物量提高幅度无明显差别,均约为 31%。但对果实和种子的生物量来说,农作物平均增加 28%和 21%,而野生植物只有 4%左右。该作者认为,由于在 CO₂ 浓度增加条件下,农作物分配到有性生殖的资源比例未发生显著变化,而野生植物在相同条件下分配到有性生殖的资源却下降了 14%。为何农作物在 CO₂ 浓度升高情况下,其生殖生物量增加幅度要远远高于野生植物?一些学者认为,农作物是经过数百年人工选择所筛选出来的最优良品种,它们的果实或种子无论在产量还是在质量上都达到最优状态。因此在大气 CO₂ 浓度不断增加下,它们会充分利用 CO₂ 进行光合作用,并把较多的资源用于生殖生长,从而大大的提高了生殖产量。然而对一些野生植物来说,由于它们是通过长期自然选择的结果,其物质资源分配在其生长、生殖、生存以及防御等方面需要有权衡关系;同时它们在营养和生殖生长特性上也比农作物具有更大的可塑性。总之,由于野生植物比农作物的生长环境差,并且还存在着许多难以预测的因素,因此当这类物种在 CO₂ 浓度升高条件下持续繁衍下去时,是把大部分资源用于营养生长、生存以及防御等方面,而不太可能分配更多的资源用于其生殖生长(Hall and Ziska 2000; Jablonski et al. 2002; Toshihiko et al. 2003)。

通常,CO₂ 浓度升高情况下,豆科植物产量增加幅度高于非豆科的 C₃ 植物,而 C₄ 植物其产量增加幅度最小(Poorter 1993; Wand et al. 1999)。Jablonski 等(2002)通过研究发现,豆科植物种子平均产量显著增加 37%,非豆科的 C₃ 植物增加 15%左右,而 C₄ 植物则无明显变化。以大豆、小麦和玉米为例,在高浓度 CO₂ 条件下,平均产量分别增加为 20%,15%和 5%。为何不同类型植物的有性生殖对 CO₂ 浓度升高的响应程度为:豆科植物>非豆科 C₃ 植物>C₄ 植物?究其原因,

是因为豆科植物具有固氮能力,即使在 CO₂ 浓度升高情况下,也不会由于氮的缺乏而使其生长受到限制;但对其它非豆科植物来说,当它们遇到氮素缺乏时,其生长在一定程度上则会受到影响,生殖产量增加的幅度也比豆科植物低。另外, C₃ 植物进行光合作用固定 CO₂ 的酶是核酮糖二磷酸羧化/加氧酶(ribulose biphosphate carboxylase, Rubisco), C₄ 植物为磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase)和 Rubisco 两种酶类, C₄ 植物在这两种酶的协同作用下利用空气中 CO₂ 的能力要远高于 C₃ 植物。相对于 C₄ 植物来说,目前空气中的 CO₂ 浓度还远不能使 C₃ 植物 Rubisco 酶得以饱和,当 CO₂ 浓度升高时, C₃ 植物光合作用增加幅度和光呼吸抑制程度均高于 C₄ 植物,因而 C₃ 植物总生物量以及生殖生物量增加幅度均会相应的高于 C₄ 植物(Poorter 1993; Ward et al. 1999; Ward and Kelly, 2004; 牛书丽和蒋高明 2003)。但是也有一些例外,如 C₃ 植物的水稻平均产量增加 42%,其产量增幅大于豆科植物的 37%,其原因可能与在农业上广泛采用高产、半矮化、光合能力极强且具有较大库强(sink strength)的水稻品种,同时水稻又长期生长在有水和高养分条件下有关(Horie et al., 2000; Jablonski et al. 2002)。

依据植物对 CO₂ 浓度变化敏感的程度,通常可分成定型植物(determinate plants)和不定型植物(indeterminate plants)两大类(Lawlor and Keys 1993; Morison and Lawlor 1999; He and Bazzaz 2003)。定型植物是指在植物生活史中,其发育过程、生长模式乃至植株大小、器官数量和库源能力等参数都变化不大的植物,如欧洲苍耳(*Xanthium strumarium*)、黑麦草(*Lolium perenne*)和白车轴草(*Trifolium repens*)等 (Wagner et al. 2001; Lewis et al. 2003);而在不定型植物的生活史中,上述各种参数的变化较大,如野萝卜(*Raphanus raphanistrum*)与拟南芥等(Curtis et al. 1994; Ward and Strain 1997)。过去的研究显示,CO₂ 浓度升高时,定型植物的果实和种子数目变化不大(Navas et al. 1997; Huxman et al. 1999; Wagner et al. 2001),而不定型植物的果实和种子数目却显著增加(Curtis et al. 1994; Ward and Strain 1997; Edwards et al. 2001)。因此,不定型植物的有性生殖对 CO₂ 浓度升高的响应程度远比定型植物高。究其原因,可能是定型植物库源能力不易受到改变,从而使其生殖产量对 CO₂ 浓度升高响应程度较小的缘故(Morison and Lawlor 1999)。

1.1.4 对花粉与花蜜产量与质量的影响

菊科植物的豚草(*Ambrosia artemisiifolia*)是一种能产生大量花粉的植物,其花粉是引起人类“干草热”(hay fever)的主要原因之一。据有关报道,目前“干草热”患者数量逐年增加与空气中花粉数量的增加有关,而花粉数量的增加又与大气中 CO₂ 浓度的升高紧密相关(Bagarozzi et al. 1998; Ziska and Caulfield 2000)。例如 Ziska 和 Caulfield (2000)比较了在 600 和 370ppm 两种不同 CO₂ 浓度下豚草花粉的产量,结果发现,在 600ppm 生长条件下,豚草花粉产量竟为 370ppm 的 2.5 倍。此外,Aloni 等(2001)在研究高温与 CO₂ 浓度对牛角椒(*Capsicum annuum*)花粉活力影响时发现,高温能显著降低其花粉活力,而高浓度 CO₂ 则减弱高温对花粉活力的影响。未曾受到高温处理的植株,其花粉萌发率是受高温处理植株的三倍;在 800ppm CO₂ 浓度生长条件下的辣椒,当给予同样高温处理后,其花粉萌发率与对照均无明显差异。通过进一步的研究发现,花粉萌发率的改变与花粉中果糖激酶(fructokinase)和己糖激酶(hexokinase)的活性变化有关,由于这两种酶在花粉萌发过程中的物质代谢起了关键性的作用,因此它们的活性降低将直接导致花粉萌发率的降低。如果植株在 800ppm CO₂ 浓度条件下受到同样高温处理后,其花粉中的上述两种酶活性并未受到显著影响,结果花粉萌发率也未发生明显变化。由此推测,高浓度 CO₂ 可能通过减弱高温对花粉和花药发育过程中相关酶活性的影响,从而保持了花粉的活力(Karni and Aloni 2002)。

Osborne 等(1997)报道,在高浓度 CO₂ 下生长的蚕豆(*Vicia faba*),虽然单花蜜产量无显著变化,但由于花量增加 25%,同时花的寿命又延长 17%,因而总的花蜜产量也就明显增加了。早金莲(*Tropaeolum majus*)生长在 CO₂ 浓度为 750ppm 的条件下,其蜜腺分泌蜜汁的速度明显加快,而蜜汁中蔗糖和氨基酸等主要成分的浓度却未发生显著变化(Lake and Hughes 1999)。

1.1.5 对种子与果实质量的影响

通常认为,在 CO₂ 浓度升高情况下,种子中的 C/N 比升高、而含氮量、蛋白质和自由氨基酸含量降低、营养成分下降、千粒重增加以及萌发率和萌发势加强等(Jablonski 2002; Barbara et al. 2003; Stiling et al. 2004; He et al. 2005)。Kimball 等(2001)研究表明,在未来的大气 CO₂ 浓度增加条件下,如果土壤中可用氮的含量得不到补充,那么谷物中的蛋白质含量就会降低 39%,而碳水化合物含量则相对提高,从而导致谷物营养价值的下降。反之,如果土壤含有足够氮肥,那

么谷物的质量受到的影响较小,蛋白含量也只降低5%左右。最近,Barbara等(2003)对一些草地植物的研究发现,在CO₂浓度升高情况下,这些植物种子的平均重量均有所增加,种子萌发时间缩短,但种子的含氮量显著降低。还有一些学者通过对已发表的278篇有关文献的分析表明,种子氮含量平均降低14%,其中非豆科C₃植物种子的氮含量降低16%左右,而豆科植物种子的氮含量无明显变化。究其原因,可能是豆科植物根部具有固氮能力的根瘤菌,它们能从空气中直接固定氮素,进而直接补充植物在高CO₂浓度下快速生长对氮肥的需求(Cotrufo et al. 1998; Allen and Boote 2000; Jablonski et al. 2002)。另外,火炬松(*Pinus taeda*)在CO₂浓度升高情况下,其种子萌发率提高两倍,萌发时间也提前5天,幼苗的生长速度加快和生长势增强,这就使得它们在群体中具有更强的竞争力(Hussain et al. 2001)。但也有研究者发现,种子重量增加对幼苗大小并无多大影响,其原因可能是由于种子含氮量的降低抵消了种子重量增加带给幼苗的优势(Steinger and Gall 2000)。

大气CO₂浓度在600~900ppm条件下,草莓果实平均重量和干物质含量均有所增加,其中含糖量显著提高,糖:酸比也相应增加,从而果实的品质得到了明显改善(Chen et al. 1997)。曼陀罗(*Datura stramonium*)的果实可随着CO₂浓度的升高,重量显著增加,果皮厚度和果皮表面的针刺数量均有增加;同时果实内有毒化合物的含量也随之增加。上述现象说明,植物可能是为增强适应能力所采取的一种策略,通常防御性强的植株后代,其生存能力要比增加种子数目的后代强(Garbutt and Bazzaz 1984)。

小麦、水稻等农作物生长在高浓度CO₂条件下,虽然其产量得到提高,但籽粒中的营养成分却有所下降,其中包括氮含量降低、C/N比上升、人体所需蛋白质和氨基酸的种类与含量,以及铁和锌等微量元素含量均明显下降(Manderscheid et al. 1995; Seneweera and Conroy 1997; Ziska et al. 2004)。Seneweera和Conroy(1997)在研究高浓度CO₂对水稻籽粒品质影响时发现,不仅籽粒蛋白含量降低,而且人体所需的Fe和Zn等微量元素含量也显著下降。Manderscheid等(1995)报道了生长在高浓度CO₂条件下的两个春小麦和春大麦品种,结果发现,上述四种作物的籽粒蛋白含量降低4%~30%,而籽粒中的N、Ca、Mg等大量元素含量分别降低30%、13%和28%;此外,微量元素S的含量也有所降低,进而影响到一些含S蛋白质的合成。因此,人们在衡量CO₂浓度升高对农作物产量的影响时,决不能简单的以产量的增减作为标准,还应当考虑

谷物增产后品质发生的改变(蒋高明等 1997; Blumenthal et al. 1996; Rogers et al. 1998)。

总之,在大气 CO₂ 浓度升高条件下,植物果实与种子的产量通常会有所增加,种子萌发率与萌发势也会有所提高(Hussain et al. 2001; Ainsworth et al. 2002; Jablonski et al. 2002; Barbara et al. 2003)。但值得注意的是,除豆科植物的种子以外,其他植物的种子营养成分也会有所降低,主要表现为 C/N 比升高,蛋白质和自由氨基酸、以及铁和锌等微量元素的含量均明显下降(Manderscheid et al. 1995; Seneweera and Conroy 1997; Kimball et al. 2001; Ziska et al. 2004)。

1.1.6 对植物群落构建的影响

特别值得注意的是,当大气 CO₂ 浓度升高后,由于植物有性生殖特性发生了变化,由此将会引发一系列不寻常的后果。例如当植物开花期提前或延缓后,使许多植物的繁殖成效(reproductive success)受到影响,从而改变了一些植物群落构建的布局。其中最典型的例子是,一些虫媒花植物经过长期演化和自然选择后,它们均具有特定类型的昆虫在一定时间来进行采蜜和传粉,以帮助这些植物完成授粉和受精作用。如果当大气 CO₂ 浓度升高后,则会引起此类植物的开花时间过度提前或推迟,从而在植物开花的时候,那些专为其传粉的昆虫可能尚未出现,或者已迁徙到其它地方去了,这样就使得这类植物种群中的个体授粉几率大为减少,繁殖力下降。如果经过几代繁殖后,将会成为退化种群,最终将可能导致这类物种的灭绝(Garbutt and Bazzaz 1984; Rusterholz and Erhardt 1998)。此外,在同一个植物群落内生长的不同植物种群之间,由于大气 CO₂ 浓度升高,使得其中一些种群的花量增加,而另一些种群的花量相对减少,这样前者就有可能吸引更多昆虫来采蜜传粉,长此以往,花量相对减少的种群授粉几率明显下降,种群衰退,这就使得整个群落的竞争等级(competitive hierarchies)发生相应的改变(Reekie and Bazzaz 1991; Reekie et al. 1994)。

植物种子产量与质量的变化,对植物群落的变化也有很大的影响。当大气 CO₂ 浓度升高后,使得有些类型植物的种子产量增加,种子体积变大,种子的萌发率和萌发势增强等,这利于其后代在植物群落中具有更强的竞争力,最终有可能成为优势种群。而另一些植物种类,由于其种子产量和质量变化不大,后代在植物群落中的竞争力相对减弱,从而可能成为弱势种群,并最终走向灭绝的道路(Baskin and Baskin 1998; Gutterman 2000; Stiling et al. 2004)。Stiling等

(2004)在对一个植物群落中三种栎属植物(*Quercus myrtifolia*、*Q. chapmanii* 和 *Q. geminata*)的研究发现,在CO₂浓度升高下,前两者的种子产量显著增加,而后者种子产量却变化不大;虽然它们的种子大小与萌发率均未发生明显变化,但是作者仍认为,CO₂浓度升高将会改变这个群落中三个物种生殖产量的比例,其中 *Q. geminata* 的种子产量相对降低,而同一个群落中的 *Q. myrtifolia* 和 *Q. chapmanii* 就会占据更多的资源和空间,并进行大量繁衍;同时还由于它们种子质量的提高,种子萌发率和萌发势的增加,幼苗生长茁壮,均能使它们在该群落中通过种间生存竞争而获胜成为优势种群。相反地,由于 *Q. geminata* 的生长资源和空间受到限制,最终被淘汰(Edwards et al. 2001; Hussain et al. 2001)。

另外,雌雄异株植物的生长发育,对 CO₂ 浓度升高的响应也存在较大差异。如 Wang 和 Curtis (2001)在研究雌雄异株颤杨(*Populus tremuloides*)的生长发育时,发现在 CO₂ 浓度升高条件下,虽然雄株光合作用强度增加的幅度高于雌株,但由于雌株总叶面积明显高于雄株,而呼吸作用强度却低于雄株,雌株最终的生物量显著高于雄株。2003 年,这些作者通过对雌雄异株的叉枝蝇子草(*Silene latifolia*)的研究进一步发现,在高浓度 CO₂ 条件下,雌性个体总生物量显著增加,其中生殖器官生物量的增加幅度远高于营养器官生物量;而雄株生殖器官生物量的增加幅度则明显低于雌株。他们由此推测,在未来大气 CO₂ 增加情况下,由于雌雄个体植株生长发育所受到的影响不同,使得用于营养生长和生殖生长的资源分配比例发生变化,从而有可能改变雌雄个体的比例,最终将导致植物繁殖、分布格局以及群落结构等的变化(Wang and Curtis 2001; Wang and Griffin 2003)。

因此,在未来大气CO₂浓度升高情况下,有些植物的有性生殖对CO₂升高表现出正面效应,从而逐渐成为植物群落中的优势种群,而那些对CO₂升高表现出负面效应的种类则成为退化种群,并最终有可能被淘汰,致使一些植物群落构建发生明显的变化(Garbutt and Bazzaz 1984; Baskin and Baskin 1998; Rusterholz and Erhardt 1998; Gutterman 2000; Stiling et al. 2004)。

1.1.7 结论与展望

总之,植物有性生殖特性的变化是预测植物对全球气候变化响应的重要指标之一,其有性生殖特性对大气CO₂浓度升高的响应主要表现为:植物相对生长速率加快,开花提前;花、果实与种子等生殖生物量增加。除豆科植物种子外,

其它植物种子的营养成分均会有不同程度的降低。不过值得注意的是,在以往的研究中仍存在一些不足之处。例如,有些研究尚未充分考虑到物种本身的特性,将长日植物与短日植物混为一谈,这就有可能使植物的开花时间对CO₂浓度升高的响应得出互为矛盾的结论。大多数的报道以开花物候学、种子产量等为指标,而对这一过程中的生殖生态与生理生化参数的变化重视不够。再者,对植物有性生殖特性响应的研究结论多建立在短期的观察结果,或以1~2个生长季(生殖周期)的变化模式为基础,忽视了植物长期在高CO₂浓度下具有的反馈作用,以及CO₂浓度变化对植物可能驯化的影响等。

1.2 本课题来源与研究意义

本课题为中国自然科学基金重点项目“植物有性生殖对大气CO₂浓度变化的响应”(90211005)支持的研究工作的一部分。

关于在高浓度CO₂条件下,植物经过数个有性世代的处理,研究对其有性生殖的响应,至今尚未见有报道,只是最近在《Nature》期刊上发表了有关CO₂浓度升高对莱茵绿藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和各种真菌生长影响的两篇文章(Collins and Bell 2004; Klironomos et al. 2005)。前者使用浓度为1050ppm CO₂对莱茵绿藻连续处理1000代(约250天)以后,观察莱茵绿藻各种生理与形态指标的变化程度;后者则使用高浓度CO₂对真菌连续处理21代(大约6年)以后,研究真菌的各种指标变异程度。在上述两篇文章中均通过比较处理前或处理数代后的各种指标,但未发现高浓度CO₂对莱茵绿藻和真菌产生遗传驯化作用,即高浓度CO₂对每一代所产生的影响未被传递到下一代。而且这两篇文章也都同时提到这样的事实,即目前还没有关于高浓度CO₂处理植物多个有性世代后,对其有性生殖响应的报道,故不清楚植物是否与真菌或藻类的研究结果相似。为此,他们建议采用高浓度CO₂对植物进行多个有性世代的影响将更具有重要的实践意义,因为与藻类和真菌相比较,植物与人类和生态环境关系更为密切。

迄今为止,为什么在国内外尚未见有使用高浓度CO₂对植物进行多个有性世代处理的研究报道呢?究其主要限制因素有两个:第一、植物尤其是木本植物生长周期很长,如树木从幼苗到有性生殖起始时至少需要数年时间;第二,植物形体通常很大,在实验中样本数量受到很大限制,如果进行相关的实验就需要更大的可控制环境条件,进而实验成本非常高。针对上面两种限制因子,

我们在本实验中拟采用模式植物拟南芥作为实验材料, 该植物生长周期短, 一般 15 周左右就能够完全完成一个有性世代, 而从种子到种子通常只需要 2 个月, 所以能够在较短时间内完成多个世代生长; 同时拟南芥形体很小, 成年植株通常高 30~40cm, 所占空间小, 便于在人工气候箱中种植大量实验材料。此外, 种子产量高, 每株可结种子近万粒, 有关拟南芥栽培、生物学特性和繁育系统等方面, 过去都有较为详细的报道。因此, 它可作为连续和环境变化可控研究最理想的实验材料。

本研究在人工控制环境中以模式植物拟南芥为材料, 以不同浓度 CO₂ 对其进行连续多个有性世代的处理, 比较各个世代生殖特性的变化, 找出高浓度 CO₂ 对拟南芥有性生殖特性的变化规律, 以便从细胞、组织和个体尺度上揭示植物有性生殖对全球变化的适应模式, 以及主要生理过程和响应机制等, 从而有助于进一步剖析影响生态系统不同层次的主导控制因子与其对生态系统多样性、时空配置, 及其生态系统稳定性的影响与反馈作用。

第二章 不同浓度 CO₂ 对拟南芥多个世代有性生殖影响的研究

2.1 引言

自 18 世纪工业革命以来,随着化石燃料消耗的不断增加以及伐木毁林的加剧,全球大气 CO₂ 浓度从当时的 280ppm 增加到目前的 370ppm 左右,并且还以每年 1.5ppm 的速率递增,预计到本世纪末,大气 CO₂ 浓度将会增加到 540~970ppm (IPCC 2001)。CO₂ 作为植物光合作用原料之一,其浓度升高将对植物光合作用产生较大的影响,并由此可能引起植株生理、生化、结构、有性生殖和同化物分配等一系列的变化,同时还可能改变植物群体的竞争能力,从而改变其群落结构(Garbutt and Bazzaz 1984; Bazzaz et al. 1995; Gibeaut et al. 2001)。迄今为止,国内外很多学者采用人工控制环境下人为升高大气 CO₂ 浓度,进而模拟未来 CO₂ 浓度的变化,以研究植物对大气 CO₂ 浓度升高的各种响应。然而,上述的模拟研究主要集中在高浓度 CO₂ 对植物光合作用、叶绿素和碳水化合物含量以及气孔密度与指数等生理、生化和结构等方面,而对植物有性生殖方面的报道却很少(Mortensen 1987; Lawlor and Mitchell 1991; Idso and Idso 1994; Klironomos et al. 2005; 林金星和胡玉熹 1993; 蒋高明等 1997; 汪杏梅等 1997; 杨金艳等 2002)。

由于植物有性生殖与其生态适应性密切相关,同时大多数农植物也与植株的有性生殖关系十分密切(Ziska and Caulfield 2000; Jablonski et al. 2002)。因此,深入研究大气 CO₂ 浓度变化对植物有性生殖的影响,将是非常必要和具有重要的理论与实际意义(滕年军等 2006; Klironomos et al. 2005)。根据以往的文献报道,在研究高浓度 CO₂ 对植物有性生殖影响的实验中,大多对植物采用几天、几周或几个月的短期处理,或一个有性世代或一个有性世代里的几个生殖年代;另外,也有少数一些为数年的处理试验,但后者的长时间处理实验材料仅局限于木本植物,由于这类植物的生命周期通常达数百年甚至上千年之久(Idso and Idso 1994; Bazzaz et al. 1995; Potvin and Tousignant 1997; Ward et al. 2000; Andalo et al. 2001; Collins and Bell 2004)。为此,在大气高浓度 CO₂ 的条件下,对植物进行多个有性世代的研究,尚不多见。长期高浓度 CO₂ 处理对植物各个方面所

产生的影响,是否会通过其有性生殖途径传递给后代,迄今为止尚无相应的报道(Collins and Bell 2004; Klironomos et al. 2005; 滕年军等 2006)。因此,采用高浓度 CO₂ 对植物进行连续多个世代处理,以研究 CO₂ 对植物是否有驯化作用,以及植物是否对 CO₂ 产生适应性,将具有十分重要的意义。

目前,在真菌和藻类中,都有 CO₂ 对其进行多个世代处理的研究,如对真菌是 21 个世代,而对藻类是 1000 个世代,最后比较它们的一些形态指标。之所以对真菌和藻类进行这么多世代处理主要原因有两点,一是生命周期短如藻类每天能繁殖 3~4 代,因此在短期内就能够进行多个世代实验,二是个体小,在很小的空间内部可以进行大量群体进行实验,这样实验设备便于制备,实验成本也较低(Collins and Bell 2004; Klironomos et al. 2005)。而对绝大多数高等植物来说不具备这两个优点,例如一些木本植物不仅个体大,而且生活周期长;同样,许多草本植物的生活周期通常也需要一年左右,所以就不太可能在短期内利用高浓度 CO₂ 对它们进行多个世代的处理(Collins and Bell 2004; Klironomos et al. 2005; 滕年军等 2006)。此外,在研究 CO₂ 对植物有性生殖影响的过程中,还必须要有一定数量的样本,而以植物为材料时,则需要较大的实验空间,实验成本也较高。鉴于上述原因,本文将采用模式植物拟南芥作为研究对象,因为拟南芥的植株个体小,成熟个体仅高约 30~40 厘米;生殖周期短,一般 15 周,而从种子到种子通常只需 60 天左右时间;种子产量高,每株可结种子近万粒等特点。同时有关拟南芥的栽培、生物学特性和繁育系统等方面,过去均有较为详细的报道。为此,我们认为,拟南芥作为连续多个世代环境变化可控研究是最为理想的实验材料。

本实验拟采用浓度为 370 和 700 ppm CO₂, 在人工气候培养箱中对拟南芥进行连续多个有性世代的处理,以探讨在未来大气 CO₂ 浓度升高条件下,植物有性生殖的变化,以及各代生殖的特性,从而找出高浓度 CO₂ 对拟南芥生殖特性影响的变化规律;同时还将从细胞、组织和个体尺度,进一步揭示植物有性生殖对全球变化的适应模式、主要生理过程和响应机制,从而有助于深入剖析影响生态系统不同层次的主导控制因子,以及对生态系统多样性、时空配置及其生态系统稳定性的影响与反馈作用。

2.2 材料与方法

2.2.1 实验材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*), 为野生型 Columbia 生态型(Wild-type Col-0), 由中国科学院植物研究所孟征研究员所赠。本研究连续进行 8 个世代拟南芥种植, 其中下 1 个世代的植株来至上 1 个世代的种子。

2.2.2 材料种植与培养箱改造

拟南芥种子在播种前置于 4°C 黑暗和湿润环境下处理 2 天。培养基质是营养土与蛭石(北京凯因有机肥生物有限责任公司)体积按 1:1 比例混合后在 121°C 条件下灭菌 20 分钟。培养容器是容积为 200 cm³ 白色塑料方形花盆(北京鸿华园艺公司)。将灭菌过的基质装满花盆, 将装满基质的花盆放在一个塑料托盘, 然后将托盘倒满蒸馏水, 基质将通过毛细作用吸水, 同时可以用小喷壶对花盆基质表面进行喷洒蒸馏水。当花盆中的基质都被水吸水达到饱和以后, 此时可以将黑暗湿润条件下处理 2 天的种子用镊子或牙签小心地播种到基质表面, 切忌被基质所覆盖, 因为拟南芥种子萌发需要光照。每盆播种 5~6 粒种子, 均匀分布在基质表面, 当真叶生长出来后, 在花盆中间保留一株苗。在真叶刚长出和植株刚抽苔时, 将基质表面进行松土, 同时用 1/2MS 培养液进行施肥(Murashige and Skoog 1962), 其它时间则用蒸馏水进行浸水, 实行“不干不浇, 一次浸透”的原则。

将播种后的花盆连着托盘一起移到人工气候培养箱中进行培养。人工气候培养箱型号为 HPG-280H, 购置哈尔滨东联电子技术开发有限公司。刚购置新的培养箱, 能够自动控制箱体内部的光照时间与强度、光照与黑暗下的温度与相对湿度, 但不能控制 CO₂ 浓度。因此, 我们请北京前景惠邦温室控制技术有限公司工程师对人工气候箱进行了适当改造, 使得人工气候箱能够自动控制箱体内部的 CO₂ 浓度。人工气候箱改造主要是在培养箱内部加入一个可以灵敏检测 CO₂ 浓度的 CO₂ 检测仪器(eSENSE-D, Sense Air, Sweden), 该仪器的检测精度为 ±5%。箱体外部有一个继电器, CO₂ 检测仪器所检测到的 CO₂ 浓度实时传递到继电器, 同继电器根据接受到的 CO₂ 浓度与我们预先设定的 CO₂ 浓度进行比较, 如果接受的 CO₂ 浓度高于我们预先设定的 CO₂ 浓度, 那么继电器就会关闭 CO₂ 气瓶上电磁阀, 从而停止对培养箱供 CO₂ 气体, 反之则打开 CO₂ 气瓶上的电磁

阀向培养箱供 CO₂ 气体。因此, 培养箱中的 CO₂ 气体浓度一直在我们预先设定值左右摆动。本实验中使用的 CO₂ 浓度为 99.999% 高纯度气体, 从北京北温气体有限公司购买。图 2-1 是 CO₂ 人工气候箱、相关控制仪器以及拟南芥植株在人工气候箱内部生长的情况。

根据相关文献(Leishman et al. 1999; Gibeaut et al. 2001)以及节省实验费用等方面的考虑, 我们实验中使用 2 个改造过的人工气候箱, 一个气候箱中的 CO₂ 浓度设定值为 370 μmol mol⁻¹, 培养箱中实际数值为 370 ± 30 μmol mol⁻¹ 范围内变动。另一个培养箱中的 CO₂ 浓度设定值为 700 μmol mol⁻¹, 培养箱中实际数值为 700 ± 50 μmol mol⁻¹ 范围内变动。每天光照 16 小时, 光强为 400 μmol m⁻² s⁻¹ PAR, 光期温度为 23°C、相对湿度为 75%, 黑暗时温度为 19 度, 相对湿度大于 90%。在培养过程中, 我们将实验材料在两个培养箱中每周交替互换一次, 同时随机改变材料在培养箱中的位置, 目的是为了减少培养箱以及位置对材料生长的影响。

2.2.3 拟南芥生长速率的测定

由于拟南芥植株生长发育早期生物量很小, 质量难以精确测定, 所以我们根据相关文献(Gibeaut et al., 2001), 以叶片总面积变化来恒量植株生长速率。在种子萌发后 1~5 周不同发育阶段, 每周采用数码相机对植株进行非破坏性拍照, 第六周时, 由于莲座叶片相互重叠, 将叶片从植株上取下来然后进行数码拍照。照片利用 AutoCAD 2000 软件进行叶片面积计算, 从而可以避免叶片仪在测定叶片面积过程中对幼嫩叶片的损伤。每个阶段随机测定 10 株。

2.2.4 拟南芥开花生活周期的确定

在拟南芥植株第 1 朵花开放的时候, 即生长发育 6.00 阶段(Boyes et al. 2001), 此时标记为开花, 并记录从种子萌发到开花所需要的时间, 此段时间定为营养生长阶段, 从第 1 朵花开放到最后 1 朵花的角果中种子成熟所需时间为植株生殖生长阶段, 植株生活周期为营养生长和生殖生长时间之和。在植株最后 1 朵花的角果种子成熟后, 记录植株生活周期, 并相应地算出生殖生长所需时间。在每 1 个世代中, 每个 CO₂ 浓度处理中所记录植株样本为 35~42 株。

2.2.5 拟南芥花、果实和种子数量的测算

在拟南芥植株开花以后开始定期记录每 1 植株开花的数目，并相应记录角果数目；统计花和角果所使用样本在每 1 个世代中为 35~42 株。角果长度、角果中种子数量统计方法：每 1 个世代中随机取 10 个植株，每个植株上随机取样 30 个角果。每植株种子重量、种子千粒重中也是随机取样 10 个植株，每植株算出千粒重，然后用每株种子总质量除以千粒重即获得每株所结种子数目。

2.3.6 拟南芥生物量及其分配比例的统计

当最后 1 朵花的角果中种子成熟后，对植株进行收获，收集盆中上部分的茎秆，用水轻轻冲洗根部的土壤，然后收获根，最后将材料在 80 °C 条件下烘 48 小时至衡重，最后计算每株植株的生物量为营养器官生物量，同时将收获的角果进行称重，获得生殖器官生物量，植株总质量为营养器官和生殖器官生物量之和，同时可以计算出每个植株生殖生物量所占总生物量的比例。每 1 个世代中样本量为 35~42 株。

2.3.7 拟南芥种子大小及质量的检测

千粒重测量方法：从 10 株中每株随机称量 50mg 种子，然后人工数出 50mg 所含种子数量，进而计算出种子千粒重。种子 C、N 含量测定方法见“3.2.8 叶片中各种元素含量测定”，最后计算出 C/N 比例，由于我们只测定 1~6 个世代种子的 C、N 含量，所以我们在结果中只给出 6 个世代的实验数据。种子萌发率计算方法：由于拟南芥种子随着储藏时间的延长，其种子萌发率会逐渐降低，因此我们在每 1 个世代种子刚收获后，立刻测定种子萌发率，具体方法是在每 1 个世代中随机从 10 个植株中取种子，每个植株取 300 粒种子，将种子预先用水湿润，放在 4 °C 条件下处理 48 小时，其目的是让种子发芽一致，然后将种子放在 16 小时光照，8 小时黑暗条件下，经过 72 小时后，数出萌发种子粒数，计算出萌发率。

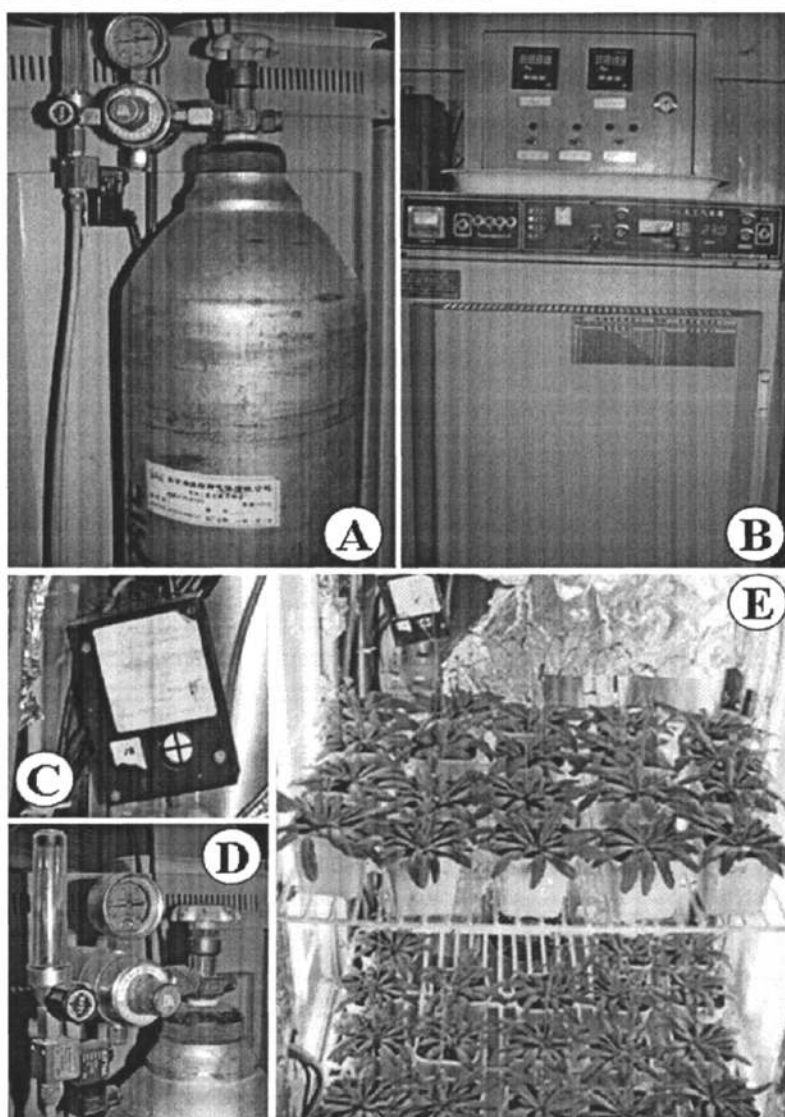


图 2-1 CO₂ 人工气候箱整体及局部构造

A. 高纯度 CO₂ 气体钢瓶，钢瓶上面连接 CO₂ 阀门和电磁阀；B. CO₂ 人工气候箱外部构造，培养箱顶部为接受 CO₂ 浓度继电器，继电器控制电磁阀的开关。C. CO₂ 浓度检测器，所检测的 CO₂ 浓度传输给继电器。D. CO₂ 专用阀门和控制阀门开关的电磁阀的放大图片。E. 植株在培养箱中生长情况。

Fig. 2-1 Figures of CO₂ growth chamber.

A. Cylinder containing CO₂ with 99.999% purity and electromagnetism valve; B. Figures of outer growth chambers and CO₂ controller on the top of the chamber; C. CO₂ detector; D. Magnified Photo of electromagnetism valve; E. Plants grown in growth chambers.

2.3 结果

2.3.1 不同浓度 CO₂ 对拟南芥生长速率的影响

图 2-1 表示从种子萌发后 6 周时间内植株叶片面积的动态变化过程。从图中可以看出 700ppm CO₂ 处理明显促进拟南芥生长发育。其中从第 2 周到第 5 周时期内, 700ppm CO₂ 对拟南芥植株生长作用更为明显。图 2-2 表示拟南芥从萌芽后 1~5 周内 370ppm 与 700ppm CO₂ 对拟南芥生长发育的影响; 图 2-3 与图 2-4 是种子萌芽 6 周后, 两种浓度 CO₂ 拟南芥处理下拟南芥植株及根生长发育状况。从这些图中可以明显地看出高浓度 CO₂ 处理显著促进拟南芥植株地下和地上部分的生长发育, 并且在种子萌发后前 5 周以内促进作用更为明显。

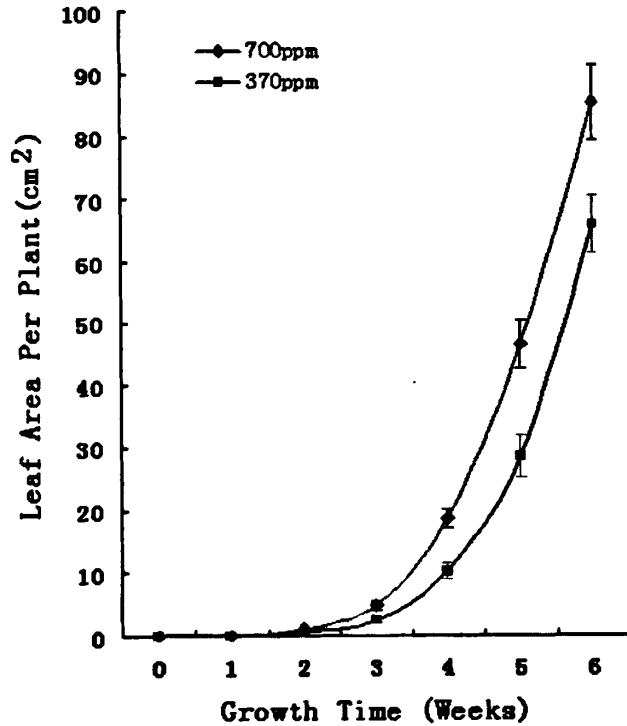


图 2-1 不同浓度 CO₂ 对拟南芥不同发育时期叶片面积动态变化的影响

Fig. 2-1 Effects of ambient and elevated CO₂ on leaf area of *Arabidopsis thaliana* during six weeks after germination



图 2-2 不同浓度 CO₂ 对拟南芥种子萌发后 5 周内植株生长发育的影响
A-E: 种子萌发 1-5 周后拟南芥植株生长情况, 左边 (700ppm), 右边 (370ppm)

Fig. 2-2 Effects of ambient and elevated CO₂ on growth and development of *Arabidopsis thaliana* during five weeks after germination.

A-E: Plants at 1~5 weeks, 700ppm(left) and 370ppm(right) in each figure.

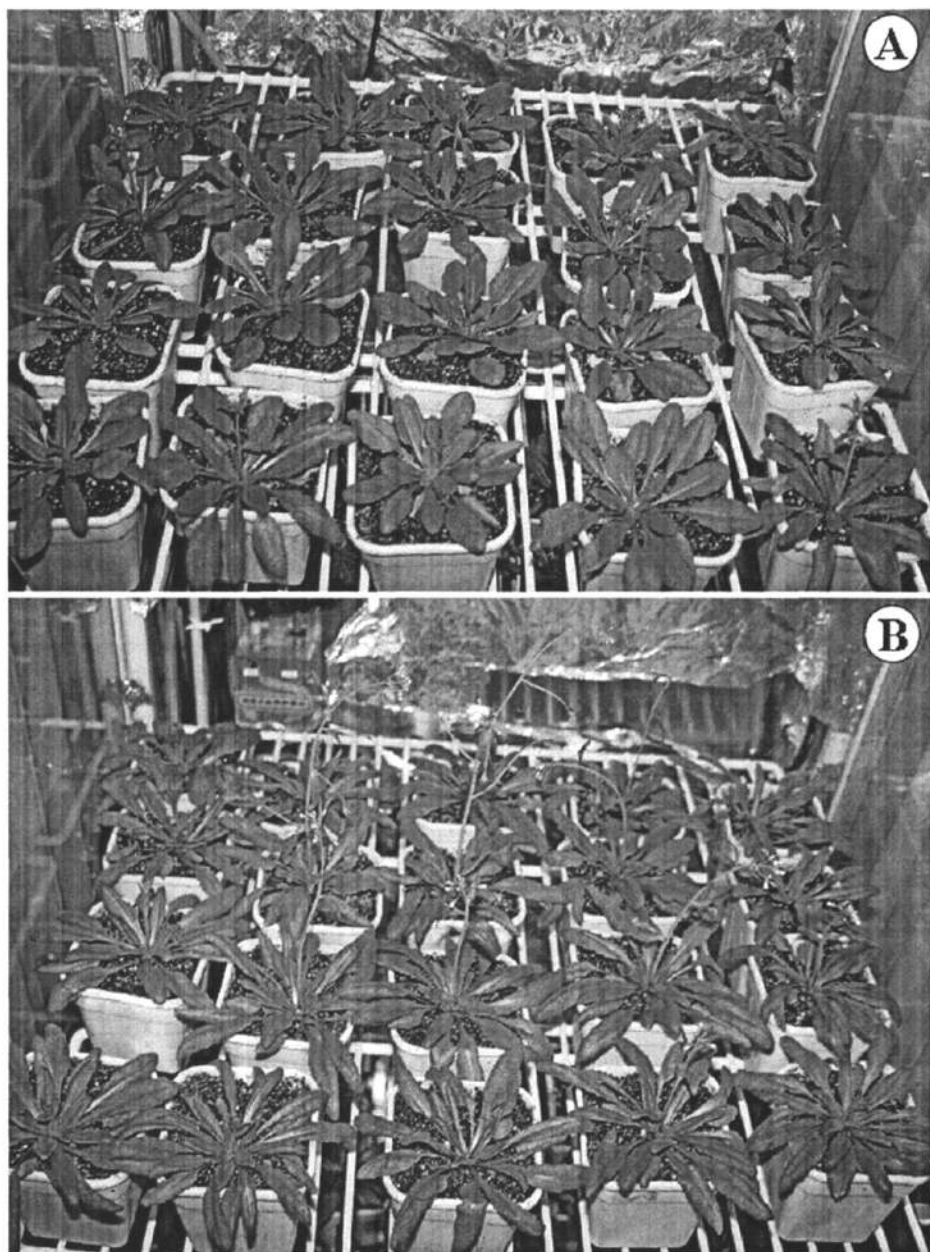


图 2-3 不同浓度 CO_2 对拟南芥种子萌发后 6 周时植株生长发育的影响
A. 370ppm 下生长的植株; B: 700ppm 下生长的植株

Fig. 2-3 Effects of ambient and elevated CO_2 on growth and development of *Arabidopsis thaliana* at six weeks after germination
A. Plants grown at 370ppm; B. Plants grown at 700ppm.

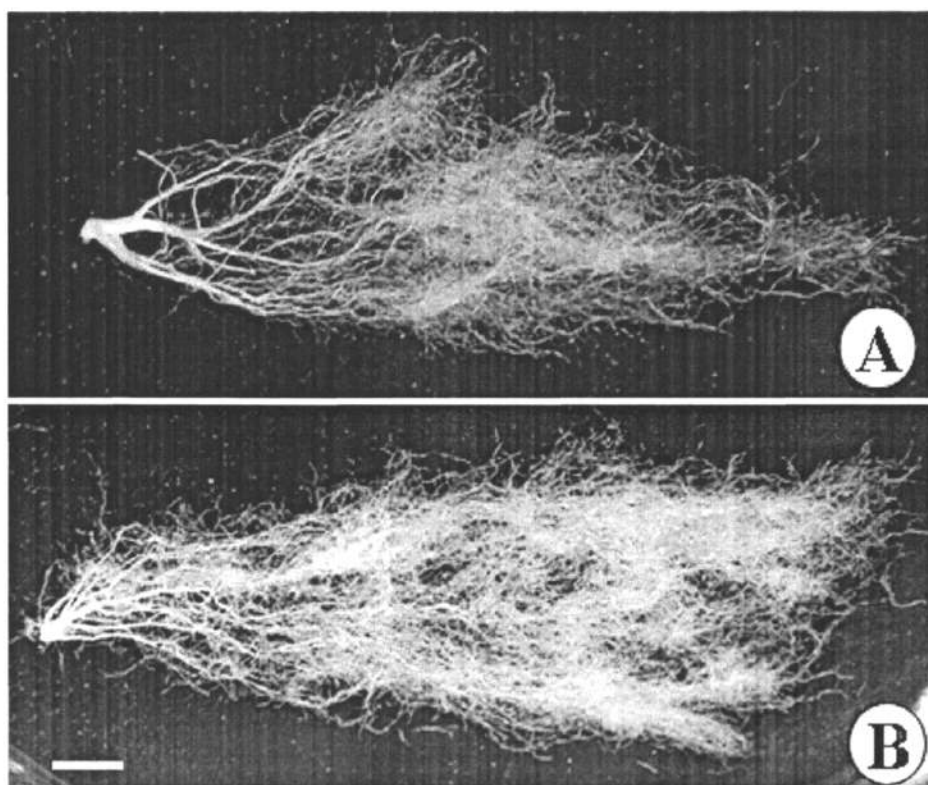


图 2-4 不同浓度 CO₂ 对拟南芥种子萌发后 6 周时植株根生长发育的影响

A. 370ppm 下生长的根； B: 700ppm 下生长的根。表尺: 1cm

Fig. 2-4 Effects of ambient and elevated CO₂ on root growth and development of *Arabidopsis thaliana* at six weeks after germination.

A. Root at 370ppm CO₂; B. Root at 700ppm CO₂.

2.3.2 不同浓度 CO₂ 对拟南芥开花、生活周期的影响

图 2-5 表示 8 个世代拟南芥在不同浓度 CO₂ 处理下,第一朵开花植株的数目和相应开花所需的时间。从图中可以看出在 370ppm CO₂ 下,拟南芥植株开花时间介于 38~51 天,第一株到最后一株开花时间的间隔为 14 天,大部分植株在 41~46 天开花,其中 44 天的时候平均开花植株数目最多,平均达到 6.88 ± 1.55 株。而在 700ppm CO₂ 下,拟南芥植株开花时间介于 35~47 天,第一株到最后一株植株开花时间的间隔为 13 天,大部分植株在 37~45 天开花,其中 41 天的时候平均开花植株数目最多,平均达到 5.13 ± 1.81 株。与对照相比较,在 8 个世代中,700ppm CO₂ 处理下,植株第一朵花开花时间平均大约前提 3 天左右;同

时开花时间范围变得更宽,如大部分植株集中在9天时间内开花(37~45天),而370ppm CO₂处理下,大部分集中在6天时间内开花(41~46天)。

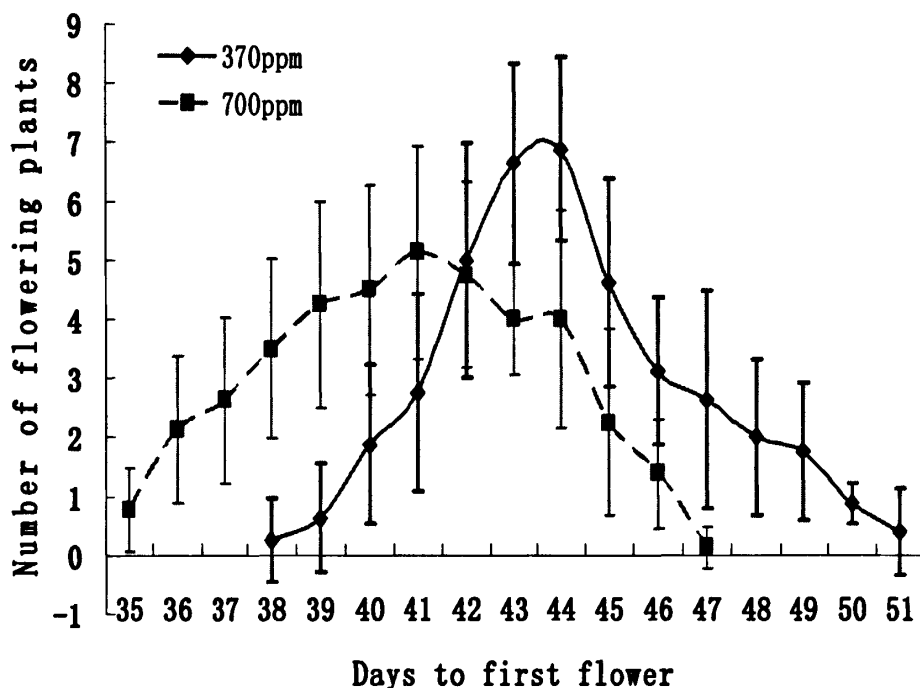


图 2-5 不同 CO₂ 浓度下 8 个世代植株平均开花时间分布

Fig. 2-5 Distribution pattern of flowering Arabidopsis plants of 8 generations grown under ambient and elevated CO₂ during different time

在每一代中,与对照相比较,高浓度 CO₂ 处理显著促进拟南芥开花 ($P < 0.0001$);但是,在相同 CO₂ 浓度处理条件下 8 个世代之间的开花时间,却没有显著差异(370ppm: $P = 0.127$; 700ppm: $P = 0.193$)。图 2-6 比较 8 个世代不同 CO₂ 浓度条件下拟南芥开花时间的变化,其中 370ppm CO₂ 处理下 1~8 个世代每一个世代开花的平均时间介于 43.37~44.71 天,8 个世代平均开花时间为 44.10 ± 0.54 天,8 个世代开花所需时间总和为 352.81 天。而在 700ppm CO₂ 处理下,1~8 个世代每一个世代开花的平均时间介于 40.07~41.45 天,8 个世代平均开花时间为 40.81 ± 0.53 天,8 个世代开花所需时间总和为 326.50 天。与对照相比较,700ppm CO₂ 处理下,每一个世代开花时间平均提前 3.29 天,8 个世代开花时间共提前 26.31 天。

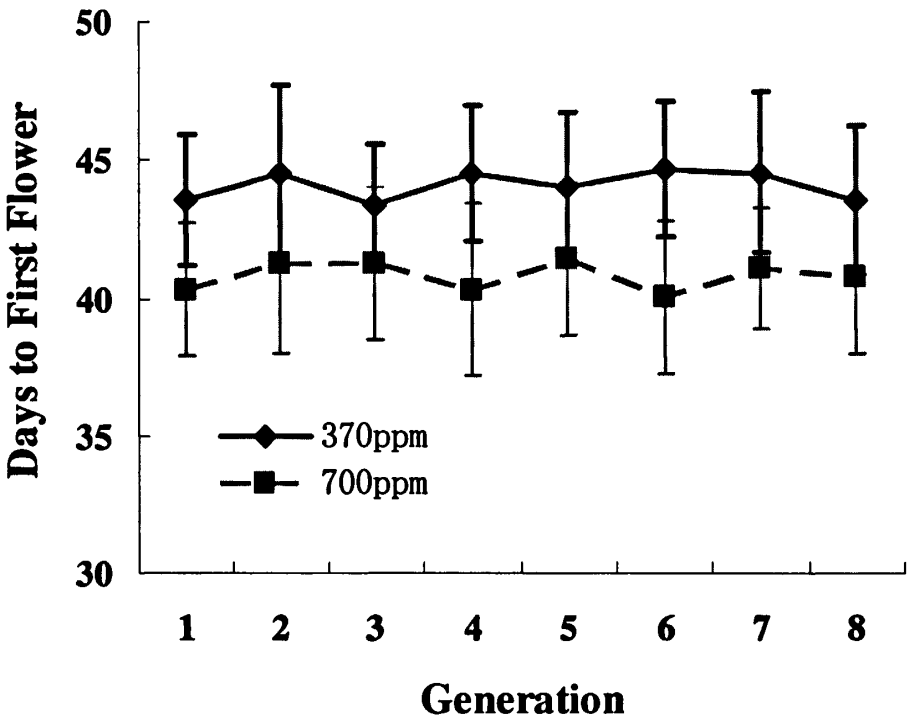
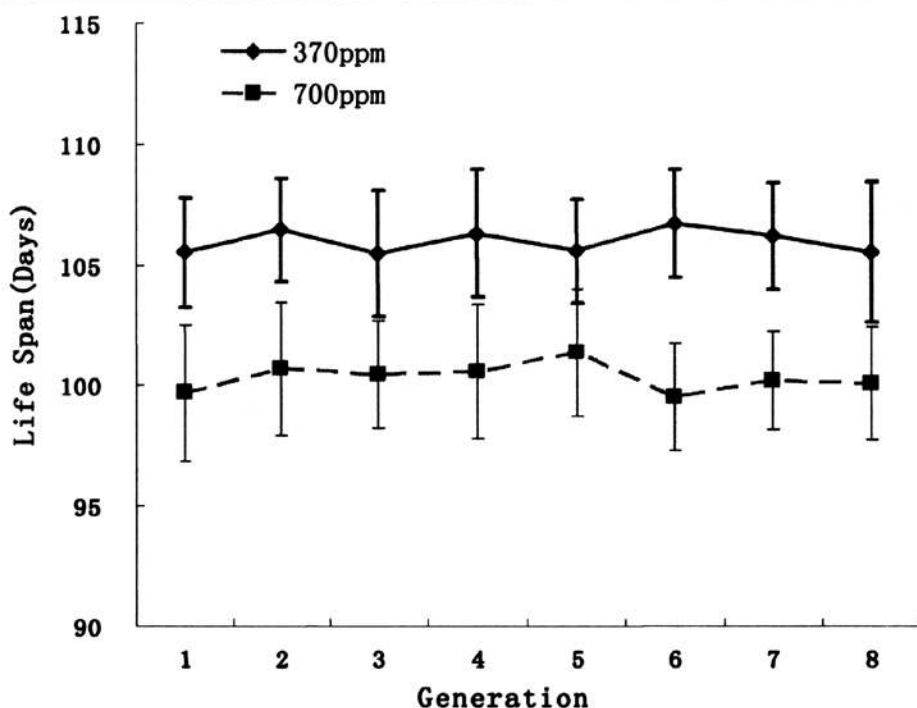
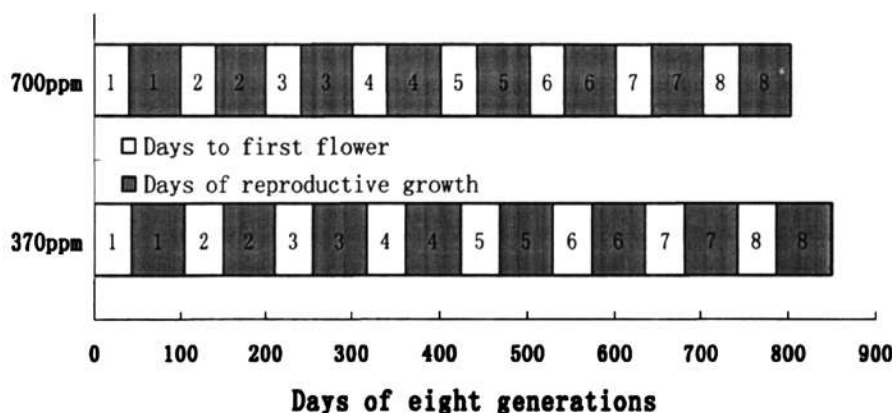


图 2-6 不同浓度 CO₂ 对拟南芥开花时间的影响
Fig. 2-6 Effects of ambient and elevated CO₂ on flowering time of *Arabidopsis thaliana*

同样，在每一个世代中，与对照相比较，高浓度 CO₂ 处理也显著缩短拟南芥生活周期($P<0.0001$)；但是，在相同 CO₂ 浓度处理条件下 8 个世代之间的生活周期长度却没有显著差异(370ppm: $P=0.095$ ；700ppm: $P=0.145$)。图 2-7 比较 8 个世代不同 CO₂ 浓度条件下拟南芥生活周期的变化，其中 370ppm CO₂ 处理下 1~8 个世代每一个世代生活周期长度介于 105.49~106.71 天，8 个世代平均生活周期长度为 105.97 ± 0.49 天，8 个世代生活周期所需时间总和为 847.74 天。而在 700ppm CO₂ 处理下，1~8 个世代中每一个世代生活周期介于 99.52~101.36 天，每个世代生活周期平均长度为 100.33 ± 0.59 天，8 个世代生活周期长度总和为 802.64 天。与对照相比较，700ppm CO₂ 处理下，每一个世代生活周期长度平均缩短 5.65 天，8 个世代共缩短 45.15 天(图 2-8)。

图 2-7 不同浓度 CO₂ 对拟南芥生活周期的影响Fig. 2-7 Effects of ambient and elevated CO₂ on life span of *Arabidopsis thaliana*图 2-8 不同浓度 CO₂ 处理下拟南芥生活周期比较Fig. 2-8 Comparison of life span of *Arabidopsis thaliana* grown at ambient and elevated CO₂

与对照相比较, 700ppm CO₂ 处理下, 每一个世代开花时间平均提前 3.29 天, 而生活周期平均缩短 5.65 天, 因此植株生殖生长(生活周期=第一朵花开所需时

间+生殖生长时间)平均缩短 2.36 天。同样，在相同 CO₂ 浓度处理下，8 个世代生殖生长时间之间没有显著差异(370ppm: $P=0.124$; 700ppm: $P=0.063$); 而不同浓度 CO₂ 处理下，每一个世代之间却存在显著差异($P<0.0001$)(图 2-9)。

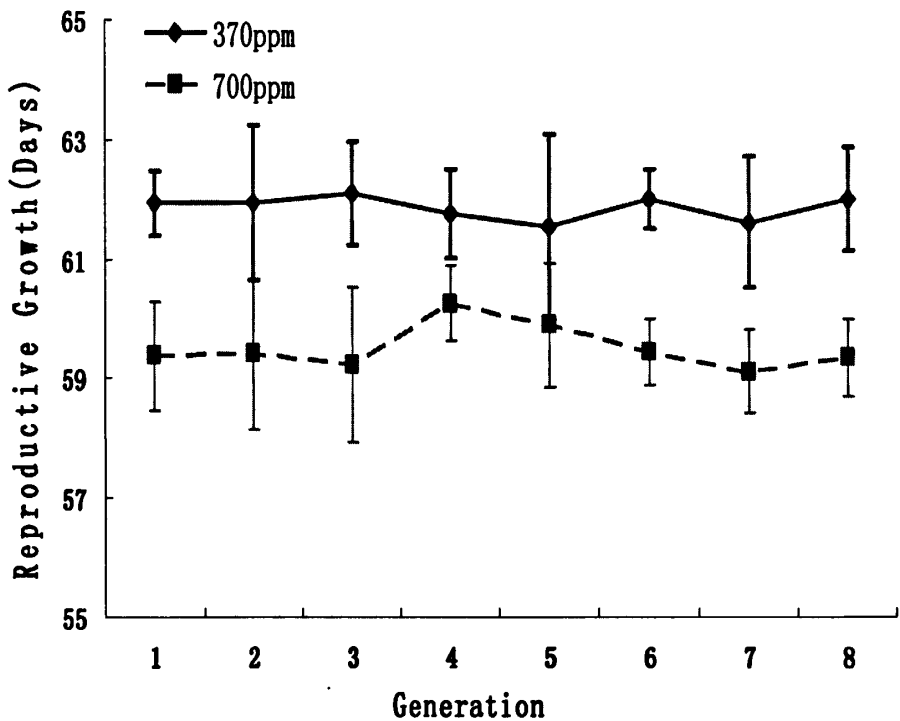


图 2-9 不同浓度 CO₂ 对拟南芥生殖生长时间的影响
Fig. 2-9 Responses of reproductive growth time of *Arabidopsis thaliana* to ambient and elevated CO₂

2.3.3 不同浓度 CO₂ 对拟南芥花、果实、种子数量影响

图 2-10 表示 8 个世代拟南芥在不同浓度 CO₂ 处理下，每一个世代中植株平均开花数量变化趋势。从图中可以看出在相同 CO₂ 浓度处理下 8 个世代之间植株平均开花数量在一定数值附近波动，其中 370ppm CO₂ 处理下，各个世代植株平均开花数量在 230 个附近波动，各个世代之间植株平均开花数量介于 225.9~241.7 个，8 个世代植株平均开花数量为 234 ± 27.5 个，各个世代之间植株开花数量没有显著性差异 ($P=0.158$)。同样，在 700ppm CO₂ 处理下，8 个世代之间植株平均开花数量也没有显著性差异 ($P=0.086$)，各个世代植株平均开

花数量在 340 个附近波动, 各个世代之间植株平均开花数量介于 328.8~347.7 个, 8 个世代植株平均开花数量为 337.2 ± 32.04 个。但在同一个世代中, 700ppm CO₂ 处理下植株平均开花数目均显著高于 370ppm CO₂ 处理下植株平均开花的数目 ($P < 0.0001$), 平均高 $44.1 \pm 4.2\%$, 各个世代中变化幅度为 38.1~50.7%。

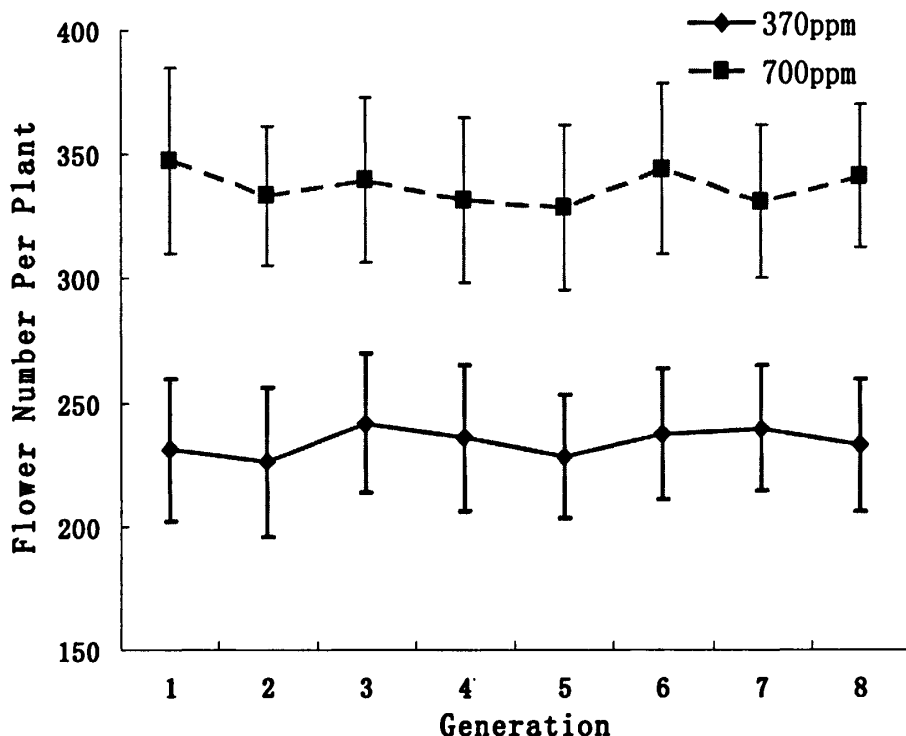


图 2-10 不同浓度 CO₂ 对拟南芥花数量的的影响

Fig. 2-10 Effects of ambient and elevated CO₂ on flower number per plant

图 2-11 表示 8 个世代拟南芥在不同浓度 CO₂ 处理下, 每一个世代中植株平均角果的数量变化趋势。从图中可以看出在相同 CO₂ 浓度处理下各个世代之间植株平均开花角果数量也在一定数值附近波动, 其中 370ppm CO₂ 处理下, 8 个世代植株平均角果数量在 200 个附近波动, 各个世代之间植株平均开花角果介于 198.7~212.2 个, 8 个世代植株平均开花数量为 205 ± 18.1 个, 各个世代之间植株角果数量没有显著性差异 ($P=0.077$)。同样, 在 700ppm CO₂ 处理下, 8 个世代之间植株平均角果数量也没有显著性差异 ($P=0.087$), 各个世代植株平均角果数量在 280 个附近波动, 8 个世代之间植株平均角果数量介于 271.3~286.3 个, 8 个世代植株平均角果数量为 279.6 ± 21.3 个。但相同世代中, 700ppm

CO₂ 处理下植株平均角果数目均显著高于 370ppm CO₂ 处理下植株平均角果的数目 ($P<0.0001$)，平均高 $36.4\pm3\%$ ，各个世代中变化幅度为 31.2~39.6%。

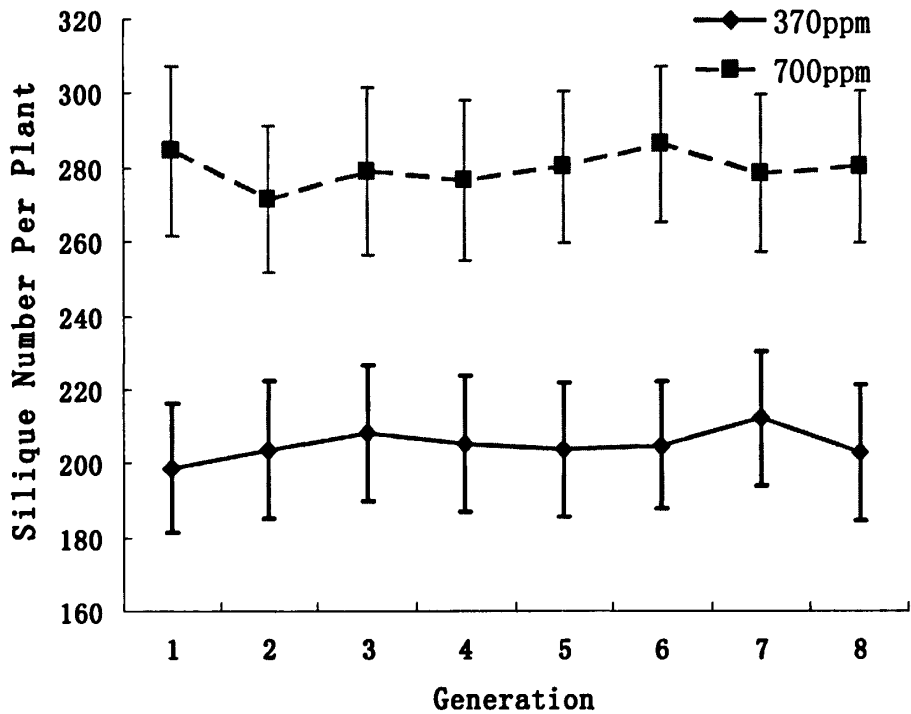


图 2-11 不同浓度 CO₂ 对拟南芥角果数量的影响
Fig. 2-11 Effects of ambient and elevated CO₂ on silique number per plant

图 2-12 表示 8 个世代拟南芥在不同浓度 CO₂ 处理下，每一个世代中角果所含种子数量变化的趋势。从图中可以看出在两种 CO₂ 浓度处理下，无论在 8 个世代之间 ($P=0.099$) 还是在各个世代中 ($0.175<P<0.847$)，CO₂ 处理对角果种子所含数量均没有显著性影响。角果所含种子平均数量在 47 个附件波动。说明角果中种子所含数量对 CO₂ 处理没有产生响应。

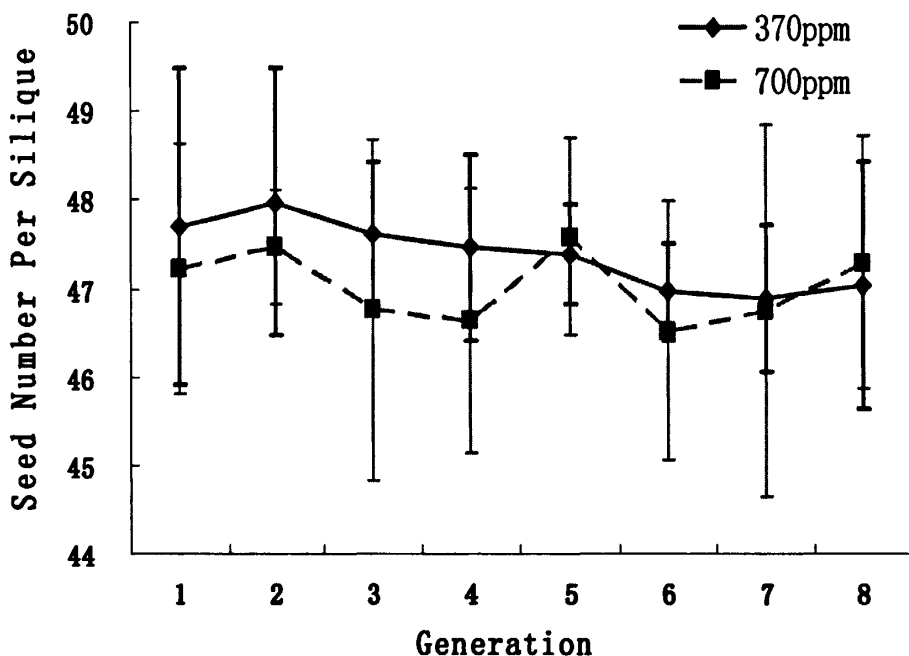


图 2-12 不同浓度 CO₂ 对拟南芥角果中种子数量的影响
Fig. 2-12 Effects of ambient and elevated CO₂ on seed number per silique

图 2-13 表示 8 个世代拟南芥在不同浓度 CO₂ 处理下，每一个世代中角果长度种子数量变化的趋势。同样，从图中可以看出在两种 CO₂ 浓度处理下，无论在 8 个世代之间 ($P=0.430$) 还是在各个世代中 ($0.124 < P < 0.764$)，CO₂ 处理对角果长度均没有显著性影响。角果平均长度在 12.6mm 附件波动。说明角果长度与所含种子数量一样都对 CO₂ 处理没有产生响应。

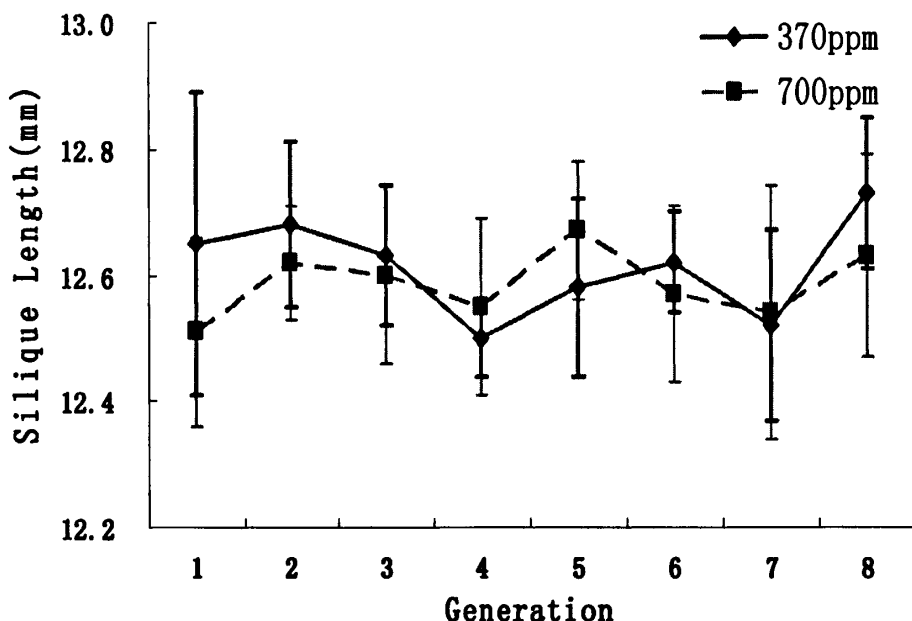


图 2-13 不同浓度 CO₂ 对拟南芥角果中种子数量的影响
Fig. 2-13 Effects of ambient and elevated CO₂ on silique length

图 2-14 表示 8 个世代拟南芥在不同浓度 CO₂ 处理下，每一个世代中植株平均所结种子数量变化的趋势。从图中可以看出在相同 CO₂ 浓度处理下各个世代之间植株平均所结种子数量在一定数值附近波动，其中 370ppm CO₂ 处理下，8 个世代植株平均所结种子数量在 10000 个附近波动，各个世代之间植株平均所结种子数量介于 9146~10010 个，8 个世代植株平均所结种子数量为 9713 ± 886 个，各个世代之间植株平均所结种子数量没有显著性差异 ($P=0.159$)。同样，在 700ppm CO₂ 处理下，8 个世代之间植株平均所结种子数量也没有显著性差异 ($P=0.767$)，8 个世代植株平均所结种子数量 13000 个附近波动，各个世代之间植株平均所结种子数量介于 12835~13593 个，8 个世代植株平均所结种子数量为 13420 ± 1001 个。但在每一个世代中，700ppm CO₂ 处理下植株平均所结种子数量均显著高于 370ppm CO₂ 处理下植株平均所结种子数量 ($P<0.0001$)，平均高 $37.7 \pm 6.1\%$ ，各个世代中变化幅度为 27.1~48.6%。

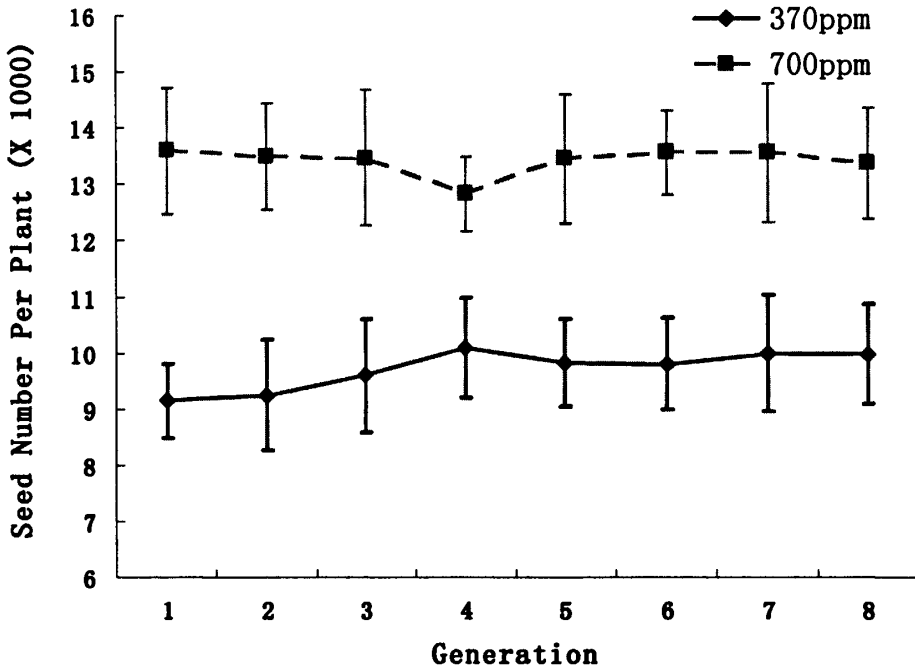


图 2-14 不同浓度 CO₂ 对拟南芥植株所结种子数量的影响
Fig. 2-14 Effects of ambient and elevated CO₂ on seed number per plant

2.3.4 不同浓度 CO₂ 对拟南芥生物量及其分配比例的影响

图 2-15 表示 8 个世代拟南芥在不同浓度 CO₂ 处理下，每一个世代中单个植株平均总干重变化的趋势。从图中可以看出在相同 CO₂ 浓度处理下各个世代之间单个植株平均总干重在一定数值附近波动，其中 370ppm CO₂ 处理下，8 个世代单个植株平均总干重在 800mg 附近波动，各个世代之间单个植株平均总干重介于 771~819mg，8 个世代单个植株平均总干重为 $797.8 \pm 71.9\text{mg}$ ，各个世代之间单个植株平均总干重没有显著性差异 ($P=0.106$)。同样，在 700ppm CO₂ 处理下，8 个世代之间单个植株总干重也没有显著性差异 ($P=0.767$)，8 个世代单个植株平均总干重在 1000mg 附近波动，各个世代之间单个植株平均总干重为 996~1058mg，8 个世代单个植株平均总干重为 $1029.3 \pm 80.8\text{mg}$ 。但在每一个世代中，700ppm CO₂ 处理下单个植株总干重显著高于 370ppm CO₂ 处理下单个植株平均总干重 ($P<0.0001$)，平均高 $29.3 \pm 2.7\%$ ，各个世代中变化幅度为 26.3~33.1%。

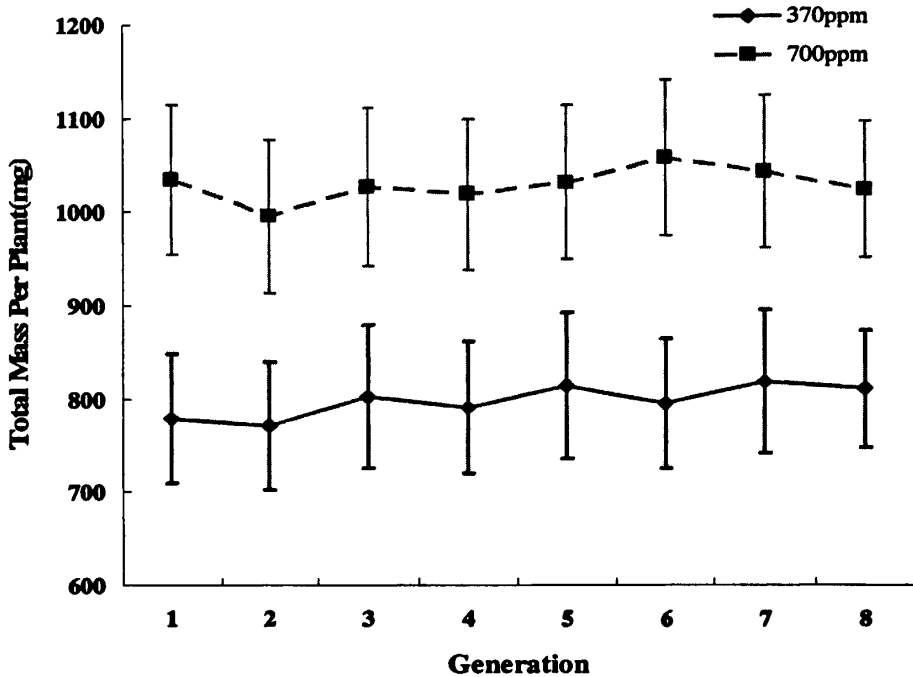


图 2-15 不同浓度 CO₂ 对拟南芥植株总生物量的影响

Fig. 2-15 Effects of ambient and elevated CO₂ on total mass weight per plant

图 2-16 表示 8 个世代拟南芥在不同浓度 CO₂ 处理下，每一个世代中单个植株生殖生物量以及生殖生物量所占总生物量百分率变化的趋势。从图中可以看出在相同 CO₂ 浓度处理下各个世代之间单个植株平均生殖生物量在一定数值附近波动，其中 370ppm CO₂ 处理下，8 个世代单个植株平均生殖生物量在 350mg 附近波动，各个世代之间单个植株平均生殖生物量介于 329~358mg，8 个世代单个植株平均生殖生物量为 $345.4 \pm 28.4\text{mg}$ ，各个世代之间单个植株平均生殖生物量没有显著性差异 ($P=0.110$)。同样，在 700ppm CO₂ 处理下，8 个世代之间单个植株平均生殖生物量也没有显著性差异 ($P=0.697$)，8 个世代单个植株平均生殖生物量在 450mg 附近波动，各个世代之间单个植株平均生殖生物量为 443~468mg，8 个世代单个平均生殖生物量为 $455.1 \pm 28.8\text{mg}$ 。但在每一个世代中，700ppm CO₂ 处理下植株平均生殖生物量显著高于 370ppm CO₂ 处理下植株平均生殖生物量 ($P<0.0001$)，平均高 $31.9 \pm 5.6\%$ ，各个世代中变化幅度为 23.7~39.5%。

从图 2-16 中也可以看出, 700ppmCO₂ 不仅显著增加拟南芥植株生殖生物量, 而且也显著提高生殖生物量所占植株总生物量的比例 ($P<0.001$)。但在 8 个世代中, 相同 CO₂ 浓度处理下, 各个世代之间生殖生物量所占总生物量比例在一定范围内浮动, 没有显著性变化, 如在 700ppmCO₂ 浓度下在 46% 附近浮动, 8 个世代平均值为 $46.4\pm3.0\%$, 变化范围为 $45.3\pm48.2\%$ ($P=0.636$)。而在 370ppm 浓度下各个世代之间生殖生物量所占总生物量比例在 43% 附近浮动, 8 个世代平均值为 $43.2\pm1.8\%$, 变化范围为 $41.8\pm44.3\%$ ($P=0.113$), 分配比例比在 700ppm 下低 3% 左右。

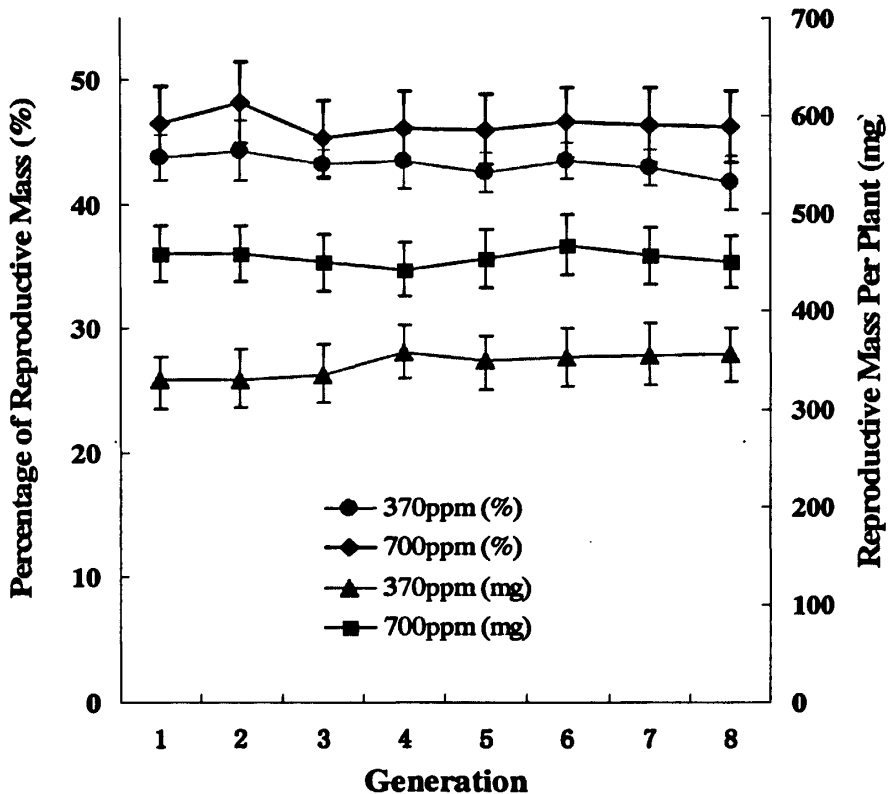


图 2-16 不同浓度 CO₂ 对拟南芥植株生殖生物量及其所占总生物量比例的影响
Fig. 2-16 Effects of ambient and elevated CO₂ on reproductivemass (siliques) per plant and percentage of reproductive mass

2.3.5 不同浓度 CO₂ 对拟南芥种子大小及质量的影响

图 2-17 表示不同浓度 CO₂ 处理下, 各个世代中种子千粒重的动态变化。从

图中可以看出, 700ppmCO₂ 显著增加种子千粒重 ($P<0.01$)。但在相同 CO₂ 浓度处理下, 各个世代中种子千粒重在一定值附近波动, 如在 370ppm CO₂ 处理下, 各个世代种子平均千粒重为 $18.16 \pm 0.42\text{mg}$, 各个世代中也没有显著性差异 ($P=0.407$) ; 而在 700ppm CO₂ 处理下, 种子千粒重在 19.5mg 附件波动, 平均值为 $19.35 \pm 0.44\text{mg}$, 各个世代之间种子千粒重中没有显著性差异 ($P=0.688$) , 平均比 370ppm 处理条件下重约 6.6%。

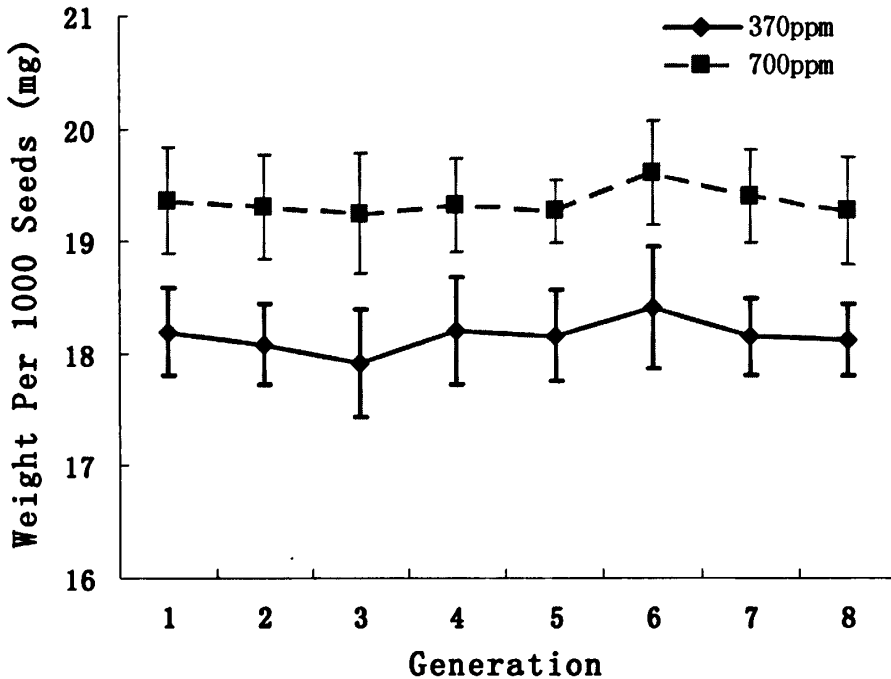


图 2-17 不同浓度 CO₂ 对拟南芥种子千粒重的影响
Fig. 2-17 Effects of ambient and elevated CO₂ on weight per 1000 seeds

图 2-18 图表示不同浓度 CO₂ 处理下, 6 世代中种子含 N 量和 C/N 比的动态变化。从图中可以看出, 在各个世代中 700ppm CO₂ 显著降低种子含 N 量 ($0.0001<P<0.0389$) ,但却显著增加种子 C/N 比例($0.0001<P<0.005$)。但在相同 CO₂ 浓度处理下, 各个世代中种子含 N 量以及 C/N 比没有显著性变化, 而都在在一定值附近波动, 如在 370ppm CO₂ 处理下, 各个世代种子含 N 量平均 $2.56 \pm 0.09\%$, 各个世代中没有显著性差异 ($P=0.915$) ; 而在 700ppm CO₂ 处理

下, 种子含 N 量在 2.3% 附件波动, 平均值为 $2.29 \pm 0.09\%$, 各个世代之间也没有显著性差异 ($P=0.674$), 平均比 370ppm 处理条件下低约 11%。而 700ppm 处理条件下, 种子 C/N 比比 370ppm 下显著增加, 但在相同浓度 CO₂ 处理下, C/N 比在各个世代中变化不大, 都在一定范围内波动, 如在 370ppm 处理下, 6 个世代中 C/N 比平均为 $19.84 \pm 0.68\%$, 6 个世代中变化范围为 19.59~20.33%, 没有显著性差异 ($P=0.612$)。而在 700ppm 处理下, 6 个世代中 C/N 比平均为 $22.96 \pm 0.91\%$, 6 个世代中变化范围为 22.55~23.25%, 也没有显著性差异 ($P=0.818$), 平均比 370ppm 下高约 15.72%。

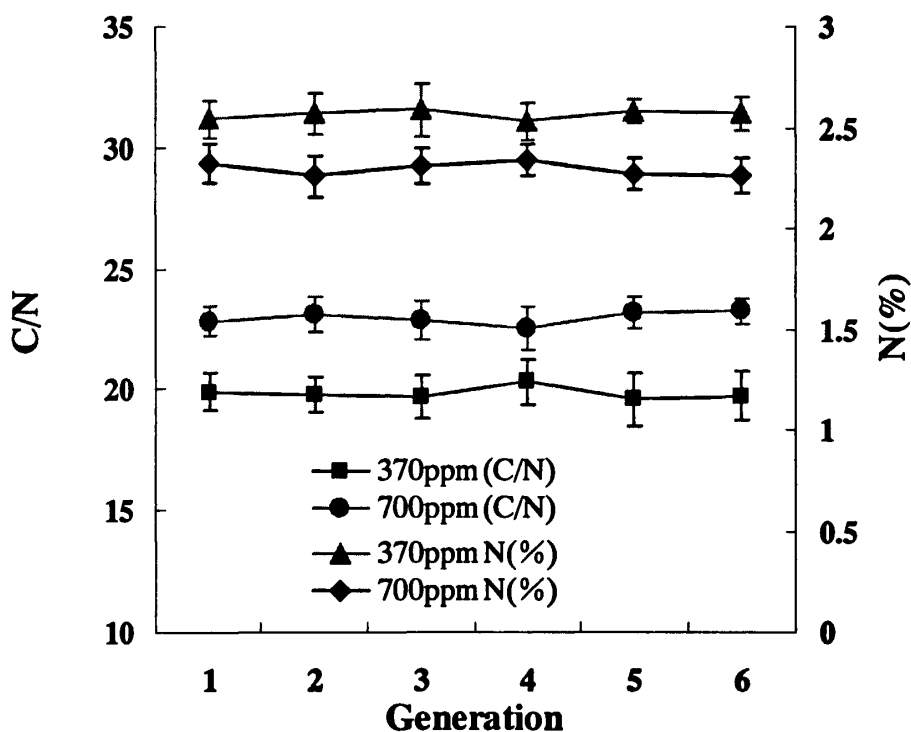


图 2-18 不同浓度 CO₂ 对拟南芥种子含氮量和碳氮比的影响
Fig. 2-18 Effects of ambient and elevated CO₂ on N content C/N of seeds

图 2-17 表示不同浓度 CO₂ 处理下, 8 个世代中种子萌发率的动态变化。从图中可以看出, CO₂ 浓度处理和世代之间均没有显著性差异。如在 370ppmCO₂

浓度处理下，8 个世代中种子萌发率为 $88.6 \pm 5.5\%$ ，介于 $87.4 \sim 90.5\%$ ，各个世代中萌发率没有显著性差异 ($P=0.832$)；而在在 700ppmCO_2 浓度处理下，8 个世代中种子萌发率为 $88.3 \pm 5.4\%$ ，介于 $87.1 \sim 89.4\%$ ，各个世代中萌发率没有显著性差异 ($P=0.699$)。两种浓度 CO₂ 处理下没有显著性差异 ($P=0.302$)。由此认为，种子萌发率不受 CO₂ 浓度及世代的影响。

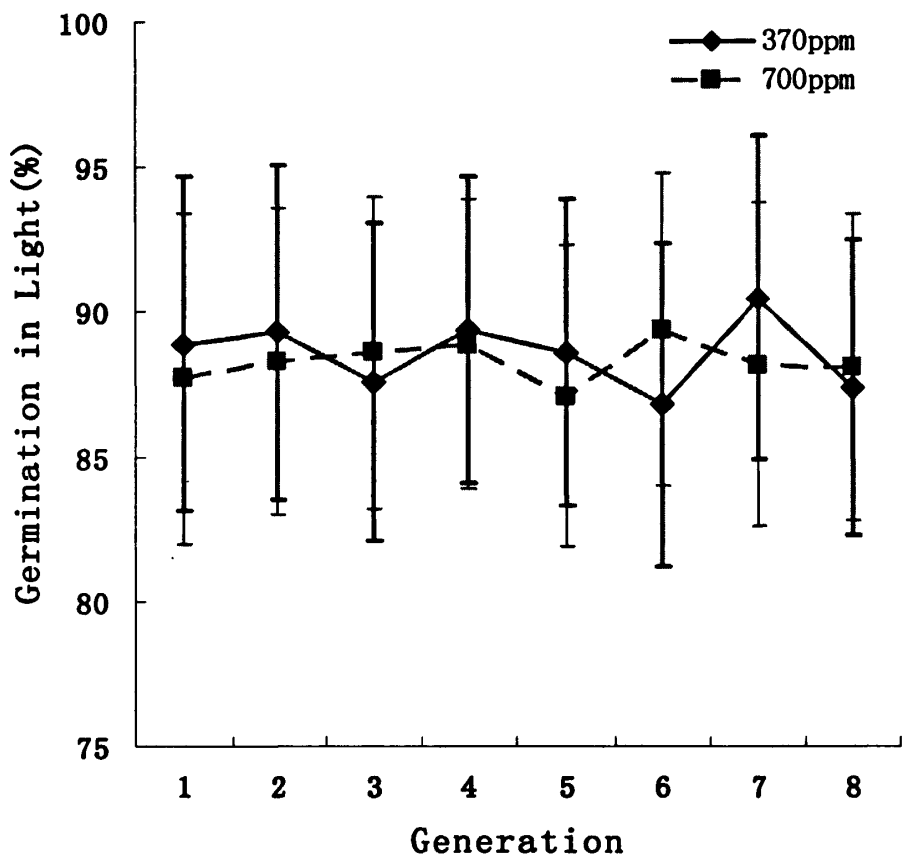


图 2-19 不同浓度 CO₂ 对拟南芥种子萌发率的影响
Fig. 2-19 Effects of ambient and elevated CO₂ on seed germination

2.4 讨论

通过利用不同浓度 CO₂ 对拟南芥进行连续 8 个世代处理的实验, 发现在每一个世代中, 与 370ppm CO₂ 处理相比较, 在 700ppm CO₂ 浓度处理下, 拟南芥生长发育速率均显著地增加、开花提前、生活周期缩短; 植株总生物量显著增加; 植株生殖生物量如角果和种子的数目和质量均显著地增加; 生殖生物量分配比例显著提高; 种子千粒重及 C/N 显著增加, 种子 N 含量却显著降低, 而种子发芽率却没有显著变化。

Gibeau 等(2001)曾经研究 1000ppm CO₂ 对拟南芥生长发育与开花的影响, 发现 1000ppm CO₂ 处理下拟南芥最早在 32 天时抽苔, 而在 360ppmCO₂ 浓度下 37 天时才抽苔; 通常在播种后的 3 周内, 正是拟南芥幼苗生长发育的关键阶段, 它对 CO₂ 浓度升高的反应最为敏感, 生长明显加快, 而 3 周以后其相对生长速率则无明显变化。优质牧草白三叶(*Trifolium repens*) 在 600ppm CO₂ 浓度条件下, 开花时间比正常的提前 10 天, 作者认为可能由于其花芽分生组织在发育过程中获得了更多的营养物质, 使发育速度加快, 从而开花时间提前(Wagner et al. 2001)。植物生殖的起始期, 是其生活史中的关键参数, 在成熟时对应年龄或植株大小均反映了生活史的适合度(fitness)(Wesselingh et al. 1997)。通常, 植物生殖起始期的提前可通过两种机制来实现: 第一是在植物有性生殖开始时所需最小形体大小保持不变情况下, 通过提高植物相对生长速率, 以加快个体发育, 使得植株在较短时间内达到有性生殖所需的形体大小(Reekie et al. 1994; Ladeau and Clark 2001; Wagner et al. 2001); 第二是通过改变植物开花时所需的形体大小(Reekie et al. 1994; He and Bazzaz 2003)。而大多数研究者认为, 植物形体大小是影响植物开花的首要因素, 而植物开花的时间与其年龄关系不大(Reekie et al. 1994; Ladeau and Clark 2001; Wagner et al. 2001; He and Bazzaz 2003)。我们的研究结果认为拟南芥主要是提高相对生长速率, 个体发育速度加快, 进而开花时间提前。

通常, 植物花部的发育对 CO₂ 浓度变化的响应相当敏感, 如在高 CO₂ 浓度条件下, 大多数植物的开花数量增多(Jablonski et al. 2002)。Thurig 等(2003)通过对 61 种植物在高浓度 CO₂ 下开花影响的研究时发现, 这些植物在群体水平上, 其花枝数目平均提高 24% 左右。Jablonski 等(2002)对已发表的 159 篇论文, 涉及 79 个物种的相关资料进行整合分析(meta-analysis)后表明, 在 500~800ppm CO₂

浓度下,所有植物的开花数量平均增加 19%。关于 CO₂ 浓度升高对植物有性生殖产量的影响,多见于对农作物的研究报道。在通常情况下,CO₂ 浓度升高主要是通过增加农作物果实或种子数量来提高产量,而对其大小却影响不大(Ainsworth et al. 2002; Jablonski et al. 2002)。Kimball(1983)对 430 篇有关农作物的研究报道进行了分析后发现,农作物平均产量增加约为 34%,而籽粒平均大小几乎没有变化。Ainsworth 等(2002)采用整合分析方法,将 1980 年到 2000 年的 20 年间,在国际期刊上发表的 111 篇论文中有关 CO₂ 浓度升高对大豆生长影响作了全面分析,结果表明,大豆种子产量平均增加 24%,主要是豆荚数目平均增加 19%所致,而单粒种子的平均重量并无显著变化。最近,Jablonski 等(2002)也发现,在高浓度 CO₂ 处理下,水稻、大豆、小麦以及玉米等农作物果实、种子数量、以及产量平均分别增加了 18%、16%和 25%,而单粒种子平均重量仅增加为 4%。本研究中我们发现,700ppm CO₂ 处理下植株平均开花数目、角果数目以种子数量均显著高于 370ppm CO₂ 处理下响应指标,平均分别高约 44.1%、36.4%和 37.7%,而种子大小和角果中种子数量没有显著变化。由此我们认为高浓度 CO₂ 主要是通过影响拟南芥增加角果数量、种子数量来增加植株生殖生物量。

我们发现在高浓度 CO₂ 下,种子数量显著增加 37.7%,而种子千粒重只有 5%的增加,为何 CO₂ 浓度变化对拟南芥种子数量的影响程度大于种子大小呢?我们认为,植物子代的适合度与亲代投入的资源量成正相关,但是种子变大将会使得种子数量下降,因为植物投入到有性生殖的资源是有限的,即种子大小与数量之间存在着权衡关系(trade-off)(Smith and Fretwell 1974; Lloyd 1987)。经典的 Smith—Fretwell 模型成功地解释了为何种子大小往往保持恒定值,该模型认为,植物子代个体的适合度曲线与其最优种子大小(optimal seed size)密切相关。在一个种群内,其种子适合度曲线往往受生境条件影响较小,这样,种子大小就不易发生改变。如果该种群投入到种子生产的资源增加,由于种子适合度曲线变化不大,使得种子大小变化也不大,因此,种子数量将会增加(Smith and Fretwell 1974; 张大勇 2004)。CO₂ 浓度升高通常会提高植物绝对生殖产量,由于最优种子大小一般受环境条件(包括 CO₂ 浓度变化)影响较小,所以种子数量就会相应增加。

拟南芥种子N含量降低以及C/N增高,已有很多相关文献报道(滕年军等, 2006)。如Barbara等(2003)对一些草地植物的研究发现,在CO₂浓度升高情况下,

这些植物种子的含氮量显著降低。He等(2005)研究高浓度CO₂对美国商陆(*Phytolacca americana*)种子N含量以及种子C/N时也发现种子N含量降低而C/N比增加。种子N含量可能主要是由于种子中碳水化合物含量增加而引起稀释作用,此外由于植株蒸腾速率降低引起从根部吸收N的含量降低所致。

关于高CO₂浓度对种子萌发率影响也有一些研究报道,如火炬松(*Pinus taeda*) 在CO₂浓度升高情况下,其种子萌发率提高两倍,萌发时间也提前5天,幼苗的生长速度加快和生长势增强,这就使得它们在群体中具有更强的竞争力(Hussain et al. 2001)。而我们的研究发现高CO₂浓度对拟南芥种子萌发率没有显著影响。因此,我们认为由于物种不同,其种子萌发率对高CO₂浓度的响应也存在一定差异。

在 8 个世代中,相同 CO₂ 浓度处理中,我们发现一个很有趣的现象,即各个世代中各种指标都是在一定范围内波动,并没有产生显著性变异。这种现象推翻了我们最初的假设,我们开始认为植物在连续经过过多个世代高浓度 CO₂ 处理后,植株某些特性尤其是生殖特性会发生相应变异,而这些变异的特性可以稳定低传递到下一个世代中。例如,我们开始认为在 700ppmCO₂ 能够促进拟南芥开花,这被我们实验所证实,如果在第 1 世代,假设拟南芥植株群体平均在 38 天开花,最早开花植株所需时间为 35 天,我们就预测在第 2 世代,平均开花时间可以短于 38 天,而单株开花时间也能是短于 35,第 3 世代相应地比第 2 个世代短,依此类推,经过 N ($N \geq 2$) 个世代后,每下 1 个世代开花时间都比上 1 个世代开花时间短,在 N 世代时,植株开花时间可能就会显著短于第 1 代。当然,拟南芥开花时间并不是一直会缩短,有可能在 M 个 ($M \geq N$) 世代时,拟南芥平均开花时间不再发生显著变化,而在一个定值范围内波动。对其它一些生物性指标的假设也类似于植株开花时间,如种植数目、大小等等。

而我们的实验结果却与我们的假设不符合,高浓度 CO₂ 对拟南芥进行连续多个处理,对拟南芥生长发育和生殖生物学许多特性能够产生显著性的变化,但是这些变化却不能够传递到下 1 个世代。我们认为高浓度 CO₂ 处理对拟南芥没有产生驯化作用,即拟南芥对高浓度 CO₂ 没有产生适应性变异。由此我们推断,在未来大气 CO₂ 浓度升高条下,高浓度 CO₂ 对其它高等植物在多个世代中也可能不产生驯化作用。

Bazzaz(1995)在采用高浓度 CO₂对苘麻(*Abutilon theophrasti*)进行 1 个世代处理后,推导出高浓度 CO₂对苘麻的产生变异的理论模型,该模型可以计算出在高浓度 CO₂ 对苘麻进行连续多个世代处理后,每 1 个世代和上 1 个世代的遗

传变异率为 0.02%。如果我们以 1% 作为显著标志, 那么从理论上认为至少需要经过 50 个世代处理后, 第 51 个世代和第 1 个世代才会从统计上检测出差异, 换句话说, 在多个世代高浓度 CO₂ 对植物产生的驯化作用非常小, 几乎可以忽略, 进而认为在多个世代中高浓度 CO₂ 对植物没有产生驯化作用。这理论模型的推断被我们的实验结果所证实。

事实上我们的实验结论与高浓度 CO₂ 对绿藻和真菌进行连续多个世代实验的结果相一致(Collins and Bell 2004; Klironomos et al. 2005), 这两篇文献最近在《Nature》期刊上发表, 前者使用浓度为 1050ppm CO₂ 对莱茵绿藻连续处理 1000 代(约 250 天)以后, 观察莱茵绿藻各种生理与形态指标的变化程度; 后者则使用高浓度 CO₂ 对真菌连续处理 21 代(大约 6 年)以后, 研究真菌的各种指标变异程度。在上述两篇文章中均通过比较处理前或处理数代后的各种指标, 但未发现高浓度 CO₂ 对真菌和莱茵绿藻产生遗传驯化作用, 即高浓度 CO₂ 对每一代所产生的影响未被传递到下一代。

第三章 不同浓度 CO₂ 对拟南芥叶片生长、 结构、生理与生化影响

3.1 引言

近年来,有关大气中CO₂浓度不断升高对全球气候变化产生的影响已越来越受到广泛的重视,其中高浓度CO₂对植物生长发育影响的研究尤为突出,例如近十多年来,国内外学者曾从分子、细胞、器官、物种、种群直至生物圈等不同层次分别做了大量的研究工作,发表的学术论文已达数千篇之多(Cheng 1998; Norby et al. 1999; Gibeaut et al. 2001; Lin et al. 2001)。然而,关于大气CO₂浓度升高对植物光合器官超微结构影响的资料相对较少,即使有一些相关报道,但他们对叶片超微结构变化的描述均较为简单,同时也很少从生物统计学的角度来定量说明高浓度CO₂对叶片超微结构影响的程度(Robertson and Leech 1995; Bockers et al. 1997; Watling et al. 2000; Zuo et al. 2002)。

依据大量实验证据表明,高浓度CO₂会影响植物顶端分生组织细胞的分裂、分化与伸长,并由此加速植物的生长与发育 (Masle 2000; Yong et al. 2000; Ferris et al. 2001; Li et al. 2002; Vu et al. 2002; Taylor et al. 2003; Luomala et al. 2005)。通常,细胞的分裂、伸长与分化会受到各种植物激素水平,如生长素、细胞分裂素、赤霉素、以及脱落酸等的调节(Yong et al. 2000; Li et al. 2002)。因此,在大气高浓度CO₂条件下,植物生长与发育速率加快必然与植物体内各种激素水平的变化密切相关。然而,到目前为止,对于在高浓度CO₂条件下,植物体内激素水平变化的研究报道甚少。通过高浓度CO₂对植物体内激素水平影响的研究将进一步有助于植物个体在高浓度CO₂条件下个体发育加快的机制。

众所周知,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)是分子、遗传与发育生物学研究领域的模式植物,应用其研究高浓度CO₂对植物生长发育影响也有不少报道(Ward and Strain 1997; Cheng et al. 1998; Andalo et al. 2001; Van Der Kooij et al. 1999; Ward and Kelly 2004)。但是,大部分研究主要集中在高浓度CO₂对拟南芥植株的生长速率、碳水化合物含量、细胞壁结构成分、生物量变化、Rubisco酶含量以及其编码基因mRNA表达水平等方面,而关于高浓度CO₂对这种模式植物叶片的超微结构、矿物质与激素水平的影响则尚未见有报道。

为此,在本章中我们将以拟南芥为实验材料,在高浓度CO₂处理条件下,对其叶片中碳水化合物含量、矿物质水平、叶片气孔参数,尤其是细胞超微结构和植物激素水平的变化等方面进行系统和深入的研究,从而为全面阐明在高浓度CO₂条件下对植物生长发育产生的响应机制提供更多佐证。

3.2 材料与方法

3.2.1 实验材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*), 为野生型 Columbia 生态型(Wild-type Col-0)。

3.2.2 材料种植与培养箱改造

请看“2.2.2 材料种植与培养箱改造”。实验中所分析材料均是拟南芥发育 5.10 阶段时的叶片(Boyes et al. 2001), 即是植株刚抽苔时。

3.2.3 气孔参数与呼吸速率测定

当植株抽苔时,对完全张开叶片进行取样,用来测定气孔密度、气孔指数以及表皮细胞密度。采用五色指甲油涂到叶片正反表面,等指甲油干了以后小心取下在显微镜(Zeiss Axioskop 40)下进行观察,数码拍照(Axiocam MRC)。根据数码照片,计算出单位面积上的气孔与表皮数目,然后计算出气孔密度、气孔指数以及表皮细胞密度(Ceulemans et al. 1995)。数据来自 5 个植株,每个植物随机取 3 枚成熟叶片,每枚叶片随机取 20 个独立区域,每个区域面积为 0.16 mm²。

此外,采用 LI-6400 型光合测定仪(LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA)测定成熟叶片的气孔导度和蒸腾速率。随机选择 5 株,每株测定 3 个叶片。生长在 370 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ 下的植株叶片测定条件:370ppm CO₂、1500ppm PAR、2.0-2.5 KPa VPD、23 °C;而对生长在 700ppm CO₂ 下的植株叶片测定条件除 CO₂ 浓度为 700ppm 以外,其它条件不变。

3.2.4 透射电镜观察

完全成熟叶片切成小块后,固定于2.5% (v/v)戊二醛(溶于0.1 M磷酸缓冲液, pH=7.0)中,并用针筒进行抽气,然后在4 °C 条件下保存2小时。然后,样品用0.1 M磷酸缓冲液清洗5次后固定于1%锇酸中。样品在锇酸中固定3小时后用同样的磷酸缓冲液进行冲洗3次后,用系列乙醇进行梯度脱水,然后用Spurr树脂进行

包埋，60℃聚合16小时。用LKB-V超薄切片机(Bromma, Sweden)进行切片，超薄切片置于铜网上经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染后，在JEM-1230透射电子显微镜(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)下观察并拍照。

(1) 0.2M 的不同 pH 值磷酸缓冲液的配制：

原液 I：将 2.76 克 NaH₂PO₄·H₂O 或 3.12 克 NaH₂PO₄·2H₂O 溶于 100 ml 蒸馏水。

原液 II：将 3.56 克 NaHPO₄·2H₂O 或 5.36 克 Na₂HPO₄·7H₂O 或 7.16 克

Na₂HPO₄·12H₂O 溶于 100 ml 蒸馏水。

将原液 I 和 II 依下表比例混合配制成不同 pH 值的缓冲液。

表 3-1 各种 pH 值 PBS 的配制

Figure 3-1 Directions for PBS

pH	0.2M 原液 I (ml)	0.2M 原液 II (ml)	pH	0.2M 原液 I (ml)	0.2M 原液 II (ml)
5.8	92.0	8.0	7.2	28.0	72.0
6.0	87.7	12.3	7.3	23.2	76.8
6.2	81.5	18.5	7.4	19.0	81.0
6.4	73.5	26.5	7.6	13.0	87.0
6.6	62.5	37.5	7.8	8.5	91.5
6.8	51.0	49.0	8.0	5.3	94.7
7.0	61.0	39.0			

(2) 醋酸双氧铀染液配制

70%或 50%酒精配制 2%的醋酸双氧铀饱和液。避光保存，该试剂有一定放射性，但很微弱，对人体影响不大。染色在培养皿中进行，培养皿底部放置湿的滤纸，以防染液蒸发而失水。用加样器轻轻地将染液加到铜网边缘，让铜网都浸有染液，20 分钟后加入几滴重蒸水，进行重新平衡，再染 20 分钟。然后将依次材料放在 3 杯重蒸水中沿着膜平行方向洗 3 次，每次清洗大约来回 20 下，然后用滤纸将水吸干，进行铅染。

(3) 柠檬酸铅染液配制

在醋酸双氧铀染色中加入几滴重蒸水后，此时可以进行柠檬酸铅染液配制，将 0.1g NaOH(0.1M)溶于 25ml 重蒸水中，然后再溶入 0.125g 柠檬酸铅，其浓度为 0.5%(W/W)(容器大约 30ml，如容积太大，则太大剩余空间中空气部分所含 CO₂ 易于柠檬酸铅形成沉淀)，轻轻振荡让其溶解然后静置。取容器中间部分染液进行染色，染色时在大培养皿中放入一些 NaOH(吸收培养皿空气中的 CO₂)，然

后将染液小心地加大到经过醋酸双氧铀染色并清洗过的铜网，染色大约 5-10 分钟。颜色结束后，将塑料条上的铜网在含少量 NaOH 重蒸水中沿着膜平行方向约 20 下，然后再依次在 2 杯重蒸水中清洗 2 次，每次还是来回清洗 20 下。清洗后用滤纸将样品轻轻吸干，放在铜网盒中，进行电镜观察。

3.2.5 碳水化合物测定

拟南芥叶片可溶性糖采用蒽酮—浓硫酸方法(Ebell 1969)；淀粉含量测定采用淀粉葡萄糖苷酶(amyloglucosidase)水解方法(Vu et al. 2002; Lindroth et al. 2002)。纤维素含量测定采用 Updegraff(1969)方法。所有的测量都重复 5 次。

(1) 可溶性糖提取与测定

新鲜叶片在 110 度下烘烤 15 分钟，70 度过夜至恒重研磨成粉末
↓
50mg 粉末放入有拧盖的塑料刻度管，加入 4mL 80%乙醇，80 度水浴 40 分钟
↓
离心，收集上清液，其残渣加入 2mL 80%乙醇重复抽提 2 次，合并上清液
↓
上清液加入 10mg 活性碳，80 度脱色 30min，过滤后定容至 10mL
↓
5mL 蒽酮试剂中加入上述 1mL 提取液，煮沸 10min，蒽酮试剂：
0.1g 蒽酮+1g 硫酸溶解于 100mL 72%硫酸（30mL 蒸馏水+76mL 浓硫酸）
↓
在 625nm 下测定 OD 值，然后代入标准方程计算出溶液浓度

(2) 淀粉提取与测定

上述提取可溶性糖的残渣烘干后，加入 1mL 0.2mol/L KOH
↓
沸水中反应 30min,冷却后加入 0.2 mL 1mol/L 乙酸，pH=4.8
↓
加入 2 mL 淀粉葡萄糖苷酶液
(用 pH=4.8 的乙酸—乙酸钠缓冲液配置，0.5mg/mL)
↓
55 度下反应 1 小时，然后煮沸 5 分钟中止反应，稀释成 10mL
↓
用蒽酮法测定水解葡萄糖含量，叶片中淀粉含量可以用葡萄糖含量来表示

3.2.6 傅里叶显微红外广谱分析 (Fourier transformed infrared microspectroscopy, FTIR)

采用FTIR对拟南芥细胞壁结构成分分析根据文献(Chen et al. 1998)并做适当修改。植株刚抽苔时,在光周期刚结束时从植株上剪取完全张开刚成熟的叶片,将叶片置于80%(V/V)乙醇溶液中,在85℃条件下水溶20分钟,以便抽提叶片中叶色素、可溶性糖和其它小分子物质。这种抽提步骤重复3次,直到叶片颜色发白为止。然后用重蒸水将样品清洗3次,将远离中脉叶片部位切成100 μ m $\times$ 100 μ m大小的小块,然后置于BaF₂晶片上,在37℃条件下烘干。红外光谱分析采用MAGNA 750 FTIR 光谱仪(Nicolet Corp., Tokyo, Japan),光谱仪配备MCT检测仪器,光谱分辨率为8 cm⁻¹,扫描次数为128次。每个样品重复3次实验,求平均值。

3.2.7 植物激素水平测定

对拟南芥叶片中各种激素水平测定步骤如下:

A. 样品中激素的提取

(1) 称取 0.5-1.0g 新鲜植物材料(若取样后材料不能马上测定,用液氮速冻后保存在-20℃的低温冰箱中),加 2ml 样品提取液,在冰浴下研磨成匀浆,转入 10ml 试管,再用 2ml 提取液分次将研钵冲洗干净,一并转入试管中,摇匀后放置在 4℃冰箱中。

(2) 4℃下提取 4h, 1 000g 离心 15min(实验中离心机型号 LDZ5-2, 约 4 000rpm), 取上清液。沉淀中加 1ml 提取液, 搅匀, 置 4℃下再提取 1h, 离心, 合并上清液并记录体积, 残渣弃去。

(3) 上清液过 C-18 固相萃取柱。具体步骤是: 80%甲醇(1ml)平衡柱→上样→收集样品→移开样品后用 100%甲醇(5ml)洗柱→100%乙醚(5ml)洗柱→100%甲醇(5ml)洗柱→循环。

(4) 将过柱后的样品转入 5ml 塑料离心管中, 真空低温干燥或用氮气吹干, 除去提取液中的甲醇, 用样品稀释液定容(一般 1g 鲜重用 1.5ml 左右样品稀释液定容)。

B. 样品测定

(1) 包被: 在 10ml 包被缓冲液中加入一定量的包被抗原(最适稀释倍数见试剂

盒标签), 混匀, 在酶标板每小孔中加 100 μ l。然后将酶标板放入内铺湿纱布的带盖瓷盘内, 置于 37℃ 下 3h。

(2) 洗板: 将包被好的板取出, 放在室温下平衡。然后甩掉包被液, 将下口瓶内的洗涤液通过乳胶管均匀加入板上, 使每孔充满洗涤液, 放置约 0.5min, 再甩掉洗涤液。重复 3 次, 将板内残留洗涤液在吸水纸上甩干。

(3) 竞争: 即加标准物、待测样和抗体。

加标样及待测样: 取样品稀释液 0.98ml, 内加 20 μ l 激素的标样试剂(100 μ g / ml), 即为 2000ng/ml 标准液, 然后再依次稀释 1000ng/ml, 500ng/ml, 250ng/ml, 125ng/ml..., 0ng/ml。将系列标准样加入 96 孔酶标板的前三行, 每个浓度加 3 孔, 每孔 50 μ l, 其余孔加待测样, 每个样品重复三孔, 每孔 50 μ l。

加抗体: 在 5ml 样品稀释液中加入一定量的抗体(最适稀释倍数见试剂盒标签), 混匀后每孔加 50 μ l, 然后将酶标板加入湿盒内开始竞争。竞争条件 37℃ 左右 0.5h。

(4) 洗板: 方法同包被之后的洗板。但要注意以下两点: ①加洗涤液时一定要从标准曲线的低浓度一边向高浓度一边加, 并且酶标板要向高浓度的一边倾斜。②第一次加入洗涤液后要立即甩掉。然后再接着加第二次。注意这两点的目的是防止各孔的交叉反应。

(5) 加二抗: 将一定量的酶标羊抗兔抗体, 加入 10ml 样品稀释液中(最适稀释倍数见试剂盒标签), 混匀后, 在酶标板每孔加 100 μ l, 然后将其放入湿盒内, 置 37℃ 下, 温育 0.5h。

(6) 洗板: 方法同竞争之后的洗板(步骤 4), 洗五次,

(7) 加底物显色: 称取 10-20mg 邻苯二胺(OPD)溶于 10ml 底物缓冲液中(小心勿用手接触 OPD), 完全溶解后加 2~4 μ l 30% H₂O₂。混匀, 在每孔中加 100 μ l(在暗处操作), 然后放入湿盒内, 当显色适当后(即 0ng/ml 孔与 2000ng/ml 孔的 OD 差值为 1.0 左右时), 每孔加入 50 μ l 2mol/L 硫酸终止反应。

(8) 比色: 用 2000ng/ml 浓度孔(即标准曲线最高浓度孔)调 0, 在酶联免疫分光光度计上依次测定标准物各浓度和各样品 490nm 处的 OD 值。

C. 结果计算

用于 ELISA 结果计算最方便的是 logit 曲线。曲线的横坐标用激素标样各浓度(ng/ml)的自然对数表示, 纵坐标用各浓度显色值的 logit 值表示。Logit 值的

计算方法如下：

$$\text{Logit}(B/B_0) = \ln \frac{B/B_0}{1-B/B_0} = \ln \frac{B}{B_0-B}$$

其中 B_0 是 0ng/ml 孔的显色值， B 是其它浓度的显色值。

作出的 logit 曲线在检测范围内应是直线。待测样品可根据其显色值的 logit 值从图上查出其所含激素浓度(ng/ml)的自然对数，再经过反对数即可知其激素的浓度(ng/ml)。

另外，也可用激素标样各浓度(ng/ml)的自然对数与各浓度显色值的 logit 值的回归方程代替 logit 曲线，求得样品激素的浓度。一般来说，二种方法求得的结果会略有差异。

求得样品中激素的浓度后，样品中激素的含量(ng/g·fw)可用下式计算：

$$A = \frac{N \cdot V_2 \cdot V_3 \cdot B}{V_1 \cdot W}$$

其中， A 表示激素的含量(ng/g·fw)；

V_2 表示提取样品后，上清液的总体积；

V_1 表示进行真空浓缩干燥的上清液体积；(当提取的上清液全部进行真空浓缩干燥时 V_1 与 V_2 的体积是相等的)

V_3 表示真空浓缩后用样品稀释液定容的体积；

W 表示样品的鲜重；

N 表示样品中激素的浓度(ng/ml)；

B 表示样品的稀释倍数(样品稀释液定容以后的稀释倍数)。

D. 激素测定过程中所须试剂如下：

(1) 包被缓冲液：称取 1.5 g Na₂CO₃， 2.93g NaHCO₃， 0.2g NaN₃(可不加)，用量筒加 1 000 ml 蒸馏水，pH 为 9.6。

(2) 磷酸盐缓冲液(PBS)：称取 8.0g NaCl, 0.2g KH₂PO₄， 2.96g Na₂HPO₄·12H₂O，用量筒加 1 000 ml 蒸馏水，pH 为 7.5。

(3) 样品稀释液：100 ml PBS 中加 0.1 ml Tween-20，0.1g 明胶(稍加热溶解)。

- (4) 底物缓冲液: 称取 5.10g C₆H₈O₇·H₂O(柠檬酸), 18.43g Na₂HPO₄·12H₂O, 溶解定容至 1 000ml, 再加 1 ml Tween-20, pH 为 5.0。
- (5) 洗涤液: 1000ml PBS 加 1ml Tween-20。
- (6) 终止液: 2mol/L H₂SO₄。
- (7) 提取液: 80% 甲醇, 内含 1 mmol/L BHT(二叔丁基对甲苯酚, 为抗氧化剂, 先用甲醇溶解 BHT, 在配成 80% 的浓度)。
- (8) 激素包被抗原、各激素抗体和标准物。
- (9) 酶标二抗: 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体。

3.2.8 叶片中各种元素含量测定

拟南芥刚抽苔时, 在光周期刚结束时收集拟南芥叶片, 置于烘箱中烘至恒重, 然后用研磨磨成粉末, 进行下面各种元素测定。

(1) 样品液制备

称取植物样品 0.2g 左右, 装入 50ml 消化管的底部, 加 5ml 浓硫酸后再加几滴去离子水, 摇匀后过夜。将含有样品的消化管置于消化炉上, 消化管上面放置一个小漏斗, 起到回流作用, 在消化炉上加热一会儿, 待 H₂SO₄ 发白烟后, 溶液呈均匀的棕黑色时, 取下消化管数滴加入 H₂O₂, 再加热至微沸, 消煮约 5 分钟, 稍冷后重复加 H₂O₂ 再消煮, 如此重复数次, 直到溶液呈无色或清亮时, 停止加 H₂O₂, 整个过程大概需要 8ml H₂O₂, 然后在 450 °C 下消煮 10—15 分钟, 将剩余 H₂O₂ 去除。冷却后将溶液定容至 50ml。此时消化管中的 50ml 提取液可以用来测定 N、P、K、Ca、Mg 等含量。

(2) 各种元素含量测定

A) N 测定

取一定量上述提取液在凯氏定氮仪上反应, 将吸收 NH₃ 的硼酸用稀硫酸滴定, 计算所用硫酸体积, 然后进行换算, 获得植物材料中 N 的含量。

$$N\% = C(v - v_0) \times 0.041 \times 100 / (m \times v_2 / v_1)$$

C—酸标准溶液浓度, mol/L; v—滴定试样所用的酸标准液, ml; v₀—滴定空白所用的酸标准液, ml; 0.041—N 的毫摩尔质量, g/mmol; m—称样量, g;

v_1 —消煮液定容体积, ml; v_2 —吸取测定的消煮液体积 ml。各种试剂: (1)10M / L NaOH 溶液; (2)2% H₃BO₃ 与甲基橙—溴甲酚绿混合液; (3)标准溶液 [C(HCl 或 1/2H₂SO₄)=0.01mol/L]。

B) P 测定

吸取上述一定量的消煮液放入 50ml 容量瓶中, 加 1 滴二硝基酚指示剂, 滴加浓 NaOH 溶液中和至刚呈浅黄色, 加入 5ml 钒钼酸铵试剂, 用水定容 50ml(V_3)。显色 30 分钟后用 1cm 光径的比色杯在波长 700nm 处进行测定, 以空白溶液(空白试验消煮液按上述步骤显色)调节仪器零点。

标准曲线回归方程 准确吸取 50mg/LP 标准液 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15ml 分别放入 50ml 容量瓶中, 按上述步骤显色, 即得 0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 15mg/LP 的标准系列溶液, 与待测液一起测定, 读取吸光度, 然后绘制标准曲线或求直线回归方程。

$$P \% = C(P) \times (v_1/m) \times (v_3/v_2) \times 10^{-4}$$

式中 $C(P)$ —从校准曲线回归方程求得的显色液中磷浓度, mg/L; v_3 —显色液体积, ml; v_2 —吸取测定的消煮液体积, ml; v_1 —消煮液定容体积, ml; m —称样量, g; 10^{-4} —将 mg/L 浓度单位换算为百分含量的换算因数。

C) K、Ca、Mg 测定

取上述一定量消煮液采用原子吸收仪(AA-6300, Shimadzu, Japan)进行 K、Ca、Mg 的测定。

(3) 碳的含量测定

称取 30mg 样品粉末于 250 ml 三角瓶中, 加入 5ml 1 mol.L⁻¹(1/6 K₂Cr₂O₇)到三角瓶中混匀, 然后再加入 10 ml 浓硫酸到三角瓶中混匀 1 分钟后, 静置 30 分钟让其充分反应, 然后加水 125 ml, 加入 4 滴邻啡罗啉指示剂混匀, 之后用 0.5 mol.L⁻¹ FeSO₄ 溶液滴定, 当颜色呈现绿色至暗绿色时, 此时快接近终点, 然后慢慢滴加 FeSO₄ 溶液, 是三角瓶中溶液呈砖红色, 此时记录所用 FeSO₄ 溶液体积 V (ml)。同样的方法用空白也进行滴定, 所用用 FeSO₄ 溶液体积为 V_0 (ml)。

$$C \text{ 含量 (g.kg}^{-1}) = [C(V_0 - V) \times 10^{-3} \times 3.0 \times 1.33] / \text{样品重(g)}$$

1.33—为氧化校正系数；C—0.5 mol.L⁻¹ FeSO₄ 标准溶液的浓度；Vo—空白滴定所用 FeSO₄ 溶液体积；V—样品滴定所用 FeSO₄ 溶液体积；3.0—1/4 碳原子的摩尔质量(g.mol⁻¹)；10⁻³—将 ml 换算成 L。

3.2.9 数据统计

数据采用 t-test 方法，统计软件为 SPSS10.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)。

3.3 结果

3.3.1 叶片气孔参数与蒸腾速率

在高浓度CO₂生长条件下，植株叶片上下表面的气孔密度和气孔指数都显著下降，但叶片表皮细胞密度未受到显著影响。与对照相比较，高浓度CO₂使得叶片上下表面的气孔密度分别增加19% 和14%(图3-1a)。同样，气孔指数分别增加12%和9%(图3-1b)。然而，叶片表皮细胞密度在高浓度CO₂处理下变化不大(图3-1)。在高浓度CO₂处理下，叶片气孔导显著降低41%，叶片蒸腾速率降低大约36%(图3-1d)。

3.3.2 叶片超微结构

在高浓度CO₂条件下，叶肉细胞中叶绿体数目、叶绿体宽度和面积、细胞壁厚度(图3-2g, h)以及叶片厚度均显著增加，但对叶绿体的长度和细胞大小似无影响(表3-2)。与370ppmCO₂处理比较，700ppmCO₂处理下单位叶肉细胞中叶绿体数目增加17.9%，叶绿体宽度增加19.8%，而叶绿体长度无变化，因此叶绿体面积相应增加了23.9%。此外，叶片厚度

在高浓度 CO₂ 处理下，叶绿体中淀粉粒数目和大小都显著增加(表 3-2)。如在对照条件下，淀粉粒的平均面积为 0.83 μm²，而高浓度 CO₂ 为 1.26 μm²，增加幅度达 51.8%。单位面积中叶绿体内淀粉粒数目对照为 1.94 个，而高浓度 CO₂ 为 2.73 个，平均增加幅度为 40.7%。在对照条件下，大约有 30%叶绿中没有淀粉粒，在高浓度 CO₂ 处理下，叶绿体中淀粉粒数目和大小都显著增加(表 3-2)。

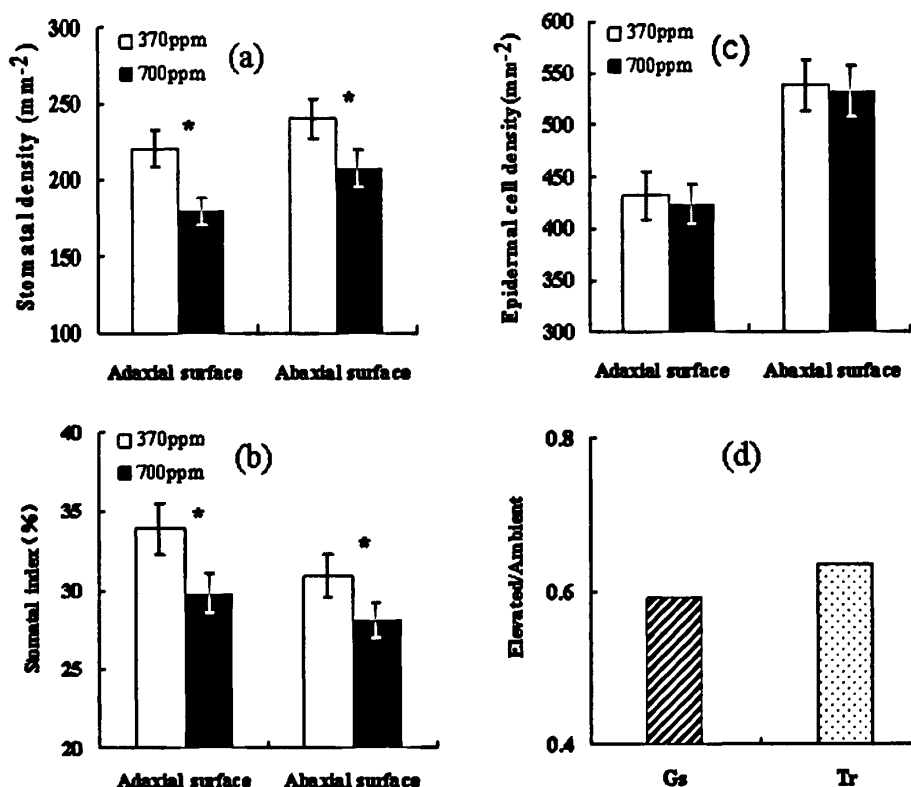


图 3-1. 不同 CO₂ 浓度条件下叶片气孔参数、气孔导度与蒸腾速率的变化

Figure 3-1. Stomatal conductance (Gs) and transpiration rate (Tr) of leaves and stomatal characters of the adaxial and abaxial leaf surfaces of *Arabidopsis* grown under two CO₂ concentrations, i.e. ambient CO₂ (370ppm) and elevated CO₂ (700ppm). Asterisks indicate statistical differences (P < 0.01, Student's t-test, bar = SD, n = 600).

如在对照条件下，淀粉粒的平均面积为 0.83 μm^2 ，而高浓度 CO₂ 为 1.26 μm^2 ，增加幅度达 51.8%。单位面积中叶绿体内淀粉粒数目对照为 1.94 个，而高浓度 CO₂ 为 2.73 个，平均增加幅度为 40.7%。在对照条件下，大约有 30% 叶绿中没有淀粉粒，而在高浓度 CO₂ 下则为 10% 左右。在高浓度 CO₂ 条件下，淀粉粒总面积占叶绿体平均大约为 34.4% (图 3-2b)，有的甚至占 60% 左右 (图 3-2c)，而对照条件下平均值为 21.8% (图 3-2a)。在高浓度 CO₂ 处理下，叶绿体由于含有大量淀粉，其形状变得较圆而饱满，有些大的淀粉粒往往把内囊体膜挤变形 (图 3-2d)。此外，在高浓度 CO₂ 下，叶绿体的基质内囊体与基粒内囊体的比例增加，基粒内囊体膜数目平均降低 27.6% (图 3-2, 表 3-2)，同时对叶绿体中的脂质体并无显著影响。

拟南芥有性生殖模式和叶片特性对大气 CO₂ 浓度变化的响应

表 3-2. 不同CO₂浓度对拟南芥叶片结构及叶绿体超微结构的影响
Table 3-2. Chloroplast ultrastructure and leaf structure of *Arabidopsis* grown at elevated or ambient CO₂

Chloroplast Features	Ambient	Elevated	% increase	P-value
Ch. Number per cell	8.90 ± 2.9	10.49 ± 3.2	17.9	<0.0001
Ch. Length (μm)	4.86 ± 1.54	4.80 ± 1.86	-1.2	0.335
Ch. Width (μm)	1.82 ± 0.54	2.18 ± 0.72	19.8	<0.0001
Ch. Area (μm ²)	6.99 ± 3.69	8.66 ± 5.62	23.9	<0.0001
St. Number per Ch.	1.94 ± 1.29	2.73 ± 1.36	40.7	<0.0001
St. Area (c ²)	0.83 ± 0.49	1.26 ± 0.58	51.8	<0.0001
Total St. Area/ Ch. Area	21.8%	34.4%	57.8	<0.0001
Number of Gr. Th. Me.	9.01 ± 3.15	6.52 ± 2.04	-27.6	<0.0001
Pl. Number per Ch.	10.14 ± 4.43	10.98 ± 3.51	8.28	0.252
Cell Wall Thickness (μm)	0.3156 ± 0.0283	0.2549 ± 0.0236	23.8	<0.0001
Cell Size (μm ³)	727 ± 266	753 ± 275	3.6	0.631
Leaf Thickness (μm)	139.9 ± 13.5	147.3 ± 14.9	5.3	0.011

表中数值为：平均值±标准差，在播种后5周左右随机从5个植株上取样，每个植株随机取3枚完全张开叶，每枚叶片观察270个叶肉细胞。采用t-test进行统计比较。

The values given indicate means ± SD from five plants (270 cells were recorded from three leaves of each plant). The fully expanded rosette leaves were sampled at stage 5.0. Mean values were compared by t-test.

St. Number per Ch. = number of starch grains per chloroplast profile; St. Area = Area per starch grain; Ch. Number per Cell = number of chloroplasts per cell; Ch. Length = longest dimension of chloroplasts; Ch. Width = widest dimension of chloroplasts; Ch. Area = area of chloroplast profile; Total St. Area/Ch. Area = rate of total starch grains per chloroplast relative to chloroplast area; Number of Gr. Th. Me. = number of grana thylakoid membranes; Pl. Number per Ch. = number of plastoglobuli per chloroplast.

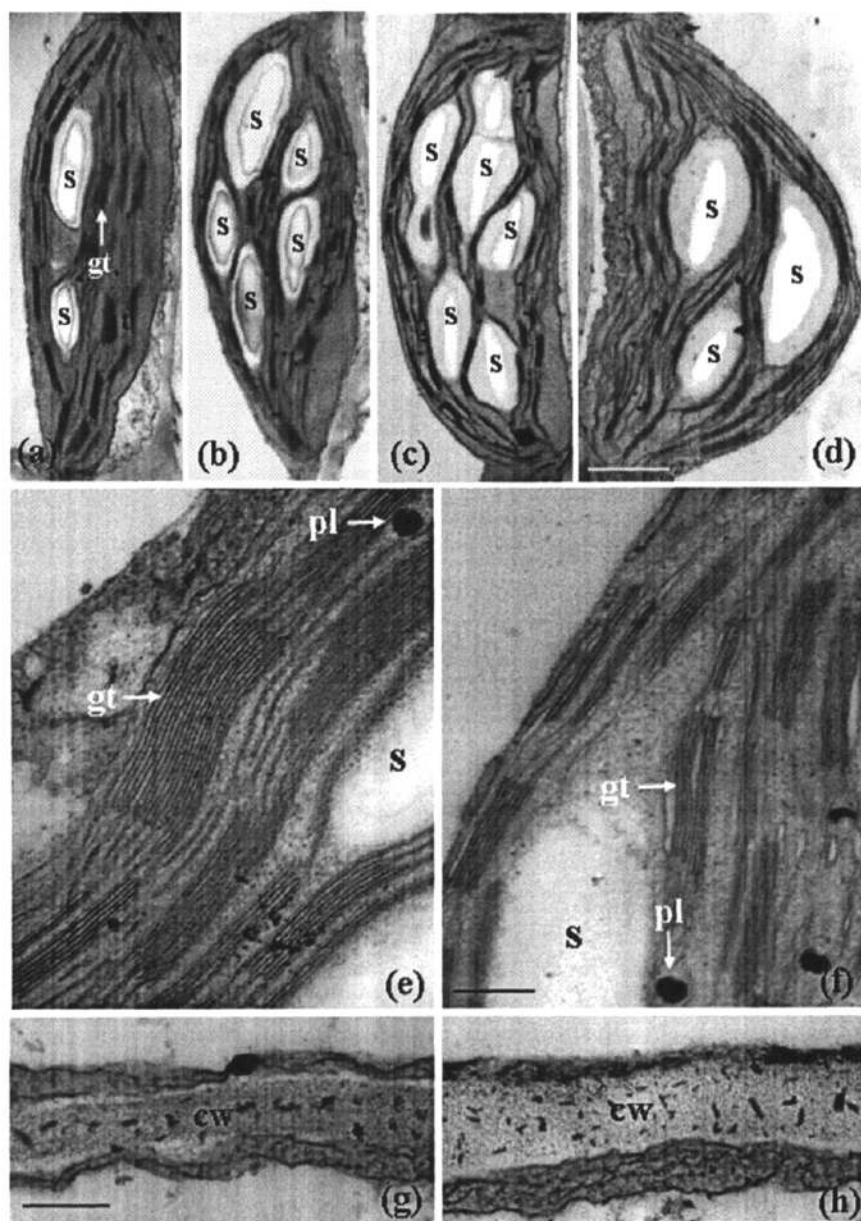


图 3-2. 不同浓度 CO₂ 对叶片超微结构的影响。

a、e 为 370 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ 处理下；b、c、d、f 为 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ 处理下。S：淀粉粒；gt：基粒内囊体；Pl：脂质体；cw：细胞壁。

Figure 3-2. Transmission electron micrographs showing chloroplast and cell wall ultrastructure of leaves of *Arabidopsis* grown under ambient CO₂ (a, e, 370ppm) and elevated CO₂ (b, c, d, f, 700ppm). Note that more and larger starch grains were observed in chloroplasts of elevated-CO₂

grown leaves than in chloroplasts of ambient-CO₂ grown leaves. In addition, elevated CO₂ increased the ratio of stroma to grana thylakoids and decreased the number of grana thylakoid membranes. s: starch; gt: grana thylakoid; pl: plastoglobuli; cw: cell wall. Scale bar = 1 μ m (a-d), 0.2 μ m (e, f; g, h).

3.3.3 叶片碳水化合物含量

可溶性总糖和淀粉是叶片中最主要的非结构性碳水化合物(nonstructural carbohydrates)。通过高浓度 CO₂ 处理后, 不仅显著增加可溶性总糖的含量, 也显著增加淀粉的含量, 同时纤维素含量也显著增加(表 3-3)。与对照比较, 高浓度 CO₂ 处理下, 可溶性总糖增加 70%, 淀粉增加 80%左右, 纤维素含量增加 22%, 因此非结构性碳水化合物平均增加 76%左右。

表 3-3. 不同浓度 CO₂ 对拟南芥叶片碳水化合物的影响
Table 3-3. Content of carbohydrates in rosette leaves of *Arabidopsis* grown at ambient or elevated CO₂

Carbohydrates (μ g mg ⁻¹ DW)	Ambient	Elevated	% increase	P-value
Soluble sugars	21.39 $\pm$ 0.81	36.76 $\pm$ 1.24	71.9	<0.0001
Starch	37.64 $\pm$ 1.47	67.26 $\pm$ 2.62	78.7	<0.0001
*TNC	59.03 $\pm$ 0.66	104.02 $\pm$ 3.86	76.2	<0.0001
Cellulose	98.46 $\pm$ 3.27	120.42 $\pm$ 4.26	22.3	0.002

表中数值为: 平均值 $\pm$ 标准差, 在播种后5周左右随机取样5个植株进行测定。采用 *t*-test 进行统计比较。
The values given indicate means $\pm$ SD. The rosette leaves at stage 5.0 were sampled and mixed for the determination of carbohydrates. Mean values ($n=5$ samples, with five plants per sample) were compared by Student's *t*-test. *TNC (Total nonstructural carbohydrates)=Soluble sugars + Starch.

3.3.4 叶片细胞壁成分的 FTIR 分析

由于CO₂处理主要对细胞壁碳水化合物含量有很大影响, 所以我们选择波数在900到1200 cm⁻¹范围, 碳水化合物吸收峰在该范围内(Michael and Maureen 2000)。叶片细胞壁的FTIR光谱主要有4个波峰(1020、1043、1082以及1157 cm⁻¹; 图3-3A)。图3-3B 是有图3-3A两种CO₂处理形成的差谱图, 从图3-3A可以看出, 纤维素的两个波峰(1043 和 1157 cm⁻¹)(Mouille et al. 2003)增加; 同样果胶的两个波峰(1020 and 1082 cm⁻¹) (Oomen et al. 2004)也有所增加, 由此说明, 在高浓度 CO₂ 处理下, 叶片细胞壁中纤维素和果胶含量均比对照高。

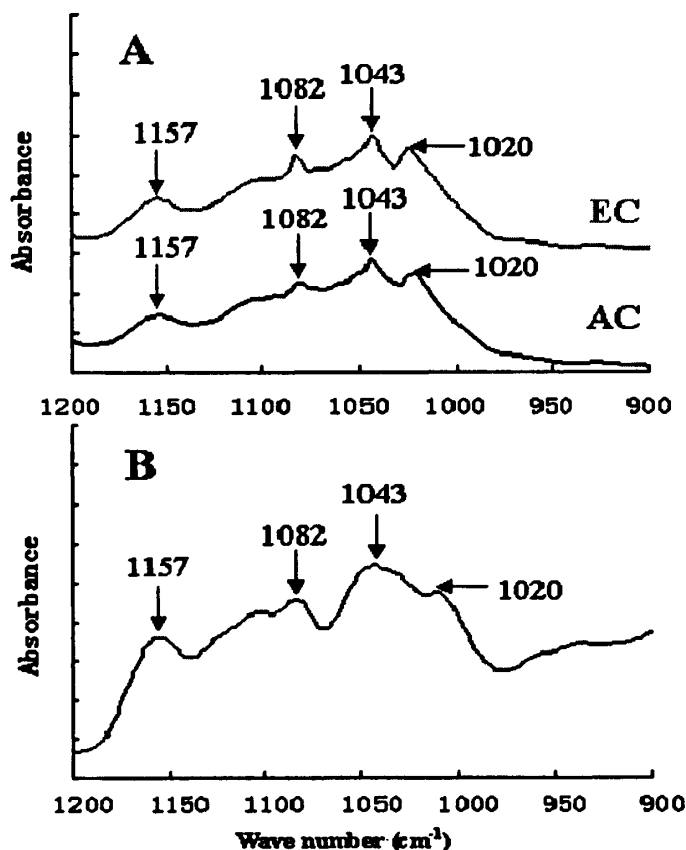


图3-3. 不同CO₂浓度处理下叶片细胞壁FTIR图谱。图A：高浓度CO₂ (EC) 叶片图谱，正常CO₂ (AC)下拟南芥图谱；图B：图A中EC与AC的差谱。

Figure 3-3. Fourier transform infrared (FTIR) spectra obtained from cell walls of *Arabidopsis* leaves. (A) The FTIR spectra obtained from cell walls of leaves of *Arabidopsis* grown under elevated CO₂ (EC) and ambient CO₂ (AC). (B) Difference spectrum generated by digital subtraction of spectrum AC from spectrum EC in Figure 3-3A.

3.3.5 叶片激素水平

照相比较，在高浓度CO₂处理下，植株叶片中IAA、GA₃、ZR、DHZR、iPA水平显著增加，其中分别GA₃、DHZR和iPA含量极显著增加，增加幅度为55.4%、55.9%和74.6%；IAA和ZR含量分别显著增加13.7%、15.6%(Table 3-4)。而叶片中ABA含量却显著降低，降幅达15.2%。

拟南芥有性生殖模式和叶片特性对大气 CO₂ 浓度变化的响应

图 3-4. 不同浓度 CO₂ 处理对叶片激素水平的影响

Table 3-4. Levels of plant hormones in rosette leaves of *Arabidopsis* grown at ambient or elevated CO₂

Plant hormones (ng g ⁻¹ FW)	Ambient	Elevated	% increase	P-value
IAA	31.27 ± 2.87	35.56 ± 2.97	13.7	0.049
GA ₃	211.05 ± 17.73	327.96 ± 30.81	55.4	<0.0001
ZR	182.36 ± 15.87	210.79 ± 18.04	15.6	0.04
DHZR	37.71 ± 6.95	58.79 ± 7.83	55.9	0.002
iPA	3.98 ± 0.86	6.95 ± 1.46	74.6	0.004
ABA	252.14 ± 22.05	213.86 ± 15.09	-15.2	0.013

表中数值为：平均值±标准差，在播种后5周左右随机取样5个植株进行测定。采用*t*-test进行统计比较。
The values given indicate means ± SD. The rosette leaves at stage 5.0 were sampled and mixed for the determination of carbohydrates. Mean values (*n*=5 samples, with five plants per sample) were compared by Student's *t*-test. *TNC (Total nonstructural carbohydrates)=Soluble sugars + Starch.

3.3.6 叶片元素含量

高浓度CO₂处理下，叶片多种元素含量均有不同程度降低，其中N、P、K、Ca、和Mg的含量分别比对照下降11.2%、17.9%、20.7%、19.2%以及14.8%(表3-5)。然而，高浓度CO₂处理下，叶片中C的含量达到455.6 mg g⁻¹(干重)，比对照411.7 mg g⁻¹(干重)高10.7%。另外，由于在高浓度CO₂条件下叶片中C含量增加，而N含量降低，所以使C:N比从13.54增加到16.9，增幅达24.8%。

表3-5. 不同CO₂浓度处理对拟南芥叶片元素含量的影响

Table3-5. The nutrient concentrations in rosette leaves of *Arabidopsis* grown at ambient or elevated CO₂

Macroelements (mg g ⁻¹ DW)	Ambient	Elevated	% increase	P-value
C	411.7 ± 11.2	455.6 ± 13.0	10.7	0.0115
N	30.4 ± 1.3	27.0 ± 0.8	-11.2	0.0185
P	3.9 ± 0.3	3.2 ± 0.3	-17.9	0.0254
K	22.2 ± 1.1	17.6 ± 0.9	-20.7	0.0055
Ca	15.1 ± 0.9	12.2 ± 0.8	-19.2	0.0120
Mg	2.7 ± 0.2	2.3 ± 0.2	-14.8	0.0201
C:N	13.54 ± 0.25	16.90 ± 0.44	24.8	0.0003

表中数值为：平均值±标准差，在播种后5周左右随机取样5个植株进行测定。采用*t*-test进行统计比较。
The values given indicate means ± SD. The rosette leaves at stage 5.0 were sampled and mixed for the determination of carbohydrates. Mean values (*n*=5 samples, with five plants per sample) were compared by Student's *t*-test. *TNC (Total nonstructural carbohydrates)=Soluble sugars + Starch.

3.4 讨论

3.4.1 不同浓度 CO₂ 与气孔参数变化的关系

大量研究表明, 通过高浓度 CO₂ 处理后, 能明显降低叶片表面气孔的密度 (Woodward 1987; Woodward and Kelly 1995; Beerling et al. 1998; Lin et al. 2001); 然而, 有一些报道认为, 高浓度 CO₂ 处理对叶片气孔密度并无影响 (Ceulemans et al. 1995; Poole et al. 2000); 相反地, 也有人认为, 气孔的密度甚至有所增加 (Atkinson et al. 1997; Lawson et al. 2002)。通过我们的研究发现, 拟南芥在高浓度 CO₂ 处理下, 其叶片上下表面的气孔密度分别下降 19% 和 14%, 这一结果与 Woodward 和 Kelly (1995) 的报道较一致, 他们在对 100 个物种的研究发现, 高浓度 CO₂ 处理下, 各物种叶子的气孔密度平均降低 14.3%。另外, 拟南芥经高浓度 CO₂ 处理后, 由于其叶片气孔密度的降低, 从而也就引起气孔指数的下降。但有趣的是, 拟南芥叶片上下表面的气孔密度对高浓度 CO₂ 具有不同的响应, 其中上表面气孔更容易受到 CO₂ 处理的影响, 同样在皱叶酸模 (*Rumex crispus*) 和欧洲越桔 (*Vaccinium myrtillus*) (Woodward 1987) 中也有上述相似的报道。总之, 高浓度 CO₂ 可能对叶片的气孔数目产生影响, 而对表皮细胞的发生、分裂与分化等则无影响。同时我们还发现, 由于叶片气孔密度的降低导致气孔导度下降, 进而使叶片的蒸腾速率也明显减弱, 这与前人的研究结果基本一致 (Hetherington and Woodward 2003; Woodward 2002; Wullschleger et al. 2002)。

3.4.2 不同浓度 CO₂ 与叶片超微结构特征的关系

在高浓度 CO₂ 生长条件下, 拟南芥叶肉细胞内平均的叶绿体数目比对照显著增加。我们的结果与 Wang 等 (2004) 在高浓度 CO₂ 下对 *Nicotiana sylvestris* 处理时, 发现叶肉细胞中叶绿体数目比对照平均增加 71% 的报道基本一致。; 同样, 高浓度 CO₂ 也能够引起 *Marchantia polymorpha* 叶肉细胞中叶绿体数目的增加 (Bockers et al. 1997)。然而, Robertson 和 Leech (1995) 却发现, 高浓度 CO₂ 对生长 7 天的普通小麦幼苗叶片中叶绿体数目并无影响。这种差异可能与植株受高浓度 CO₂ 处理时间的长短以及取样时叶片的叶龄所引起, 例如在对拟南芥和 *N. sylvestris* 采样时, 其植株是在高浓度 CO₂ 处理 5 周以后采样, 而普通小麦的叶片叶龄仅为 7 天, 也许在小麦生长早期高浓度 CO₂ 处理的效应尚未显示出来。虽然多数研究者认为高浓度 CO₂ 处理能够引起叶肉细胞中叶绿体的增加, 如 Wang 等人 (2004) 也认为, 高浓度 CO₂ 可能促进叶绿体的发生来增加叶绿体数目。但迄今为止, 仍未彻底弄清这

种增加的真正原因(Bockers et al. 1997)。

在高浓度CO₂处理下,拟南芥叶片中叶绿体形态特征的变化主要表现为,它的宽度显著增大,而长度则无变化,因而从叶绿体的表观面积看也明显增加。叶绿体宽度的增加与其中大量淀粉粒的积累有关。在叶绿体中由于光合作用的增强,使其产生的淀粉速率大大超过淀粉向外运输的速率,故有大量淀粉积累在叶绿体中(Pritchard et al. 1997; Ramonell et al. 2001; Wang et al. 2004)。此外,我们通过生化测定也进一步证实了在高浓度CO₂下叶绿体中淀粉粒大小和数量增加的事实。不过Robertson和Leech (1995)的报道却认为,在小麦叶片中叶绿体的形状并未受到高浓度CO₂处理的影响。究其原因一方面可能与叶片发育早期叶绿体发育不健全,故光合速率低和光合产物较少有关;另一方面也可能与幼嫩叶片处在发育早期阶段,叶片生长迅速,大部分光合产物均被用来供给其生长有关。从叶绿体的超微结构看,在高浓度CO₂处理下拟南芥叶绿体的基粒内囊体数目、基粒内囊体膜片层数量均有下降。Kutik 等(1995)和Griffin等(2001)也有这方面的类似报道。Griffin(2001)等认为,在叶绿体光合作用增加情况下,基粒内囊体数量减少是对高浓度CO₂胁迫所采取的一种适应机制,但他们并未指出基粒内囊体膜片层数量为何下降原因。从图3-2所示,我们可以推断叶绿体中基粒内囊体膜片层数量比对照明显下降,很可能是基粒内囊体膜被大量积累的淀粉粒挤压所致。

3.4.3 不同浓度CO₂与叶片碳水化合物含量变化的关系

以往大量研究表明,高浓度CO₂处理能够增加叶片中淀粉和可溶性糖的含量,其主要原因是由于同化速率大于碳水化合物消耗速率所致(Delucia et al. 1985; Long and Drake 1992; Moore et al. 1997)。Long和Drake(1992)曾报道,各种植物在高浓度CO₂处理下,叶片中的可溶性糖和淀粉含量比对照平均分别增加50%和160%。又如生长在720 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂下的柑桔,其叶片中可溶性糖含量增加50%,而淀粉竟然是对照的4倍多(Vu et al. 2002)。同样在对高浓度CO₂处理烟草、金鱼草以及欧芹的研究中,Moore (1997)等人发现,这三种植物叶片中非结构性的总碳水化合物含量均比对照分别增加108%、69%和62%。在我们的实验中也发现,拟南芥经700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ 处理后,其叶片中的碳水化合物含量比370 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ 处理高出76.2%。尽管我们的实验结果与上述报道较为一致,但值得注意的是Cheng(1998)等的研究与上述结果竟有很大的出入,如他们同样采用拟

南芥为实验材料, 在CO₂浓度为1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ 下, 叶片中总的非结构性碳水化合物含量比在370 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ 处理下要高2倍。我们认为, 这种显著差异可能与各自使用CO₂浓度的不同所至。同时, 也由此证实, 拟南芥叶片的CO₂饱和点远高于700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, 至少是1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ 以上。如果采用超过1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂处理, 其叶片中碳水化合物的含量可能增加的幅度更高。另外, 关于在高浓度CO₂处理下对叶片纤维素含量的影响报道很少, 仅Staudt(2001)等人发现, 高能浓度CO₂处理后能显著增加*Quercus ilex*叶片中纤维素含量。在本研究, 我们也发现700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂处理增加叶片纤维素含量。在高浓度CO₂处理下, 叶片纤维素含量增加的主要原因: 第一, 在细胞壁合成过程中获得更多比例的光合产物; 第二, 与纤维素合成相关的一些酶类活性在细胞壁合成过程中大幅度增加 (Gibeaut et al. 2001)。

3.4.4 FTIR显微光谱

应用FTIR显微光谱检测细胞壁结构成分, 现已被认为是一种快捷、非破坏性以及可靠的重要实验技术(Chen et al. 1998; Szyjanowicz et al. 2004; Hao et al. 2005)。另外, 通过FTIR光谱分析结果表明, 在高浓度CO₂处理下拟南芥叶片细胞壁中纤维素含量增加, 这一检测结果与上述纤维素生化测定的结果完全一致。由此表明, 采用FTIR这项技术可快速、简便的研究高浓度CO₂对叶片细胞壁成分的影响。

3.4.5 不同浓度CO₂与叶片激素水平变化的关系

高浓度CO₂处理显著增加叶片中IAA、GA₃、以及ZR水平, 但却降低了植物体内ABA含量(表3-3)。IAA、GA₃、与ZR能够促进细胞分裂、生长与伸长, 进而能够促进植物生长与发育(Yong et al. 2000), 而ABA被认为能够抑制叶片生长(Zhang and Davies 1990)。植物在高浓度CO₂处理条件下, 生长速率比对照加快, 同时促进植物生长发育的激素类物质也显著增加, 而抑制叶片生长的激素ABA含量却有所上升。因此, 我们认为在高浓度CO₂生长条件下, 植物体内促进生长发育的激素类物质水平的提高以及抑制叶片生长激素含量降低是植物速率加快的一个重要因素。事实上, 近年来Li (2002)等也曾发现, 在高浓度CO₂处理条件下, 兰花相对生长速率比对照高25%, 同时植株体内IAA, GA, ZR等水平也显著高于对照。同样, Yong(2000)等发现在高浓度CO₂和低氮营养条件下, 叶片碳水

化合物含量增加，同时也伴随着细胞分裂素水平升高；然后，他们还发现当棉花在氮素供应充足的情况下，叶片中细胞分裂素含量却未发生变化。因此，在高浓度CO₂处理下，植物激素含量变化可能还受到营养水平的影响。但植物在高浓度CO₂处理下为何引起植物激素水平的变化？究其机理尚不清楚，还有待于进一步的研究。

3.4.6 不同浓度CO₂与叶片元素含量

目前已经有大量研究认为，高浓度CO₂将引起植物体内多种元素含量的降低。(Norby et al. 1986; Kuehny et al. 1991; Cao and Tibbitts 1997; Roberntz and Linder 1999; Luomala et al. 2005; Riikonen et al. 2005)。在本研究中，我们也观察到在700 μ mol mol⁻¹ CO₂浓度下，将导致拟南芥叶片元素含量的下降。由此我们推断其产生的原因：第一、在高浓度CO₂条件下，叶片中淀粉、可溶性糖等碳水化合物含量显著增加，这样就起到稀释作用，从而使得叶片中各种元素含量下降。该推论在以往的一些报道中也得到证实(Kuehny et al. 1991; Cao and Tibbitts 1997; Riikonen et al. 2005)；第二、我们发现，在高浓度CO₂条件下，叶片气孔密度降低，气孔导度下降，最终导致植株蒸腾速率下降，而植物叶片等地上部分的很多元素都是通过蒸腾流从根部运输上来的，当蒸腾速率下降后，运输到地上部的矿物质也会相应减少，从而引起叶片中多种元素的含量比对照少，这一点同样也被Norby 等 (1986)和Hetherington和Woodward(2003)的报道所证实。因此，我们认为拟南芥在高浓度CO₂处理下，其叶片元素含量下降主要归于淀粉等碳水化合物的稀释作用，以及蒸腾速率降低引起矿物质元素吸收减少等因素。

总之，通过采用透射电镜、FTIR、ELISA、原子吸收光谱、光合测定系统和生化测定等多种实验技术和方法，系统而深入地研究了拟南芥经高浓度CO₂处理后对其叶片结构、生理、生化等特性的影响。主要结论为：（1）叶绿体中大量淀粉粒积累是引起叶绿体超微结构的变化一个原因；（2）激素类水平的增加促进了植物生长发育的速度；（3）淀粉的稀释作用和蒸腾流降低是叶片多种营养元素含量下降的主要原因。

第四章 结 论

本研究以模式植物拟南芥作为实验材料,采用370和700ppm两种浓度CO₂对其进行连续8个世代的处理研究,比较各个世代的多项生殖特性指标。此外,也通过透射电子显微镜、酶联免疫方法(ELISA)、原子吸收仪、傅里叶显微红外光谱分析(FTIR)等各种技术或方法,研究高浓度CO₂对拟南芥叶片结构、生理与生化影响。所得主要结果与结论如下:

(1) 在每一个世代中,与 370ppm CO₂相比较,700ppm CO₂处理显著促进了拟南芥开花,缩短生长周期,增加花、角果及种子等生殖的产量,降低种子 N 含量,提高种子 C/N 比、种子千粒重以及生殖生物量所占总生物量的比例等,而对种子萌发率、角果所含种子数目以及角果长度则无显著影响。

(2) 通过对相同 CO₂ 浓度处理条件下,不同世代之间的研究结果比较发现,不同世代之间相关的生殖生物学指标并无显著差异。由此认为,高浓度 CO₂ 处理显著提高植物的生殖生物量,促进植物开花,缩短生殖周期等,但是高浓度 CO₂ 处理对植物所引起的效应在多个世代以内并不能够传递给后代,所以在多个有性生殖世代内,高浓度 CO₂ 处理对植物生长、生殖没有驯化作用。

(3) 在高浓度CO₂处理下,拟南芥叶片中叶绿体超微结构的变化,可能主要是由于叶绿体中淀粉数量和体积大小显著增加而引起。

(4) 在高浓度CO₂处理下,由于拟南芥叶片内与促进细胞分裂与伸长的激素(如 IAA、GA、ZR、DHZR和iPA)含量显著增加,从而对拟南芥植株生长发育速率的提高起了重要的作用。

(5) 拟南芥生长在高浓度 CO₂ 条件下,其叶片中各种矿质元素含量(如 N、P、K、Ca 和 Mg)均显著降低,究其原因可能是,第一由于叶片中碳水化合物含量的显著增加而对矿物质元素具有稀释作用;第二由于蒸腾速率下降,引起矿质元素从根部随着蒸腾流运输到地上部分的含量相应减少。

参 考 文 献

- Ainsworth E A, Davey PA, Bernacchi C J. *et al.* 2002. A meta-analysis of elevated [CO₂] effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. *Global Change Biol.*, 8: 695-709
- Allen LH, Boote KJ. 2000. Crop ecosystem responses to climatic change: soybean. In: Reddy K.R., Hodges H.F., eds. *Climate change and global crop productivity*. New York: CABI Publishing: 133-160
- Aloni B, Peet M, Pharr M. *et al.* 2001. The effect of high temperature and high atmospheric CO₂ on carbohydrate changes in bell pepper (*Capsicum annuum*) pollen in relation to its germination. *Physiol. Plantarum*, 121: 505-512
- Andalo C, Goldringer I, Godelle B. 2001. Inter- and intragenotypic competition under elevated carbon dioxide in *Arabidopsis thaliana*. *Ecology*, 82: 157-164
- Atkinson C J, Taylor JM, Wilkins D. *et al.* 1997. Effects of elevated CO₂ on chloroplast components, gas exchange and growth of oak and cherry. *Tree Physiol.*, 17: 319-325
- Bagarozzi D A, Potempa J, Travis J. 1998. Purification and characterization of an arginine-specific peptidase from ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen. *Amer. J. Res. Cell Mole. Biol.*, 18: 363-369
- Barbara T, Christian K, Jurg S. 2003. Seed production and seed quality in a calcareous grassland in elevated CO₂. *Global Change Biol.*, 9: 873-884
- Baskin C C, Baskin J M. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego. 1998
- Beerling D J, McElwain J C, Osborne CP. 1998. Stomatal responses of the 'living fossil' *Ginkgo biloba* L. to changes in atmospheric CO₂ concentrations. *J. Expe. Bot.*, 49: 1603-1607
- Blumenthal C, Rawson H M, McKenzie E. *et al.* 1996. Changes in wheat grain quality due to doubling the level of atmospheric CO₂. *Cereal Chem.*, 73: 762-766
- Bockers M, Capková V, Tichá I. *et al.* 1997. Growth at high CO₂ affects the chloroplast number but not the photosynthetic efficiency of photoautotrophic *Marchantia polymorpha* culture cells. *Plant Cell, Tiss. Org. Cutl.*, 48: 103-110
- Boyes D C, Zayed A M, Ascenzi R *et al.* 2001. Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of *Arabidopsis*: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *Plant Cell*, 13: 1499-1510.
- Cao W X, Tibbitts T W. 1997. Relationships of starch concentration with species leaf weight and mineral concentrations in potato leaves under varied CO₂ and temperature. *Acta Bot. Sini.*, 39: 1118-1125
- Ceulemans R, Praet L V, Jiang X N. 1995. Effects of CO₂ enrichment, leaf position and clone on stomatal index and epidermal cell density in poplar (*Populus*). *New Phytol.*, 131: 99-107
- Chen K, Hu GQ, Lenz F. 1997. Effects of CO₂ concentration on strawberry. VI. Fruit yield and quality. *J. Appl. Bot.*, 71: 195-200

- Chen L M, Carpita N C, Reiter W D, *et al.* 1998. A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra. *Plant J.*, 16: 385-392
- Cheng S H, Moore B D, Seemann J R. 1998. Effects of short- and long-term elevated CO₂ on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.*, 116: 715-723
- Costa W A J M D, Weerakoon W M W. *et al.* 2003. Abeywardena R.M.I. Response of growth and yield of rice (*Oryza sativa*) to Elevated atmospheric carbon dioxide in the subhumid zone of Sri Lanka. *J. Agro. Crop Sci.*, 189: 83-95
- Cotrufo M F, Ineson P, Scott A. *et al.* 1998. Elevated CO₂ reduces the nitrogen concentration of plant tissues. *Global Change Biol.*, 13: 43-54
- Curtis P S, Snow A A, Miller A S. 1994. Genotype-specific effects of elevated CO₂ on fecundity in wild radish *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia*, 97: 101-105
- Delucia E H, Sasek T W, Strain B R. *et al.* 1985. Photosynthetic inhibition after long-term exposure to elevated levels of atmospheric carbon dioxide. *Photosynth. Res.*, 7: 175-184
- Ebell L F. 1969. Variation in total soluble sugars of conifer tissues with method of analysis. *Phytochemistry*, 8: 227-233
- Edwards G R, Clark H, Newton P C D. 2001. The effects of elevated CO₂ on seed production and seedling recruitment in a sheep-grazed pasture. *Oecologia*, 127: 383-394
- Ellis R H, Craufurd P Q, Summerfield R J. *et al.* 1995. Linear relations between carbon dioxide concentration and rate of development toward flowering in sorghum, cowpea and soybean. *Ann.. Bot.*, 75: 193-198
- Endo M, Ikushima I. 1997. Effects of CO₂ enrichment on yields and preservability of cut flowers in *Phalaenopsis*. *J. Jpn. Society of Horticultural Science*, 66: 169-174
- Evans L T. 1993. Crop evolution, adaptation and yield. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Ferris R, Sabatti M, Miglietta F. *et al.* 2001. Leaf area is stimulated in *Populus* by free air CO₂ enrichment (POPFACE), through increased cell expansion and production. *Plant Cell Environ.*, 24: 305-315
- Garbutt K, Bazzaz FA. 1984. The effects of elevated CO₂ on plants. III. Flower, fruit and seed production and abortion. *New Phytol.*, 98: 433-446
- Gibeaut D.M., Cramer G.R., Seemann J.R. Growth, cell walls, and UDP-Glc dehydrogenase activity of *Arabidopsis* grown in elevated carbon dioxide. *J. Plant Physiol.*, 2001, 158: 569-576
- Griffin K L, Anderson O R, Gastrich M D. *et al.* 2001. Plant growth in elevated CO₂ alters mitochondrial number and chloroplast fine structure. *Proc..Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 98: 2473-2478
- Gutterman Y. 2000. Maternal effects on seeds during development. In: Fenner M, ed. *Seeds, the ecology of regeneration in plant communities*. New York, NY, USA: CABI Publishing: 59-84
- Hall A E, Ziska L H. 2000. Breeding strategies for the 21st century. In: Reddy K.R., Hodges H.F.,

- eds. Climate change and global crop productivity. New York, NY, USA: CABI Publishing, 407: 436
- Hao H Q, Li Y Q, Hu YX. *et al.* 2005. Inhibition of RNA and protein synthesis in pollen tube development of *Pinus bungeana* by actinomycin D and cycloheximide. *New Phytol.*, 165: 721-730
- He J S, Bazzaz F A. 2003. Density-dependent responses of reproductive allocation to elevated atmospheric CO₂ in *Phytolacca Americana*. *New Phytol.*, 157: 229-239
- He J S, Flynn D F B, Wolfe-Bellin K, *et al.* 2005. CO₂ and nitrogen, but not population density, alter the size and C/N ratio of *Phytolacca americana* seeds. *Funct. Ecol.*, 19: 437-444
- Hetherington A M, Woodward FI. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424: 901-908
- Hicklenton P R, Jolliffe P A. 1980. Carbon dioxide and flowering in *Pharbitis nil* Choisy. *Plant Physiol.*, 66: 13-17
- Horie T, Baker J T, Nakagawa H. *et al.* 2000. Crop ecosystem responses to climate change: ice. In Reddy KR, Hodges HF, eds. Climate change and global crop productivity. New York, NY, USA: CABI Publishing: 81-106
- Hussain M, Kubiske M E, Connor K F. 2001. Germination of CO₂-enriched *Pinus taeda* L. seeds and subsequent seedling growth responses to CO₂ enrichment. *Funct. Ecol.*, 15: 344-350
- Huxman T E, Hamerlynck E P, Smith S D. 1999. Reproductive allocation and seed production in *Bromus madritensis* ssp. *rubens* at elevated atmospheric CO₂. *Funct. Ecol.*, 13: 769-777
- IPCC In: Houghton J T, Ding Y, Griggs D G. *et al.* 2001 eds. Climate change: the scientific basis. Cambridge: Cambridge University Press.
- Jablonski L M, Wang X Z, Curtis P S. 2002. Plant reproduction under elevated CO₂ conditions: a meta-analysis of reports on 79 crop and wild species. *New Phytol.*, 156: 9-26
- Johannessen M M, Mikkelsen T N, Nersting L G. *et al.* 2005. Effects of increased atmospheric CO₂ on varieties of oat. *Plant Breed.*, 124: 253-256
- Karni L, Aloni B. 2002. Fructokinase and hexokinase from pollen grains of bell pepper (*Capsicum annuum*): possible role in pollen germination under conditions of high temperature and CO₂ enrichment. *Ann. Bot.*, 90: 607-612
- Kimball B A. 1983. Carbon dioxide and agricultural yield: an assemblage and analysis of 430 prior observations. *Agr. J.*, 75: 779-788
- Kimball B A, Morris C F, Pinter P J Jr. *et al.* 2001. Elevated CO₂, drought and soil nitrogen effects on wheat grain quality. *New Phytol.*, 150: 295-303
- Klironomos J N, Allen M F, Rillig M C. *et al.* 2005. Abrupt rise in atmospheric CO₂ overestimates community response in a model plant-soil system. *Nature*, 433: 621-624
- Kuehny J S, Peet M M, Nelson PV. *et al.* 1991. Nutrient dilution by starch in CO₂-enriched chrysanthemum. *J. Expe. Biol.*, 42: 711- 716
- Kutik J, Natr L, DemmersDerks H H. *et al.* 1995. Chloroplast ultrastructure of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivated in normal and elevated CO₂ concentrations with two contrasted

- nitrogen supplies. *J. Expe. Biol.*, 46: 1797-1802
- Ladeau S L, Clark J S. 2001. Rising CO₂ levels and the fecundity of forest trees. *Science*, 292: 95-98
- Lake J C., Hughes L. 1999. Nectar production and floral characteristics of *Tropaeolum majus* L. grown in ambient and elevated carbon dioxide. *Ann. Bot.*, 84: 535-541
- Lawlor D W, Keys A J. 1993. Understanding photosynthetic adaptation to changing climate. In: Fowden L. et al. (eds), *Plant Adaptation to Environmental Stress*. London, Chapman & Hall: 85-106
- Lawson T, Craigon J, Black C R. *et al.* 2002. Impact of elevated CO₂ and O₃ on gas exchange parameters and epidermal characteristics in potato (*Solanum tuberosum* L.). *J. Expe. Biol.*, 53: 737-746
- Leishman M R, Sanbrook K J, Woodfin R M. 1999. The effects of elevated CO₂ and light environment on growth and reproductive performance of four annual species. *New Phytol.*, 144: 455-462
- Lewis J D, Wang X Z, Griffin K L. *et al.* 2003. Age at flowering differentially affects vegetative and reproductive responses of a determinate annual plant to elevated CO₂. *Oecologia*, 135: 194-201
- Li C R, Gan L J, Xia K. *et al.* 2002. Responses of carboxylating enzymes, sucrose metabolizing enzymes and plant hormones in a tropical epiphytic CAM orchid to CO₂ enrichment. *Plant Cell. Environ.*, 25: 369-377
- Lin J X, Jach M E, Ceulemans R. 2001. Stomatal density and needle anatomy of Scots pine (*Pinus sylvestris*) are affected by elevated CO₂. *New Phytol.*, 150: 665 - 674
- Lindroth R L, Osier T L., Barnhill H R A. *et al.* 2002. Effects of genotype and nutrient availability on phytochemistry of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) during leaf senescence. *Biochem. Syst. . Ecol.*, 30: 297-307
- Lloyd D G. 1987. Selection of offspring size at independence and other size-versus-number strategies. *Amer. Natu.*, 129: 800-817
- Long S P, Drake B G P. 1992. photosynthetic CO₂ assimilation and rising atmospheric CO₂ concentrations. In Baker N R, Thomas H, eds, *Crop Photosynthesis: Spatial and Temporal Determinants*, Amsterdam: Elsevier: 69-95
- Luomala E M, Laitinen K, Sutinen S *et al.* 2005. Stomatal density, anatomy and nutrient concentrations of Scots pine needles are affected by elevated CO₂ and temperature. *Plant Cell Environ.*, 28: 733-749
- Manderscheid R, Bender J J, Jäger H J. *et al.* 1995. Effects of season long CO₂ enrichment on cereals. II. Nutrient concentrations and grain quality. *Agri., Ecos. . Environ.*, 54: 175-185
- Masle J. 2000. The effects of elevated CO₂ concentrations on cell division rates, growth patterns, and blade anatomy in young wheat plants are modulated by factors related to leaf position, vernalization, and genotype. *Plant Physiol.*, 122: 1399-1415

- Michael C J, Maureen C M. 2000. Macromolecular biophysics of the plant cell wall: concepts and methodology. *Plant Physiol. and Biochem.*, 38: 1-13
- Miglietta F, Magliulo V, Bindi M. 1998. Free air CO₂ enrichment of potato (*Solanum tuberosum* L.): development, growth and yield. *Global Change Biol.*, 4: 163-172
- Moore B D, Palmquist D E, Seemann J R. 1997. Influence of plant growth at high CO₂ concentrations on leaf content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and intracellular distribution of soluble carbohydrates in tobacco, snapdragon, and parsley. *Plant Physiol.*, 115: 241-248
- Morison J, Lawlor D W. 1999. Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. *Plant Cell Environ.*, 22: 659-682
- Mortensen L M. 1985. Effect of CO₂ enrichment and supplementary light on growth and flowering of poinsettia, *Euphorbia pulcherrima* Will. *Meld Norg Land.*, 64: 1- 8
- Mouille G, Robin S, Lecomte M. *et al.* 2003. Classification and identification of Arabidopsis cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *Plant J.*, 35: 393-404
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15: 473-497
- Murray D R. 1997. Carbon Dioxide and Plant Responses. Taunton, UK: Research Studies Press Ltd.
- Navas M L, Sonie L, Richarte J. *et al.* 1997. The influence of elevated CO₂ on species phenology, growth and reproduction in a Mediterranean old-field community. *Global Change Biol.*, 3: 523-530
- Norby R J, O'Neill E G, Luxmoore R J. 1986. Effects of atmospheric CO₂ enrichment on the growth and mineral nutrition of *Quercus alba* seedlings in nutrient-poor soil. *Plant Physiol.*, 82: 83-89
- Norby R J, Wullschlegel S D, Gunderson C A. *et al.* 1999. Tree responses to rising CO₂ in field experiments: implications for the future forest. *Plant Cell Environ.*, 22: 683-714
- Oomen R J F J, Tzitzikas E N, Bakx E J. *et al.* 2004. Modulation of the cellulose content of tuber cell walls by antisense expression of different potato (*Solanum tuberosum* L.) Cesa clones. *Phytochemistry*, 65: 535-546
- Osborne J L, Awmack C S, Clark S J. 1997. Nectar and flower production in *Vicia faba* L. (field bean) at ambient and elevated carbon dioxide. *Apidologie*, 28: 43-55
- Poole I, Lawson T, Weyers J D B. *et al.* 2000. Effect of elevated CO₂ on the stomatal distribution and leaf physiology of *Alnus glutinosa*. *New Phytol.*, 145: 511-521
- Poorter H. 1993. Interspecific variation in the growth response of plants to an elevated ambient CO₂ concentration. *Vegetatio*, 104: 77-97
- Prasad P V V, Boote K L, Hartwell A. *et al.* 2002. Effects of elevated temperature and carbon dioxide on seed-set and yield kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Global change boil.*, 8: 710-721

- Pritchard S G, Peterson C M, Prior S A. *et al.* 1997. Elevated atmospheric CO₂ differentially affects needle chloroplast ultrastructure and phloem anatomy in *Pinus palustris*: interactions with soil resource availability. *Plant Cell Environ.*, 20: 461-471
- Ramonell K M, Kuang A, Porterfield D M. *et al.* 2001. Influence of atmospheric oxygen on leaf structure and starch deposition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.*, 24: 419-428
- Reekie E G, Bazzaz F A. 1991. Phenology and growth in four annual species grown in ambient and elevated CO₂. *Can. J. Bot.*, 69: 2475-2481
- Reekie J Y C, Hicklenton P R, Reekie E G. 1994. Effects of elevated CO₂ on time of flowering in four short-day and four long-day species. *Can. J. Bot.*, 72: 533-538
- Reinert R A, Eason G, Barton J. 1997. Growth and fruiting of tomato as influenced by elevated carbon dioxide and ozone. *New Phytol.*, 137: 411-420
- Riikonen J, Holopainen T, Oksanen E. 2005. Leaf photosynthetic characteristics of silver birch during three years of exposure to elevated CO₂ and O₃ in the field. *Tree Physiol.*, 25: 549-560
- Roberntz P, Linder S. 1999. Effects of long term CO₂ enrichment and nutrient availability in Norway spruce. II. Foliarchemistry. *Trees*, 14: 17-27
- Robertson E J, Leech R M. 1995. Significant changes in cell and chloroplast development in young wheat leaves (*Triticum aestivum* cv hereward) grown in elevated CO₂. *Plant physiol.*, 107: 63-71
- Rogers G S, Gras P W, Batey I L. *et al.* 1998. The influence of atmospheric CO₂ concentration on the protein, starch, and mixing properties of wheat flour. *Aust. J. Plant Physiol.*, 25: 387-393
- Rusterholz H P, Erhardt A. 1998. Effects of elevated CO₂ on flowering phenology and nectar production of nectar plants important for butterflies of calcareous grasslands. *Oecologia*, 113: 341-349
- Seneweera S P, Conroy J P. 1997. Growth, grain yield and quality of rice (*Oryza sativa* L.) in response to elevated CO₂ and phosphorus. *Soil Sci. Plant Nutri.*, 43: 1131-1136
- Collins S, Bell G. 2004. Phenotypic consequences of 1,000 generations of selection at elevated CO₂ in a green alga. *Nature*, 431: 566-569
- Smith C C, Fretwell S D. 1974. The optimal balance between the size and number of offspring. *Amer. Natu.*, 136: 154-166
- Staudt M, Joffre R, Rambal S. *et al.* 2001. Effect of elevated CO₂ on monoterpene emission of young *Quercus ilex* trees and its relation to structural and ecophysiological parameters. *Tree Physiol.*, 21: 437-445
- Steinger T, Gall R, Schmid B. 2000. Maternal and direct effects of elevated CO₂ on seed provisioning, germination and seedling growth in *Bromus erectus*. *Oecologia*, 12: 475-480
- Stiling P, Moon D, Hymus G. *et al.* 2004. Differential effects of elevated CO₂ on acorn density, weight, germination, and predation among three oak species in a scrub forest. *Global Change Biol.*, 10: 228-232
- Szyjanowicz P M, Mckinnon L, Taylor N G. *et al.* 2004. The irregular xylem 2 mutant is an allele of *korrigan* that affects the secondary cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 37: 730-740

- Taylor G, Tricker P J, Zhang F Z. *et al.* 2003. Spatial and temporal effects of free-air CO₂ enrichment (POPFACE) on leaf growth, cell expansion, and cell production in a closed canopy of poplar. *Plant Physiol.*, 131: 177-185
- Thurig B, Konner C, Stocklin J. 2003. Seed production and seed quality in a calcareous grassland in elevated CO₂. *Global Change Biol.*, 9: 873-884
- Toshihiko K, Kouki H, Tadaki H. 2003. Reproductive allocation of an annual, *Xanthium canadense*, at an elevated carbon dioxide concentration. *Oecologia*, 137: 1-9
- Updegraff D M. 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal .Biochem.*, 32: 420-424
- Upreti D C, Dwivedi N, Jain V. *et al.* 2003. Responses of rice cultivars to the elevated CO₂. *Biol. Plantarum*, 46: 35 -39
- Van Der Kooij T A W, De KoK L J, Stulen I. 1999. Biomass production and carbohydrate content of *Arabidopsis thaliana* at atmospheric CO₂ concentrations from 390 to 1680 ppm. *Plant Biol.*, 1: 482-486
- Vu J C V, Newman Y C, Allen L H Jr. *et al.* 2002. Photosynthetic acclimation of young sweet orange trees to elevated growth CO₂ and temperature. *Journal of Plant Physiol.*, 159: 147-157
- Wagner J, Lscher A, Hillebrand C. *et al.* 2001. Sexual reproduction of *Lolium perenne* L. and *Trifolium repens* L. under free air CO₂ enrichment (FACE) at two levels of nitrogen application. *Plant Cell Environ.*, 24: 957-965
- Wand S J E, Midgley G F, Jones M H. *et al.* 1999. Responses of wild C₄ and C₃ grass (*Poaceae*) species to elevated atmospheric CO₂ concentration: a meta-analytic tests of current theories and perceptions. *Global change Biol.*, 5: 723-741
- Wang X Z, Anderson O R, Griffin K L. 2004. Chloroplast numbers, mitochondrion numbers and carbon assimilation physiology of *Nicotiana sylvestris* as affected by CO₂ concentration. *Environ. Expe. Bot.*, 51: 21-31
- Wang X Z, Curtis P S. 2001. Gender-specific variation of *Populus tremuloides* in its physiological and growth responses to elevated CO₂. *New Phytol.*, 150: 675-684
- Wang X Z, Griffin KL. 2003. Sex-specific physiological and growth responses to elevated atmospheric CO₂ in *Silene latifolia* Poir. *Global Change Biol.*, 9: 612-618
- Ward J K, Kelly J K. 2004. Scaling up evolutionary responses to elevated CO₂: lessons from *Arabidopsis*. *Ecol. Lett.*, 7: 427-440
- Ward J K, Strain B R. 1997. Effects of low and elevated CO₂ partial pressure on growth and reproduction of *Arabidopsis thaliana* from different elevations. *Plant Cell Environ.*, 20: 254-260
- Watling J R, Press M C, Quick W P. 2000. Elevated CO₂ induces biochemical and ultrastructural changes in leaves of the C₄ cereal sorghum. *Plant Physiol.*, 123: 1143-1152
- Wesselingh R A, Renate A, Klinkhamer P G L. *et al.* 1997. Threshold size for flowering in different habitats: effects of size-dependent growth and survival. *Ecology*, 78: 2118-132
- Woodward F I. 2002. Potential impacts of global elevated CO₂ concentrations on plants. *Curr.*

- Opin. Plant Biol.*, 5: 207-211
- Woodward F I. 1987. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ concentration from pre-industrial levels. *Nature*, 327: 617-618
- Woodward F I., Kelly C K. 1995. The influence of CO₂ concentration on stomatal density: *New Phytol.*, 131: 311-327
- Wullschlegel S D, Gunderson C A, Hanson P J. *et al.* 2002. Sensitivity of stomatal and canopy conductance to elevated CO₂ concentration- interacting variables and perspectives of scale. *New Phytol.*, 153: 485-496
- Yong J W H, Wong S C, Letham D S. *et al.* 2000. Effects of elevated CO₂ and nitrogen nutrition on cytokinins in the xylem sap and leaves of cotton. *Plant Physiol.*, 124: 769-779
- Zhang J, Davies W J. 1990. Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil-water status can account for changes in leaf conductance and growth. *Plant Cell Environ.*, 13: 277-285
- Ziska L H, Caulfield F A. 2000. Rising CO₂ and pollen production of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*), a known allergy-inducing species: implications for public health. *Australian J. Plant Physiol.*, 27: 893-898
- Ziska L H, Morris C F, Goins E W. 2004. Quantitative and qualitative evaluation of selected wheat varieties released since 1903 to increasing atmospheric carbon dioxide: can yield sensitivity to carbon dioxide be a factor in wheat performance? *Global Change Biol.*, 10: 1810-1819
- Zuo B Y, Zhang Q, Jiang G Z. *et al.* 2002. Effects of doubled- CO₂ concentration on ultrastructure, supramolecular architecture and spectral characteristics of chloroplast from wheat. *Acta Bot. Sin.*, 44: 908-912
- 方精云等. 2000. 全球生态学—气候变化与生态响应. 北京: 高等教育出版社.
- 蒋高明, 韩兴国, 林光辉. 1997. 大气 CO₂ 浓度升高对植物的直接影响—国外十余年来模拟实验研究之主要手段及基本结论. *植物生态学报*, 21(3): 489-502
- 牛书丽, 蒋高明. 2003. 豆科固氮植物对 CO₂ 加富的生理响应. *植物生态学报*, 27: 844-850
- 滕年军, 陈彤, 林金星. 2006. 植物有性生殖对大气 CO₂ 浓度变化响应的研究进展. *植物生态学报*, (已经接受)
- 魏胜林, 刘业好, 屈海泳, 等. 2001. 高 CO₂ 浓度对百合某些生理生化物质的影响. *植物生态学报*, 25(4): 410-413
- 张大勇. 2004. 植物生活史进化与繁殖生殖生态学. 北京: 科学出版社
- 张效平. 光强和增施 CO₂ 对唐菖蒲生长开花的影响. *园艺学报*, 1995, 22(2): 73-76
- 张新时, 高琼, 杨莫安, 等. 1997. 中国东北样带的梯度分析及其预测. *植物学报*, 39(1): 785-799

致 谢

值此论文完成之际,心中涌动最多的就是感激之情,回顾这三年的学习、实验和生活经历,感觉有很多心理话要说,很多指点、鼓励、关心与帮助过我的亲人、老师、朋友和同学需要我真切地去感谢!

首先,特别感谢我的导师林金星研究员,感谢他三年来对我在学习和科研上的指导与鼓励、生活上的关心与帮助。先生严谨的工作作风和治学态度、对科研的忘我精神、前瞻的学术理念和博学的专业知识,以及严于律己、宽以待人的为人之道深深影响并感染了我。几年来先生给予的指导和帮助,我将永生难忘。在自己未来的人生道路上,先生这些优秀的品质将永远激励我不断向上!此外,特别感谢师母林月惠老师三年来对我在生活上的关心。

同时还要非常感谢母锡金研究员和胡玉熹研究员三年来对我在学术上的精心指导和生活上的关心。两位先生严谨的工作作风、谦逊的学术品格让我肃然起敬。感谢李元女士在拟南芥培养及数据记录方面给予的帮助。感谢北大贺金生副教授在我实验过程中给予的指导与帮助。感谢生态环境所陆海明博士在植物元素方面测定给予的帮助。感谢中国农大王保民老师在植物激素测定方面给予的帮助。感谢北大苏都莫日根教授、张泉老师、胡宇飞博士在电子显微镜技术上给予的指点与帮助。感谢本所生态中心万师强研究员和牛书丽博士在光合测定方面给予的帮助。感谢本中心田世平研究员及徐勇老师提供本实验场所。感谢研究生处张惠苗、吴海燕、赵剑锋和张文娟等老师在我学习和工作中给予的支持和帮助。感谢本中心实验室苑成和陈凌凤老师在实验仪器应用上提供的诸多方便。

感谢曾经或目前在本实验室工作、学习过的黎晓峰、陈坤明、吕洪飞、李景原等教授,房克凤、张凌云、郝怀庆、吴小琴、王钦丽、孔令安、张海燕等博士,陈彤、陈艳梅、盛仙永、王晓华、李晓娟、王玉花、王健、林青青、郑茂钟、刘鹏、汪玉清、张春雨、王锋、田翠婷、汪小雄、唐江华、张亮、张春洋、刘永康、侯桂玲等同学。很荣幸在人生的驿站中能够与大家相逢、相识,非常感谢大家在日常生活与实验中给予我的关照与帮助。

感谢硕士导师陈发棣教授,大学老师金飏老师,蒋甲福师兄,张进中和王水顺大哥,朱毅、李博强、产助龙、秦国政、刘锋、蔡耀兵、杨国庆、钱坤、陆美芳等同学在我学习和生活上给予的指点、关心、鼓励与帮助。

最后,特别感谢我的父母及家人多年以来一直对我在学业上的鼓励和生活上的关爱,他们的理解是我的精神支柱,他们的期望是我前进的动力!

滕 年 军

2006 年 4 月 28 日于中科院植物所

New Phytologist 评委们对第三章内容整理成的英文稿件审稿意见

Dear Dr. Lin,

The paper you submitted to New Phytologist, "Elevated CO₂ induces physiological, biochemical, and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*" (NPH-MS-2006-04177) has been read by the three reviewers whose comments are below. The reviewers found your work to be careful and thorough and your presentation to be clear and well written. They were especially supportive of your detailed analyses of chloroplast and cell wall components. The reviewers recommend that your paper can be published in New Phytologist after you have made some revisions, and I concur with their advice...

Thank you for submitting your work to New Phytologist. I will be looking forward to your revision.

Sincerely,
Richard Norby
Environment Section Editor

Referee 1 Comments:

This is a detailed set of experiments to compare *Arabidopsis thaliana* plants propagated at ambient and elevated atmospheric CO₂ concentrations. The experiments appear to have been carefully carried out, and well replicated. This represents a useful data set of biochemical measurements to compare with ongoing molecular studies in this species.....

Referee 2 Comments:

Teng et al is a detailed and thorough piece of research that looks into the various levels of responses of *Arabidopsis* to elevated CO₂. In particular, I would like to credit the authors for making a detailed and careful study, especially with respect to the chloroplasts and cell walls responding to CO₂ enrichment. On the whole, the paper is well-written, length of the manuscript is acceptable, general scientific techniques are appropriately applied, and the references cited are also relevant.....

Referee 3 Comments:

I have reviewed the manuscript of elevated CO₂ induces physiological, biochemical, and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. Although this manuscript contains several conclusions that have been shown many times before for elevated CO₂ response (stomatal conductance, stomatal density, transpiration, soluble sugars, etc.), there are novel aspects of this manuscript that are important to add to the literature. Therefore, I recommend publication of this manuscript in New Phytologist, if the authors can adequately address the weaknesses listed below.

Strengths

1. This manuscript is well written and I commend the authors on doing a very good job in that respect. 2. This manuscript has some novel aspects with regard to elevated CO₂ plant research. First, this study is one of only a few that utilizes the *Arabidopsis* model system, and certainly future work could incorporate the powerful tools that can be applied to this system. 3. In addition, this manuscript is one of only a few to measure the effects of elevated CO₂ on chloroplast number (and size), thylakoid structure, starch grain number and size, and hormone levels. It may be the only manuscript that includes measures of cellulose and pectin within cell walls as influenced by elevated CO₂.....

- Accept as Submitted -

To: linjx@ibcas.ac.cn
From: rjn@ornl.gov
Date: 05 05 2006
CC: rjn@ornl.gov, newphytol@lancaster.ac.uk

Subject: New Phytologist manuscript NPH-MS-2006-04177.R1

Dear Dr. Lin,

Thank you for making the revisions to your paper for New Phytologist, "Elevated CO₂ induces physiological, biochemical, and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*" (NPH-MS-2006-04177). You have addressed all of the reviewers' concerns, and **I am pleased to inform you that your paper is now accepted for publication in New Phytologist.** The central editorial office will be in contact with you soon.

Thank you for submitting your work to New Phytologist. I will look forward to seeing your paper in the journal.

Sincerely,
Richard Norby
Environment Section Editor

Manuscript Central™ v1.8 (patent pending). Copyright © ScholarOne, Inc., 2006. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. Terms and Conditions of Use
[ScholarOne Privacy Policy](#)

FLORA

Editors:

**Plant Morphology, Distribution
and Functional Ecology**

Editorial office: Prof. Dr. Rainer Lösch

Abt. Geobotanik, Universitätsstr. 1 / 26.13

D-40 225 Düsseldorf

Tel.: +49/(0)211/811 4878 Fax: +49/(0)211/811 3335

e-mail: loesch@uni-duesseldorf.de

**Prof. Jinxing Lin
Institut of Botany,
Chinese Acad. Sci.
Beijing 100093,
China**

linjx@ibcas.ac.cn

**Prof. Dr. Eckehart J. Jäger
Inst. f. Geobotanik und Bot. Garten
Neurwerk 21
D-06 108 Halle (Saale)
Tel.: ++49/(0)345/552 6210
Fax: ++49/(0)345/552 7094
e-mail: jaeger@botanik.uni-halle.de**

**Prof. Dr. Drs. h.c. Otto L. Lange
J.-v.-Sachs-Inst. f. Biowissensch., Bot. II
Julius-von-Sachs-Platz 3
D-97 082 Würzburg
Tel.: ++49/(0)931/888 62 05
Fax: ++49/(0)931/888 62 35
ollange@botanik.uni-wuerzburg.de**

Düsseldorf, 7 March 2006

Confirmation of acceptance

Dear Dr. Lin,

Herewith is confirmed that the paper

Abnormalities in pistil development result in low seed set in *Leymus chinensis*

Nianjun Teng, Tong Chen, Biao Jin, Xiaoqin Wu, Zehao Huang, Xiaoguan Li, Yuhua Wang, Xijin Mu, Jinxing Lin

is accepted for publication in "Flora". Formal date of acceptance is 7 March 2006.

It is scheduled to appear printed in *Flora* vol. 201, issue 6 (September/October 2006)

signed:

Prof. Dr. Rainer Lösch, editor-in-chief

[transmitted as e-mail attachment]



Microsporogenesis and pollen development in *Leymus chinensis* with emphasis on dynamic changes in callose deposition

Nianjun Teng^{a,b}, Zehao Huang^a, Xijin Mu^a, Biao Jin^c, Yuxi Hu^a, Jinxing Lin^{a,*}

^aKey Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 100093 Beijing, China

^bGraduate School of the Chinese Academy of Sciences, China

^cDepartment of Horticulture, Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Received 16 September 2004; accepted 23 December 2004

Abstract

Leymus chinensis is an economically and ecologically important grass that exhibits low seed production. To better understand the causes of its low sexual reproductivity, the microsporogenesis and pollen development of this species were investigated, with emphasis on dynamic changes in callose deposition. A variety of histochemical stains were employed, including Heidenhain's hematoxylin, decolorized aniline blue, DAPI, and acetocarmine, along with a temporary mount method. Microsporogenesis and pollen development generally took place from June 12 to 26. The meiosis of microspore mother cells (MMCs) was of the successive type and the tetrad was isobilateral in shape. Mature pollen grains comprised two sperms and a vegetative nucleus. Callose initially appeared in the center of the anther locule at the premeiotic phase, and then gradually and unevenly deposited around the MMC before the commencement of meiosis. At the onset of meiosis, the accumulation of callose enclosing the MMC peaked, accompanied by the disappearance of callose in the center of the locule. At the dyad and tetrad stages, the dyads and tetrads were surrounded by callose wall and the microspores in the tetrads were isolated by a crossed cell plate composed of callose. Microspores just released from tetrads were still enclosed in callose wall, and then callose gradually disappeared in the pollen wall. Ultimately, callose almost completely disappeared from the walls of mature pollen grains. In the large numbers of sections observed, most of the cases of meiosis of the MMCs, pollen development, and callose dynamics were normal, with only a few abnormalities observed. The results suggest that microsporogenesis, male gametogenesis, and callose dynamics during these processes are generally normal in this species, and that the callose wall plays an important role in the production of functional pollen grains. The small numbers of abnormalities of these processes that occurred likely do not adversely affect the production of viable pollen grains. Therefore, microsporogenesis and pollen development may not be factors in the low seed production of *L. chinensis*.

© 2005 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: *Leymus chinensis*; Callose deposition; Microsporogenesis; Microspore mother cell; Pollen development

Introduction

Leymus chinensis (Gramineae) is a perennial rhizome grass that is widely distributed at the eastern end of the

*Corresponding author. Fax: 0086 10 6290833.

E-mail address: linjx@ibcas.ac.cn (J. Lin).

Eurasian steppe, from North Korea westward to Mongolia and northern China and north-westward to Siberia (Kuo, 1987). This grass is economically and ecologically important because it is rich in vitamins, high-quality protein, minerals, and carbohydrates, grows rapidly, and is highly tolerant of arid conditions (Huang et al., 2002; Koyama, 1987). However, its low sexual reproductivity is a major problem limiting its propagation (Huang et al., 2002).

With the dwindling forage resources in eastern Asia over the past several decades, this species has in recent years received considerable attention (Huang et al., 2004; Song et al., 2003; Wang, 2001; Wang et al., 2003). However, most studies of this species have focused on the effects of ecological factors on its seed production, such as climate (Wang et al., 2003), water use (Song et al., 2003), nutrition uptake (Wang, 2001), and grazing (Wang and Ripley, 1997). Only a few investigations of the sexual reproduction of this species have been reported. Wei and Shen (2003) reported the processes of sporogenesis and gametophyte development in *L. chinensis*, but paid little attention to the cellular behavior during microsporogenesis and pollen development. Duan and Fan (1984) noted that the behavior of the chromosomes of most microspore mother cells (MMCs) of this species was abnormal during meiosis, and concluded that these abnormalities during microsporogenesis were the main factors in the low seed set. Pan and Sun (1986) and Mu et al. (1984) found that over 83.5% of the pollen grains were viable and concluded that pollen grain sterility was not responsible for the low seed yield. Thus, the conclusions based solely on morphological observations or cytogenetic methods can be challenged. In our previous study (Huang et al., 2004), we found that pistil receptivity and pollen longevity were two limiting factors for seed production in *L. chinensis*. Nevertheless, the causes of the low reproductivity of this grass are still unclear, mainly because many aspects of the reproductive processes of this species remain unknown.

Callose, a specialized wall material that is composed of β (1–3)-linked glucose polymers, fluoresces brightly when stained with decolorized aniline blue. Callose is synthesized in plants during differentiation processes and contributes to the molecular strategies of morphogenesis during reproduction (Bhatia and Malik, 1996; Peel et al., 1997; Tucker et al., 2001). In most plants, the deposition and degradation of callose during microsporogenesis and gametogenesis are indispensable for the formation of functional pollen grains (Bhatia and Malik, 1996; Johri, 1984; Lu et al., 2003; Worrall et al., 1992), and faulty timing in the deposition or degradation of callose led to male sterility (Izhar and Frankel, 1971; Warmke and Overman, 1972; Worrall et al., 1992). Several studies of callose deposition during male reproduction have been reported (Bhandari and

Khosla, 1995; Gorska-Brylase, 1967; Li et al., 2001; Lu et al., 2003; Waterkeyn and Bienfait, 1971), while few investigations integrated callose deposition with low seed production. So far, no research of callose deposition during male reproduction in *L. chinensis* has been reported. Therefore, in an effort to determine the causes of low seed yield in this vital grass, we investigated microsporogenesis and pollen development in *L. chinensis*, with particular attention to the changes in callose during these processes.

Materials and methods

Plant material and growth conditions

L. chinensis grows in the south of the Xilin River basin, Inner Mongolia, China (43°32'58"N, 116°40'34"E), at approx. 1265 m a.s.l. This site has a temperate, semi-arid climate with a mean annual precipitation of 350 mm and mean annual temperature of 0.3 °C (Chen, 1988).

Preparation of materials for light microscopy

Flower buds were collected daily from June 8 to 28 and immediately immersed in FAA solution until use. Paraffin sections were stained with Heidenhain's hematoxylin to detect microsporogenesis and with 0.01% (w/v) decolorized aniline blue to investigate callose deposition (Smith and McCully, 1978). Fresh pollen grains just discharged from the anthers were stained with 1 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) in TAN buffer (Tajic et al., 1994) and aniline blue to examine the nucleus and callose, respectively, and with 1% acetocarmine to stain the nucleus. Samples were observed using a microscope with fluorescence excitation for aniline blue and DAPI staining, and with bright-field illumination for other staining (Zeiss Axioskop 40). Digital images were captured using an Axiocam MRC camera.

Results

Microsporogenesis and pollen development

The reproductive processes of microsporogenesis and pollen development were completely observed using paraffin section combined with a temporary mount method. The archesporial stage of microsporogenesis was first observed in buds collected on June 12. Microsporogenesis and pollen development took place from June 12 to 26 (Table 1). Microsporogenesis lasted about 10 days, and pollen development about 5 days.

Table 1. Developmental processes of *Leymus rhinensis* pollen as observed in the southern region of the Xilin river basin, Inner Mongolia, China in 2002

Date	Stage of development
June 12, 2002	Archisporium
June 14, 2002	Microspore mother cell (MMC)
June 16, 2002	Meiosis of MMC
June 17, 2002	Formation of dyads
June 19, 2002	Formation of tetrads
June 21, 2002	Release of microspore from tetrads
June 22, 2002	Pollen with a central nucleus
June 23, 2002	Pollen with a nucleus near the wall
June 25, 2002	Two-celled pollen
June 26, 2002	Three-celled pollen

The anther walls were of the monocotyledonous type and contained four layers: from the outer to the inner layers, epidermis, endothecium, middle layer, and tapetum. The archisporial cells were interconnected and characterized by scattered nuclear materials and dense cytoplasm (Fig. 1). As development proceeded, the archisporium developed into an MMC with a distinct nucleus (Fig. 2). At the commencement of meiosis, the nucleolus of the MMC disappeared and chromatin granules and the chromonema appeared (Fig. 3). After the completion of meiosis I, the MMC gave rise to a dyad (Fig. 4). Soon after the completion of meiosis I, the MMC began to undergo meiosis II to form an isobilateral tetrad with four microspores (Fig. 5). The division of the MMC was successive, and about 80% of the MMCs divided synchronously in the same locule. The young microspores (hereafter called pollen grains) just released from the tetrad were characterized by dense cytoplasm and a conspicuous, centrally located nucleus (Fig. 6). The pollen grain was then displaced along the tapetal cells. At this time, the pollen cytoplasm became vacuolated and the nucleus migrated from the center toward the cell periphery (Fig. 7). Afterwards, the pollen nucleus divided to form a larger vegetative cell and a smaller generative cell. The generative cell stained more darkly with acetocarmine than the vegetative cell (Fig. 8). The generative cell underwent a division to form two sperms with a crescent shape, and the sperms were more strongly stained with acetocarmine than the vegetative nucleus (Fig. 9). Ultimately, the mature pollen comprised two sperms and a vegetative nucleus.

A few abnormalities were observed during the various developmental stages. For example, the nuclear material in the archisporial tissue accidentally degenerated (Fig. 10), and some MMCs disintegrated during meiosis (Fig. 11), accompanied by the breakdown of tapetal cells. In addition, the MMCs in one of the

microsporangia of an anther exhibited strong fluorescence after aniline blue staining, whereas only weak fluorescence was observed in the other microsporangia (Fig. 22).

Dynamics of callose deposition

At the archisporial stage, no fluorescence was observed in the microsporangium (Fig. 12). The fluorescence was first detected only in the center of the locule at the premeiotic phase, indicating that callose was initially synthesized in the center of the locule at this stage. Just before the onset of meiosis, the fluorescence intensity in the center reached a peak and no fluorescence appeared around the MMC yet (Figs. 13 and 14). As meiosis progressed, the callose in the center gradually disappeared concomitant with callose deposition on the inner tangential and radial walls of the MMC (Fig. 15). With the entry of the MMC into metaphase I, the callose in the center of the locule almost completely disappeared (Fig. 16). At this time, each MMC was surrounded by callose wall and isolated from the other MMCs. The callose was not evenly deposited around the MMC; in general, the inner tangential and radial callose walls were thicker than those contacting the tapetum. In addition, the callose wall exhibited prominent protrusions facing the center of the anther locule. As meiosis progressed, the locule slowly expanded. After the completion of meiosis I, the dyad was enclosed in the callose wall and possessed a cell plate composed of callose (Fig. 17). The dyads were usually united in a ring shape concentric to the tapetum, and then the MMC underwent meiosis II. At the end of meiosis II, the tetrads were formed and enveloped in a common callose wall. The four microspores within a tetrad were isolated from one another by a crossed callose plate (Fig. 18). Next, the callose walls of the tetrads degraded and individual microspores were released from the tetrads into the locule. Microspores released from the tetrads were still enclosed by a thin callose wall (Fig. 19). As the development of the pollen grain progressed, the callose surrounding the pollen grain gradually dissipated. At approximately the two-celled stage, the fluorescence became very faint (Fig. 20) and was nearly undetectable (Fig. 21) in the walls of mature pollen grain. Therefore, the walls of mature pollen grains contained little callose. However, a small disc around the aperture of the pollen grains at its various developmental stages exhibited stronger fluorescence than the other parts of the pollen wall (Figs. 19–21).

Discussion

The division processes of the MMCs of angiosperms are of two basic types: (1) the successive type, in which

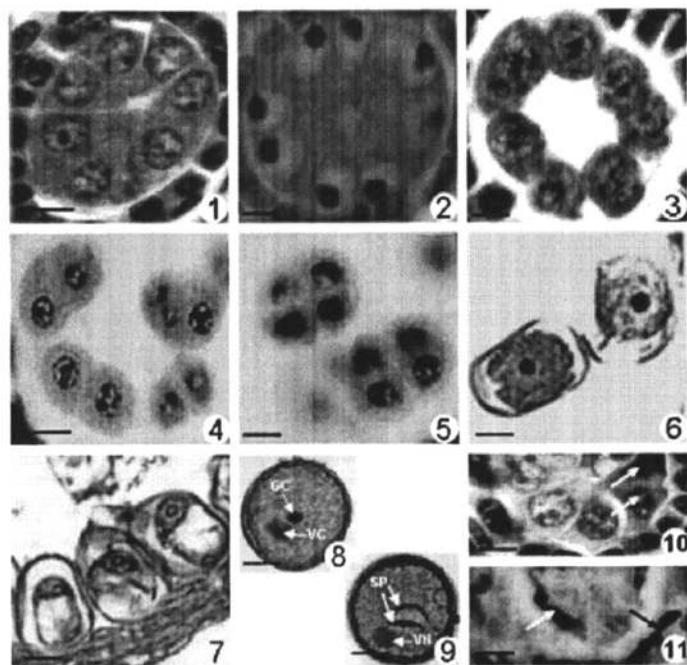


Plate I. Figs. 1–9: Microsporogenesis and pollen development of *L. chinensis*. Figs. 10 and 11: Abnormalities during microsporogenesis. Figs. 1–7, 10, 11: Stained with Heidenhain's hematoxylin. Figs. 8 and 9: Stained with aceto-carmine. Fig. 1: At the archesporial stage, a ring of archesporial cells with scattered nuclear materials and dense cytoplasm lining the tapetum. Fig. 2: Microsporogenesis mother cells (MMC) with distinct nuclei in a cross-section of a pollen sac. Fig. 3: During the meiosis of the MMC, some MMCs in the same locule divided asynchronously. Fig. 4: at the dyad stage, a cell plate formed in the dyads after meiosis. Fig. 5: At the tetrad stage, the partitioning callose walls of the tetrads were perpendicular to each other. Fig. 6: Pollen with a conspicuous and centrally located nucleus. Fig. 7: Pollen with a distinct nucleus near the side of wall along the tapetum. Fig. 8: A binucleate pollen with a larger vegetative cell (VC) and a smaller generative cell (GC). The GC stained more intensely than the VC. Fig. 9: A trinucleate pollen with two crescent-shaped sperms (SP) and a vegetative nucleus (VN). The sperms stained more intensely than the VN. Fig. 10: Abortive archesporial cells with coalescing nuclei (arrows). Fig. 11: During meiosis, the MMCs (white arrow) and tapetal cells (black arrow) disintegrated completely. Bars: Figs. 1–3, 6, 10 and 11: 8.5 μ m; Figs. 4 and 5: 7 μ m; Fig. 7: 12 μ m; and Figs. 8 and 9: 10 μ m.

the two cell plates are laid down in a centrifugal manner immediately after the first and the second meiotic division, and (2) the simultaneous type, in which the tetrad is formed in one step after the completion of the second meiotic division (Johri, 1984). In *L. chinensis*, the cell plate was centrifugally formed in the center of the MMC after the completion of meiosis I, and then a crossed cell plate was produced after meiosis II. Therefore, its microsporogenesis pattern is of the successive type, similar to that observed in some other plants of the Gramineae, such as wheat (Lu and Guo, 1984) and *Saccharum cereale* (Li et al., 2001). In angiosperms, mature

pollen grains are divided into two groups: binucleate type and trinucleate type and the mature pollen grains of most species have two nuclei (Brewbaker, 1967). However, mature pollen grain possesses three nuclei in most taxa of the Gramineae (Chas and Karas, 1975; Vithanage and Knox, 1980). As a member of the Gramineae, *L. chinensis* also belongs to the trinucleate type. Moreover, it is of interest to observe that the highly vacuolated pollen grains as shown in Fig. 7 were displaced along the tapetal cells. This phenomenon was also reported in *Sorghum bicolor* (Christensen and Horner, 1974). Therefore, we speculate that this

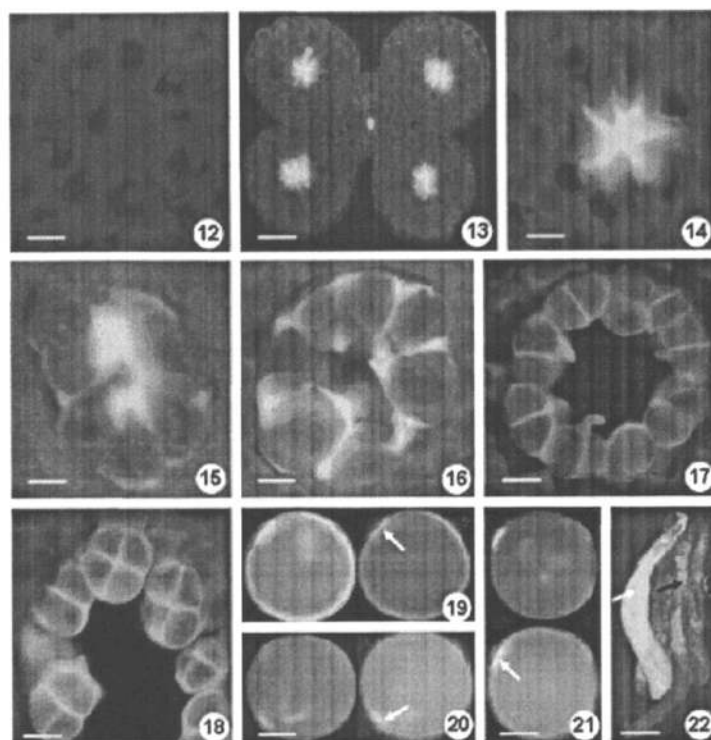


Plate II. Figs. 12–21: Dynamics of callose during microsporogenesis and gametogenesis in *L. chinensis*. Figs. 12–18 and 22: Aniline blue staining for the localization of callose by fluorescence microscopy (light gray in black-and-white reproduction), Figs. 19–21: Pollen double-stained with DAPI (blue) and aniline blue (green). Fig. 12: During the archesporial stage, no callose was deposited in the locule. Fig. 13: At the premeiotic phase, callose accumulation reached a peak in the center of locule. Fig. 14: Callose in the center of a microsporangium at the premeiotic phase. Fig. 15: At prophase I, the callose in the center degraded concurrently with its deposition in the corner of MMC wall. Fig. 16: During metaphase I, MMCs exhibited asymmetric callose deposition, the callose deposited in the inner tangential and radial walls was thicker than in the other parts of wall. Fig. 17: At the dyad stage, dyads with a conspicuous cell plate of callose were enclosed by the callose wall. Fig. 18: At the tetrad stage, tetrads with a prominent crossed cell plate were surrounded by the callose wall. Fig. 19: At the uninucleate microspore stage, distinct callose fluorescence appeared around the wall of the yellow-green pollen grain. The blue (left) image demonstrates that the pollen was still at the uninucleate stage. A small disc inside the intine of pollen grain exhibited strong fluorescence (white arrow). Fig. 20: At the two-celled stage, faint callose fluorescence appeared around the wall of the yellow-green pollen grain. The blue one (left) indicated that the pollen comprised a vegetative cell and a generative cell. A small disc inside the intine of pollen grain exhibited strong fluorescence (white arrow). Fig. 21: At the three-celled stage, almost no callose fluorescence was detected around the wall of the pollen. The blue (upper) image shows that the pollen possessed two sperms and a vegetative nucleus. A small disc inside the intine of pollen grain exhibited strong fluorescence (white arrow). Fig. 22: During meiosis, only one microsporangium in an anther emitted strong fluorescence (white arrow), demonstrating that MMCs in this microsporangium are normal, whereas the rest exhibited weak fluorescence (black arrow), implying that the MMCs in these microsporangia are abortive. Bars: Figs. 12 and 14–18: 8.5 μ m; Fig. 13: 30 μ m; Figs. 19–21: 10 μ m; and Fig. 22: 515 μ m.

displacement of pollen grains along the tapetum may facilitate the nutrition transport from the tapetum to the developing pollen grains.

With regard to the temporal progress of MMC division, different conclusions have been made. Wei and Shen (2003) reported that the MMCs in the same locule divide synchronously, but Zhao and Tu (1993) observed asynchronous division of MMCs in the same locule. In our observations of a large number of temporary sections, about 20% of the MMCs in one locule divided asynchronously. Nevertheless, unfavorable environmental conditions might lead to asynchronous development. Duan and Fan (1984) investigated abnormal phenomena during microsporogenesis and concluded that abortion of the MMC was the main factor in the low seed production of *L. chinensis*, whereas other investigators concluded that the low seed yield is likely not caused by abnormalities in microsporogenesis (Ma et al., 1984; Pan and Sun, 1986). In the present study, most of the MMCs in the large number of sections examined divided normally, although a few abnormalities were observed. Therefore, asynchronous division and abnormalities during microsporogenesis should not be causes of the low seed production of *L. chinensis*. In fact, we previously observed a high pollen grain germination rate on the stigma and pollen tubes growing through the transmitting tissue of the stigma (Huang et al., 2004).

Callose deposition is an essential event during microsporogenesis and gametogenesis in most angiosperms (Bhatia and Malik, 1996; Johri, 1984). In experiments in which Worrall et al. (1992) introduced a tapetal-specific glucanase gene into tobacco, premature dissolution of callose took place during microsporogenesis in the transgenic plants, causing male sterility. In triticales, erratic callose deposition was observed in the sterile anthers of EMS-treated plants, whereas callose deposition in the fertile anthers followed the normal pattern observed in some other members of the Gramineae (Bhandari and Khosla, 1995). In the present study, the dynamics of callose deposition during sexual reproduction followed a model similar to that observed in triticales (Bhandari and Khosla, 1995). Only a very few anomalous instances of callose deposition were observed during microsporogenesis. For example, one microsporangium in an anther stained with aniline blue emitted much stronger fluorescence than the rest of the microsporangia (Fig. 22), demonstrating that during meiosis, some MMCs lacked callose walls and consequently lost the ability to develop into functional pollen grains. Nevertheless, the rate of such abnormalities was so low as to likely have no influence on the production of viable pollen grains.

Bhandari and Khosla (1995) found that in triticales, callose precursors are formed in the tapetum and then released into the locule for utilization by the MMC at

the appropriate times. Additionally, they observed that any physiological disturbance in the tapetum prevented the release of the precursors, causing anther sterility. Li et al. (2001) demonstrated that archesporial cells in the center of the locule gradually disintegrated, accompanied by increasing accumulation of callose in the center. They concluded that the dissolution of these cells provides nutritional material for the synthesis of callose. As no archesporial cells were located at the center of *L. chinensis* locules in our observations (Figs. 1 and 2), we can conclude that the precursors are first synthesized in the tapetum and are then transferred toward the center of the locule, ultimately accumulated in the center, similar to the case in triticales (Bhandari and Khosla, 1995) and *S. bicolor* (Overman and Warmke, 1972).

Interestingly, the gradual dissolution of callose in the center of the locule was accompanied by the accumulation of callose around the walls of the MMC (Figs. 14–16). By the prophase I stage, the MMC was completely enclosed in a callose wall and no callose was left at the center of the locule (Fig. 16). Perhaps the degradation of callose in the center provides the raw materials for the synthesis of callose around the MMC. A similar phenomenon has also been observed in triticales (Bhatia and Malik, 1996), *S. bicolor* (Warmke and Overman, 1972) and *S. cereale* (Li et al., 2001). Furthermore, we observed that callose was not evenly deposited on the walls of the MMC. The callose on the inner tangential and radial walls was thicker than in the regions in contact with the tapetum (Fig. 16). The formation of the callose wall was thought to be a necessary event that played several important roles during microsporogenesis, including isolating the archesporial tissue from the somatic tissue (Heslop-Harrison, 1966), protecting the developing sporocytes from the hormonal and nutritional influence of the surrounding diploid tissue or sister spores (Godwin, 1968; Heslop-Harrison and Mackenzie, 1967), preventing cell cohesion and fusion (Heslop-Harrison, 1964), and maintaining the genetic autonomy of the MMC (Warmke and Overman, 1972). The thin outer tangential callose wall observed here may facilitate the transfer of material from the tapetum to the MMC, and the thick callose wall may help maintain the autonomy of the MMC as well as prevent influences from adjoining cells. The asymmetric deposition of callose observed provides additional evidence for the above-mentioned opinions on the functions of the callose wall during microsporogenesis and pollen development.

Different views existed on the occurrence of callose in the mature pollen of angiosperms (Dumas and Knox, 1983). In *Populus* pollen, callose only occurred in the intine of a portion of mature pollen grains (Ashford and Knox, 1980). In the mature pollen of sunflower, callose persisted in the outermost wall layer (Vithanage and

Knox, 1979). In the present study, it was noticed that almost no aniline blue fluorescence was detectable in the mature pollen grain, indicating the absence of callose in the wall of mature pollen. Therefore, the presence or absence of callose in mature pollen wall may be regarded to be species-dependent.

In summary, the present work described microsporogenesis and pollen development in *L. chinensis* as well as the dynamics of callose deposition during these processes. These observations showed that the percentage of abnormalities during microsporogenesis and callose deposition was very low, and therefore such abnormalities were probably not a factor in the low seed set of *L. chinensis*. Further studies on meiosis, pollen development, fertilization, and embryogenesis in this species will probably reveal the causes of the low seed production of this species.

Acknowledgements

We thank the Inner Mongolian Grassland Ecosystem Research Station for providing field and laboratory facilities. This study was supported by the Key Project of the Chinese Academy of Sciences (KSCX1-08) and National Science Fund of China for Distinguished Young Scholars (30225005).

References

- Ashford, A.E., Knox, R.B., 1980. Characteristics of pollen diffusates and pollen wall cytochemistry in poplars. *J. Cell Sci.* 44, 1–17.
- Bhandari, N.N., Khosla, R., 1995. Callose deposition during microsporogenesis in the control and EMS-treated anthers of triticale cv. tri-1¹. *Phytomorphology* 45, 15–22.
- Bhatia, D.S., Malik, C.P., 1996. Significance of callose in reproduction of higher plants with special reference to male gametophyte. In: Malik, C.P. (Ed.), *Pollen-Spore Research Emerging Strategies. Advances in Pollen-Spore Research*, vol. 21. Today and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi, pp. 221–240.
- Brewbaker, J.L., 1967. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. *Am. J. Bot.* 54, 1069–1083.
- Cass, D.D., Karas, L., 1975. Development of sperm cells in barley. *Can. J. Bot.* 53, 1051–1062.
- Chen, Z.Z., 1988. Topography and climate of the Xilin River basin. *Res. Grassland Ecosyst.* 3, 13–22.
- Christensen, J.E., Horner, H.T., 1974. Pollen pore development and its spatial orientation during microsporogenesis in the grass *Sorghum bicolor*. *Am. J. Bot.* 61, 604–623.
- Duan, X.G., Fan, J.L., 1984. Studies on the behavior of chromosome of PMC meiosis of *Leymus chinensis*. *Grassland China* 6, 66–68 (in Chinese with English abstract).
- Dumas, C., Knox, R.B., 1983. Callose and determination of pistil viability and incompatibility. *Theor. Appl. Genet.* 67, 1–10.
- Fujie, M., Kuroiwa, H., Kawano, S., Mutoh, S., Kuroiwa, T., 1994. Behavior of organelles and their nucleoids in the shoot apical meristem during leaf development in *Arabidopsis thaliana* L. *Planta* 194, 395–405.
- Gedwin, H., 1968. The origin of exine. *New Phytol.* 67, 667–678.
- Gorska-Brylask, A., 1967. Temporary callose wall in the generative cell of pollen grain. *Naturwissenschaften* 54, 230–231.
- Heslop-Harrison, J., 1964. Cell walls, cell membranes, and protoplasmic connections during meiosis and pollen development. In: Linskens, H.F. (Ed.), *Pollen Physiology and Fertilization*. North Holland Publishing Company, Amsterdam, pp. 39–47.
- Heslop-Harrison, J., 1966. Cytoplasmic continuities during spore formation in flowering plants. *Endeavour* 25, 65–72.
- Heslop-Harrison, J., Mackenzie, A., 1967. Autoradiography of soluble [³-¹⁴C] thymidine derivatives during meiosis and microsporogenesis in *Lilium* anthers. *J. Cell Sci.* 2, 387–400.
- Huang, Z.H., Zhu, J.M., Mu, X.J., Lin, J.X., 2002. Advances on the mechanism of low sexual reproductivity of *Leymus chinensis*. *Grassland China* 24, 55–60 (in Chinese with English abstract).
- Huang, Z.H., Zhu, J.M., Mu, X.J., Lin, J.X., 2004. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. *Ann. Bot.* 93, 295–301.
- Izhar, S., Frankel, R., 1971. Mechanism of male sterility in petunia: the relationship between pH, callose activity in the anthers, and the breakdown of the microsporogenesis. *Theor. Appl. Genet.* 41, 104–108.
- John, B.M., 1984. *Embryology of Angiosperms*. Springer, Berlin.
- Koyama, T., 1987. *Grasses of Japan and its Neighboring Regions*. Kodansha, Tokyo, pp. 48–50.
- Kuo, P.C., 1987. *Flora Republicae Popularis Sincae*. Science Press, Beijing, p. 19.
- Li, Z.Y., Wang, Y.N., Wang, X.Y., 2001. Change of callose wall synthesis during formation and development of microsporocytes in *Sesuvium coccineum*. *Acta Bot. Boreal. Occident. Sin.* 21, 700–705 (in Chinese with English abstract).
- Lu, W.L., Guo, C.S., 1984. Cytological observation of microsporogenesis and pollen development in wheat in vivo. *Acta Bot. Sin.* 26, 28–33 (in Chinese with English abstract).
- Lu, S.Y., Li, Y.F., Chen, Z.K., Lin, J.X., 2003. Pollen development in *Pennisetum asiaticum* Mast. *Flora* 198, 112–117.
- Ma, H.L., Wan, T., Wang, F.G., 1984. Characteristics of seed setting and causes of low seed yields in *Aeluropedium chinensis*. *Grassland China* 6, 15–21 (in Chinese with English abstract).
- Overman, M.A., Warmke, H.F., 1972. Cytoplasmic male sterility in sorghum. Tapetal behaviour in fertile and sterile anthers. *J. Hered.* 63, 227–234.
- Pan, G.F., Sun, Z.L., 1986. The study about cytogenetics and fertility of *Aeluropedium chinensis*. Meiosis, pollen fertility

- and fruiting character. *Grassland China* 8, 7–14 (in Chinese with English abstract).
- Pool, M.D., Caeman, J.G., Leblanc, O., 1997. Megasporeocyte callose in apomictic buffelgrass, Kentucky bluegrass, *Pennisetum squamulatum* Fresen., *Tripsacum* L., and weeping Lovegrass. *Crop Sci.* 37, 724–732.
- Smith, M.M., McCully, M.E., 1978. A critical evaluation of the specificity of aniline blue induced fluorescence. *Protoplasma* 95, 229–254.
- Song, B.Y., Yang, J., Xu, R., Wu, J.Y., 2003. Water use of *Leymus chinensis* community. *Acta Bot. Sin.* 4, 1245–1250.
- Tucker, M.R., Paech, N.A., Willems, M.T.M., Koltunow, A.M.G., 2001. Dynamics of callose deposition and β -1,3-glucanase expression during reproductive events sexual and apomictic *Hieracium*. *Planta* 212, 487–498.
- Vithanage, H.I.M.V., Knox, R.B., 1979. Pollen development and quantitative cytochemistry of exine and intine enzymes in sunflower, *Helianthus annuus*. *Ann. Bot.* 44, 95–106.
- Vithanage, H.I.M.V., Knox, R.B., 1980. Periodicity of pollen development and quantitative cytochemistry of exine and intine enzymes in the grasses *Lolium perenne* and *Phalaris tuberosa*. *Ann. Bot.* 45, 131–142.
- Wang, R.Z., 2001. Photosynthesis, transpiration, and water use efficiency of vegetative and reproductive shoots of grassland species from northeastern China. *Photosynthetica* 39, 569–573.
- Wang, R.Z., Ripley, E.A., 1997. Effects of grazing on a *Leymus chinensis* grassland on the songnen plain, north-eastern China. *J. Arid Environ.* 36, 312–318.
- Wang, R.Z., Gao, Q., Chen, Q.S., 2003. Effects of climate on biomass and biomass allocation of *Leymus chinensis* (Poaceae) along the Northeast China Transect. *J. Arid Environ.* 54, 653–665.
- Warmke, H.E., Overman, M.A., 1972. Cytoplasmic male sterility in sorghum. I. Callose behavior in fertile and sterile anthers. *J. Hered.* 63, 103–108.
- Waterkeyn, L., Benfalt, A., 1971. On a possible function of the callosic special wall in *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. *Grana* 10, 13–20.
- Wei, X., Shen, J.H., 2003. Observations on megasporogenesis, microsporogenesis and development of female and male gametophyte of *Anurolepidium chinense* (Trin.) Kitag. *Acta Bot. Boreal. Occident. Sin.* 23, 2058–2066 (in Chinese with English abstract).
- Worrall, D., Hind, D.L., Hodge, R., Paul, W., Draper, J., Scott, R., 1992. Premature dissolution of the megasporeocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* 4, 759–771.
- Zhao, Q.L., Tu, L.Z., 1993. The microsporogenesis and the formation of male gametophytes in *Leymus chinensis* (Trin.) Kitag. *Acta Sci. Naturalium Universitatis Nei Mongol* 24, 55–65 (in Chinese with English abstract).

个人简历、在学期间发表的学术论文与研究成果

一、个人简历

滕年军, 男, 1977 年 1 月出生, 籍贯江苏句容。2000 年 6 月从扬州大学获得学士学位; 2003 年 7 月从南京农业大学获得硕士学位; 2003 年 9 月至今在中科院植物所植物学专业攻读博士学位。

二、参加科研项目情况

1. 国家自然科学基金 (90211005) “植物有性生殖对大气 CO₂ 浓度变化的响应”主要完成人。
2. 中国科学院知识创新工程重大项目的子项目 (KSCX1-08) “羊草生殖生态学研究”的主要完成人之一。

三、在读博士研究生期间发表论文情况

1. Teng N J, Huang Z H, Mu X J, Jin B, Hu Y X, Lin J X. 2005. Microsporogenesis and pollen development in *Leymus chinensis* with emphasis on dynamic changes in callose deposition. *Flora*, 200, 256-263. (SCI 核心期刊, IF: 1.124)
2. Teng N J, Chen T, Jin B, Wu X Q, Huang Z H, Mu X J, Li X J, Lin J X. 2006. Abnormalities in pistil development result in low seed set in *Leymus chinensis*. *Flora* (accepted).
3. Teng N J, Wang J, Chen T, Wu X Q, Wang Y H, Lin J X. 2006. Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* (accepted, SCI 核心期刊, IF: 3.355)
4. Teng N J, Lin J X. Reproductive consequences of *Arabidopsis thaliana* after 10 generations of selection at elevated CO₂. (in preparation).
5. 滕年军, 陈彤, 林金星. 2006. 植物有性生殖对大气 CO₂ 浓度变化响应的研究进展. *植物生态学报* (已经接受).
6. Li X J, Wang H G, Li H B, Zhang L Y, Teng N J, Lin Q Q, Wang J, Kuang T Y, Li Z S, Li B, Zhang A M, Lin J X. 2006. Awns play a dominant role in carbohydrate production during the grain-filling stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiologia Plantarum* (in press, SCI 核心期刊, IF: 2.017).
7. Wang J, Zhu J M, Lin Q Q, Li X J, Teng N J, Li Z S, Li B, Zhang A M, Lin J X. 2006. Influence of stem structural features and cell wall components on the bending strength of wheat stems. *Chinese Science Bulletin*, 51: 815-823 (in press, SCI 核心期刊, IF: 0.683).
8. Chen T, Teng N J, Wu X Q, Wang Y H, Tang W, Šamaj J, Baluška F, Lin J X. Disruption of actin filaments by latrunculin B affects cell wall construction in *Picea meyeri* pollen tube via vesicle trafficking disturbance. *Plant and Cell Physiology*, (submitted, SCI 核心期刊, IF: 3.258).