

参赛队员姓名: 刘骁 杜一冰

中学: 中国人民大学附属中学

省份: 北京

国家/地区: 中国

指导教师姓名: 李峰

论文题目: 红瓶猪笼草 (*Nepenthes x
ventrata*) 捕虫器官发育过程研究

论文题目：红瓶猪笼草 (*Nepenthes x ventrata*) 捕虫器官发育过程研究

摘要：

猪笼草 (*Nepenthes*) 是一类很重要的食虫植物，由于具有巨大的捕虫器官，也被称作 pitcher plant，深受植物学家、博物学家和园艺爱好者喜爱。但是“猪笼草的 pitcher 是个什么”这个看似简单的问题，却从达尔文时代就困扰着许多科学家。包括 Joseph D. Hooker、Frederick O. Bower 在内的众多著名植物学家产生了各种截然不同的观点，但是这些观点都缺少令人信服的证据，不能解释清楚猪笼草捕虫器官性质。本文通过扫描电镜、石蜡切片、解剖镜等形态学观察手段，将猪笼草捕虫器官——笼子的发育过程划分为 7 个时期 (P0-P6)，系统地描述了猪笼草从叶原基到笼子打开、具备捕虫功能的完整发育过程，为猪笼草相关科学研究提供了系统的发育时期划分标准。并且通过分子生物学的研究，为猪笼草是单叶还是复叶这个关键问题，提供了新的证据。我们克隆了猪笼草中 *KNOX1* 基因，包括基因的编码区与非编码区，命名为 *Nv KNOX1*，并开始确定基因的表达特征。综合各种实验结果，我们提出，猪笼草笼子独特的三维结构是由于异常的原基活动形成，形成方式不同于瓶子草等其它 pitcher plant，更加接近于传统概念中对复叶的定义。

关键词：猪笼草；pitcher plant；发育；*KNOX1* 基因

Title: Pitcher Formation in *Nepenthes x ventrata*

Abstract:

Nepenthes is a type of carnivorous plant widely adored by botanists, naturalists, and gardeners. It is also called "pitcher plant" because of its large insect trap. However, since Charles Darwin's day, scientists have been perplexed by the seemingly easy question of what pitcher is for. Renowned botanists, including Joseph D. Hooker and Frederick O. Bower, proposed several vastly different opinions. Yet none of these opinions was substantiated by convincing evidence, and thus they failed to explain what the *Nepenthes*' insect trap is. In this paper, using methods including scanning electron microscope, paraffin section and anatomical lens to observe *Nepenthes*' morphological features, we divided the *Nepenthes* pitcher's development into 7 stages (P0-P6). We described the pitcher's formation process systematically, from leaf primordium to pitcher opened up and ready for insect trapping, and thus provided a range of indicators to identify the pitchers' formation stage. Moreover, through in molecular biological analysis, we added new evidence to the essential question of whether *Nepenthes* leaves are simple leaves or compound leaves. We cloned the *KNOX1* gene in *Nepenthes*, including its coding and non-coding area, and started to analyze its expression. By combining the results of our experiments, we concluded that *Nepenthes* forms pitchers with unique three-dimensional structure because of its anomalous primordium activities. Hence, its formation is different from other pitcher plants such as *Sarraceniaceae*. Therefore, the leaves of *Nepenthes* are closer to the traditional definition of compound leaves.

Key words: *Nepenthes*; pitcher plant; development; *KNOX1* gene

本参赛团队声明所提交的论文是在指导老师下进行的研究工作和取得的研究成果。尽本团队所知，除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外，论文中不包含其他人或本团队已经发表或撰写过的研究成果。若有不实之处，本人愿意承担一切相关责任。

参赛团队签名：

李峰 刘骁 杜一冰

日期：2016.09.13

一、背景介绍

猪笼草属于通过陷阱捕食昆虫的食虫类植物,类似的植物还包括瓶子草科和凤梨科植物[1]。在1658年,法国殖民地长官 Etienne de Flacourt 首次描述了一种马达加斯加猪笼草 (*N. madagascariensis*), 认为猪笼草的笼子花或者果实。伟大的林奈用荷马史诗《奥德赛》中的“nepenthe”命名了猪笼草,“nepenthe”是一种神秘的、能使人遗忘悲伤的药物。但是从猪笼草被发现之日起,这种神奇的植物除了能让人遗忘悲伤之外,还一直困扰着所有关心它的科学家。如何定义猪笼草独特的 pitcher (下文中统一译作笼子) 成为了最受关注的话题——人们疑惑的追问: “But what are pitchers for? Can anyone tell me that?” [2]。1942年, Lloyd 总结了各个时代学者们对猪笼草叶片结构的看法[3]: 1) 英国皇家植物园园长 Joseph D. Hooker 认为, 猪笼草的笼子是叶片的附属结构, 是一个长在叶片顶端膨大的腺体; 还有类似的观点认为, 笼子是叶片中脉膨大形成的[4]。2) 瑞士著名植物学家 Augustin de Candolle 认为, 盖子 (lid) 是真正的叶片, 其他各个部分都是叶柄, 高度特化变成各种样子。3) 德国植物学家 Wunschmann Ernest 认为, 所有部分都是叶片, 膨大的、通常人们称作“叶片”的部分是整个叶片的下半部分 (近轴端), 卷须、笼子、盖子和刺是叶片的上半部分 (远轴端), 猪笼草不存在叶柄。4) 美国宾夕法尼亚大学植物学家 Alexander Dickson 认为, 猪笼草的各个部位共同组成一片叶子, 基部是叶片, 远端的叶片部分特化为猪笼草的 pitcher, 中间的卷须其实是叶脉。猪笼草的 pitcher 是由扁平的叶片边缘卷起形成笼子, 笼子外表面其实是叶片的背面表皮。5) 苏格兰皇家学会会长 Frederick O. Bower 认为, 猪笼草的叶片不是单叶 (single leaf), 而是复叶 (compound leaf), 由笼子和盖子两片小叶构成。美国植物学家 John M. Macfarlane 走得更远, 认为猪笼草是 3-5 个小叶组成, 盖子、笼子表面的翼、卷须、膨大的“叶片”统统可以归类为小叶。6) 德国植物学家 Wilhelm Troll 认为, 整个猪笼草叶由三部分平行结构构成: 第一部分基底层 (basal zone) 变大, 形成了我们通常称作“叶片 (lamina)”的部分; 第二部分是“叶片”发育成了笼子和卷须; 笼子上长着的翼 (wing) 是叶柄[5]。参与这场大讨论中的学者, 都是当时植物学领域有重要影响力的科学家, 对植物的形态发育有着深刻的理解, 但是这些科学家们却得出了差异巨大的多种观点, 这也充分说明了猪笼草捕虫器官发育过程的复杂性。

之后的半个多世纪, 猪笼草器官发育的问题逐渐被人们所淡忘, 猪笼草的捕虫器官的发育过程仍然是个充满未知的问题[6]。虽然科学家也有过对猪笼草捕虫器官发育过程的形态学描述, 但是由于缺少明确的发育学问题[7], 所建立的发育过程十分粗糙, 所描述的最早发育的阶段其实已经是猪笼草复杂器官分化完成之后了。对之前的时期划分特征也是更多停

留在描述巨大捕虫器官发育细节之上, 缺少对发育机制的分析。更有甚者, 只粗糙地把猪笼草笼子发育只分为笼子打开前和打开之后两个阶段。这样的观察和分析尺度, 完全无法回答极其复杂的猪笼草器官发育问题。

为了能够真正解决从达尔文时代就开始的这场讨论, 真正理解食虫植物最复杂的器官形成机制, 我们从细致的形态学观察入手, 重新建立系统的猪笼草发育过程。通过扫描电镜、石蜡切片和解剖镜观察等手段, 我们划分了最完整的猪笼草发育阶段, 并通过克隆猪笼草中影响单复叶分化的重要基因 *KNOX1*, 为猪笼草属于单叶还是属于复叶的争论提供了形态学描述之外的分子生物学证据。

二、实验结果

2.1 猪笼草叶片发育过程描述

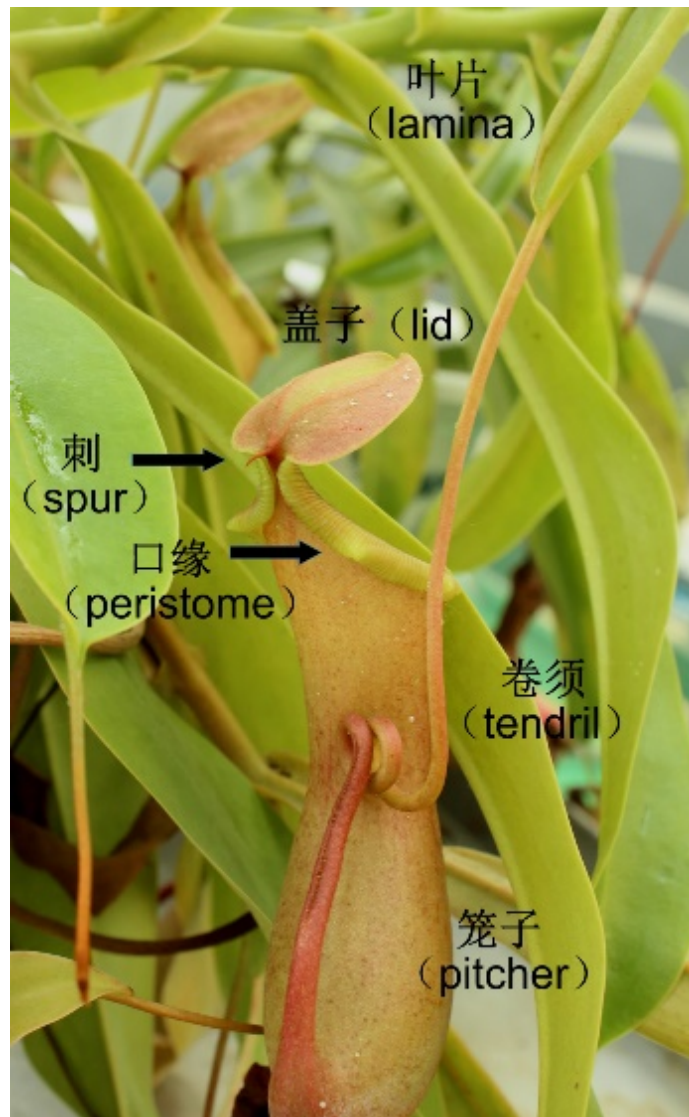


Figure 1 *Nepenthes x ventrata* 红瓶猪笼草捕虫器官结构

猪笼草叶片的形态可以分为两部分，一部分是笼子 (pitcher)，另一部分是宽大的“叶片” (lamina)。两部分之间会有卷须 (tendrils) 连接。pitcher 可以分成以下几个部分：刺 (spur)；盖子 (lid)；口缘 (peristome)；笼身 (pitcher)；翼 (wing) (Figure 1)。

为了能够真正理解形态复杂、高度特化的猪笼草捕虫器官，我们通过扫描电镜 (SEM)、石蜡切片和解剖镜拍摄描述了猪笼草从顶端分生组织 (SAM) 开始的发育过程 (Figure 2A; Figure 3A)，并划分为 7 个时期。第一个时期为 P0 期，在顶端分生组织旁边凸起叶原基，与普通的叶原基一样，是扁片状结构 (Figure 2B)，分为 (dorsal) 和腹面 (ventral)。

P1 期 (Figure 2B-D; Figure 3A-B; Figure 4A)，这一时期，在叶原基接近叶片远轴端位置的腹面上，垂直于腹面凸起两个原基。最远端的为圆型，不断膨大，会发育为将来的盖子。在它的下面，有一圈细胞隆起，围成一个凹窝，会发育为将来的笼子部分。两团原基在几乎相同时间开始生长，而生长的方向相对，盖子的原基向下，而笼子的原基向上。在生长过程中，盖子中间位置出现一条纵向的凹槽 (Figure 2D-E)。

P2 期，盖子和笼子的原基相遇 (Figure 2E; Figure 3C; Figure 4B)。整个叶原基也在迅速生长、纵向伸长，由于笼子和盖子原基生长方向相对，两部分相遇后，盖子嵌套在笼子里，并且两部分均持续生长。由于盖子被笼子所包裹，生长发育空间受到限制，盖子上的凹槽继续加深，此时盖子与笼子的表面都出现多乳突状凸起，将来会发育成表皮毛。

P3 期 (Figure 2F; Figure 3C; Figure 4C)，整个叶原基迅速伸长，叶原基顶端将会发育为笼子上的刺 (spur)，整个叶尖端覆盖满淡绿色的表皮毛，在笼子内部与盖子相接触的一圈隆起，以后将会发育成口缘。

P4 期 (Figure 4D)，整个叶尖表皮毛的颜色变成棕色，卷须已经显著伸长，整个叶原基从上一片叶子的包裹中挣脱出来，但笼子内部表皮细胞仍然未分化。

P5 期 (Figure 4E)，笼子不断长大，内部表皮发生很大变化，在笼子下半部出现分泌腺，并开始分泌消化液 (Figure 5A)；笼子上半部分泌出晶体状蜡 (Figure 5B)；笼子内部的口缘上，开始出现纵向的肋状凸起；两个肋状凸起之间、靠近笼子内部的末端位置开始出现圆形的凸起，将来要发育成腺体 (Figure 5C)；盖子日渐隆起，但仍然未与笼子分离；有翼 (wing) 的种类在笼子外面会开始长出两排凸起，而红瓶子猪笼草只在靠下位置的笼子有翼，比较靠上位置的成熟笼子的翼都退化了。

P6 期 (Figure 4F)，盖子与笼子分离，笼子打开，在口缘位置开始出现半月形、覆瓦状排列的表面结构，肋状凸起成为口缘齿 (peristome teeth) (Figure 5D)。至此，猪笼草的捕虫器官已经发育完全，具备诱捕昆虫的能力。

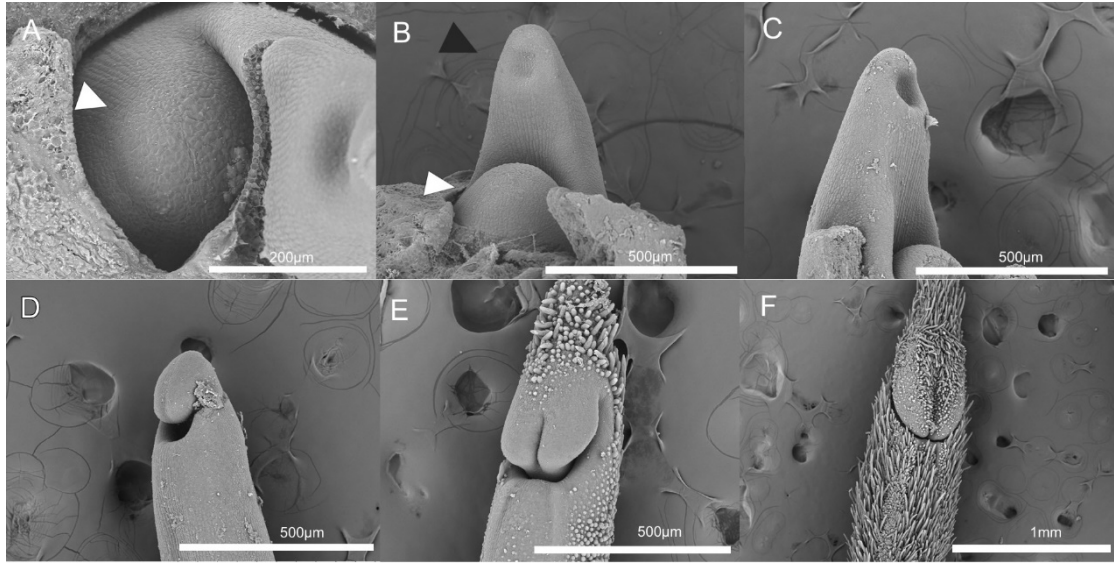


Figure 2 猪笼草顶端分生组织及叶原基发育过程

A. 猪笼草顶端分生组织 (SAM) (白色箭头所示); B. P0 期叶原基 (白色箭头所示) 和 P1 期叶原基 (黑色箭头所示); C-D. P1 期叶原基, 笼子和盖子部分逐渐长大; E. P2 期叶原基, 笼子与盖子上出现凸起; F. P3 期叶原基, 整个叶原基布满表皮毛。

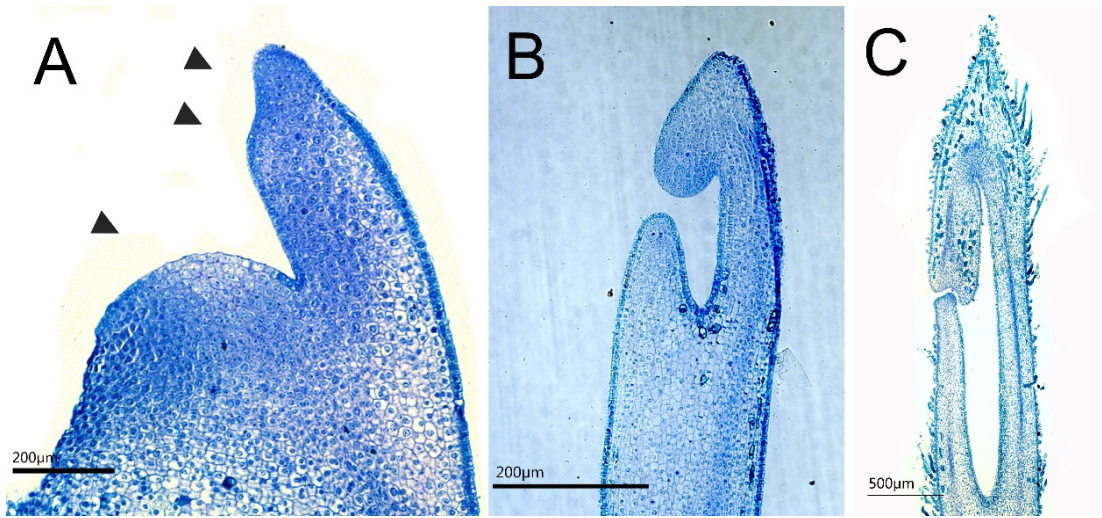


Figure 3 猪笼草叶原基石蜡切片

A. 猪笼草顶端分生组织和 P1 叶原基, 左下方黑色箭头所指为顶端分生组织, 上方两个黑色箭头所指为叶原基顶端凸起部分; B. P1 期叶原基; C. P2-P3 期叶原基, 盖子与笼子相遇, 开始出现表皮毛。



Figure 4 猪笼草捕虫器官发育过程

A. P1 期叶原基; B. P2 期叶原基; C. P3 期; D. P4 期, 叶原基尖端表皮毛颜色变为棕色; E. P5 期, 猪笼草笼子尚未打开, 笼子里已经分泌出消化液; F. P6 期, 猪笼草笼子成熟, 盖子打开, 具备捕虫能力。

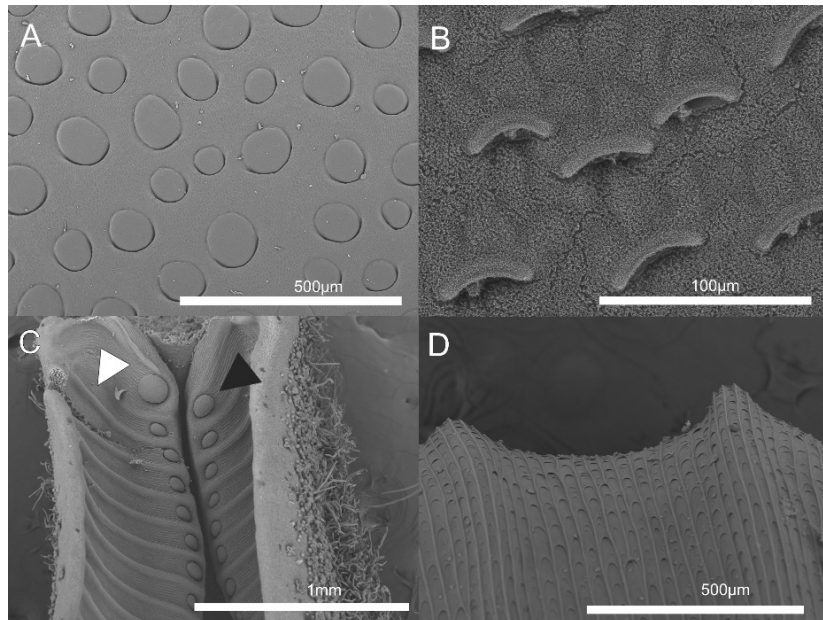


Figure 5 猪笼草瓶子内部结构

A. P5 期猪笼草瓶子底部的消化腺; B. P5 期猪笼草瓶子上部蜡质晶体; C. P5 期叶原基口缘上的肋状凸起(白色箭头所示)和分泌腺(黑色箭头所示); D. P6 期成熟猪笼草的口缘表面结构。

2.2 克隆猪笼草中影响单复叶分化的重要基因 *KNOX1*

虽然形态学描述基本上厘清了六种观点中的含混之处, 但是猪笼草复杂器官是单叶还是复叶的问题仍然没有回答清楚, 因为两种说法都有其合理性。我们借助飞速发展的现代分子生物学, 通过对很多其他物种的分析, 掌握了超越依赖形态学主观臆断的分子证据。

KNOX1 (Class 1 KNOTTED1-LIKE HOMEBOX) 与顶端分生组织 (SAM) 活动有密切关系, 有决定或者维持分生组织命运的功能。在单叶植物中, 叶原基中 *KNOX1* 表达下调后, *KNOX1* 在叶原基随后的生长发育中不表达; *KNOX1* 的过表达可以造成叶片异常以及异位的茎端生长。而复叶植物中, *KNOX1* 在叶原基中表达下调后, 又重新活跃表达[8] [9]。虽然我们对单、复叶形成机制还知之甚少, 但是重要的调节基因 *KNOX1* 为我们研究猪笼草捕虫器官到底属于单叶还是复叶的问题提供了新的切入点。

通过 3'RACE 实验, 我们依靠同源序列, 设计随机引物, 克隆到了猪笼草中 *KNOX1* 基因的大片段同源序列, 共获得了 518bp 的基因序列片段。利用目前已完成的猪笼草基因组初步测序工作 (未发表数据) 中的数据, 我们进行比对, 获得了预测的猪笼草 *KNOX1* 基因的全长序列 (Figure 6)。

NCBI 的蛋白 BLAST 结果显示, 实验得到猪笼草的蛋白序列 *KNOX1* 和含有 *KNOX1*、*KNOX2*、*ELK*、*Homeobox_KN* 的同源保守框均一致 (Figure 7), 因此判定所得序列是猪笼草的 *KNOX1* 基因。通过与不同物种中 *KNOX1* 基因的比对, 我们采取邻接法 (Neighbor-joining method), 构建分子系统发生树 (Figure 8)。从树上可以看出, 猪笼草的 *KNOX1* 基因与其他的 *KNOX1* 基因聚在一起, 从而证实所获的序列属于 *KNOX1* 亚家族。我们把它命名为 *NvKNOX1*。

我们用于 3'RACE 实验的 mRNA 分别来自于顶端分生组织 (SAM) 和 P2 时期的猪笼草原基, 而且从两种来源的 cDNA 扩增出的序列相同, 说明该基因在猪笼草叶原基发育后期仍然有表达。这种表达式样更接近于我们对复叶的定义。



Figure 6 猪笼草中 *KNOX1* 基因的结构示意图

红色方框代表 *KNOX1* 基因的外显子区; 黑色实线标示内含子区; 灰色实线标示 *KNOX1* 基因的 UTR 区。

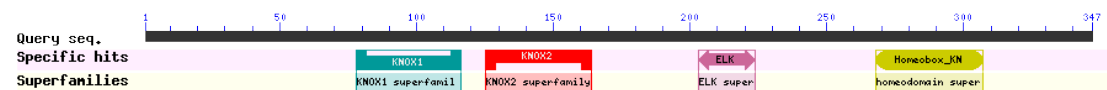


Figure 7 猪笼草中的 *KNOX1* 的同源框结构图



0.05

Figure 8 猪笼草的 *KNOX1* 基因的系统进化分析

三、讨论

本文通过详细的形态学描述,对猪笼草的捕虫器官发育过程进行了最全面和准确的时期划分,并在此基础上克隆了猪笼草中的重要基因 *Nv KNOX1*。

依据本文实验结果,可以重新对自达尔文时代起的不同观点做出判断。首先,把盖子作为唯一的叶片 (*lamina*) 部分看待,是不合理的。顶端的刺也是整个叶的一部分,无论从内部结构,还是发育过程来看,都是如此。笼子部分也不是叶柄特化而来,笼子和盖子是平行、独立起源。胡克的早期观察结果也说明了这一点。

其次,将所有部分都当作叶片的观点也不合理,空间上不对。虽然猪笼草盖子、笼子、卷须和“叶片”都来自同一个原基,但是在发育过程中,盖子和笼子明显具有二次生长的特征。这两部分脱离了叶片发育的主线,朝着不同的方向生长发育,把它们全部算作一个叶片的说法并没有阐明猪笼草叶的发育过程。

另外,认为笼子是叶子中脉 (*midrib*) 顶端膨大的腺体的观点也有错误,时间上不正确。笼子不是叶片中脉发育而成:叶片中脉还没形成之时,复杂精致的笼子就已经基本分化好了。而且,笼子在发育的起源上来自于叶原基的两个不同的部位,远比一个腺体要复杂得多。叶片卷曲形成笼子的观点与事实不符,虽然叶原基下部会发生折叠、卷曲,但那部分是用来包裹更幼嫩的叶、日后形成宽大的“叶片” (*lamina*) 部分的,而并非会形成笼子。

由于 P2 期叶原基及以后的组织中可以克隆到 *KNOX1* 序列,我们可以推测猪笼草叶原基发育后期仍然有 *KNOX1* 表达,更接近于复叶的形成机制。但是猪笼草的新原基活动的位置比较特殊。与其它复叶植物中新叶原基位于叶片边缘的发育方式不同,猪笼草是在叶片腹面长出两个原基,上下两个独立的原基不断发育,形成了复杂的捕虫器官。

在与猪笼草相似的另一类 *pitcher plant*——瓶子草中,也存在巨大的捕虫笼,但它的发育过程与猪笼草截然不同,是由早期叶原基在不断向上生长并同时向左右两侧隆起形成的。瓶子草没有独立的盖子,由一片叶原基形成全部的笼子结构,形态上可以归类为单叶植物。在瓶子草中的原位杂交实验也显示, *KNOX1* 基因不表达[10]。这也从另一个侧面证实了我们的观点。

对于 *KNOX1* 基因表达的时间、空间、表达量特征的精细分析,将有助于我们最终理解猪笼草为代表的复杂捕虫器官本质。在精准的猪笼草、瓶子草基因组数据公布之后,一定会有更多重要结果被发现。例如,为什么在瓶子草中没有 *KNOX1* 基因表达的问题,可能还要从启动子序列、基因调节网络中寻找答案,基因组信息将会有助于解决这些问题。被人为划分成同一类 *pitcher plant* 的猪笼草、瓶子草,在发育过程、演化方式上可能存在很大差异,

属于多次起源。开始于达尔文时代的食虫植物研究，在现代分子生物学研究的大潮中会迎来新的机遇。而真正复杂的问题可能是：不同种植物是如何通过调整自身发育过程来适应各自环境变化，分别走上食虫植物的道路的呢？

四、实验材料与实验方法

4.1 植物培养：

Nepenthes x ventrata 采购自小虫草堂，在温室中培养。温度 25-35℃，湿度 40%-60%。

4.2 实验方法

4.2.1 3' RACE

利用 3' RACE 引物特异 (mRNA 的 3'末端的 poly(A)及一段特异序列) 作为一个引物结合位点，反转录合成标准第一链 cDNA。以 cDNA 为模板，用上游的基因特异引物 GSP1 和下游巢式引物 CNS1 进行第一轮 PCR。稀释 PCR 产物 100 倍作为模板，用目的基因特性引物 GSP2 和下游巢式引物 CNS2 扩增出目的基因的 3'末端。经过两轮 PCR 和切胶、回收、T 载体克隆，纯化、克隆得到 *KNOX1* 基因。利用 BLAST 进行序列比对，分析所得样本的 DNA 序列和对应的氨基酸序列，研究所得基因编码的蛋白的功能，并与已知的其它植物中 *KNOX* 家族的基因对比。

引物序列：“GSP1: CACTACCACCGCCTCTTGGCCGCTTAT; GSP2:
TGTCAGAAGGTTGGAGCACCACCG; CNS1: TTTAGGATTTTCTGT; CNS2:
WAGCATAAAWMYCGGGAGRBYACT”

4.2.2 PCR 扩增

- ① 将 TRANSTART KOD Plus Kit 试剂盒中的 Template 稀释为 200 倍，根据配方配出略多于所需体积的 Mix，在多个 EB 管中分别加入 48 μ L Mix + 2 μ L Template，相应标记。
- ② 将 EB 管放入 PCR 仪，运行 TRANSTART KOD Plus Kit 相应程序。

94°C 5 min
——35 cycles——
94°C 30 s
58°C 30 s
68°C 40 s

68°C 5 min

- ③ 根据加入量, 选取适当大小的梳子, 准备琼脂糖凝胶块。
- ④ 将 PCR 产物分别加入各个孔, Marker 加入最侧面的孔。
- ⑤ 开启电泳仪, 在 140 V 电压下运行 15 min。
- ⑥ 对应 Marker 显示的条带位置, 确定片段大小, 并拍照记录。

(2) 切胶回收

- ① 将吸附柱放入收集管, 加入 500 μ L BL, 转速 12000 rpm 离心 1 min, 弃废液。
- ② 切下胶块中的 DNA 条带部分, 放入离心管, 称重并记录。
- ③ 加入等倍体积 PC (如有 0.1 g 胶块, 则加入 100 μ L PC), 在 50°C 下加热 10 min, 不断温和翻转。
- ④ 将吸附柱放入收集管, 转速 12000 rpm 离心 1 min, 弃废液。
- ⑤ 加入 600 μ L PW, 转速 12000 rpm 离心 1 min, 弃废液。
- ⑥ 加入 600 μ L PW, 转速 12000 rpm 离心 1 min, 弃废液。
- ⑦ 将吸附柱放回, 转速 12000 rpm 离心 2 min。
- ⑧ 将吸附柱放入干净离心管, 室温放置 10 min。
- ⑨ 将 20 μ L EB 滴加在膜中间, 室温放置 2 min, 转速 12000 rpm 离心 2 min。
- ⑩ 将吸附柱和离心管以转速 12000 rpm 离心 2 min, 收集。

4.2.3 T 载体构建

- ① 用小离心管配置体系, 轻轻混合 (载体与片段摩尔比为 1:7 大约 1 kb ~ 20 ng ~ 0.5 μ L)。
- ② PCR 仪控温, 在室温 (20-37°C) 下反应。
- ③ 将小离心管置于冰上。

4.2.4 转化

- ① 取感受态细胞 T1 Phage Resistant 置于冰上 10 min 融化。
- ② 加入连接产物, 轻弹混匀, 冰浴 20-30 min。
- ③ 42°C 水浴热激 30 s, 立即置于冰上 2 min。
- ④ 加入 250-500 μ L LB, 混匀, 在 37°C 200 rpm 条件下, 摇菌 1 h。
- ⑤ 转速 4000 rpm 离心 1 min, 弃上清液。
- ⑥ 轻弹, 取菌液, 在超净台上将菌液均匀涂抹在 LB 培养基上。
- ⑦ 将培养基倒置, 37°C 恒温箱过夜。
- ⑧ 每一个 LB 培养基取 10 个离心管, 在超净台上加入 300-500 μ L 卡那霉素抗性 LB 培养基。

- ⑨ 蘸取 10 个菌点, 把枪头留在离心管内, 或使劲摇晃将菌点加入离心管。
- ⑩ 在 37°C 200 rpm 条件下, 摇菌 3-4 h。

4.3 石蜡切片

- ① 取材及固定: 剥取不同发育时期的材料并立即浸入 FAA 固定液 (90 份 50%乙醇、5 份冰醋酸和 5 份甲醛) 中, 减压浸透后固定 12-24 h;
- ② 脱水和透明: 材料依次经过 30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、85%乙醇、95%乙醇、100%乙醇 (两次) 进行脱水, 每级乙醇梯度 30min; 脱水后的材料再依次进入 1:2 二甲苯乙醇溶液、1:1 二甲苯乙醇溶液进行透明, 每个梯度也是 60min;
- ③ 浸蜡: 为材料更换二甲苯并加入等体积的碎石蜡 (熔点为 58-60°C) 后置于 37°C 温箱中至少 3h, 使石蜡慢慢溶解, 然后将材料和未溶解的石蜡转入 42°C 温箱中继续溶解, 并打开瓶盖在 42°C 条件下过夜, 使二甲苯尽量蒸发, 最后材料转移至 62°C 温箱中使二甲苯完全蒸发, 并更换两次纯蜡, 每次间隔 2h;
- ④ 包埋、修块及切片: 包埋时, 迅速将材料在包埋用的小纸盒中摆好方向并静置数分钟, 等石蜡表面凝固后轻轻地将小纸盒防入冷水中, 使石蜡快速凝固; 根据所观察的切面的情况对材料进行进一步修块, 然后进行切片, 切片厚度为 8 μ m, 将切片整齐地摆在涂有多聚赖氨酸和蒸馏水 (用作展片剂) 的洁净载玻片上, 在 45°C 左右的恒温台上展片后吸取多余的蒸馏水, 将切片置于 37°C 温箱中干燥 1-2 天;
- ⑤ 脱蜡染色;
- ⑥ 封片: 将切片在二甲苯中脱蜡 5-10 min, 再在二甲苯中浸洗 5 min 后, 在载玻片上粘有材料的部位滴加适量的加拿大树胶, 在 37°C 温箱中干燥 3 天左右制成永久封片;
- ⑦ 观察及照相: 利用奥林帕斯显微镜对切片进行观察并照相。

4.4 扫描电镜

- ① FAA 固定 (100%酒精: 50 ml, 37-40%甲醛: 10 ml, 乙酸: 5 ml)。固定的步骤包括: 取材并将材料浸泡在固定液中 (醛类固定剂); 使用真空泵温和地抽气, 直到材料沉入固定液内; 固定 12-24h, 中间换一次固定液。所取材料要相对较大, 避免从样品篮空隙中脱落。
- ② 脱水: 过程逐级进行, 一般的程序如下: 50%乙醇 20-30 min; 70%乙醇 20-30 min; 90%乙醇 20-30 min; 100%乙醇两次, 每次 20-30 min。脱水后的样品最好及时干燥。若间

隔时间长, 最好停留在 70%乙醇步骤处。

- ③ 临界点干燥: 材料转移到无水硫酸铜-酒精溶液中, 放入样品篮, 酒精要没过材料, 全程过程中材料不能干燥。
- a) 开机;
 - b) 倒酒精, 没过样品篮;
 - c) 制冷 15°C;
 - d) 开 CO₂ 钢瓶气阀;
 - e) 点进气键, 用 slow 档, 开搅拌器转子;
 - f) 进气到液面 2/3 点进气键, 停止进气, 停留 2-5 min 混匀;
 - g) 混匀后, 再点换气键, 液面一定不能低于样品篮 (换气用最低档 1);
 - h) 回到第五步, 重复六次循环;
 - i) 最后一次换气后混匀 20 min;
 - j) 点加热键, 加热至 35°C, 78 个大气压, 停留 5-10 min;
 - k) 放气。
- ④ 喷金 90 s: 15 nm 厚度 (需要相对较厚, 避免电导过低或不均匀)。
- ⑤ 电镜拍照。

五、致谢

感谢北京大学白书农实验室、张传茂实验室的老师、同学们提供的相关仪器设备帮助。

感谢北京大学农学院李霞老师在基因序列分析方面提供的指导。

感谢武汉未来组公司提供的猪笼草 survey 测序结果。

参考文献

1. McPherson, S., *Carnivorous Plants and their Habitats Volume one*. Redfern Natural History Productions, 2010. one.
2. 李峰, 《食虫植物》. 电子工业出版社, 2016.
3. Lloyd, F.E., *The Carnivorous Plant*. Chronica Botanica Company, 1942.
4. Hooker, J.D., *On the origin and development of the pitcher of Nepenthes, with an account of some new Bornean plants of the genus*. Transactions of the Linnean Society 1859. 22: 415–424.
5. Troll, W., *Morphologie der schieldförmigen Blätter*. Planta 1932. 17:153–314.
6. Dkhar, J. and A. Pareek, *What determines a leaf's shape?* Evodevo, 2014. 5(1): p. 47.
7. Owen, T.P., Jr. and K.A. Lennon, *Structure and development of the pitchers from the carnivorous plant Nepenthes alata (Nepenthaceae)*. Am J Bot, 1999. 86(10): p. 1382-90.
8. Bharathan, G., et al., *Homologies in leaf form inferred from KNOXI gene expression during development*. Science, 2002. 296(5574): p. 1858-60.
9. Uchida, N., et al., *Regulation of SHOOT MERISTEMLESS genes via an upstream-conserved noncoding sequence coordinates leaf development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(40): p. 15953-8.
10. Fukushima, K., et al., *Oriented cell division shapes carnivorous pitcher leaves of Sarracenia purpurea*. Nat Commun, 2015. 6: p. 6450.

指导教师及参赛队员简历

指导教师：李峰

北京大学生命科学学院博士，瑞典哥德堡大学博士后，人大附中生物教师，科普作家。

参赛队员：刘骁

刘骁，男，中国人民大学附属中学 2018 届高中生。初高中就读于人大附中早培班。对从初中开始对生物学学习抱有浓厚兴趣，其间多次参加“信息技术在生物学上的应用”、“食品中的生物学”等生物研究性学习课程，并取得良好成绩。高中在李峰老师的指导下，学习生物学的实验研究思想，并曾多次独立完成制作石蜡切片等实验。在校期间积极参加校内活动，曾被评为三好学生，组织参加关爱流浪动物公益讲座。爱好体育运动，喜欢读历史类书籍和小说。

参赛队员：杜一冰

杜一冰，女，中国人民大学附属中学 2017 届高中生。高一、高二就读于科学实验班，在李峰老师的指导下，以课前自学、上课讨论的方式学习了坎贝尔《生物》教材。2015 年参加了中学生英才计划，完成黄瓜卷须结构研究，并在导师推荐下作为中学生代表参加了 12 月的冷泉港亚洲论坛，学习了解大数据与癌症预测的前沿知识。在生物学习之外，积极参加校内外活动。在校担任年级学生会主席，以及学生记者团副团长，并且建立班级微信公众平台，以图文并茂的科普文章介绍同学研究性学习项目成果。校外积极锻炼英语辩论与学术写作能力，参与了全国中学生学术辩论总决赛（英文）并获得全国总冠军。课余时间，爱好读书，尤其喜爱古体诗歌。