

3 种石斛叶绿素荧光、碳同化、气孔联动关系研究

任建武 王兴枝 杨丽娜 高荣孚

(北京林业大学生物科学与技术学院)

摘要: 一些石斛属(*Dendrobium*) 植物光合作用表现为景天酸代谢特征。以鼓槌石斛(*D. chrysotoxum*)、金钗石斛(*D. nobile*)、报春石斛(*D. primulinum*) 为材料,以长寿花(*Kalanchoe blossfeldiana*) 为对照,运用 LI-COR-6400-40 便携式光合作用测定系统,同步测定了 4 种试验材料的光系统 II 电子传递状况和碳同化速率;同时以鲜叶快速制片技术在扫描电镜和激光共聚焦显微镜上观察了相应条件下气孔运动状态及气孔复合体结构。结果表明: CAM 植物报春石斛光下气孔近乎关闭,但是光合作用系统电子传递正常进行。鼓槌石斛、金钗石斛明显存在气孔不均匀开闭现象。具有明显 C_3 植物特征的鼓槌石斛的 PS II 光化学有效量子产量最高。而其他 3 种具有 CAM 植物特征材料的光化学效率相对较低,因此干物质积累缓慢。活体实时观测试验材料光合电子传递、碳同化以及气孔运动的联动状态是研究其景天酸代谢特征的有效手段。

关键词: 光合作用; 叶绿素荧光; 景天酸代谢; 气孔

中图分类号: S718.43 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2011)06-0166-07

REN Jian-wu; WANG Xing-zhi; YANG Li-na; GAO Rong-fu. **Comprehensive linkage among chlorophyll fluorescence , carbon assimilation and stomatal movement of three dendrobia.** *Journal of Beijing Forestry University* (2011) **33**(6) 166-172 [Ch , 21 ref.] College of Biological Sciences and Biotechnology , Beijing Forestry University , 100083 , P. R. China.

Some species within *Dendrobium* demonstrated characteristics of crassulacean acid metabolism. Our objective was to establish an effective measurement system to clarify the comprehensive linkage among chlorophyll fluorescence , carbon assimilation and stomatal movement of three dendrobia. In the research , three species of dendrobia were selected , including *D. chrysotoxum* , *D. nobile* and *D. primulinum*. Meanwhile , *Kalanchoe blossfeldiana* was employed as control. By using Li-6400 portable photosynthesis system equipped with leaf chamber fluorometer , the electron transport of PS II and rate of carbon assimilation were inspected. Meanwhile , the corresponded stomatal movement and the structure of stomata complex on fresh leaf were observed under scanning electronic microscope and confocal laser scanning microscope. The results showed that CAM plant *D. primulinum*'s stoma almost closed under light , but the electron transported in photosynthesis system. The phenomenon of stomatal opening and closing non-uniform was obvious in *D. chrysotoxum* and *D. nobile*. The PS II photochemistry of *D. chrysotoxum* with obvious characteristics of C_3 plant had the highest yield of effective quantum. However , the other three materials accumulated dry matter slowly as low photochemical efficiency. Real-time observation on electron transfer , carbon assimilation and stomatal movement of fresh leaf would be the efficient means to research their characteristics of crassulacean acid metabolism.

Key words photosynthesis; chlorophyll fluorescence; crassulacean acid metabolism; stomata

CAM(crassulacean acid metabolism) 植物有专性和兼性之分,叶片年龄和外界条件变化会导致其光合碳同化途径在 C_3 和 CAM 之间转换^[1]。Cushman^[2]认为,遗传因素、个体发育及环境因素诸

如光强、相对湿度和水分都可以在一定程度上从生理生化方面影响 CAM 植物的表达。Winter 和 Holtum^[3]认为环境导致了冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum*) 的 CAM 碳同化途

收稿日期: 2011-05-25

基金项目: “948”国家林业局引进项目(2006-4-C07)。

第一作者: 任建武, 博士, 副教授。主要研究方向: 花卉栽培生理、药用植物学、农产品贮藏与加工。电话: 010-62337116 Email: jianwu@bjfu.edu.cn 地址: 100083 北京市清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

本刊网址: <http://journal.bjfu.edu.cn>

径。Ulrich^[4]从分子起源、代谢机制、生理、个体生态、群体生态等不同层面论述了 *Clusia* 属植物的 CAM 特征及其调控方式,并将其分为4种光合生理方式: C_3 、CAM、 C_3 -CAM、CAM-idling。

石斛属(*Dendrobium*)植物光合作用碳同化途径具有 CAM 植物特征^[5-9]。对于兼性和专性 CAM 植物来说,以气体交换的方式测得的表观光合作用速率并不能反映叶绿体内实际光合作用状况;而叶绿素荧光动力学技术可以不受气孔开闭的限制,用来探测光系统 I 和光系统 II 的电子、质子以及能量传递运输状况^[10-11]。界定不同程度的 CAM 植物^[12],需要有 C_4 双羧酸含量^[13-14]、PEPC 活性^[15-16]、Rubisco 活性、气孔的昼夜变化节律作为佐证。其中最直接的证据莫过于观察到气孔的实时运动状态^[17-18]。因此,活体实时观测石斛属植物光合电子传递^[19]、碳同化以及气孔运动的联动状态应是研究其 CAM 植物特征的有效手段。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为盆栽报春石斛(*D. primulinum*)、金钗石斛(*D. nobile*)、鼓槌石斛(*D. chrysotoxum*);对照材料选用长寿花(*Kalanchoe blossfeldiana*)。分别采用 0、100、500 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的光照强度处理试验材料 8 h,试验采用 LED 人工光源,3 组光源从不同角度辐照以确保叶片受光均匀,3 组光源均为距离叶片 (20 ± 5) cm;试验环境温度昼 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、夜 (20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,空气湿度 60%,于 09:00—11:00 测定。

试验在北京林业大学分析测试平台、植物光生物学研究室完成。

1.2 方法

1.2.1 二氧化碳同化速率和叶绿素荧光动力学测定

采用美国 LI-COR-6400-40,荧光叶室同步测定净光合作用速率和叶绿素荧光动力学参数。选用生长状态中等、均匀一致的4种试验材料各10株,每株标定同一生长方向的成熟叶片3片,仪器稳定后,测定叶片的净光合作用速率(P_n)、气孔导度(G_s)、胞间二氧化碳浓度(C_i)、蒸腾速率(T_r),连续3次读数,取平均值,记录。

6 h 黑暗适应处理后,采用调制式荧光测量原理测定叶绿素荧光参数,作用光强度分别为 100、500 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。

1.2.2 扫描电镜法观察气孔变化

仪器设备:日立(HITACHI)S-3400N型扫描电子显微镜。加速电压模式 5 kV,分辨率 4.0 nm,放

大倍数 200 ~ 5 100。

清理样品台,剪下长 10 mm、宽 8 mm 双面碳导电胶带,撕掉下面保护膜,粘贴在样品台上并撕下上表面保护膜,用锋利刀片迅速切取 4 ~ 5 mm 宽、6 mm 长的带中脉叶块,粘贴于导电胶带上,做好标记。安装样品,高度 13 cm。

分别于放大倍数 200、1 000、部分细部 3 000 观察气孔状态。

1.2.3 激光扫描共聚焦显微镜技术研究气孔动态变化

仪器系统为:Confocal Laser Scanning Microscope-Leica TCS SP5;荧光显微镜:Leica DMI6000CS。采用断层扫描,多重荧光的断层扫描及重叠技术研究气孔动态,制片方法运用鲜叶快速切片法。

鲜叶快速切片法:迅速剪切 LI-COR-6400 测定过的叶片,纯净水漂洗,于盛有薄层纯净水的培养皿中切取叶块,叶块包含中脉,叶块面积为 3 mm \times 5 mm,轻轻夹住叶块使之直立,记住叶片正反面;以锋利刀片沿铲形镊内侧切下,得到厚度小于 0.1 mm 均匀的材料;将材料平展放在滴有纯净水的载玻片上,盖上盖玻片,上镜观察。

所有数据均用 EXCEL 和 DPS 统计软件进行整理。

2 结果与分析

2.1 光合作用、叶绿素荧光、气孔运动之间的关系

使用 LI-COR-6400-40 光合仪配荧光叶室,光合作用碳同化与叶绿素荧光指标同步测定,得到4种试验材料的光合作用及叶绿素荧光相关参数,列于表 1、2。

由表 1 可见,报春石斛从其光合作用指标的数值来看,具有比较鲜明的景天酸代谢植物特征,微弱光下其光合作用速率较高,气孔开张;而在相对强光下,气孔关闭,表观光合作用速率显示为负值。鼓槌石斛随着光照强度的增大,气孔开度增大,蒸腾速率加强,光合作用速率加速,数值分别达到 161 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、0.398 3 $\text{mmol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、2.96 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$;金钗石斛在低光强下光合作用速率高,气孔开度较大,黑暗中气孔关闭,二氧化碳交换速率为负值,低至 -1.04 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,当光合有效辐射达到 500 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时,产生光抑制,但是气孔并没有关闭。另外,鼓槌石斛和金钗石斛的叶片气孔随光合作用有效辐射的增强而开张增大,表观光合作用速率、气孔导度、胞间二氧化碳浓度、蒸腾速率都发生相应变化,表现出一定程度的 C_3 植物特征。

表 1 4 种试验材料的光合作用相关参数表

Tab.1 Parameters related to photosynthesis measured via LI-COR-6400-40 for four species employed in the trials

种名	有效辐射 (PAR)/(μmol· m ⁻² ·s ⁻¹)	P _n /(μmol· m ⁻² ·s ⁻¹)	G _s /(mol· m ⁻² ·s ⁻¹)	C _i / (μmol·mol ⁻¹)	T _r / (mmol·m ⁻² ·s ⁻¹)	气孔开度 S _a / μm ²	气孔宽度 W/μm	气孔长度 L/μm
长寿花	0	1.210 ± 0.102	0.005 84 ± 0.001	136 ± 2.66	0.112 0 ± 0.024	62.4 ± 7.2	2.6 ± 0.12	24.0 ± 3.2
	100	0.147 ± 0.013	0.005 06 ± 0.001	356 ± 18.35	0.084 2 ± 0.018	34.5 ± 4.1	1.5 ± 0.03	23.0 ± 3.5
	500	-1.690 ± 0.128	0.002 49 ± 0	1 150 ± 69.87	0.047 5 ± 0.005	10.4 ± 1.8	0.4 ± 0.01	26.0 ± 2.8
鼓槌石斛	0	-2.620 ± 0.225	0.001 99 ± 0	1 660 ± 108.36	0.069 2 ± 0.004	11.4 ± 1.3	0.6 ± 0.02	19.0 ± 2.1
	100	1.040 ± 0.091	0.003 26 ± 0	216 ± 19.68	0.236 5 ± 0.029	54.6 ± 7.3	2.6 ± 0.18	21.0 ± 2.6
	500	2.960 ± 0.228	0.008 90 ± 0.001	132 ± 5.21	0.398 3 ± 0.048	161.0 ± 18.0	7.0 ± 0.62	23.0 ± 3.0
金钗石斛	0	-1.040 ± 0.086	0.000 56 ± 0	1 237 ± 112.66	0.022 6 ± 0.003	12.0 ± 1.9	1.5 ± 0.09	8.0 ± 0.9
	100	1.550 ± 0.139	0.004 25 ± 0	266 ± 28.27	0.096 1 ± 0.006	82.8 ± 9.1	6.0 ± 0.38	13.8 ± 1.4
	500	-0.051 ± 0.003	0.006 34 ± 0.001	472 ± 39.26	0.068 2 ± 0.007	147.0 ± 15.4	7.0 ± 0.49	21.0 ± 2.2
报春石斛	0	2.700 ± 0.226	0.001 96 ± 0	171 ± 19.32	0.112 6 ± 0.095	72.0 ± 9.5	4.0 ± 0.38	18.0 ± 2.1
	100	0.493 ± 0.038	0.001 39 ± 0	603 ± 69.22	0.083 6 ± 0.009	15.6 ± 2.1	1.3 ± 0.12	12.0 ± 1.7
	500	-2.020 ± 0.196	0.001 08 ± 0	732 ± 83.51	0.009 2 ± 0.002	9.6 ± 1.1	0.6 ± 0.03	16.0 ± 1.9

注:表中样本数为 30。下同。

表 2 4 种试验材料叶绿素荧光相关参数表

Tab.2 Parameters related to chlorophyll fluorescence measured via LI-COR-6400-40 for four species employed in the trials

种名	PAR/(μmol· m ⁻² ·s ⁻¹)	最小荧光 (F ₀)	最大荧光 (F _m)	光下最小荧光 (F ₀ ')	光下最大荧光 (F _m ')	瞬态荧光 (F _s)	最大光量 子效率 (F _v /F _m)	光下最大 光量子效率 (F _v '/F _m ')	有效光量 子产量 (Φ _{PSII})
长寿花	0	180.6 ± 12.6	969.3 ± 83.9	0	0	0	0.813 ± 0.065	0	0
	100	188.5 ± 15.2	989.6 ± 92.4	559.2 ± 48.5	1 297.3 ± 93.8	670.2 ± 62.3	0.810 ± 0.032	0.569 ± 0.028	0.483 ± 0.038
	500	189.3 ± 19.6	955.2 ± 92.2	402.4 ± 39.2	678.1 ± 51.6	512.0 ± 44.2	0.802 ± 0.043	0.407 ± 0.033	0.245 ± 0.019
鼓槌石斛	0	197.3 ± 16.3	1 089.4 ± 102.3	0	0	0	0.819 ± 0.051	0	0
	100	176.5 ± 18.1	903.8 ± 86.2	214.7 ± 22.3	887.1 ± 62.7	287.7 ± 31.5	0.805 ± 0.052	0.758 ± 0.046	0.676 ± 0.039
	500	207.8 ± 21.3	1 245.4 ± 113.5	289.0 ± 29.2	1 297.3 ± 88.2	602.0 ± 58.2	0.833 ± 0.048	0.777 ± 0.052	0.706 ± 0.057
金钗石斛	0	160.0 ± 15.5	762.1 ± 82.5	0	0	0	0.790 ± 0.049	0	0
	100	179.0 ± 18.1	771.1 ± 80.6	167.1 ± 15.3	483.1 ± 32.1	210.5 ± 19.3	0.768 ± 0.056	0.654 ± 0.038	0.564 ± 0.044
	500	221.0 ± 19.8	855.7 ± 82.6	447.9 ± 42.6	702.0 ± 54.7	615.7 ± 46.8	0.742 ± 0.039	0.362 ± 0.019	0.123 ± 0.009
报春石斛	0	154.7 ± 16.2	656.9 ± 79.1	0	0	0	0.764 ± 0.045	0	0
	100	168.6 ± 18.8	789.2 ± 72.5	177.3 ± 19.3	707.1 ± 61.8	248.9 ± 16.9	0.786 ± 0.047	0.749 ± 0.029	0.648 ± 0.031
	500	172.2 ± 18.2	819.2 ± 80.3	239.8 ± 20.8	803.4 ± 69.5	391.8 ± 22.5	0.790 ± 0.038	0.702 ± 0.031	0.512 ± 0.022

由表 2 可知,金钗石斛的 F₀ 相对最小,说明捕光天线系统的热耗散较多,其叶片利用弱光的能力较强。鼓槌石斛的 F_m 最大,表明其潜在光合作用能力最强。金钗石斛的最大光量子化学效率偏低,而且在 500 μmol/(m²·s) 光照时,F_v/F_m 低至 0.742,说明这一光照强度已不适合金钗石斛生长,对其产生强烈的光抑制。具有明显 C₃ 植物特征的鼓槌石斛的 PS II 光化学有效量子产量最高。

本试验中气孔开度总体来说与各个种的试验材料净光合作用速率成正相关关系,而与光系统 II 的实际光量子光化学效率没有明显的联系。也正说明气孔开度只是与经过气孔的二氧化碳有关系,而 CAM 植物在细胞内部的二氧化碳同化过程显然无论气孔开、闭都在进行,光下气孔关闭时的碳同化受光系统电子传递形成同化力的直接推动,但是与气孔开度的关系不大(表 3)。

表 3 光合作用速率、叶绿素荧光及气孔运动综合相关关系

Tab.3 Comprehensive relationship among apparent photosynthetic rate, chlorophylla fluorescence and stomatal movement

	相关系数				
	P _n	G _s	C _i	T _r	Φ _{PSII}
S _a	0.610 7*	0.856 3**	-0.572 6*	0.674 0*	0.067 3
W	0.651 6*	0.756 3**	-0.567 8*	0.583 3*	0.052 0
L	0.083 7	0.601 9*	-0.222 0	0.373 9	-0.001 9

注: * 代表显著, ** 代表极显著。

2.2 石斛叶片气孔不均匀开闭

2.2.1 气孔复合体观察

显微观察结果表明:金钗石斛、鼓槌石斛叶表皮细胞排列整齐、紧凑、致密,而报春石斛叶表皮细胞呈囊泡状。3 种石斛叶片上表皮没有气孔分布,气孔全部位于叶片背面,属于兰科植物常见 Hypostomaty 类型;报春石斛气孔密度为 33 个/

mm^2 ; 金钗石斛气孔密度为 $88 \text{ 个}/\text{mm}^2$; 鼓槌石斛气孔密度为 $172 \text{ 个}/\text{mm}^2$ 。

3种石斛中,金钗石斛和鼓槌石斛叶片表面角质层明显,角质层突起在气孔上形成环状构造,轮廓与气孔相似。角质层的突起将气孔到表皮间的空腔一分为二,形成双重开关。

鼓槌石斛叶片下表皮细胞垂周壁平直,叶片表面具稠密的表皮角质层条纹,表皮细胞轮廓不明显;角质层较厚,纹脊突起处厚度达到 $6.8 \mu\text{m}$,角质层在气孔外侧周围紧贴保卫细胞形成保护性圆环(如图1~5),圆环内缘光滑,稍加厚;在保卫细胞外包被有拱形盖,厚度达 $1.66 \mu\text{m}$,保卫细胞 $22.82 \mu\text{m} \times 8.21 \mu\text{m}$,半月形,气孔侧细胞壁加厚,厚度达到 $1.98 \mu\text{m}$,内部有大量叶绿体存在;表面看,气孔复合体外侧饰纹为两层同心圆环,圆环呈现波状条纹,内层不明显,外层明显突出,整个气孔复合体近圆形,激光共聚焦光学层切后得到连续的光学切片,通过这样的显微CT图片可以看到:在角质层后面,两个保卫细胞为4个表皮细胞所环绕组成气孔复合体,没有副卫细胞,气孔复合体为不规则型。

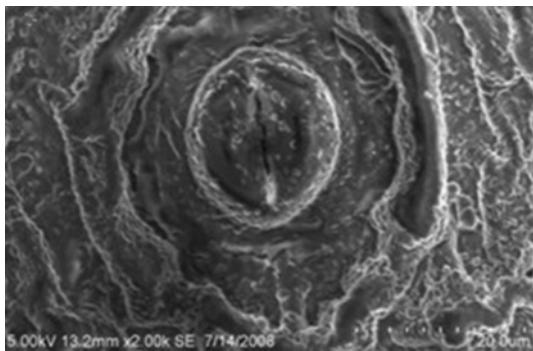


图1 鼓槌石斛叶片下表皮气孔关闭图(2 000 ×)

Fig. 1 Close stomata of leaf backside for *D. chrysotoxum* (2 000 ×)

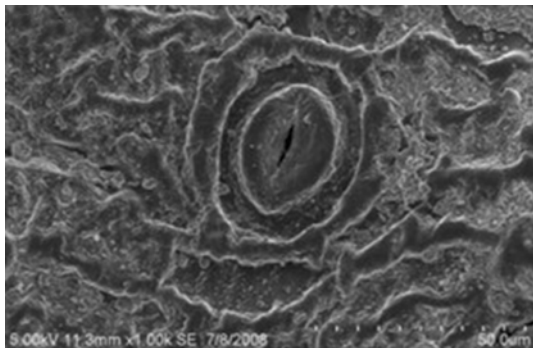


图2 鼓槌石斛叶片下表皮气孔半开图(1 000 ×)

Fig. 2 Half-open stomata of leaf backside for *D. chrysotoxum* (1 000 ×)

金钗石斛叶片下表皮细胞垂周壁平直(如图6~11),表面密被角质层,角质层成线形沿气孔纵轴平行排列,在气孔周围成网状,角质层边缘在紧靠气孔外围形成圆环。下表皮表面角质层外形呈浅波



图3 鼓槌石斛叶片下表皮气孔打开图(1 000 ×)

Fig. 3 Open stomata of leaf backside for *D. chrysotoxum* (1 000 ×)

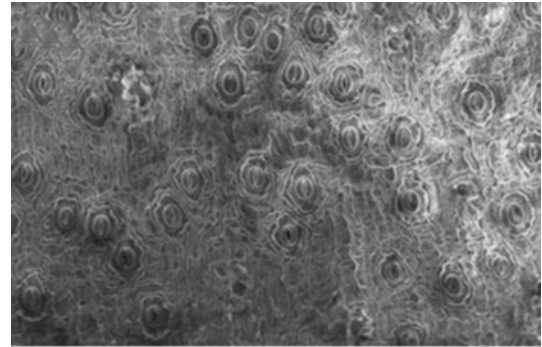


图4 鼓槌石斛气孔不均匀开闭图(200 ×)

Fig. 4 Non-uniform stomata closure for *D. chrysotoxum* (200 ×)

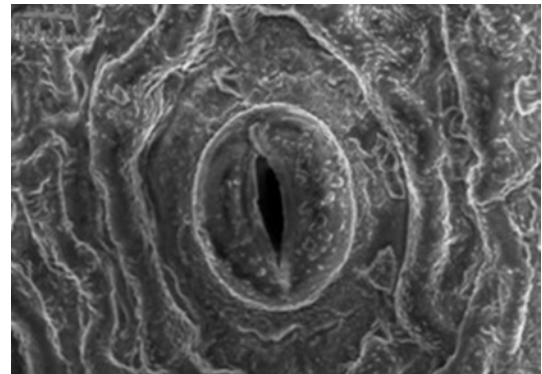


图5 表面看鼓槌石斛气孔复合体图(2 000 ×)

Fig. 5 Image of stomata complex viewed from outside for *D. chrysotoxum* (2 000 ×)

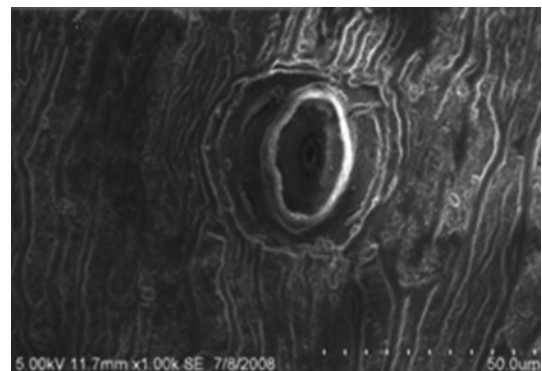


图6 金钗石斛叶片下表皮气孔关闭图(1 000 ×)

Fig. 6 Close stomata of leaf backside for *D. nobile* (1 000 ×)

纹状,激光共聚焦层切分析表明,角质层厚度达 $3.5 \mu\text{m}$ 。气孔为宽椭圆形,外被角质层拱形盖,拱形盖

厚度为 $0.65\ \mu\text{m}$ 。在扫描电镜下,叶片下表皮的气孔外拱盖均为单层,表面光滑或具蜡质小颗粒。外拱盖内缘平滑,或呈不规则的波状。保卫细胞大小为 $13.82\ \mu\text{m} \times 36.65\ \mu\text{m}$,内部分布有大量叶绿体,气孔侧细胞壁中间加厚达 $1.52\ \mu\text{m}$ 。从切面来看,两个保卫细胞被4个表皮细胞围合,没有副卫细胞,气孔复合体亦为不规则型。

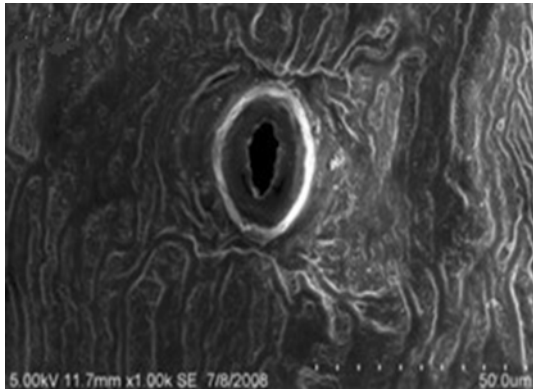


图7 金钗石斛叶片下表皮气孔半开图(1 000 ×)

Fig. 7 Half-open stomata of leaf backside for *D. nobile* (1 000 ×)

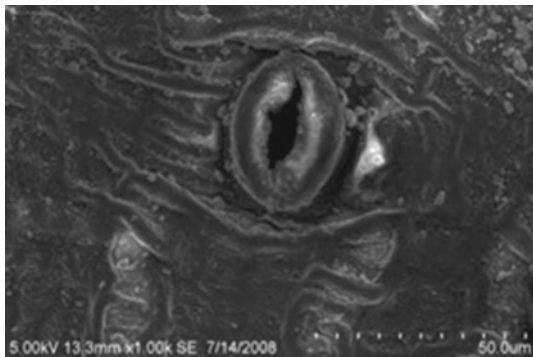


图8 金钗石斛叶片下表皮气孔打开图(1 000 ×)

Fig. 8 Open stomata of leaf backside for *D. nobile* (1 000 ×)

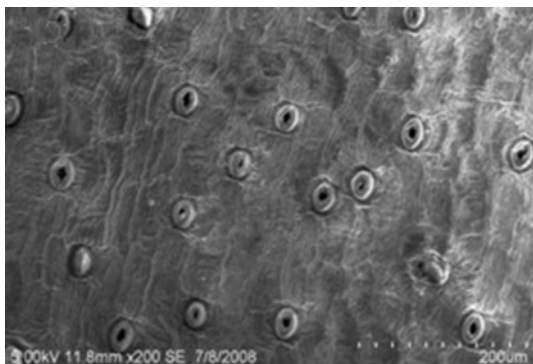


图9 金钗石斛气孔不均匀开闭图(200 ×)

Fig. 9 Non-uniform stomata closure for *D. nobile* (200 ×)

报春石斛叶片下表皮细胞垂周壁平直稍成弧形(图12~17),未见表面覆盖有角质层,表皮细胞清晰可见,成圆球形囊泡状。保卫细胞气孔侧细胞壁稍加厚,达到 $0.43\ \mu\text{m}$,保卫细胞大小为 $15.36\ \mu\text{m} \times 36.21\ \mu\text{m}$,肾形,包括两个保卫细胞的气孔器近圆形,密布叶绿体颗粒。保卫细胞外被拱形盖,边



图10 金钗石斛气孔复合体(1 000 ×)

Fig. 10 Image of stomata complex for *D. nobile* (1 000 ×)

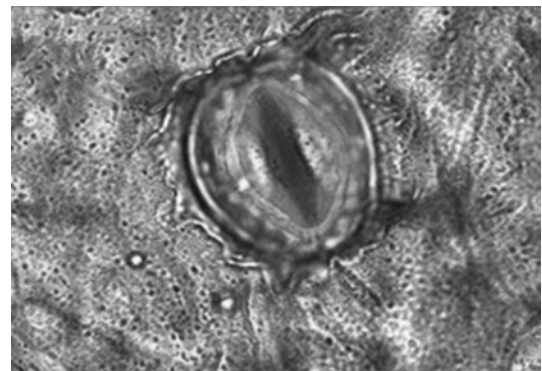


图11 金钗石斛下表皮被角质层覆盖图(3 000 ×)

Fig. 11 Image of top surface on lower epidermis covered by cuticle for *D. nobile* (3 000 ×)

缘不规则波形,有犬牙突起,外缘加厚,厚度为 $1.6\ \mu\text{m}$ 。两个保卫细胞外围由4~5个形状明显更大的表皮细胞包围。没有副卫细胞,整个气孔复合体为不规则型。

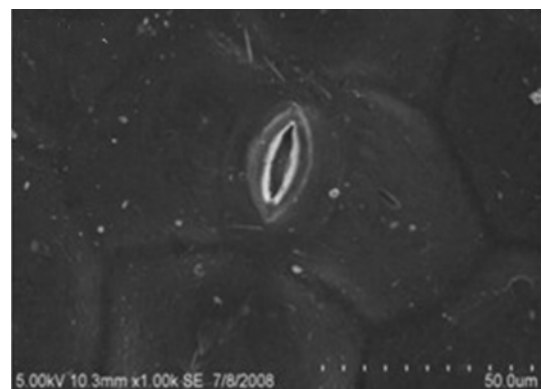


图12 报春石斛叶片下表皮气孔打开图(1 000 ×)

Fig. 12 Open stomata of leaf backside for *D. primulinum* (1 000 ×)

2.2.2 气孔不均匀开闭

参见图4、9、15,试验材料中存在气孔的不均匀开闭现象^[20-21],特别是金钗石斛和鼓槌石斛,表现十分明显,同一视野中气孔的开闭状态差异非常大;在报春石斛、长寿花叶片气孔中也有不同程度的开度差异。

气孔的不均匀开闭主要是影响胞间二氧化碳浓度的计算结果。北京林业大学植物光生物学研究室

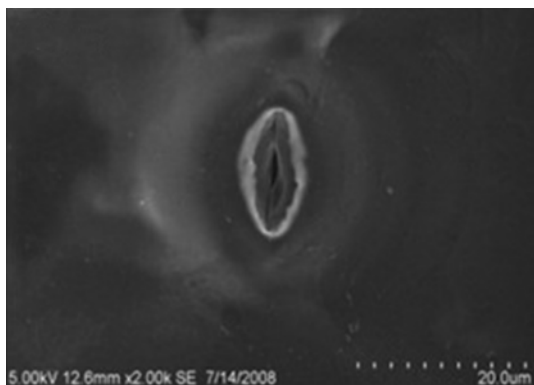


图13 报春石斛叶片下表皮气孔半开图(2 000 ×)

Fig. 13 Half-open stomata of leaf
backside for *D. primulinum*(2 000 ×)

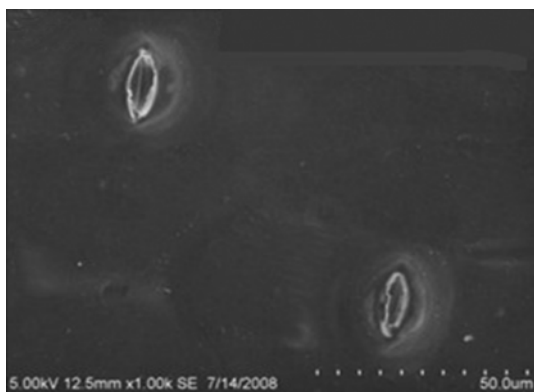


图14 报春石斛叶片下表皮气孔关闭图(1 000 ×)

Fig. 14 Close stomata of leaf backside for *D. primulinum* (1 000 ×)

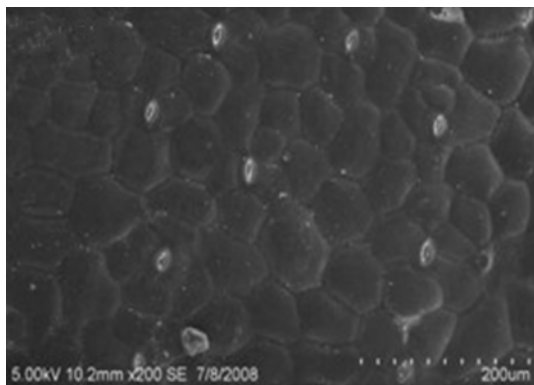


图15 报春石斛气孔不均匀开闭图(200 ×)

Fig. 15 Non-uniform stomata closure for *D. primulinum*(200 ×)

在玉竹的光合作用研究中,发现气孔不均匀开闭的存在,以气孔的长轴长度和短轴长度的乘积表示气孔开度,以一天中所观测到的气孔开度最大值为基数,其他气孔开度值与其相比得到气孔的相对开度,进而计算气孔相对开度与气孔导度的函数关系,得到 $G_s = 196.76 \ln x + 414.61$ (其中 x 代表气孔相对开度)。由于发生气孔不均匀开闭时,各个气孔导度不同,如果以气孔导度的平均值计算胞间二氧化碳浓度,显然会产生误差。因此通过观测到的气孔相对开度值计算气孔导度,代入公式 $C_i = C_a - 1.6P_n / G_s$,得到比较准确的胞间二氧化碳浓度值(其中 C_a

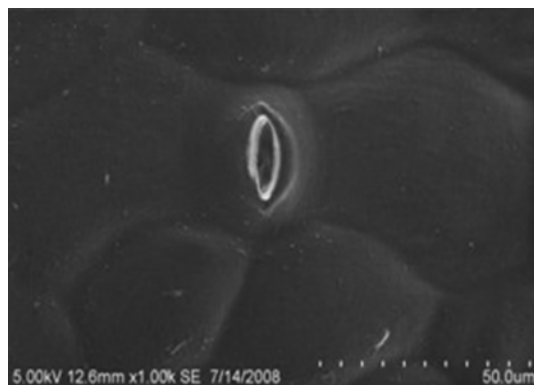


图16 报春石斛气孔复合图(3 000 ×)

Fig. 16 Image of stomata complex for *D. primulinum*(3 000 ×)

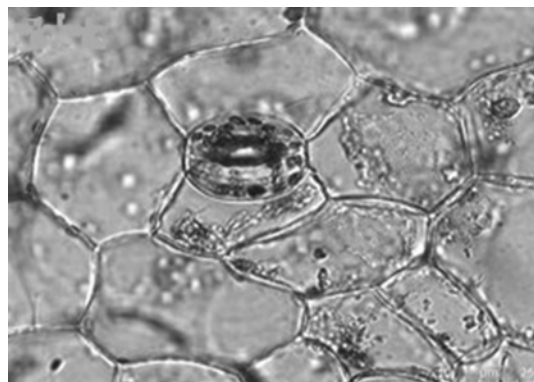


图17 报春石斛气孔内侧图(5 010 ×)

Fig. 17 Image of stomata inside for *D. primulinum*(5 010 ×)

为气孔周围单位体积空气中 CO_2 摩尔数)。

但是该方法源于 Rubisco 活性和 NADPH 变化的推导,适合于 C_3 植物;而对于 CAM 植物目前尚没有可信的计算胞间二氧化碳浓度的模型。本研究表明,在 5 种试验材料中,气孔的不均匀开闭是不同程度地普遍存在的。目前看来,采用单一的测定气体交换或者辅之以独立分离的气孔动态观测都不可能准确地测定 CAM 植物胞间二氧化碳浓度的真实变化。而是应该以同步联动的方法,测定气体交换(二氧化碳、氧气)的同时,非损伤观测气孔实时变化以及电子传递。通过测定电子传递了解真实的叶肉细胞内二氧化碳同化作用动态,而二氧化碳的同化作用最终决定了叶肉组织与外界环境交换气体的来源、组份、绝对数量;通过净光合作用速率的测定掌握叶肉组织内外气体交换的状况;通过同步显微

观察,研究气孔实时变化动态,明确气体交换与气孔变化的内在关系。而目前国内外尚没有专门用来同步测定三者联动关系的仪器,用来进行非损伤活体实时测定。

3 结论与讨论

CAM 植物报春石斛光下气孔近乎关闭,但是光合作用系统电子传递正常进行。鼓槌石斛、金钗石斛明显存在气孔不均匀开闭现象。

3 种石斛的气孔结构相似,气孔复合体为不规则型,没有副卫细胞;保卫细胞外侧罩有拱盖。金钗石斛、鼓槌石斛的叶表皮覆盖有花纹的角质层,而报春石斛没有,叶片下表皮外观与前两者有明显的不同。金钗石斛、鼓槌石斛通过角质层保护来减少水分散失,而报春石斛通过内在生理机制提高水分利用效率。

电镜观察和显微制片都会对植物材料进行预处理,无论这些处理方法是物理的还是化学的,均不同程度地造成对材料的影响,改变气孔的状态。因此显微镜下观察到的气孔往往与活体状态有很大差别。本研究经过多次反复试验,首次使用扫描电镜观察活体植物材料,取得了良好的试验结果,尽可能保持了叶片功能状态的气孔形态;在 confocal 显微制片方面,本研究通过巧妙的创新设计,开创了用最简单的操作工具快速无化学损伤制片的方法。

尽管在试验设计和方法方面有创新,但是碳同化、电子传递、气孔变化研究依然没有做到活体、无损伤、完全同步。可以明确的是,目前的科研技术已经具备开发这样仪器的条件。基本思路应该是:以倒置荧光显微镜为基础,观察一般说来气孔分布比较多的叶片背面,位于形态学下方;而叶片放置在透明底的叶室内,上部加装 LED 光源用来提供作用光;气体交换测定装置与叶室相连。这样便可以同步、实时、非损伤测定碳同化、气体交换、气孔动态。将显微技术、荧光动力学分析技术、光合气体交换测定技术结合起来。

参 考 文 献

- [1] SHORINA M V, RAGULIN V V, KUZNETSOV V V, et al. Are cadaverine and ethylene involved in the induction of CAM photosynthesis in the common ice plant? [J]. *Doklady Biological Sciences* 2005 400(1): 45–47.
- [2] CUSHMAN J C. Crassulacean acid metabolism: A plastic photosynthetic adaptation to arid environments[J]. *Plant Physiol*, 2001, 127: 1439–1448.
- [3] WINTER K, HOLTUM J A M. Environment or development? Lifetime net CO₂ exchange and control of the expression of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* [J]. *Plant Physiology* 2007, 143: 98–107.
- [4] ULRICH L. Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity: questions and lessons from *Clusia*, the only CAM tree in the neotropics [J]. *New Phytologist* 2006, 171: 7–25.
- [5] 蔡永萍, 李合生, 骆炳山, 等. 霍山 3 种石斛的生长节律及其与生态因子关系的研究 [J]. *武汉植物学研究* 2003 21(4): 351–355.
- [6] 蔡永萍, 李玲, 李合生, 等. 霍山石斛叶片光合速率和叶绿素荧光参数的日变化 [J]. *园艺学报* 2004 31(6): 778–783.
- [7] 吕献康, 徐春华, 舒小英. 3 种石斛的光合特性研究 [J]. *中草药* 2004 35(11): 1296–1298.
- [8] 任建武, 王雁, 彭镇华. 3 种温室栽培石斛冬季光合特性研究 [J]. *西北林学院学报* 2009 24(1): 39–43.
- [9] 任建武, 王雁, 彭镇华, 等. 3 种石斛叶片苹果酸含量日变化动态研究 [J]. *江西农业大学学报* 2010 32(3): 547–552.
- [10] ERNST K, WESTHOFF P. The phosphoenolpyruvate carboxylase (ppc) gene family of *Flaveria trinervia* (C₄) and *F. pringlei* (C₃): molecular characterization and expression analysis of the ppcB and ppcC genes [J]. *Plant Molecular Biology* 1997 34: 427–443.
- [11] LI Y G, LI L H, JIANG G M, et al. Traits of chlorophyll fluorescence in 99 plant species from the sparse-elm grassland in Hunshandak Sandland [J]. *Photosynthetic* 2004, 42(2): 243–249.
- [12] FERNANDO B, HEITOR M D, ULRICH L. Responses of chlorophyll fluorescence parameters of the facultative halophyte and C₃-CAM intermediate species *Mesembryanthemum crystallinum* to salinity and high irradiance stress [J]. *Journal of Plant Physiology* 2007, 164(7): 904–912.
- [13] HOANG T K H, AKIHIRO N, SAKAE A. Respiratory properties and malate metabolism in Percoll-purified mitochondria isolated from pineapple *Ananas comosus* (L.) Merr. cv. smooth cayenne [J]. *Journal of Experimental Botany* 2004, 55(406): 2201–2211.
- [14] HOANG T K H, AKIHIRO N, SAKAE A, et al. Malate metabolism in *Hoya carnosa* mitochondria and its role in photosynthesis during CAM phase III [J]. *Journal of Experimental Botany* 2008 59(7): 1819–1827.
- [15] BORLAND A M, TAYBI T. Synchronization of metabolic processes in plants with crassulacean acid metabolism [J]. *Journal of Experimental Botany* 2004 55(400): 1255–1265.
- [16] GRIFFITHS H, COUSINS A B, BAGER M R, et al. Discrimination in the dark, resolving the interplay between metabolic and physical constraints to phosphoenolpyruvate carboxylase activity during the crassulacean acid metabolism cycle [J]. *Plant Physiology* 2007, 143: 1055–1067.
- [17] ANITA R N. Computer-based studies of diffusion through stomata of different architecture [J]. *Annals of Botany* 2007, 100(1): 23–32.
- [18] GREGORY J J, PETER H W, RAYMOND J C, et al. The evolutionary relations of sunken, covered and encrypted stomata to dry habitats in Proteaceae [J]. *American Journal of Botany* 2008, 95(5): 521–530.
- [19] OXBOROUGH K. Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance [J]. *Journal of Experimental Botany* 2004 55(400): 1195–1205.
- [20] MOTT K A, BUCKLEY T N. Patchy stomatal conductance: emergent collective behavior of stomata [J]. *Trends in Plant Science* 2000 5(6): 258–262.
- [21] HAEFNER J W, BUCKLEY T N, MOTT K A. A spatially explicit model of patchy stomatal responses to humidity plant [J]. *Cell & Environment* 2008 20(9): 1087–1097.

(责任编辑 李 斐)