

光合作用对光和二氧化碳响应的观测方法探讨

陈根云*, 俞冠路*, 陈悦, 许大全**

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032

摘要: 用便携式光合仪 LI-6400 观测自然条件下生长的盆栽蚕豆叶片光合作用对光和二氧化碳的响应发现:(1) 用未经过光合诱导的叶片观测光合作用对光的响应会得到即使在全太阳光强下光合作用仍然不饱和的假象;(2) 利用某些经验方程计算的饱和光强远低于实际观测值;(3) 在观测光合作用对 CO₂ 的响应过程中, 每一次 CO₂ 浓度变化都应当伴随一次光合仪的匹配步骤, 否则所得结果偏差很大;(4) 在不饱和光下观测光合作用对 CO₂ 的响应, 会导致对叶片光合能力的低估。

关键词: 净光合速率; 光合能力; 光合诱导; 光合响应; 饱和光强; 蚕豆

中图分类号: Q945

光合作用效率是人们描述光合机构功能和运转状况的基本指标, 是光合机理研究的重要内容, 也是揭示光合作用调节规律的有力工具。人们常说的光合作用效率, 往往涉及光合速率和光合量子效率等一些指标(许大全 2002)。虽然有关光合作用的文献中经常涉及这些指标和参数, 可是对获得它们的方法步骤却很少具体描述(许大全等 1987; Long 和 Hallgren 1985; von Caemmerer 2000), 以致不少初学者提供的这些指标和参数由于所用观测及计算方法失当而缺乏可信性。因此, 很有必要对这些观测方法进行一番探讨。我们以室外自然条件下的盆栽蚕豆为材料, 研究了光合作用对光和 CO₂ 响应的观测中可能发生的一些偏差及后果。

1 材料与方法

1.1 植物材料的培养

从 2005 年夏天收获的蚕豆(*Vicia faba*)种子中选取饱满者, 放在 26 °C 恒温培养箱中发芽, 5~6 d 后种入装土的塑料盆, 置于室外自然条件下生长, 适时浇水。出苗约 30 d 后, 选取刚完全展开的第 3 片

叶(从植株上部数)用于光合作用测定。

1.2 叶片光合作用测定

使用便携式光合作用测定仪(LI-6400; LI-COR, Inc, Lincoln, NE, USA)进行叶片气体交换测定。在测定过程中由该测定仪控制光照强度、CO₂ 浓度和叶室温度。

光合作用对光强变化响应的观测: 考虑到自然条件下生长的 C₃ 植物叶片光合作用的饱和光强即光量子通量密度(photosynthetic photon flux density, PPF)大多在 1 000 μmol m⁻² s⁻¹ 左右的事实, 首先将蚕豆植株置于人工光源碘钨灯(1 000 W)下, 让待测定叶片在 PPF 为 1 000 μmol m⁻² s⁻¹ 的光下、普通空气中诱导约 60 min, 待叶片光合诱导期结束后, 开始进行光合作用对光响应的观测。先从光强 1 000 μmol m⁻² s⁻¹ 开始, 以每次增加 100 μmol m⁻² s⁻¹ 的幅度依次提高光强, 当光合速率不再随光强的增高而增加时, 再以每次递减 100 μmol m⁻² s⁻¹ 的幅度, 逐步将光强降低到 200 μmol m⁻² s⁻¹, 然后以每次变化约 30 μmol m⁻² s⁻¹ 的幅度逐步递减至约 30 μmol m⁻² s⁻¹。在每个光强下停留 2~3 min 后记录光合速率值。

上面叙述的是光合作用对光强变化响应观测的通常作法。为了说明光合作用的光诱导过程结束与否和光强变化顺序对观测结果的重要影响, 比较了观测前被置于黑暗中未经光诱导的叶片在光强由低到高变化时的光响应情况。

光合作用对 CO₂ 浓度变化响应的观测: 具体步骤与 Ainsworth 等(2002)、Long 和 Bernacchi (2003) 所描述的相似。在通过光合作用对光强变化响应的观测确知自然条件下生长的蚕豆叶片光合作用饱和光

2006-06-13 收到, 2006-10-25 接受。

国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2005CB121106)资助。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: dqxu@sippe.ac.cn; Tel: 021-54924231)。

强的前提下,先让待测叶片在饱和光强下和普通空气中诱导约 60 min。在光合作用达到稳态即诱导期结束后,依次在 CO₂ 浓度分别为 350、250、200、150、100、50 μmol/mol 的条件下测定光合速率值,然后将 CO₂ 浓度调回 350 μmol/mol,待光合速率读数稳定后,再以每次变化 100~200 μmol/mol 的步幅逐步调高 CO₂ 浓度,直至净光合速率不再随 CO₂ 浓度增高而增加时(大约 1 200 μmol/mol)止。对于 LI-6400 型分析仪来说,在整个观测过程中,每次 CO₂ 浓度变化后都需要按照仪器说明书指示的步骤进行 1 次光合仪的匹配操作,让同一气体样品流经样品室和参比室,使其重新平衡。然后再停留 3 min 左右后记录这一 CO₂ 浓度下的净光合速率值。

为了说明在对 CO₂ 浓度变化响应的观测中随时进行光合仪匹配操作的必要性和在饱和光下进行这种观测的重要性,还分别在不做这种匹配和光不饱和情况下进行了这种观测,以便比较。

1.3 叶片最大羧化速率和最大电子传递速率的计算

根据 Farquhar 等(1980)、von Caemmerer 和 Farquhar (1981)的模型,植物叶片光合速率(*A*)与有关因素的关系可以用如下公式(1)表示。这里,*O* 为氧浓度,*C_i* 为胞间 CO₂ 浓度,*τ* 为光合作用碳同化的关键酶 1,5-二磷酸核酮糖(RuBP)羧化酶/加氧酶(Rubisco)的专一性因子(specificity factor),*R_d* 为暗呼吸速率。将公式(2)、(3)或(4)代入公式(1),用 SigmaPlot 或其他软件分别计算 *V_c* (Rubisco 羧化速率)、*J* (电子传递速率)和光合产物磷酸丙糖的利用速率(*TPU*)。如果光合作用对 CO₂ 响应的观测是在饱和光下进行的,计算得到的数值就是它们的最大值。其中,*W_c*、*W_j* 和 *W_p* 是分别由 Rubisco 活力、RuBP 和无机磷的再生支持的潜在的 CO₂ 同化速率,*K_c* 和 *K_o* 分别为 Rubisco 对 CO₂ 和 O₂ 的米氏常数,*V_o* 是 Rubisco 加氧速率。

$$A = \left(1 - \frac{0.5 \cdot O}{\tau \cdot C_i}\right) \cdot \min(W_c, W_j, W_p) - R_d \quad (1)$$

$$W_c = \frac{V_{cmax} \cdot C_i}{C_i + K_c(1 + O/K_o)} \quad (2)$$

$$W_j = \frac{J \cdot C_i}{4(C_i + O/\tau)} \quad (3)$$

$$W_p = 3 \cdot TPU + 0.5 \cdot V_o \cdot O \quad (4)$$

1.4 统计分析

实验数据的平均值获得以及作图用 SigmaPlot 9.0 (SPSS, Inc. USA)进行。

2 结果与讨论

2.1 光合诱导对光响应曲线的影响

光合作用是光推动的生物合成过程,在有限光(不饱和)下其速率自然依赖于光照强度。当植物从暗中转移到光下或从弱光转移到强光下时,其光合速率需要经过一个或长或短的诱导过程逐渐达到该光强下的最高水平(Osterhout 和 Hass 1918; Prinsley 和 Leegood 1986),因此在光合诱导未完成时测得的光合速率不能反映叶片的稳态水平。

从图 1 可以看到,经过充分诱导的叶片光合作用的光响应曲线基本上是一条直角双曲线,其整个过程大致可分为 3 个阶段:第 1 阶段(PPFD 小于 250 μmol m⁻² s⁻¹ 的部分)为光合速率随光强增加而直线上升的阶段,直线的斜率即为表观(因为是按入射到叶片的而非叶片实际吸收的 PPFD 计算的)光合量子效率;第 2 阶段(PPFD 约为 250~1 000 μmol m⁻² s⁻¹ 的部分)为光合速率随光强增加而曲线上升阶段;第 3 阶段(PPFD 大于 1 000 μmol m⁻² s⁻¹ 的部分)几乎为一平

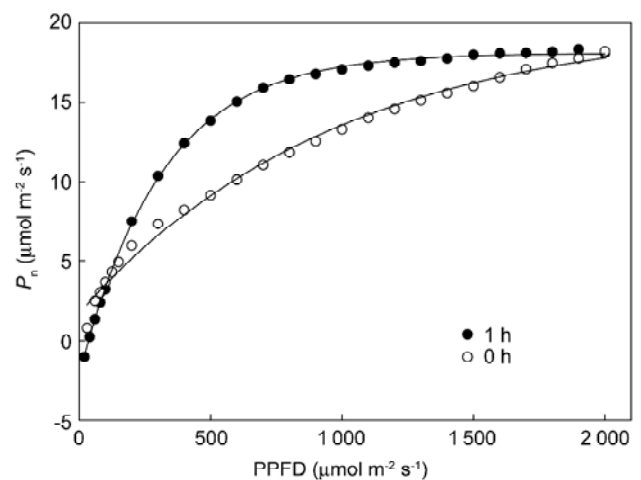


图 1 光合诱导对蚕豆叶片光合作用光响应的影响

Fig.1 Effects of photosynthetic induction on response of photosynthesis to light in broad bean leaves

The observations of photosynthetic response to light were made at 350 μmol CO₂/mol and 12°C. Before observation the fully dark-adapted leaf was induced with light of 1 000 μmol photons m⁻² s⁻¹ for 0 h (open circle) or 1 h (filled circle).

台, 这时光合速率几乎不再随光强的增加而增加, 光合速率已经达到饱和水平(实心点)。而未经光合诱导的响应曲线则明显不同, 其光合速率一直随着光强的增加而升高, 即使光强达到 $2\,000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时, 其光合作用还没有达到光饱和(空心点)。

由此可见, 在进行光合作用对光响应的观测以及作物不同品种或不同处理间光合作用比较时, 都应当特别注意这个光合诱导的问题, 一定要在叶片的光合诱导期结束(在田间条件下常常要在上午10点之后)之后方可进行, 否则会造成很大偏差, 甚至导致假象。

2.2 用光响应观测资料计算的饱和光强不可靠

饱和光强是光合速率不再随光强的升高而增高即光合作用达到饱和时的光强。确定饱和光强有 2 种不同方法: 一是用经验方程对光响应观测资料进行计算和拟合(Walker 1989), 如 Photosyn Assistant 软件就是; 二是根据光响应曲线的走势进行估计。然而, 这样计算得到的饱和光强是否符合实际, 值得认真研究。从图 1 的光响应曲线可以看出, 蚕豆叶片光合作用的饱和光强为 $1\,000\sim 1\,100\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 而用图 1 中叶片经过充分光诱导后观测的数据和这种软件计算得到的饱和光强仅为 $450\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 两者的差别很大。

为了检验这种计算的饱和光强正确与否, 先将刚完全展开的蚕豆叶片置于 $500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的光强下诱导 90 min, 然后测定其在更强的光下的净光合速率(P_n)。结果如图 2 所示: 在光强从 500 开始逐渐增加到 $1\,000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的过程中, P_n 随光强的增强而不断升高, 没有饱和的迹象; 而叶片在 $1\,100\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光强下诱导 40 min 后, P_n 没有随着光强从 $1\,100$ 逐步增强到 $1\,500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 而增加。可见, 叶片光合作用的饱和光强并不是计算的 $450\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 而应该是 $1\,000\sim 1\,100\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。尽管用肉眼从光响应曲线估计的饱和光强不像计算值那样可以“精确”到个位数, 而只能准确到百位数, 说出一个大致的范围, 但是却比计算值更接近真实, 因而也就更可靠。

2.3 CO_2 响应观测中改变 CO_2 浓度时重新匹配光合仪的必要性

LI-6400 光合仪使用说明书指出, 在光合作用测定前或在变换所用空气 CO_2 浓度后, 必须对仪器

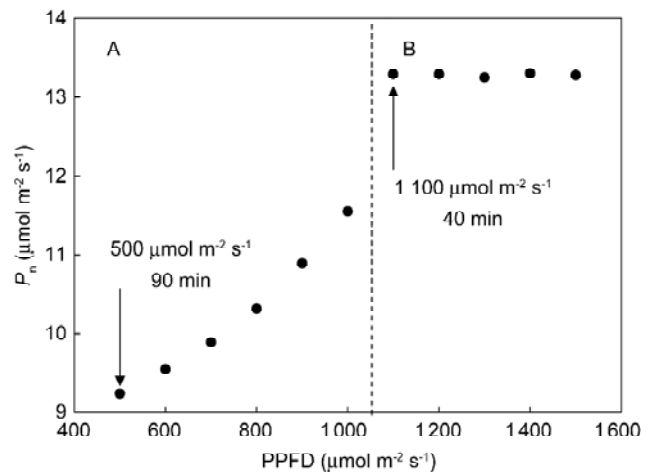


图 2 蚕豆叶片光合作用的饱和光强的检验

Fig.2 Verification of saturating light intensity for photosynthesis in broad bean leaf

Responses of leaf photosynthesis to light were observed at $350\ \mu\text{mol CO}_2/\text{mol}$ and 15°C after pre-illumination with PPFD of $500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for 90 min and $1\,100\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for 40 min, respectively, for Part A and Part B. This experiment demonstrated that the saturating light intensity for photosynthesis in broad bean leaf was $1\,000\sim 1\,100\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ rather than $450\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ calculated from the data of photosynthetic response to light (Fig.1).

进行匹配操作。那么, 在进行 CO_2 响应观测过程中是否有必要每次变换 CO_2 浓度后都要对仪器进行重新匹配? 如果不随时进行匹配结果会怎么样呢? 为了回答这些问题, 我们对 CO_2 响应观测过程中进行匹配和不进行匹配的 2 种情况进行了比较。结果表明, 当胞间 CO_2 浓度(C_i)超过 $600\ \mu\text{mol/mol}$ 之后, 没有采取匹配步骤(实心点)与采取匹配步骤(空心点)后所测得的光合速率值明显不同, 并且这 2 个数值间的差值随 CO_2 浓度的增高而增大, 以至后来净光合速率竟随着 CO_2 浓度的增高而逐渐降低(图 3)。如下实验证明这种降低是与叶片生理状态无关的假象。

众所周知, 当叶室内没有叶片时, 由于没有光合作用和呼吸作用发生, 仪器的净光合速率读数应当为零。可是, 如果在每次改变流经叶室空气的 CO_2 浓度后都不经过仪器重新匹配步骤就读数, 会发现 LI-COR 光合仪的“净光合速率”读数并不总是零, 而是随 CO_2 浓度变化而有规律地变化(图 4)。这表明, 测定前在 $350\ \mu\text{mol/mol}$ 的 CO_2 浓度下对仪器所做的匹配(让同一气体样品流经仪器的样品室和

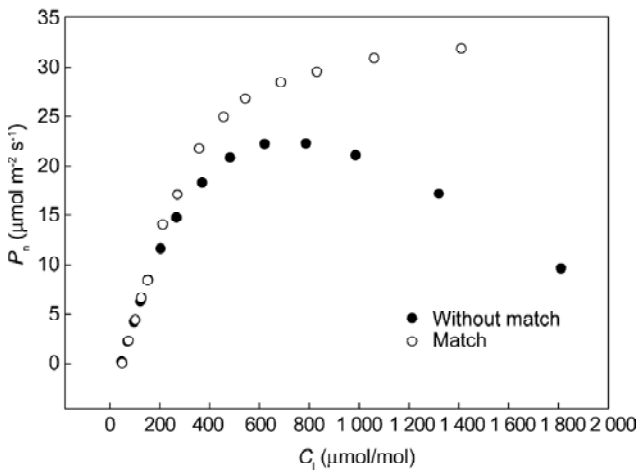


图3 CO₂ 响应观测中采用与不采用匹配步骤所得响应曲线的比较

Fig.3 Comparison of two curves of photosynthetic response to CO₂ in broad bean leaves with (open circle) and without (filled circle) match steps during observation

Observations were made at 1 000 μmol photons m⁻² s⁻¹ and 18°C.

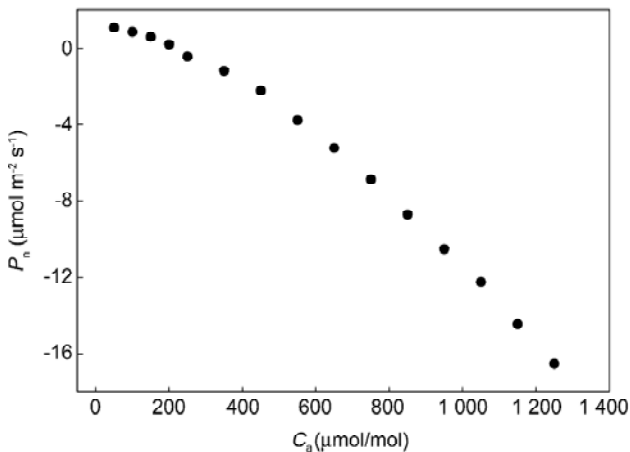


图4 叶室内没有叶片时光合仪读数随流经叶室空气CO₂浓度的变化而变化

Fig.4 Change in reading of the photosynthetic analyzer along with altering of CO₂ concentration of air flowing through the leaf chamber without leaf

Before observation a match step was applied to the analyzer at 350 μmol CO₂/mol and the leaf chamber was closed. Each CO₂ concentration was kept for 3 min before taking reading. C_a: CO₂ concentration in air.

参比室,使它们之间浓度读数差值为零)不适用于其他CO₂浓度下的测定,而且离这个浓度越远偏差越大。看来,在使用LI-6400型光合仪进行CO₂响应

观测的过程中,每次变换CO₂浓度后都必须进行仪器的匹配操作,以保证所得光合速率数值的准确。

用饱和光下光合作用对CO₂响应观测资料计算的体内最大羧化速率(V_{cmax})、最大电子传递速率(J_{max})和最大磷酸丙糖利用速率(TPU_{max})现在被广泛设想为光饱和光合速率的主要限制因素(Long和Bernacchi 2003)。从表1结果可以看到,匹配与否对于 V_{cmax} 、 J_{max} 和 TPU_{max} 的计算值也有很大影响,这再次证明了CO₂响应观测中每次变换CO₂浓度后对仪器进行匹配操作的必要性。

表1 在光合对CO₂响应观测过程中不采用光合仪匹配步骤对 V_{cmax} 、 J_{max} 和 TPU_{max} 计算值的影响

Table 1 Effects of omission of the match step of photosynthetic analyzer during observation of photosynthetic response to CO₂ on the values of calculated V_{cmax} , J_{max} and TPU_{max}

	V_{cmax} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	J_{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	TPU_{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)
Match	45	213	11.9
No match	34.7	127	17.2

V_{cmax} , J_{max} and TPU_{max} were calculated from the data of Fig.3.

2.4 测定光强对于光合作用CO₂响应观测的影响

图5所示为2种光强(PPFD分别为300和1000 μmol m⁻² s⁻¹)下观测得到的P_n对胞间CO₂浓度变化的响应曲线。2条曲线的变化趋势基本相同,都可以分为3个阶段:第1阶段为近似直线段(C_i小于200 μmol/mol),叶片的光合速率随着胞间CO₂浓度的增大而迅速增高,直线的斜率即为叶肉导度或羧化效率(Ku和Edwards 1977);第2阶段为曲线段(C_i为200~1000 μmol/mol),光合速率随胞间CO₂浓度增高而较慢地增高;第3阶段几乎也是直线段(C_i大于1000 μmol/mol),光合速率基本上不再随胞间CO₂浓度的增加而增加,表明它已达到了饱和水平。

当然,在饱和光下测得的光合速率总是明显高于有限光下的测定值。值得注意的是,不同光强下观测计算的Rubisco的羧化速率(V_c)、电子传递速率(J)和磷酸丙糖利用速率(TPU)值差异很大(表2),只有在饱和光下得到的这些参数才是各自的最大值。这说明,必须在使光合作用饱和的饱和光下进行光合作用对CO₂浓度响应的观测,因为非饱和光下的观测会导致对叶片光合能力的低估。因此,在进行

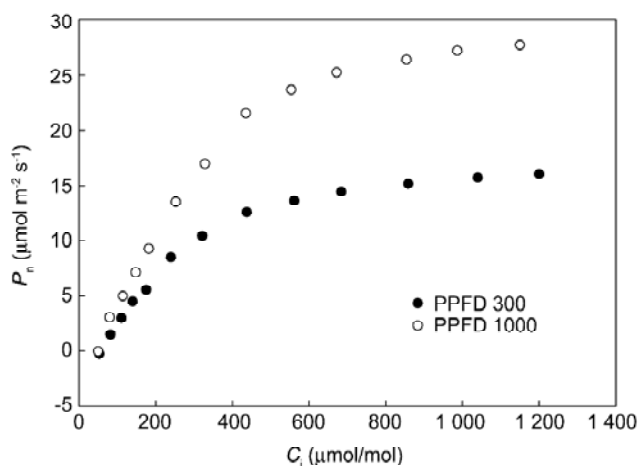


图5 两种测定光强下蚕豆叶片光合速率对CO₂浓度变化的响应

Fig.5 Photosynthetic responses of broad bean leaves to CO₂ concentration changes observed under different light intensities. Before observation the dark-adapted leaf was induced to photosynthesize first at 300 μmol photons m⁻² s⁻¹ (filled circle), then at 1 000 μmol photons m⁻² s⁻¹ (open circle) for 1 h. The photosynthetic responses to CO₂ were observed at given light intensity, 350 μmol CO₂/mol, and 20°C.

表2 从不同光强 (PPFD)下蚕豆叶片光合作用对 CO₂ 响应观测资料计算得到的体内二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)羧化速率 (V_c)、电子传递速率(J)和磷酸丙糖利用速率(TPU)

Table 2 The rates of RuBP carboxylation (V_c), electron transport (J) and triose-phosphate utilization (TPU) *in vivo* calculated from the data of photosynthetic response to CO₂ in broad bean leaf observed at two different photosynthetic photon flux densities (PPFD)

PPFD (μmol m ⁻² s ⁻¹)	V_c (μmol m ⁻² s ⁻¹)	J (μmol m ⁻² s ⁻¹)	TPU (μmol m ⁻² s ⁻¹)
300	26	85.5	7.08
1 000	37	138	17.9

V_c , J and TPU were calculated from the data of Fig.5.

光合作用对 CO₂ 浓度响应的观测之前, 必须通过实验确知被测定叶片光合作用的饱和光强是多少。

参考文献

- Ainsworth EA, Davey PA, Hymus GJ, Drake BG, Long SP (2002). Long-term response of photosynthesis to elevated carbon dioxide in a Florida scrub-oak ecosystem. *Ecol Appl* **12**: 1267-1275
- Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA (1980). A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* **149**: 78-90
- Ku SB, Edwards GE (1977) Oxygen inhibition of photosynthesis II. Kinetic characteristics as affected by temperature. *Plant Physiol* **59**: 991-999
- Long SP, Bernacchi CJ (2003). Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? *Procedures and sources of error. J Exp Bot* **54**: 2393-2401
- Long SP, Hallgren JE (1985). Measurement of CO₂ assimilation by plants in the field and the laboratory. In: Coombs J, Hall DO, Long SP, Scurlock JMD (eds). *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press 62-94
- Osterhout WJV, Hass ARC (1918). On the dynamics of photosynthesis. *J Gen Physiol* **1**: 1-16
- Prinsley RT, Leegood RC (1986). Factors affecting photosynthetic induction in spinach leaves. *Biochim Biophys Acta* **849**: 244-253
- von Caemmerer S (2000). *Biochemical Models of Leaf Photosynthesis*. Collinwood: CSIRO Publishing
- von Caemmerer S, Farquhar GD (1981). Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**: 376-387
- Walker (1989). Automated measurement of leaf photosynthetic O₂ evolution as a function of photon flux density. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* **323**: 313-326
- Xu D-Q (许大全) (2002). *Photosynthetic Efficiency (光合作用效率)*. Shanghai: Shanghai Science and Technique Press (in Chinese)
- Xu D-Q (许大全), Li D-Y (李德耀), Qiu G-X (邱国雄), Shen Y-G (沈允钢), Huang Q-M (黄启民), Yang D-D (杨迪蝶), Beadle CL (1987). Studies on stomatal limitation of photosynthesis in the bamboo (*Phyllostachys pubescens*) leaves. *Acta Phytophysiol Sin (植物生理学报)* **13**: 154-160 (in Chinese)

Exploring the Observation Methods of Photosynthetic Responses to Light and Carbon Dioxide

CHEN Gen-Yun*, YU Guan-Lu*, CHEN Yue, XU Da-Quan**

Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: Through observing the responses of photosynthesis in leaves of broad bean grown under natural conditions to light and CO₂ using a portable photosynthetic analyzer LI-6400, the following findings were obtained. (1) Observing the response of photosynthesis to light using a leaf without being induced by light might lead to an artifact that photosynthesis was not saturated even under full sunlight (Fig.1). (2) The calculated saturating light intensity of photosynthesis by some empirical equations was much lower than actual value obtained by observing (Fig.2). (3) During observation of photosynthetic response to CO₂, each step of changing CO₂ concentration should be accompanied by a match step of the photosynthetic

analyzer, otherwise, there will be substantial deviations in the results obtained (Figs.3,4; Table 1). (4) Observing photosynthetic response to CO₂ at non-saturating light might lead to an underestimation of leaf photosynthetic capacity (Fig.5; Table 2).

Key words: net photosynthetic rate; photosynthetic capacity; photosynthetic induction; photosynthetic response; saturating light intensity; broad bean

This work was supported by the National Basic Research Program of China (No. 2005CB121106).

* The two authors made the same contributions to this study.

**Corresponding author (E-mail: dqxu@sippe.ac.cn; Tel: 86-21-54924231).