

## 问题讨论 Discussion

## 光合作用测定及研究中一些值得注意的问题

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

## Some Noteworthy Problems in Measurement and Investigation of Photosynthesis

XU Da-Quan\*

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

随着科学研究的深入和现代化光合测定系统的推广, 越来越多的植物生理学和植物生态学以及农学、林学、园艺学和遗传学的研究均涉及叶片光合作用的测定。用于叶片光合测定的仪器种类和数量越来越多。这类仪器的使用简便、快捷, 几乎人人都能使用, 即使对光合作用一无所知的人也可以用它在2 min内测得一组光合速率及有关的参数。然而, 尽管使用这类仪器的人很多, 但能利用所得资料写出高水平科学论文的人却很少。其中的原因主要的可能是使用者缺乏足够的有关光合作用的背景知识和测定及研究经验, 测定方法不当, 所得结果不可靠; 或者实验设计不合理, 难以说明问题; 或者是对相关研究现状不清楚, 不能明确地提出科学问题; 或者是对光合作用的基础知识知之太少, 不能对所得结果作出恰当的分析与解释。这几种情况也许兼而有之。为了充分发挥这类现代化但价格昂贵的仪器的作用, 将光合作用研究推向深入, 这里将光合测定与研究中一些常见的问题提出来, 以引起初学者们的注意。

## 1 测定方法

光合作用的一个突出特点是对植物自身生理状态和外界环境条件的变化高度敏感。这一特点, 决定了测定方法的复杂性、多样性和灵活性, 也决定了测定结果的多变性以及解释这些结果时了解植物状态、测定条件、环境条件、背景知识和研究经验的重要性。

**1.1 测定时间** 在田间测定时, 不仅要选择无云或少云的晴天, 以便保证在太阳光强相对稳定的条

件下进行, 而且要注意选择合适的日时段。众所周知, 在晴天, 光强和温度等环境条件从早到晚都呈现规律性变化, 上午逐渐增高, 中午达到最高值, 然后逐渐降低。叶片的光合作用速率也发生类似的变化。光合速率之所以在中午前后才达到最高值, 一是因为上午早些时候光强和温度比较低, 二是因为光合作用还处在逐步增高的光合诱导期中。因此, 在作不同处理或品种的对比测定时, 一定要在光合作用的诱导期结束、光合作用达到稳态之后进行, 否则会得到不可靠、不可比、甚至错误的结果。为了避免可能发生的中午光合作用明显降低(“午睡”或“午休”, Xu and Shen 2005)对测定结果可比性的影响, 以在10:00~12:00和14:00~16:00之间进行测定较为适宜。除了光合作用日变化的观测以外, 过早开始和过晚结束测定, 都不合适。为了尽量缩小测定期间环境条件变化的影响, 比较类实验的测定时间要尽量短, 处理或品种的数目要尽可能少, 最好相互交替进行(许大全 2002), 以便避免较长时间内环境因素变化对测定结果可比性产生的不良影响。

在较长时间阴雨天之后, 叶片的光合活力往往很低, 不宜在转晴后立即测定。至少在转晴半天或1 d后开始测定。有研究表明, 前几天的天气不同(阴雨或晴天), 所得观测结果也不同(Yong等2006)。特别是在观测叶片光合作用的发育变化

收稿 2006-09-29 修订 2006-11-06

资助 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2005CB121106)。

\* E-mail: dqxu@sippe.ac.cn, Tel: 021-54924231

或季节变化时, 更要注意这一点。观测叶片发育期间光合作用的变化, 最好在环境因素可控制的条件下例如人工气候室内进行, 以便避免环境因素变化的干扰(杨巧凤等 1999)。

在室内测定时, 要注意光合作用的诱导期(光合速率逐步增高)是否已经结束(光合速率达到稳定不变的状态, 即稳态)的问题, 在将植物或叶片从黑暗中转移到光下或从弱光下转移到强光下的时候, 测定前一定要在测定光强的光下先照射一段时间(0.5~1 h或更长), 以保证所测定的叶片完成光合作用诱导而达到稳定状态。

**1.2 叶片的选择** 许多研究已经表明, 不仅不同叶位叶片、不同叶龄叶片、同一叶片的不同部位(例如禾本科植物叶片的上、中、下部)的光合速率明显不同(Zhang 等 2005), 而且不同叶片取向或着生角度(平展和直立)也对叶片的光合速率有影响(陈悦等 2002)。因此, 在作对比测定时一定要充分注意所测叶片的叶位、叶龄、叶取向和叶部位等因素的一致性和可比性。由于刚刚完全展开的叶片光合活力最高, 所以在光合作用的比较测定中常常选用为样品叶。不考虑这些因素的差异而随便取一个叶片就测的作法是不适宜的。有的人在介绍其所测定的叶片时喜欢用“功能叶”一词, 其实在多数情况下这是一个含糊的概念, 至少应该标明它的叶位和叶龄(幼、成、老)。

在使用离体叶片进行光合测定时, 一定要在水下剪断叶柄, 并将叶柄插入水中。否则, 如果在空气中剪断叶柄, 木质部导管内水柱收缩后空气会乘虚而入, 此后即使将叶柄插在水中, 水分也不容易进入叶片, 从而导致水分胁迫(许大全 2002)。由于离体叶片的水分供应不如连体叶片, 所以对较大的叶片最好作适当修剪, 保留的叶面积比叶室窗口面积稍大一些即可。经验表明, 叶片离体后光合活力在短时间(例如4 h)内是稳定的, 长时间以后活力会大幅度下降, 不再适用于光合作用测定。另外, 用树木离体枝条上的叶片进行测定, 不是一个好办法, 因为这些叶片很容易由于供水状况不良而导致气孔部分或完全关闭。

有的人为了测定方便, 在测定前临时把田间生长的较大的植株连根挖出来带回实验室测定。这也不是个好办法, 因为部分细根和须根的折断

或丢失会导致气孔导度和光合速率的明显降低。这种移栽的植株叶片光合作用可能至少需2周后才能恢复正常。

**1.3 测定结果的可靠性检验** 在测定过程中, 应当随时检查和分析所得结果的可靠性, 看看有关的指标或参数是否处于正常范围内。例如, 胞间与叶片周围的二氧化碳浓度比是否为0.7左右, 碳同化的量子需要量是否大于8或量子效率是否小于0.125(如果分别小于或大于这些理论值, 则说明测定和计算结果有问题),  $C_3$ 植物光合作用的饱和光强(光量子通量密度)是否低于 $2\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 充分暗适应叶片光系统II的光化学效率是否在0.83~0.85之间,  $C_3$ 植物的 $\text{CO}_2$ 补偿浓度是否大于 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 而 $C_4$ 植物的 $\text{CO}_2$ 补偿浓度是否小于 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; 看看光响应曲线和二氧化碳响应曲线是否合乎规律而流畅自然(通常为一直角双曲线)。如若不然, 参数奇高或奇低, 曲线奇形怪状, 就要及时找出原因: 是植物材料处于某种环境胁迫之下呢, 还是仪器发生故障, 或是测定方法不恰当, 应该及时加以纠正或改善。否则, 一直盲目地测定下去, 不仅得到一些不可靠而没有用处的资料, 而且可能丧失合适的测定时机。特别是田间实验, 生长季节不等人, 往往一些实验想重做都不可能, 只好等待明年。

**1.4 测定条件和环境条件的记录** 由于叶片的光合作用受植物生理状态的制约和环境条件的影响, 生理状态和环境条件的变化往往引起叶片光合速率的明显变化。只有清楚地了解所测定叶片的生理状态和环境条件, 才能对叶片光合速率的变化做出正确的解释。因此, 在记录光合速率和有关参数的同时, 应该详细地记录天气状况、环境条件和测定条件以及植物、叶片的生理状态。这样, 在日后整理、分析光合测定结果和写文章时, 才不会因缺乏这些资料而感到茫无所措。

## 2 研究方法

为了光合作用测定的结果准确、可靠, 能够用于说明问题, 写作具有创新意义的科学论文, 不仅要有正确的测定方法, 而且还要有正确的研究方法, 这包括实验设计合理, 对测定结果进行必要的生物统计、综合分析和深入探讨新现象以及排除实验假象等。否则, 测定的数据再多、工

作再辛苦, 积累的也只能是一些没有多大用途的资料。

**2.1 实验设计** 首要的是目标明确, 围绕已定的科学问题或假说设计实验(见下面第3节)。其次是设置合适的对照。例如, 要想研究人工遮阴对叶片衰老和光合作用的影响, 不仅要观测叶片遮阴不同天数后光合作用的变化, 而且要设不遮阴的对照, 同时观测对照叶片光合作用变化的进程, 因为除了遮阴的作用外, 叶片本身也处在自然衰老过程之中。再如, 要寻找外来物种(由外地引进的物种)迅速扩展的原因, 仅仅观测外来物种的光合作用是不够的, 还应该同时观测本土物种的光合作用, 以便相互比较, 找出外来物种的优势所在。如果是单因子实验, 除了某一因素有不同以外, 处理与对照的其它因素应当完全相同。例如, 在研究低温胁迫的实验中, 如果处理与对照之间不仅温度不同, 而且光强也不同时, 就不能把观测到的差异仅仅归之于低温。

在实验设计中一个比较常见的问题是, 光合速率以单位叶面积计算, 而叶绿素、光合产物含量等却以单位叶片鲜重计算, 这样很难把这些指标联系起来分析、讨论。尤其是在涉及水分胁迫的研究中, 如果也以单位叶片鲜重表示有关物质的含量, 则处理和对照之间一些物质含量的差异很可能是含水量不同造成的假象, 即如果以单位叶面积表示时这些物质的含量在处理和对照之间没有差异。

**2.2 生物统计** 在不少文稿中, 对光合作用的比较测定结果缺乏必要的统计分析, 以至不能确定处理和对照之间或不同品种之间的差异是实验误差呢, 还是处理引起的或不同品种之间确实存在的差异。所以, 如果不经过差异显著水平分析, 就不能随便说什么差异显著与否。

为了便于测定和统计, 应尽量减少相比较的品种数目或处理的数目, 以便测定足够多的样本数。如果所测的样本太少, 即使差异很大也达不到显著水平。有的初学者或缺乏光合测定经验的人, 往往在一次测定中用于比较的不同处理或不同品种的数目太多, 有时竟高达几十个, 以致每个处理或品种只测定2~3片叶, 其结果的可靠性很差。或者虽然每个处理或品种测定的叶片比较

多, 但是由于处理种类或品种过多, 以致整个测定时间拖得很长, 测定期间的光强和温度等环境条件变化较大, 结果是先后测定的资料之间缺乏可比性。根据经验, 在一次测定中, 处理和对照总数或品种总数最好不超过4个, 每个处理或品种测定的叶片数最好不少于10片。当然, 这是对叶片光合速率的比较而言的。对于测定起来比较费时的量子效率和羧化效率等指标来说, 测定的样本数可以少一些, 但是也不宜小于3。在测定光合速率时, 有人喜欢在同一叶片上重复多次, 这样做虽然使一个叶片的测定结果更可靠, 但在统计时, 一个叶片上无论重复多少次, 还是算一个样本, 并不能按多个样本进行统计。

**2.3 综合分析** 认真分析测定结果, 不仅可以判断所得结果是否可靠, 而且还可以对所得结果做出恰当的解释, 同时有可能发现值得深入研究的问题。首先要看有关参数和指标的变化是否与光合速率的变化相互一致, 是否合乎理论的准量关系。如果不一致, 就要找出原因, 是测定有误, 还是计算有误。众所周知, 在光合作用中, 每同化一分子二氧化碳成碳水化合物, 需要消耗3分子ATP和2分子NADPH, 而2分子NADPH的产生是2个光系统的光合电子传递链传递4个电子的结果。这样, 即使在没有光呼吸和氮同化等其它同化作用同时进行的情况下, 电子传递速率也应当是净光合速率的4倍以上, 才可以为碳同化提供足够的同化力。因此, 如果最大电子传递速率小于光合速率的4倍, 说明测定或计算存在某种偏差。又如, 多种阳生植物叶片中叶绿素a/叶绿素b的比值通常为3左右, 只有那些叶绿素b缺乏的突变体和遭受严重环境胁迫的植物这个比值会远大于3, 而阴生植物的这一比值则小于3。如果不是上述几种特殊情况, 这个比值若是远离3, 其可靠性是值得怀疑的, 这很可能与测定叶绿素含量的仪器所用光的波长控制不准确有关。再如, 用叶绿素荧光分析得到的光化学效率变化与光化学猝灭的变化如果方向相反, 也是不可思议的。

虽然不同参数和指标之间的相关分析有用, 但不要做盲目的相关分析, 不要把不同情况下得到的数据不分青红皂白地混合在一起做相关分析, 也不要仅仅根据相关分析结果作结论。否则, 可

能会得出令人难以置信甚至违背常识的结论。例如, 蒸腾速率和气孔导度呈负相关, 光化学效率与光合速率呈负相关, 光合速率与光能利用率呈负相关, 光合速率与大气CO<sub>2</sub>浓度呈负相关等等。应当指出, 在统计光合作用或气孔导度与空气湿度的相关性时, 不应当使用相对湿度值, 而应当用空气的水汽饱和差或叶片与空气之间的蒸汽压亏缺, 因为光合作用或气孔导度响应的是后者, 而不是前者。并且, 在不同温度下, 相同的相对湿度值所反映的空气水汽含量很不相同。

作关于光合速率和气孔导度变化之间的因果关系分析时, 必须依据叶肉细胞间的CO<sub>2</sub>浓度变化, 而不能想当然地根据它们之间的正相关关系下结论。光合速率降低可能是气孔导度降低的结果, 也可能是气孔导度降低的原因。只有叶肉细胞间的CO<sub>2</sub>浓度降低可以证明光合速率的降低是气孔导度降低的结果。相反, 叶肉细胞间的CO<sub>2</sub>浓度增高说明光合速率的降低是气孔导度降低的原因。在光合作用的气孔限制分析中, 胞间CO<sub>2</sub>浓度是一个很有用的参数, 而且多种现代的光合测定仪器在测定光合速率时都能同时给出这个参数, 可惜不少初学者还不知道充分利用它。

**2.4 假象的排除** 在实验中看到新现象是令人高兴的事情, 但在深入研究新现象、提出和证实假说之前, 不仅要多次重复, 而且要用多种方法证明它确实是新现象, 而不是方法不当造成的假象。

例如, 自然条件下生长的许多C<sub>3</sub>植物在光量子通量密度为800~1 600 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>的光下, 它们的叶片光合作用达到饱和, 即光合速率不再随光强的提高而增高。因此, 那些饱和光强高达1 800、2 000 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 甚至2 400、3 500 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>的结果总是让人难以置信, 很可能是在观测叶片光响应的过程中叶温逐步增高或光合诱导期没有结束造成的假象(陈根云等 2006)。顺便要指出的是, 有的人在观测光合作用的光响应时, 使用的光照强度高达2 500、3 000 和3 500 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 这完全没有必要, 因为自然界(海拔很高的高原可能是例外)的植物不可能遇到这么强的光, C<sub>3</sub>植物光合作用的饱和光强也不可能有这么高。并且, 使用这么强的光不仅耗电过多, 不利于田间较长时间的测定, 而且也可能对叶片

造成伤害或破坏。

又如, 在低温光抑制研究中, 如果受处理的是叶片, 那么从低温和光照处理的叶片中分离的叶绿体, 其光合活力会明显低于从常温和光照下(对照)叶片中分离的叶绿体。这是由于光下低温导致光合作用的光抑制甚至光合机构光破坏的结果。但是, 如果处理的不是叶片, 而是离体叶绿体, 其结果会相反: 低温光照预处理的叶绿体的光合活力明显高于常温光照预处理(对照)的叶绿体。显然, 这后一种差异并不是预想的低温光抑制的结果, 而是实验设计不当造成的假象。这是因为, 叶绿体离体后, 多种蛋白酶开始对光合机构起破坏作用。在常温(对照)下的这种破坏作用会远甚于低温下的处理, 因为在生理温度范围内酶的作用是随着温度提高而增强的。

再如, 在观测C<sub>3</sub>植物光合作用对CO<sub>2</sub>的响应时可能会看到, 较高浓度CO<sub>2</sub>下光合速率竟会随着CO<sub>2</sub>浓度的增高而下降, 这大多是在CO<sub>2</sub>浓度变化后没有随时对所使用的光合测定仪进行“匹配”操作(让同一气体流过分析室和参比室并将两室的CO<sub>2</sub>浓度差值调至零)而造成的假象(陈根云等 2006)。

### 3 结束语

光合作用测定及研究的结果最后往往要通过科学论文报告出来。科学论文的灵魂和魅力在于创新, 报告新现象、新结果和新发现, 提出新观点、新思想和新假说, 明确地提出和解决科学问题。例如, 叶片光合作用对光照强度变化的响应, 是人们最常观测的项目。在C<sub>3</sub>植物或C<sub>4</sub>植物中不同种类植物的光响应曲线大致相同, 不同种植物之间往往只有量的差异, 而没有质的不同。所以, 如果没有特殊的科学问题与研究目的, 仅仅泛泛地观测, 是不会得到什么新结果的。然而, 如果把这种观测和某一科学问题例如饱和光下部分捕光天线的可逆脱离联系起来, 情况就不相同(Chen 和 Xu 2006)。

在以光合作用为主要研究内容的文稿和论文中, 最常见而又最基本的问题, 是没有提出和解决科学问题。往往是撒网式地“普查”或者是观测某种处理下光合作用的光响应、CO<sub>2</sub>响应或日变化以及叶绿素荧光参数变化之后, 在笼统的

“光合特性”的题目下, 罗列一堆数据, 泛论一些常识。这样的论文, 报告的往往是重复性或资料性的工作, 谈不上创新。

从事光合作用的测定和研究, 要想获得可靠的结果, 并做出令人信服的解释, 写出具有创新性的文章, 仅仅拥有并且会使用现代化的测定仪器还远远不够, 还应学习光合作用的基础知识, 了解光合作用的主要研究进展, 即获得丰富的背景知识, 并且把观测和研究紧密地结合起来。这样, 才能在观测与研究实践中, 积累丰富的经验, 不断地提出和解决新的科学问题, 有所发现, 有所创新, 有所前进。

### 参考文献

- 陈根云, 俞冠路, 陈悦, 许大全(2006). 叶片光合作用对光和二氧化碳响应观测方法的探讨. 植物生理与分子生物学学报, 32(6): 691~696
- 陈悦, 王学华, 廖轶, 蔡时青, 张海波, 许大全(2002). 水稻剑叶取向对其光合功能的影响. 植物生理与分子生物学学报, 28(5): 396~398
- 杨巧凤, 江华, 许大全(1999). 小麦旗叶发育过程中光合效率的变化. 植物生理学报, 25(4): 408~412
- 许大全(2002). 光合作用效率. 上海: 上海科学技术出版社, 9~19
- Chen Y, Xu D-Q (2006). Two patterns of leaf photosynthetic response to irradiance transition from saturating to limiting one in some plant species. *New Phytol*, 169: 789~798
- Xu D-Q, Shen Y-K (2005). External and internal factors responsible for midday depression of photosynthesis. In: Pessarakli M (ed). *Handbook of Photosynthesis*. 2 nd. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 287~297
- Yong Z-H, Chen G-Y, Zhang D-Y, Chen Y, Chen J, Zhu J-G, Xu D-Q (2006). Is photosynthetic acclimation to free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE) related to a strong competition for the assimilatory power between carbon assimilation and nitrogen assimilation in rice leaf? *Photosynthetica* (in press)
- Zhang D-Y, Wang X-H, Chen Y, Xu D-Q (2005). Determinant of photosynthetic capacity in rice leaves under ambient air conditions. *Photosynthetica*, 43 (2): 273~276