

叶片生长进程中气孔发育对叶温调节的影响

吴冰洁^{1,2,3}, 刘玉军^{1,*}, 姜闯道^{2,*}, 石雷²

¹北京林业大学生物科学与技术学院, 北京100083; ²中国科学院植物研究所北方资源植物重点实验室, 北京100093; ³聊城大学农学院, 山东聊城252059

摘要: 鉴于气孔发育影响气孔导度和蒸腾速率, 推测气孔发育可能影响叶温调节。为验证这一假设并阐述相关规律, 在控光和控温条件下研究了冬青卫矛和河北紫丁香气孔发育、气孔导度、蒸腾速率及其与叶温的关系。结果表明, 伴随冬青卫矛、河北紫丁香叶片生长气孔逐渐增大, 但气孔密度下降; 在此过程中, 气孔导度和蒸腾速率逐步提高, 而叶片温度降低; 尽管冬青卫矛和河北紫丁香叶片的气孔密度和大小差异很小, 但河北紫丁香近轴侧和远轴侧均有气孔分布, 而冬青卫矛则只有远轴侧分布气孔, 且相同条件下河北紫丁香的气孔导度和蒸腾速率高、叶温低。因此, 气孔发育能够促进气孔导度和蒸腾速率提高, 有助于降低叶温; 近轴侧气孔可能更有利于蒸腾降温。

关键词: 气孔发育; 气孔导度; 蒸腾速率; 叶片温度

Effects of Stomatal Development on Leaf Temperature during Leaf Expansion

WU Bing-Jie^{1,2,3}, LIU Yu-Jun^{1,*}, JIANG Chuang-Dao^{2,*}, SHI Lei²

¹College of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ²Key Laboratory of Plant Resources, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ³College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059, China

Abstract: Considering the crucial influences of stomatal development on stomatal conductance and transpiration, we speculated that stomatal development may affect the regulation of leaf temperature. To test this hypothesis, stomatal development, stomatal conductance, transpiration and the relationship between transpiration and leaf temperature were carefully studied in both *Euonymus japonicus* and *Syringa oblata* under controlled light intensity and air temperature. Our results showed that the size of stomata increased gradually with leaf expansion in both *E. japonicus* and *S. oblata*, resulting in increased stomatal conductance and associated transpiration up to the time of full leaf expansion. Stomatal development helped to reduce leaf temperature through transpirationally driven leaf cooling. Although the differences in density and size of stomata were small between leaves in *E. japonicus* and *S. oblata*, there were large differences in stomatal distribution between the two species. Stomata distributed on both sides of leaves in *S. oblata*, while there were stomata only on abaxial side of leaves in *E. japonicus*. Under the same conditions of light intensity and air temperature, the stomatal conductance and transpiration of *S. oblata* were higher than that of *E. japonicus*, but the leaf temperature in *S. oblata* was lower than that in *E. japonicus*. We proposed that adaxial stomata may mainly contribute to reducing leaf temperature by transpiration cooling.

Key words: stomatal development; stomatal conductance; transpiration; leaf temperature

植物新生叶片一般位于冠层顶部或枝条先端, 故往往容易暴露在强光下。此时光合器官的结构和功能尚未发育完善, 叶片光合速率低, 所以通过光合作用碳同化过程利用的光能相对较少。这使得强光很容易诱导幼叶积累较多的过剩激发能并导致光抑制(Krause等1995; Choinski等2003; Jiang等2005, 2006b)。为避免幼叶遭受强光伤害, 光呼吸、依赖叶黄素循环的热耗散以及抗氧化酶系统等与光破坏防御相关的机制在叶片发育初期就迅

速建立起来, 而光合功能的完善则相对滞后(姜闯道等2004; Jiang等2005)。所以, 叶片发育过程中光

收稿 2014-12-02 修定 2014-12-18

资助 北京市自然科学基金(6122025)和北京市科委项目(Z1411-00006014036)。

致谢 中国科学院植物研究所分子生理重点实验室徐秀萃老师和董凤琴老师在显微观察过程中给予大力帮助。

* 共同通讯作者(E-mail: jcdao@ibcas.ac.cn, Tel: 010-62836657; E-mail: yjliubio@163.com, Tel: 010-62336012)。

破坏防御机制的优先构建很可能是植物在长期进化过程中形成的适应强光的策略(姜闯道等2004; Jiang等2005, 2006a, b)。

除强光外, 高温也是一种田间常见的胁迫因子, 而且高温往往与强光相伴存在(Long等1994)。大量研究表明, 高温会导致植物光合速率下降, 伤害光合机构, 甚至诱导叶片死亡(Qiu和Lu 2003; Sharkey 2005; Jiang等2006b; Djanaguiraman等2014; Rakić等2015)。所以, 植物需要有效调节叶温, 从而应对高温胁迫维持光合功能(Matsumoto等2000; Carmo-Silva等2012; Mathur等2014)。众所周知, 叶片蒸腾过程中的水分散失是植物降低叶温的重要措施。而气孔作为控制叶片水分散失的通道在调节叶温方面起着至关重要的作用。

众所周知, 在叶片生长过程中伴随着气孔的发育(Choinski和Wise 1999; Woodall等1998; Wise等2000; Snider等2009; Hall等2014)。我们的前期研究证明, 叶片生长过程中气孔的发育可以通过增加气孔导度缓解光合作用的气孔限制, 从而有助于叶片光合能力的提高(Wu等2014)。很显然, 气孔发育影响叶片气孔导度的同时也势必影响其蒸腾速率, 而蒸腾速率的变化又会涉及叶温调节。Snider等(2009)的研究表明, 自然条件下幼叶的叶温较成熟叶高。但是, Snider等(2009)在证明这一问题时, 幼叶和成熟叶未能严格控制在相同的光强和气温条件下, 即未能完全排除环境因素影响。实际上, 与成熟叶片相比, 自然条件下幼叶因其位于冠层顶部, 所以应该更容易暴露在强光和高温下(Jiang等2005, 2006a; Wright等2006; Tounekti等2012)。而强光和高温能够直接或间接影响气孔开度和气孔导度, 因此我们希望澄清在相同的光照和气温条件下气孔发育状态是否影响其叶温调节? 如何影响? 在本研究中, 我们以冬青卫矛和华北紫丁香为材料对上述问题进行了探讨; 同时, 也讨论了两物种在叶温的调节中存在的差异及可能原因。

材料与方法

1 材料

实验在中国科学院植物研究所植物园内进行。以园区自然生长的常绿阔叶植物冬青卫矛

(*Euonymus japonicus* Thunb.)和落叶植物华北紫丁香(*Syringa oblata* Lindl.)为材料。选择长势一致的冬青卫矛和华北紫丁香各3株, 株高分别为(2.4±0.5) m和(3.07±0.6) m, 胸径分别为(5.46±0.12) cm和(3.7±0.31) cm。选取枝条顶端刚刚长出的叶片进行跟踪研究, 直至叶面积达到最大且完全发育成熟为止。叶片不同发育时期的叶面积用便携式叶面积仪(LI-3000A, Licor, USA)测定, 以完全展开的叶片面积作为100%, 其他各发育时期叶面积与成熟叶片的面积之比×100%表示其相对叶面积。叶面积随时间的变化如表1所示。实验所有参数的测定在2014年4月4日~5月8日进行。此时, 平均气温从17 °C上升至25 °C, 午间最高气温不超过33 °C, 最大光强在1 500~1 650 μmol·m⁻²·s⁻¹之间。

表1 冬青卫矛和华北紫丁香叶片生长过程中叶面积的变化

Table 1 Changes in relative leaf area with time in *E. japonicus* and *S. oblata*

<i>E. japonicus</i>		<i>S. oblata</i>	
叶龄/d	相对叶面积/%	叶龄/d	相对叶面积/%
-20	13.84	-24	19.12
-16	40.85	-20	53.25
0	100	0	100
10	100	10	100

叶龄“0”表示叶面积刚刚达到最大时的叶片, 负值表示叶片幼叶, 正值表示完全成熟叶片。图1~4同。

2 气孔密度和大小的测定

将新鲜的叶片切成2~3 mm的小块, 迅速投入FAA固定液(90 mL 50%乙醇:5 mL冰乙酸:5 mL甲醛)中, 注射器负压抽气去除附着于样品表面的气体, 4 °C固定24 h。进行梯度乙醇(70%、80%、90%、95%和100%)脱水, 和乙酸异戊酯置换(75%乙醇-25%乙酸异戊酯, 50%~50%乙酸异戊酯, 25%~75%乙酸异戊酯, 100%乙酸异戊酯), 各处理20 min。二氧化碳临界点干燥, 粘台、离子溅射仪对金属台喷金、镀膜。并在400倍扫描电镜下观察气孔密度和大小。

两物种的每个叶片发育时期均选取5个叶片样本, 在每个样本上随机选取6个视野, 在Photoshop软件中数出每个视野的气孔数目, 同时度量气孔长轴。气孔的长轴值表示气孔的大小。

3 气体交换参数的测定

选择晴朗的天气分别于9:00~11:00 am, 用英国PP-Systems公司生产的CIRAS-2便携式光合系统进行温度-光合响应曲线的测定, 温度按25、30、35、40 °C的顺序对各发育阶段的两种植物材料进行连续测定。CO₂浓度为400 μmol·mol⁻¹, 光强为1 200 μmol·m⁻²·s⁻¹, 相对湿度为70%。CO₂浓度、光强、湿度及叶室温度由CIRAS-2自动控制, 叶片温度通过能量平衡方式测定。每个温度下适应10 min后测定, 待读数稳定后记录气孔导度、蒸腾速率、水蒸汽压差及叶片温度。

4 统计分析

数据采用SPSS (Version 11.5)进行方差分析(one-way ANOVA), 并在SigmaPlot 10.0中作图并进行相关性分析。

实验结果

1 气孔形态的变化

由图1可以看出, 冬青卫矛的气孔仅仅分布在叶片远轴侧, 而华北紫丁香的气孔在叶片近轴侧和远轴侧均有分布。因为叶片生长过程中气孔分化是连续的, 所以叶片发育初期可以观察到处于不同发育状态的气孔(图1)。不过, 这种气孔间的发育差异会随着叶片的继续生长而减小。统计气孔的形态学特征表明, 冬青卫矛和华北紫丁香叶片的气孔密度都随着叶片生长而逐渐降低, 而气孔平均大小则逐步提高(图2)。此外, 尽管华北紫丁香叶片两侧均有气孔, 但气孔主要分布在远轴侧, 近轴侧气孔密度很低。我们还注意到, 在两者叶片均发育成熟后, 华北紫丁香远轴侧和冬青卫矛远轴侧的气孔密度及大小差异很小(图2)。

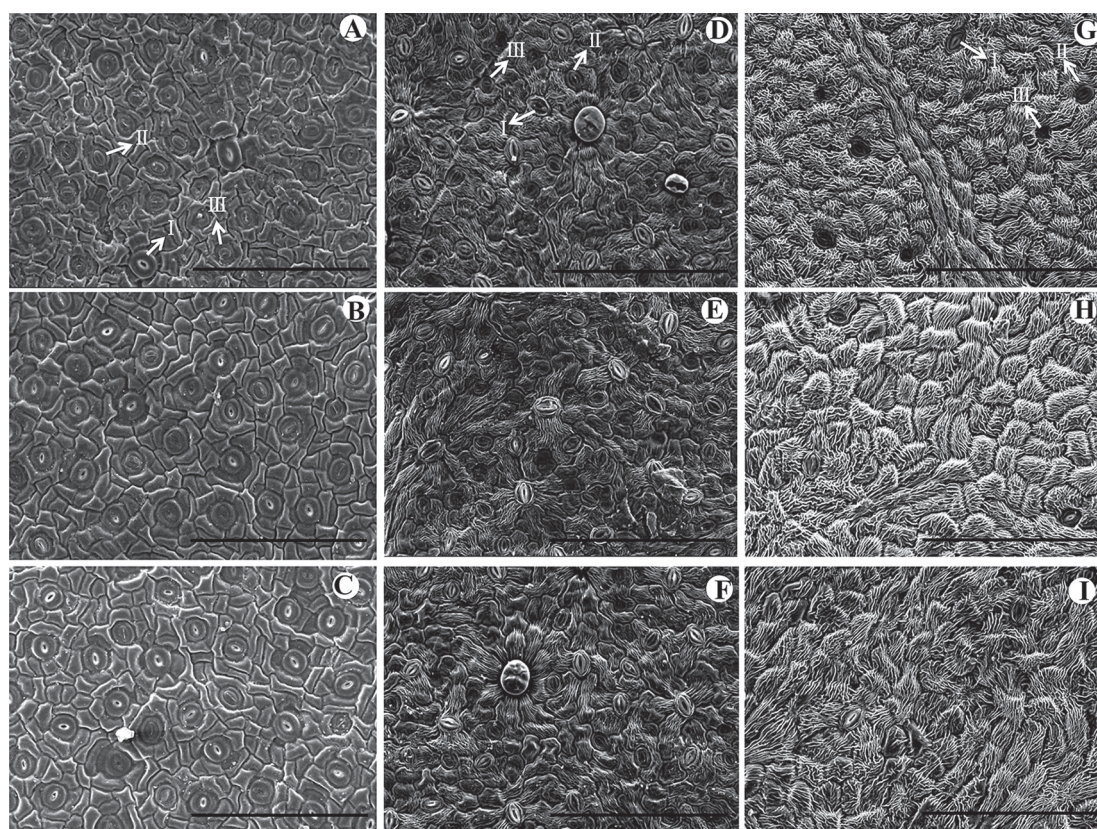


图1 不同叶片发育时期冬青卫矛叶片远轴侧(A~C)及华北紫丁香叶片远轴侧(D~F)和近轴侧(G~I)的扫描电镜图像
Fig.1 Scanning electron micrographs of abaxial surface in *E. japonicus* (A~C) and *S. oblata* (D~F) leaves and adaxial surface in *S. oblata* (G~I) leaves at different stages of leaf development

各图叶龄为: A=20 d; D、G=24 d; B、E和H=0 d; C、F和I=10 d。叶片生长初期不同发育状况的气孔共同存在。根据气孔长轴的大小, 把气孔发育程度划分为三类: 完全发育的气孔(I)、部分发育的气孔(II)和刚刚分化形成的气孔(III)。Bar=100 μm。

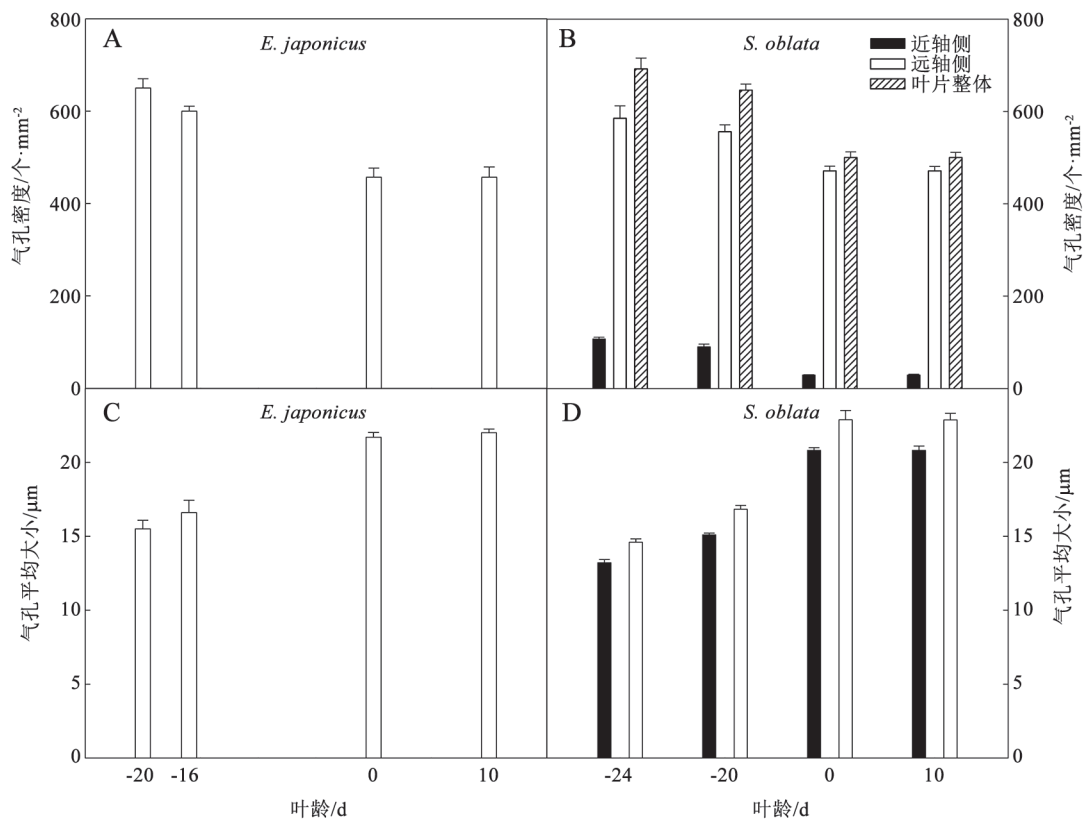


图2 叶片发育过程中冬青卫矛和华北紫丁香叶片的气孔密度(A、B)和大小(C、D)的变化

Fig.2 Changes in the density (A, B) and size (C, D) of stomata during leaf development of *E. japonicus* and *S. oblata*

2 气孔发育对蒸腾速率和气孔导度的影响

如图3所示,在相同光强和处理温度下伴随叶片生长冬青卫矛和华北紫丁香的蒸腾速率和气孔导度均迅速提高。对于同一发育阶段的叶片,其蒸腾速率也随着处理温度的提高明显增加,但是气孔导度则略有降低(图3)。在冬青卫矛和华北紫丁香叶片完全发育成熟后,后者的蒸腾速率和气孔导度都远远高于前者。图3的数据还表明,相同的测定条件下(相同光强和温度)不同发育阶段的叶片其蒸汽压差(vapor pressure deficit, VPD)相似,但是随着处理温度的提高冬青卫矛和华北紫丁香叶片的VPD均迅速增加。

3 气孔发育对叶片温度的影响

如图4所示,相同处理温度和光强条件下伴随叶片生长冬青卫矛和华北紫丁香的叶温均逐渐下降。提高处理温度导致幼叶和成熟叶的叶温都增加,但两者的差值明显扩大。而且,我们还观察到华北紫丁香成熟叶的叶温要低于冬青卫矛成熟叶的叶温。不同温度条件下这一规律相同。此外,计算叶

温与气温之差($T_{\text{leaf}} - T_{\text{air}}$)发现,其趋势与叶温变化一致。当气温达到40 °C时,华北紫丁香成熟叶的叶温低于气温,而冬青卫矛成熟叶的叶温仍高于气温。

讨 论

本研究中,伴随叶片生长冬青卫矛和华北紫丁香的气孔均由小变大,反映了气孔的逐步发育(图2)。伴随气孔发育,我们也观察到气孔导度迅速提高(图3)。不过,随着叶片生长两者的叶面积增加,而气孔密度均逐步下降(图2)。故冬青卫矛和华北紫丁香叶片气孔密度的下降主要是由于其叶面积的快速增加所致。数据表明气孔导度与气孔大小之间具有很好的正相关性(图5)。很显然,气孔导度的增加主要受气孔发育的影响。因此,叶片生长过程中气孔导度的提高应该主要取决于气孔发育,也就是气孔大小,而不是气孔密度。这一结果也暗示,未发育成熟的气孔不具有或者仅具有很少的气体交换功能。进一步分析证明,在相同温度和光强下气孔导度和蒸腾速率之间也存

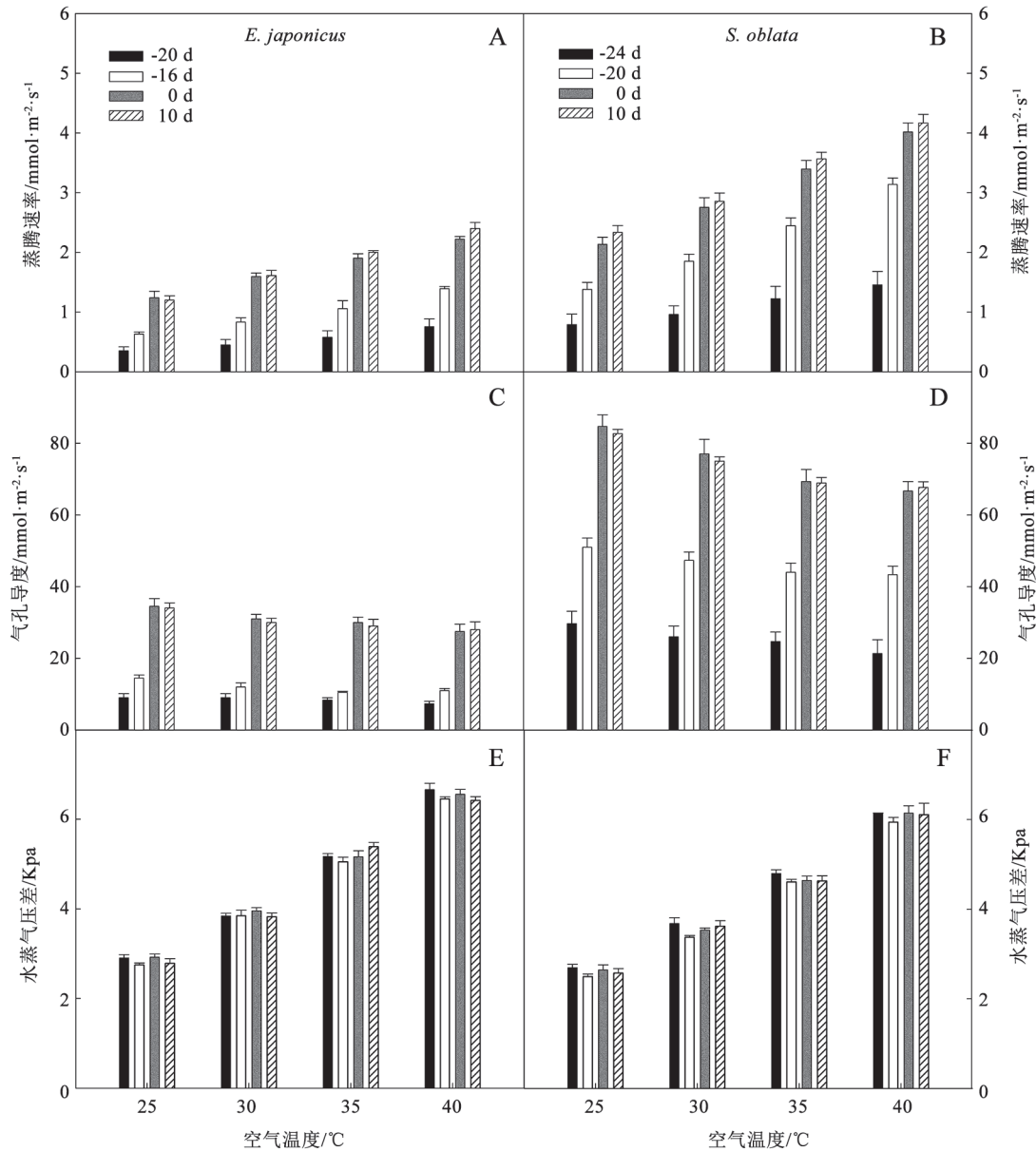


图3 不同气温下气孔发育对冬青卫矛和河北紫丁香叶片蒸腾速率(A、B)、气孔导度(C、D)及水蒸汽压差(E、F)的影响
 Fig.3 Effects of stomatal development on transpiration (A, B), stomatal conductance (C, D) and water vapor pressure deficit (E, F) under different air temperatures during leaf development in *E. japonicus* and *S. oblata*

在很好的线性关系(图6)。所以,我们认为植物在气孔发育过程中通过提高气孔导度,进而增加了叶片的蒸腾速率。但是,我们观察到蒸腾速率并不总是与气孔导度的变化趋势一致。当处理温度从25 °C增加到40 °C的过程中,蒸腾速率逐步提高,但是气孔导度却呈下降趋势(图3)。我们注意到,随着叶室温度的提高叶片蒸汽压差迅速提高(图3-E、F)。因此,温度升高导致的蒸腾速率提高应

该还与叶片内外蒸汽压差的增加有关。众所周知,叶片蒸腾过程中的水分散失可以有效降低叶片温度。本研究中幼叶较低的蒸腾速率与其高的叶温一致,而成熟叶较高的蒸腾速率则与其低的叶温一致(图3、4)。结合气孔发育与气孔导度以及蒸腾速率的关系,我们认为气孔发育可以通过影响气孔导度和蒸腾速率,进而调节叶温。

Snider等(2009)也曾在田间条件下观察到幼叶

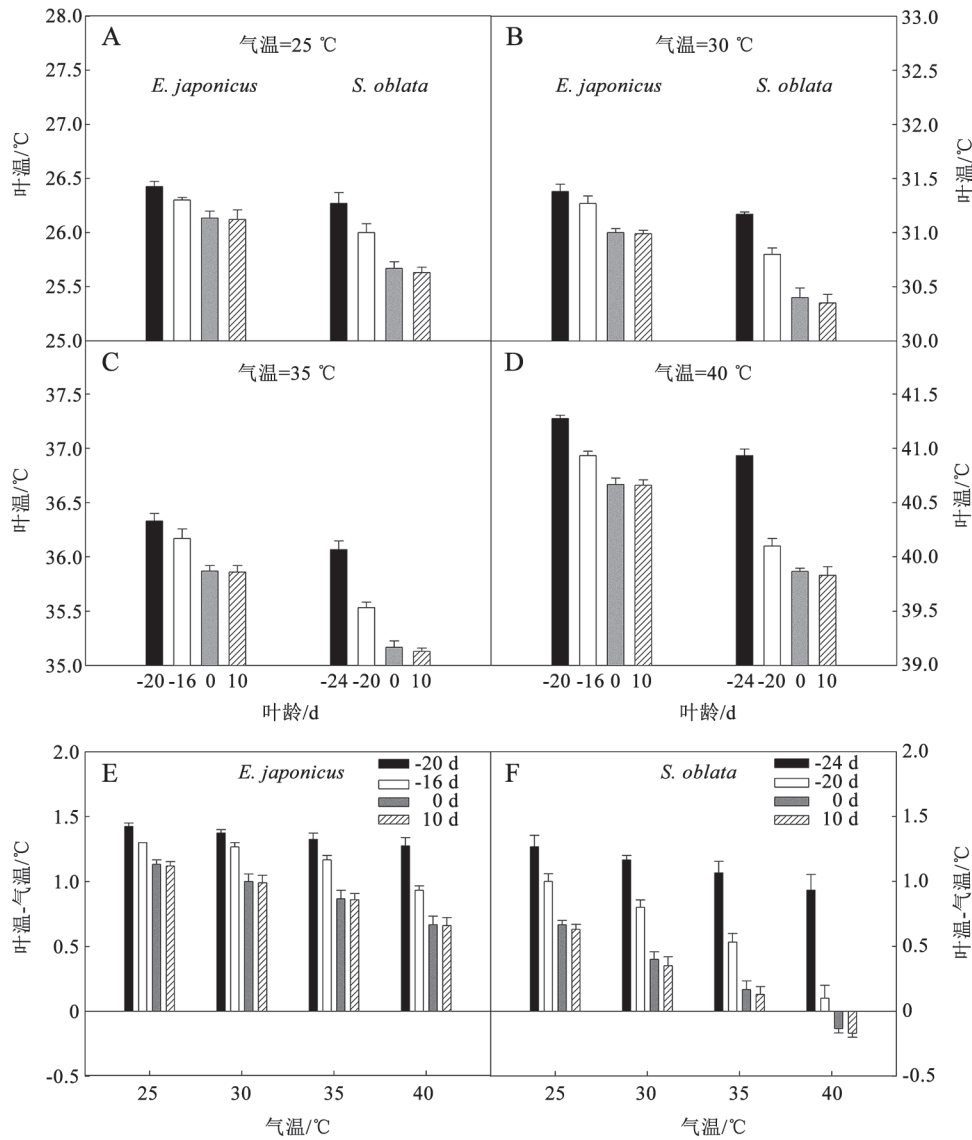


图4 不同气温下气孔发育对冬青卫矛和华北紫丁香叶片叶温(T_{leaf}) (A~D)及叶温和气温之差($T_{leaf}-T_{air}$) (E、F)的影响
Fig.4 Effects of stomatal development on leaf temperature (T_{leaf}) (A~D) and leaf-air temperature differences ($T_{leaf}-T_{air}$) (E, F) under different air temperatures during leaf development in *E. japonicus* and *S. oblata*

叶温较成熟叶高。但是, 自然环境条件下影响叶片温度的环境因素很多, 包括光强和气温(Choinski和Gould 2010)。实际上, 与成熟叶相比, 幼叶因为位于冠层顶部, 所以很容易暴露在强光和高温下(Jiang等2006a, b; Wright等2006; Tounekti等2012)。因此, 只有排除光强和气温的影响才能比较气孔发育状态对叶片温度的影响。本研究中, 我们证明在光强和气温完全相同的情况下气孔发育状态确实可以影响叶片温度。在叶片气孔未发育成熟时叶温较高, 随着气孔发育叶温逐步下降。尽管气

孔发育成熟之前可能导致幼叶具有较高的叶温, 但自然条件下我们很少能够观察到幼叶遭受高温伤害。一方面, 有些植物可能通过改变幼叶悬挂角和叶脉角减少截获的光能(Jiang等2006a), 从而降低高温伤害的几率; 另一方面, 有些植物幼叶的叶绿体膜质不饱和脂肪酸含量增加, 同时抗氧化酶活性提高, 这可能也是植物有效应对高叶温伤害的重要策略(Jiang等2006a, b; Choinski和Gould 2010)。

此外, 我们的数据还表明, 尽管华北紫丁香叶片两侧都有气孔, 但远轴侧的气孔密度远高于近

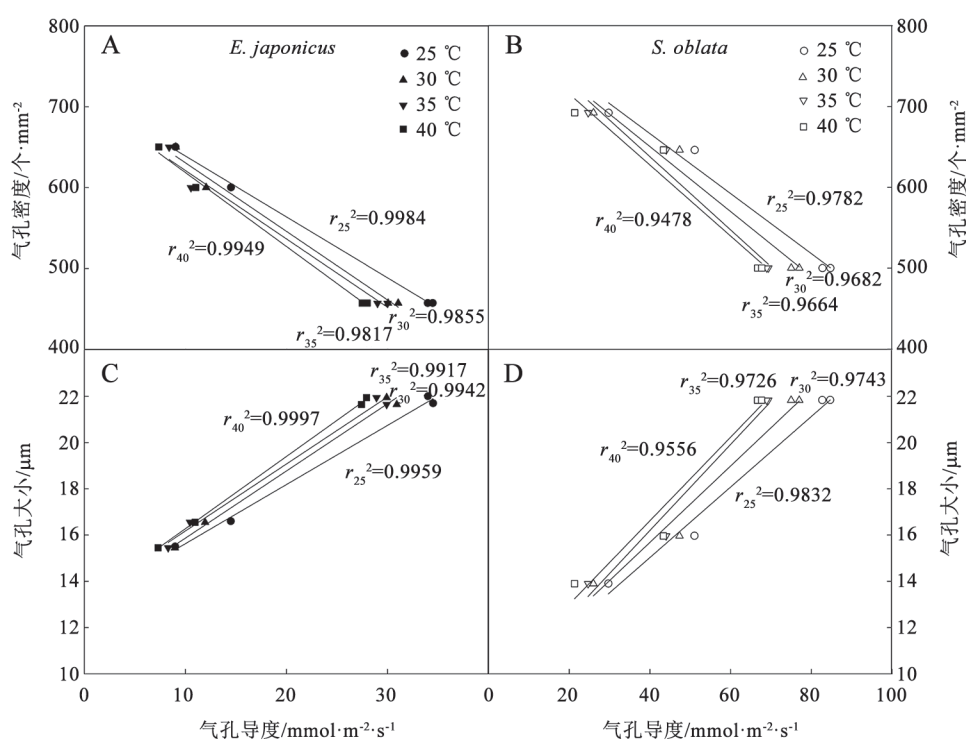


图5 冬青卫矛和华北紫丁香叶片的气孔密度(A、B)和大小(C、D)与导度的相关性

Fig.5 Linear correlations between stomatal density (A, B), the size of stomata (C, D) and stomatal conductance during leaf development for *E. japonicus* and *S. oblata*

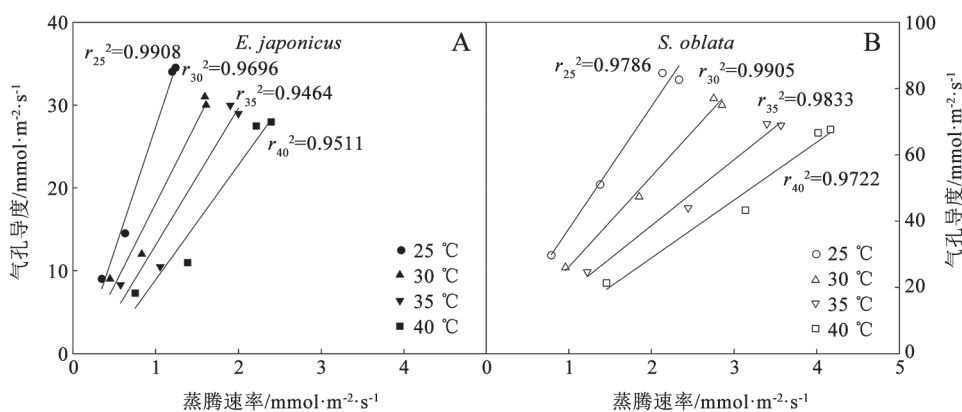


图6 不同发育时期冬青卫矛和华北紫丁香叶片气孔导度与蒸腾速率的相关性

Fig.6 Linear correlations between stomatal conductance and transpiration during leaf development for *E. japonicus* and *S. oblata*

轴侧。更重要的是, 华北紫丁香远轴侧气孔与冬青卫矛的远轴侧气孔密度和大小差异很小。但是, 两者的气孔导度和蒸腾速率却差异很大。考虑到近轴侧气孔直接暴露在强光下, 更容易受强光的影响, 因此推测华北紫丁香近轴侧气孔可能在气孔导度和蒸腾速率中起重要的作用, 很可能也更有利于蒸腾作用降低叶温。所以, 与冬青卫矛相

比, 华北紫丁香叶片有较低的叶温(图4)。

基于上述研究, 我们认为在光强和气温完全相同的情况下气孔发育状态确实可以影响叶温; 对于叶片两侧均有气孔的叶片而言, 近轴侧气孔可能更有利于通过蒸腾作用调节叶温。

参考文献

姜闯道, 高辉远, 邹琦, 蒋高明(2004). 田间大豆叶片成长过程中的

- 光合特性及光破坏防御机制. 植物生理与分子生物学学报, 30 (4): 428~434
- Carmo-Silva AE, Gore MA, Andrade-Sanchez P, French AN, Hunsaker DJ, Salvucci ME (2012). Decreased CO₂ availability and inactivation of Rubisco limit photosynthesis in cotton plants under heat and drought stress in the field. *Environ Exp Bot*, 83: 1~11
- Choinski Jr JS, Gould KS (2010). Immature leaves of *Weinmannia racemosa* are more heat tolerant than mature leaves based on differences in chlorophyll a fluorescence and solute leakage. *New Zeal J Bot*, 48: 163~177
- Choinski Jr JS, Ralph P, Eamus D (2003). Changes in photosynthesis during leaf expansion in *Corymbia gummifera*. *Aust J Bot*, 51: 111~118
- Choinski Jr JS, Wise RR (1999). Leaf growth and development in relation to gas exchange in *Quercus marilandica* Muenchh. *J Plant Physiol*, 154: 302~309
- Djanaguiraman M, Prasad PVV, Murugan M, Perumal R, Reddy UK (2014). Physiological differences among sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) genotypes under high temperature stress. *Environ Exp Bot*, 100: 43~54
- Hall TD, Chastain DR, Horn PJ, Chapman KD, Choinski Jr JS (2014). Changes during leaf expansion of Φ_{psII} temperature optima in *Gossypium hirsutum* are associated with the degree of fatty acid lipid saturation. *J Plant Physiol*, 171: 411~420
- Jiang CD, Gao HY, Zou Q, Jiang GM, Li LH (2006a). Leaf orientation, photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybean leaves against high irradiance in field. *Environ Exp Bot*, 55: 87~96
- Jiang CD, Jiang GM, Wang XZ, Li LH, Biswas DK, Li YG (2006b). Increased photosynthetic activities and thermostability of photosystem II with leaf development of elm seedlings (*Ulmus pumila*) probed by the fast fluorescence rise OJIP. *Environ Exp Bot*, 58: 261~268
- Jiang CD, Li PM, Gao HY, Zou Q, Jiang GM, Li LH (2005). Enhanced photoprotection at the early stages of leaf expansion in field-grown soybean plants. *Plant Sci*, 168: 911~919
- Krause GH, Virgo A, Winter K (1995). High susceptibility to photoinhibition of young leaves of tropical forest trees. *Planta*, 197: 583~591
- Long SP, Humphries S, Falkowski PG (1994). Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 45: 633~662
- Mathur S, Agrawal D, Jajoo A (2014). Photosynthesis: Response to high temperature stress. *J Photochem Photobiol B*, 137: 116~126
- Matsumoto J, Muraoka H, Washitani I (2000). Ecophysiological mechanisms used by *Aster kantoensis*, an endangered species, to withstand high light and heat stresses of its gravelly floodplain habitat. *Ann Bot*, 86: 777~785
- Qiu N, Lu C (2003). Enhanced tolerance of photosynthesis against high temperature damage in salt-adapted halophyte *Atriplex centralasiatica* plants. *Plant Cell Environ*, 26: 1137~1145
- Rakić T, Gajić G, Lazarević M, Stevanović B (2015). Effects of different light intensities, CO₂ concentrations, temperatures and drought stress on photosynthetic activity in two paleoendemic resurrection plant species *Ramonda serbica* and *R. nathaliae*. *Environ Exp Bot*, 109: 63~72
- Sharkey TD (2005). Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reaction, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant Cell Environ*, 28: 269~277
- Snider JL, Choinski Jr JS, Wise RR (2009). Juvenile *Rhus glabra* leaves have higher temperatures and lower gas exchange rates than mature leaves when compared in the field during periods of high irradiance. *J Plant Physiol*, 166: 686~696
- Tounekti T, Abreu ME, Khemira H, Munné-Bosch S (2012). Canopy position determines the photoprotective demand and antioxidant protection of leaves in salt-stressed *Salvia officinalis* L. plants. *Environ Exp Bot*, 78: 146~156
- Wise RR, Sassenrath-Cole GF, Percy RG (2000). A comparison of leaf anatomy in field-grown *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*. *Ann Bot*, 86: 731~738
- Woodall GS, Dodd IC, Stewart GR (1998). Contrasting leaf development within the genus *Syzygium*. *J Exp Bot*, 49: 79~87
- Wright IJ, Leishman MR, Read C, Westoby M (2006). Gradients of light availability and leaf traits with leaf age and canopy position in 28 Australian shrubs and trees. *Funct Plant Biol*, 33: 407~419
- Wu BJ, Chow WS, Liu YJ, Shi L, Jiang CD (2014). Effects of stomatal development on stomatal conductance and on stomatal limitation of photosynthesis in *Syringa oblata* and *Euonymus japonicus* Thunb. *Plant Sci*, 229: 23~31