

植物叶肉导度的测定及计算方法综述

朱 凯^{1,2} 袁凤辉¹ 关德新^{1*} 吴家兵¹ 王安志¹

(¹中国科学院沈阳应用生态研究所, 中国科学院森林生态与管理重点实验室, 沈阳 110016; ²中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要 叶肉导度(g_m)指叶肉细胞内部的 CO_2 扩散能力,它是叶肉细胞阻力的倒数.光合作用研究的早期,研究者们多将叶肉细胞对 CO_2 的扩散阻力视为零,即假定 g_m 无穷大,而忽略了其对光合作用的限制.但近来的研究表明, g_m 是有限的,并随着环境条件的改变而发生变化,此外, g_m 的大小直接决定了 CO_2 在叶片内的扩散量,进而影响到植物光合效率的高低.因此, g_m 的估算对于植物光合能力的评估意义重大.目前,气体交换与叶绿素荧光相结合法、曲线拟合法以及瞬时碳同位素($^{13}\text{CO}_2$)辨别法已经成为植物 g_m 估测的 3 种常用方法,但国内针对这 3 种方法原理及其优缺点介绍的文献极少,阐述这 3 种方法的原理、过程并比较分析其优缺点就显得尤为必要.本文综合了相关文献,从原理、推导过程及优缺点 3 方面对上述 3 种 g_m 估测方法进行了详细介绍.结果表明:曲线拟合法虽然易于理解,便于操作,但其拟合模型因光合作用的发生状态不同而不同,需要研究者对光合作用不同状态进行严格划分,不利于推广应用;瞬时碳同位素($^{13}\text{CO}_2$)辨别法虽然提高了结果的准确性,但其测定过程比较复杂,对试验操作的要求比较严格,同时该方法对试验误差的敏感性较差,可靠性不高.相较于上述两种方法,气体交换与叶绿素荧光相结合法的可操作性更强,可靠性更高,更利于多处理多重重复的大样本的观测分析,叶绿素荧光技术的使用,既简化了试验步骤,又降低了试验过程的偶然误差,增加了观测结果的科学性;此外,叶绿素荧光技术还能为叶片提供饱和脉冲活化能,从而最大限度地激发叶片的光合潜能,但该方法也存在很多问题,比如,为了提高叶片叶绿素荧光参数的准确程度,试验中需要使用较低的气体流速,而流速的降低又会增大气体扩散泄漏的风险,所以该方法对选择合理气体流速的要求很高.综合来看,气体交换与叶绿素荧光相结合法在植物 g_m 的实际测定中的认可度最高,使用最广泛.

关键词 叶肉导度; 光合作用; 气体交换与叶绿素荧光相结合法; 曲线拟合法; 瞬时碳同位素($^{13}\text{CO}_2$)辨别法

Measuring and calculating methods of plant mesophyll conductance: A review. ZHU Kai^{1,2}, YUAN Feng-hui¹, GUAN De-xin^{1*}, WU Jia-bing¹, WANG An-zhi¹ (¹Key Laboratory of Forest Ecology and Management, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110164, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China).

Abstract: Mesophyll conductance (g_m) refers to the diffusion capacity of CO_2 inside mesophyll cells, which is the reciprocal of resistance of mesophyll cells. In the early stage of photosynthesis research, mesophyll diffusion resistance to CO_2 was usually assumed to be zero, namely the g_m was infinite. In recent studies, however, the g_m was found to be limited and changed with external environments. As g_m directly determines CO_2 diffusion and affects leaf photosynthetic efficiency, it is of great significance to mechanistic research of photosynthesis. Presently, simultaneous chlorophyll fluorescence and gas exchange, the curve-fitting and instantaneous carbon isotope ($^{13}\text{CO}_2$) discrimination are commonly used to estimate g_m , but few literature have been introduced on those methods in China. Therefore, it is particularly necessary to elaborate the principles and processes of these methods and to compare their advantages and disadvantages. We synthesized the relevant literature,

本文由国家自然科学基金项目(31670707,41675112,31870625)资助 This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31670707,41675112,31870625).

2019-01-18 Received, 2019-04-11 Accepted.

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: dxguan@iae.ac.cn

and introduced the three methods in detail from the aspects of principle, derivation process and advantages and disadvantages, aiming to provide a methodological basis to promote the research on g_m in China. The curve-fitting method was easy to understand and operate. Its fitting model varied with the status of photosynthesis, which is needed to be divided strictly by researchers. Consequently, it was not conducive to be widely used. Although the instantaneous carbon isotope ($^{13}\text{CO}_2$) discrimination method improved the accuracy of results, it was complex in measurement and strict in operation. Furthermore, it was less sensitive to test errors with low reliability. Compared with the above two methods, simultaneous chlorophyll fluorescence and gas exchange was more operable and reliable, and was more conducive to the observation and analysis for large samples with multi-processing and multi-repetition. In addition, the use of chlorophyll fluorescence technology not only simplified the test procedures, but also reduced the accidental errors, making the results more scientific. Chlorophyll fluorescence technology also provided saturated pulse activation energy to maximize leaf photosynthetic potential. But this method also had many problems, for instance, to improve the accuracy of chlorophyll fluorescence parameters, a lower gas flow rate was needed, which would increase the risk of gas diffusion and leakage. Thus, this method had a high requirement for a reasonable gas flow rate. In general, simultaneous chlorophyll fluorescence and gas exchange method was most widely used in the actual determination of plant g_m .

Key words: mesophyll conductance; photosynthesis; simultaneous gas exchange and chlorophyll fluorescence method; the curve-fitting method; instantaneous carbon isotope ($^{13}\text{CO}_2$) discrimination method.

植物光合作用是陆地生态系统生产力的基础,对农林牧生产、大气成分净化以及生态环境保护等各个领域均具有重要意义。然而,光合作用是一个非常复杂的过程,它除了受到气孔和生物化学因子变化的影响外,还会受到叶肉细胞阻力的限制^[1]。研究发现, CO_2 自外界大气进入叶肉细胞叶绿体中参与光合作用的路径上会依次受到边界层阻力(r_b)、气孔阻力(r_s)和叶肉细胞阻力(r_m)的限制,将 CO_2 克服上述 3 种阻力的能力分别称为边界层导度(或表层导度, g_b)、气孔导度(g_s)和叶肉细胞导度(简称叶肉导度, g_m)^[2],换言之, g_b 、 g_s 和 g_m 分别用以衡量 CO_2 在边界层、气孔以及叶肉细胞间的扩散能力。早期的光合研究中, g_m 一直被忽略,认为它是一个无穷大的常数,它对 CO_2 扩散的限制作用基本可以忽略,即认为叶肉阻力为零^[3]。但随着近代光合作用研究的深入,人们逐渐认识到了 g_m 对光合作用的重要性,随着先进仪器和研究方法的出现,已经能够对其进行较为准确的测定。近些年的研究表明, g_m 并非无穷大,它是有限的,并随着物种、环境条件[光照、温度、水分、 CO_2 浓度等、植物营养(氮素等)等]的变化而变化^[4-13]。 g_m 作为光合作用 CO_2 扩散路径的重要组成部分,它的准确测定对于提高植物光合产量的估测水平和评估光合能力的大小至关重要,它也被认定为植物光合作用的基础^[14]。

获取可靠的观测数据是提高叶肉导度测定准确程度的先决条件。早期有学者对植物 g_m 的测定进行

了深入探索,比如, Evans 等^[15] 在 1986 年比较分析了碳同位素分辨率的理论值与其鲜活植物叶片碳同位素分辨率的实测值之间的差异,发现植株叶绿体羧化位点处的 CO_2 浓度(C_c)明显小于其胞间 CO_2 浓度(C_i),在 1988 年,又分析了叶片 CO_2 响应曲线(A_n - C_i 曲线)的初始斜率和叶片 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶(ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco)的活性大小,同样得出 C_c 小于 C_i 的结论^[16],但这两次探索均没有得到 g_m 的实测值。此外,叶肉细胞内 CO_2 的传输空间尺度很小(微米量级),而 g_m 的测定必须在活体样本中进行,截至目前,人们仍无法实现对叶绿体内光合作用(羧化反应)的直接物理或化学观测,故 g_m 无法被直接测量。但随着科学技术的迅速发展,同位素标记技术和叶绿素荧光技术相继出现并臻于成熟,先进的仪器设备也被研发出来,经过研究者的不断努力探索,已经形成了机理和手段较为完善的 g_m 间接测定方法,这些间接测定方法均依托于植物的光合作用模型。光合作用模型是不同尺度陆地模型的基础^[17],它主要包括经验模型和机理模型两种,光合作用的经验模型最早由 Monteith 等^[18-19] 基于植被冠层对太阳辐射的利用效率建立的,其在光合研究中应用较少,而光合作用的机理模型虽然在一些领域得到了大量的研究探索,但其因过程较复杂而在生态学领域应用较少。20 世纪 80 年代, Farquhar 等^[3] 提出了光合作用生化模型,简称 Farquhar 模

型,使得光合作用机理模型在生态学领域得到了广泛推广应用. Farquhar 模型的建立基于光合作用的两个基本过程,即受 Rubisco 活性限制的光合过程和受 RuBP 再生速率限制的光合过程,后者依赖于叶片的电子传递速率(J),主要受到光量子通量密度(PPFD)和叶片 C_c 的限制^[20]. 依托光合作用 Farquhar 模型,可以得到 J 、 C_c 和净光合作用速率(A_n)三者间的函数关系,进而得到 g_m 的求解公式. 因此,植物光合作用模型是 g_m 推测的基础.

目前,叶肉导度的测定方法主要分为 3 种:气体交换与叶绿素荧光相结合方法(变量 J 法和常数 J 法)^[21]、曲线拟合法^[22]和瞬时碳同位素($^{13}\text{CO}_2$)辨别法^[15, 23-24],这 3 种方法对于 C3、C4 和 CAM 植物 g_m 的估测均具有一定适用性. 本文就这 3 种方法的理论原理、推导过程及其优缺点进行分类阐述,以为 g_m 的相关研究提供理论和方法指导.

1 叶肉导度推测所依托的光合作用模型

1.1 光合作用的 3 个状态

叶肉导度所依托的光合作用模型中,最常用的是 Farquhar 等^[3]提出的 C3 植物光合作用模型. 该模型认为,光合作用存在以下 3 个独立的状态(图 1),分别为:(I)在光合作用的初始阶段,反应底物 1,5-二磷酸核酮糖(ribulose-1, 5-bisphosphate, RuBP)供应充足,而饱和光照激发的高光能会产生大量的光量子,促进光反应产生充足的还原性辅酶 II (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH),加快光合作用的羧化反应,此时的光合速率随 C_i 的升高而直线增加,但由于正处于光合作用的初始阶段,其 C_i 相对较低,由其调控的 Rubisco 活性也较弱,此

时的光合速率主要受到 C_i 和 Rubisco 酶活性的限制. 因此,该状态的光合作用被称为受限于 Rubisco 酶的光合作用(A_c),此状态通常发生于 C_i 较低的阶段,一般认为该阶段的临界 C_i 上限为 20 Pa,近似等于 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$; (II)度过状态 I 后,随着 C_i 的持续升高, Rubisco 酶被完全激活,其活性达到最大,但此时的反应底物 RuBP 量随着大量的消耗而逐渐减少,它又因其薄弱的再生能力而不能得到及时补充,导致 RuBP 供应不足,降低了光合速率的增加幅度. 此时的光合作用主要受到 RuBP 再生能力的限制,被称为受限于 RuBP 再生能力的光合作用(A_j),常发生于较高的 C_i 下,一般认为其临界 C_i 下限为 30 Pa,近似等于 $300\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$,当 C_i 处于 20~30 Pa 时,光合作用处于状态 I 和 II 的过渡态; (III)随着 C_i 的进一步升高,光合速率不会再继续增大,而是趋于平稳,甚至有所降低. 原因在于,叶绿体膜上的磷酸转运蛋白对光合产物[主要是磷酸丙糖(triose phosphate utilization, TPU)]的运载能力比较弱^[25-26],阶段 I 和 II 产生的磷酸丙糖不能被及时运出叶绿体,而大量的有机物积累又会对光合作用产生负反馈调节^[27-28],此时的光合作用被称为受限于磷酸丙糖(TPU)运载能力的光合作用(A_t),该过程的光合速率既不会对 C_i 升高产生响应,也不受 O_2 浓度增加的抑制,而达到最大光合作用速率,但该状态在自然条件下很少发生,所以本文对光合作用状态 III 不做深入介绍.

1.2 光合作用的数学模型

依据叶片内部的气体扩散定律,以及 g_m 的定义,可以得到 g_m 与 C_i 、 C_c 和 A_n 间的数学关系:

$$g_m = \frac{A_n}{C_i - C_c}$$

(1)

式中: g_m 为植株叶肉导度($\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); A_n 为植株净光合作用速率(简称净光合速率, $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); C_i 和 C_c 分别叶片胞间和叶绿体羧化位点处的 CO_2 浓度($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$).

当光合作用处于不同的状态时,其模型的数学表达式会有所不同. 具体如下:

1) 当光合作用处于状态 I,即光合速率受限于 Rubisco 酶时(A_n 记作 A_c),其数学模型可用下式表示:

$$A_c = V_{c,\max} \left[\frac{C_c - \Gamma^*}{C_c + K_c(1 + O/K_o)} \right] - R_d$$

(2)

式中: $V_{c,\max}$ 为最大羧化反应速率($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

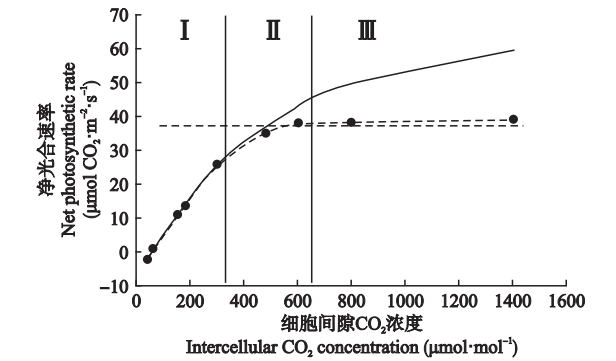


图 1 水稻叶片的 A_n - C_i 响应曲线^[27]

Fig.1 A_n - C_i response curve of rice leaf^[27].

I: 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶(Rubisco)限制 Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) limit; II: 1,5-二磷酸核酮糖(RuBP)限制 Ribulose-1, 5-bisphosphate (RuBP) limit; III: 磷酸丙糖(TPU)限制 Triose phosphate utilization (TPU) limit.

s^{-1}); C_c 为叶绿体羧化位点的 CO_2 分压 ($\mu mol \cdot mol^{-1}$); K_c 和 K_o 分别为 Rubisco 羧化反应氧化反应的米氏常数 (Michaelis constants); O 为 Rubisco 位置的 O_2 分压, 在 $25\text{ }^{\circ}C$ 下, K_c 、 K_o 和 O_i 分别为 $302\text{ }\mu mol \cdot mol^{-1}$ 、 $256\text{ mmol} \cdot mol^{-1}$ 和 $198\text{ mmol} \cdot mol^{-1}$ ^[29]; R_d 是不含光呼吸的 CO_2 呼吸释放 (又称光下暗呼吸、线粒体呼吸或日间呼吸速率) ($\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$); Γ^* 为光下暗呼吸的 CO_2 补偿点 ($\mu mol \cdot mol^{-1}$), 其数值稍低于叶片的总补偿点 C_i^* . 另外, 对式 (2) 的推演详见文献[30–31].

2) 当光合速率受限于 RuBP 时 (A_n 记为 A_j), 其数学模型可用下式表示:

$$A_j = J_{\max} \frac{C_c - \Gamma^*}{4C_c + 8\Gamma^*} - R_d \quad (3)$$

式中: J_{\max} 为最大电子传递速率 ($\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$); 系数 4 和 8 表示每次羧化和氧化反应所需要的电子数量.

2 叶肉导度常用测定方法

2.1 气体交换与叶绿素荧光相结合方法

2.1.1 原理与求解公式 这种方法假设类囊体 (植物叶绿体中的蛋白质和脂肪膜) 中电子传递产生的能量全部用于羧化作用或氧化作用 (即光呼吸), 而其他过程 (如光合硝酸盐还原) 消耗的能量忽略不计, 即没有环式和假环式电子传递发生 (没有 Mehler 反应、光合氮素代谢相关反应等). 因此, 荧光观测可以得到叶片 J , 以反映叶片的总光合速率, 而利用红外气体分析仪可以观测叶片净光合速率 (A_n) 和光下暗呼吸速率 (R_d), 其中, A_n 可用来估算消耗于类囊体羧化作用和氧化作用的能量^[1, 32–33].

该方法基于羧化反应中电子传递速率 (J_a)、净光合速率 (A_n) 和 Rubisco 羧化位点 CO_2 浓度 (C_c) 三者间的函数关系来估算叶肉导度 (g_m). 借助 Farquhar 模型, 三者的函数关系可以模拟如下^[3]:

$$J_a = (A_n + R_d) \frac{4C_c + 8\Gamma^*}{C_c - \Gamma^*} \quad (4)$$

再联合气体扩散定律 (式 1), 可以得到:

$$J_a = 4(A_n + R_d) \frac{(C_i - A_n/g_m) + 2\Gamma^*}{(C_i - A_n/g_m) - \Gamma^*} \quad (5)$$

由式 5 可得:

$$g_m = \frac{A_n}{C_i - \frac{\Gamma^* [J_a + 8(A_n + R_d)]}{J_a - 4(A_n + R_d)}} \quad (6)$$

式 (6) 即为利用气体交换与叶绿素荧光相结合方法得到的 g_m 估算公式, 各参数的含义同上文所述, 其值均可由红外气体分析仪和荧光仪独立观测得到. 另外, 羧化反应电子传递速率 (J_a) 还可以基于叶绿素荧光测定的 PS II 的量子产量得到^[34], 此时的电子传递速率被记作 J_f , 公式如下:

$$J_f = \alpha \beta \cdot PPFD \cdot \Phi_{PSII} \quad (7)$$

式中: α 为叶片的吸收系数, 反映叶片对活化光的吸收能力; β 为光系统 II (PS II) 的光学截面, 用于估计活化光在两个光系统 (PS I 和 II) 间的分配比例, 其值一般取 0.5, 但也会因物种和环境条件而有所变化^[35]; Φ_{PSII} 为荧光法测定的光系统 II (PS II) 的光化学效率; PPFD 为光合有效辐射即活化光光子量子密度 ($\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$).

Φ_{PSII} 的计算公式^[34] 如下:

$$\Phi_{PSII} = \frac{F_m' - F_s}{F_m'} \quad (8)$$

式中: F_m' 为脉冲饱和活化光下最大荧光产量; F_s 为脉冲活化光下的稳态荧光产量.

因此, 基于叶绿素荧光法得到的电子传递速率 J_f , 得到该方法下 g_m 的估算公式如下:

$$g_m = \frac{A_n}{C_i - \frac{\Gamma^* [J_f + 8(A_n + R_d)]}{J_f - 4(A_n + R_d)}} \quad (9)$$

2.1.2 变量 J 方法 变量 J 方法是气体交换与叶绿素荧光相结合方法中的一种, 由 Di Marco 等^[21] 最早提出, Harley 等^[36] 对其进行了细化, 一般在正常大气条件下进行观测. 此方法要求各变量之间的关系必须在相同条件下测定, 得到电子传递速率 J , 而后联合方程 (9) 估算 g_m .

另外, J_a 和 J_f 虽然均为叶片的电子传递速率, 但是二者大小相近, 并不完全相等, 可以在低氧 (<1% O_2) 下借助公式 (10) 进行校正, 即测定一定 CO_2 浓度区间内 J 的变化. 低氧下光呼吸作用可以被忽略, 因此, 式 (10) 又可被近似为 $J_a = 4(A_n + R_d)$, 此时不需要对 Γ^* 或 g_m 进行任何假设^[33, 37].

$$J_a = b_f (J_f + c) \quad (10)$$

式中: b_f 和 c 为回归系数, 并且研究发现, c 很小, 可被忽略, 而 b_f 趋近于一个常数, 但也有其非线性变化的报道^[34, 38].

变量 J 方法中假设低氧 (<1% O_2) 与正常氧 (21% O_2) 下测定的 b_f 和 c 值间没有差异. Harley 等^[36] 发现, J 是测定误差的重要来源, 比如, Pons

等^[39]对常春藤属植物叶片 g_m 的测定结果表明,对 b_F 值 5% 的低估将会导致对 g_m 值 15% 的高估^[33];此外,变量 J 方法对 Γ^* 的变化也很敏感.该方法的优点之一是不必进行 g_m 独立于 CO_2 浓度变化的假设,所以变量 J 方法适合于探究不同 CO_2 浓度下 g_m 的变化,但在高 CO_2 浓度下,光呼吸速率急剧下降,会降低 J_a 与 J_t 的差异,从而增强该方法的误差敏感性^[40].此外,由于该方法受 CO_2 浓度变化的影响较小,因此,它可以在单一的 CO_2 浓度下进行观测,但仍需要假设 b_F 和 c 值及其他描述 J_a - J_t 关系的变量不受 O_2 浓度变化的影响.

2.1.3 常数 J 方法 除了变量 J 方法外,气体交换与叶绿素荧光相结合方法的另外一种方法——常数 J 方法也被用于 g_m 的估测.Bongi 等^[41]最早提出该方法,而后其他学者对其进行了细化^[42-42].

常数 J 方法假定 J 和 g_m 在 CO_2 浓度变化的过程中均为常数,但这并不符合实际情况,从而对 g_m 测定的准确性产生了一定影响^[42-45].此外,由于高浓度 CO_2 下光合作用受 RuBP 羧化酶再生能力的限制,且此时的 J 为常数,因此,该方法一般只适用于高 CO_2 浓度条件下,从这点来说,常数 J 方法具有一定局限性.但该方法只需假定给定 CO_2 浓度范围内电子的分配比例为常数,毋需考虑 J_a - J_t 的关系,因此其又具有一定的优越性.

2.1.4 $\alpha\beta$ 的校正 α 和 β 分别反映了叶片对活化光的吸收能力以及活化光在 PS I 与 II 之间的分配比例,对二者估测的准确程度直接决定了叶片 J_t 计算的准确程度^[46].在早期研究中, α 常被赋值 0.84 或 0.85^[27,47-50],即假设照射到叶片表面的光有 84% 或 85% 被叶片光系统吸收利用,但自然界中的植物多种多样,不同的植物种具有不同的叶片结构,也会产生不同的光吸收效率,有的高于 0.84 或 0.85,有的则低于该值.因此,用 0.84 或 0.85 计算的 J_t 并不准确. β 多被取值 0.5,即假设活化光在两个光系统间均等分配,但活化光存在波长差异,不同的植物品种在不同的环境条件下叶片的活化光分配比例必然也存在一定差异^[35].因此,在实际的光合测定中,需要对 α 和 β 进行校正.

目前,常用的 $\alpha\beta$ 校正方法主要有两种,分别为:1) 低氧 (<1% O_2) 下测定叶片光系统 II 的光化学效率 $\Phi_{\text{PS II}}$ 和 CO_2 同化效率 Φ_{CO_2} ,绘制 $\Phi_{\text{PS II}}$ 与 $4\Phi_{\text{CO}_2}$ 的线性相关关系,其斜率近似等于叶片的 $\alpha\beta$ 值,称之为 Valentini 方法^[51];2) 低氧 (<1% O_2) 下

通过改变光照强度,测定叶片的荧光光响应曲线 (A_n -PPFD),将光合速率 A_n 与 PPFD $\cdot \Phi_{\text{PS II}}/4$ 进行回归分析,得到的斜率即为 $\alpha\beta$ 值,将之称为 Yin 方法^[45].此外, α 还可以通过叶绿素含量进行推算,即 $\alpha = [\text{Chl}]/([\text{Chl}] + 76)$ ^[33,52],其中, $[\text{Chl}]$ 为单位叶面积的叶绿素含量 ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$),但借助该方法推算的 α 值与叶绿素浓度测定的准确程度紧密相关,对试验过程中叶绿素浓度的测定要求很高,所以该方法并不常用.

2.1.5 CO_2 补偿点和光下暗呼吸速率的估算 利用变量 J 方法进行叶肉导度的估测,叶片的光下暗呼吸速率即线粒体呼吸速率 (R_d) 及其不含光呼吸的 CO_2 补偿点 (Γ^*) 是本方法需要输入的两个主要参数.对于 Γ^* 值,由于测定比较困难,大量的研究直接使用经验值,但对于不同的植物品种, Γ^* 值不可能是个常数,因此也有很多的研究用叶绿体内 CO_2 总补偿点 (C_i^*) 替代 Γ^* ^[33].此外,不同文献给出的结果间也存在一定差异^[30,37,48],而且当目标物种没有可参考的数值时,取文献的经验值可能会引起一定误差^[33].而对于 R_d ,可以通过同位素的方法进行直接测量,但测定过程比较复杂,因此,大多数学者还是倾向于借助 Laisk 方法进行实际估测^[53].

Laisk 方法被广泛应用于估测叶片的 R_d 以及 Γ^* .简言之,该方法需要测定不同低光照强度不同低 CO_2 浓度下的 A_n - C_i 曲线,并对所测 A_n - C_i 曲线进行线性回归,它们的交点在横、纵坐标上的值分别代表叶片叶绿体内 CO_2 总补偿点 C_i^* 和 R_d .研究发现, Γ^* 、 C_i^* 和 g_m 三者之间存在一定的关系^[54-55],公式如下:

$$\Gamma^* = C_i^* + R_d/g_m \quad (11)$$

此外,由于 Laisk 方法要求其测量过程须严格在远低于外界 CO_2 浓度的条件下进行,这会导致叶室与外界空气间不可避免地存在一定的空气交换,所以在实际拟合过程中,3 条直线不可能完美地交于一点,而是相交于一个三角形区域,有研究将该三角形区域的重心作为代表暗呼吸值与 CO_2 补偿点的交点^[56];其次,该方法的可操作性较差,在 A_n - C_i 曲线的实际测定过程中,当给定的 CO_2 浓度低于 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ (比如 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$) 时, Li-6400XT 便携式光合作用测定系统 (Li-6400XT; Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) 中的 C_i 值不会随之降低,甚至会高于给定值,对试验结果观测的准确性会造成很大误差.因此,为减小试验误差,在低 CO_2 浓度下利用

Laisk 方法估算 Γ^* 、 R_d 最好使用较大的光合叶室,而且需要对试验仪器 Li-6400 进行气路改装.另外, Γ^* 、 R_d 与温度的关系也有报道^[30, 57-58],这些成果可被用于 Γ^* 、 R_d 与温度的修正.

Γ^* 和 R_d 的准确获取对于 g_m 的估测非常重要, Laisk 方法虽然降低了使用经验值带来的物种差异,但该方法耗时太长,实际中测定一个重复平均需要近 1 h,不适于多物种多重复的试验.同时,利用 Laisk 方法估算的 R_d 值小于夜间的呼吸作用速率(R_n)^[59],有研究表明, R_n 近似等于 R_d 的 2 倍^[60-61],如果测定了植株叶片的 R_n ,利用二者的数量关系即可大体估算出该物种的暗呼吸速率 R_d .此外, Γ^* 还可以根据文献中羧化酶的特征因子(τ)来估算^[36],但这种方法仅适用于叶温在 25 ℃ 的观测条件,此叶温条件下许多物种的 τ 值也已有所报道^[33, 62],该参数值对温度的响应变化与物种有关.因此, Γ^* 值及其随温度和其他环境条件的变化规律需更深入的研究^[33].

2.2 曲线拟合法

2.2.1 原理与估算公式 曲线拟合法指仅用气体交换的观测结果来计算 g_m 值的方法.它的原理是, g_m 的增大使光合 CO_2 响应曲线(A_n - C_i)的曲率增加,根据上述光合作用模型,计算出光合作用的相关参数(包括最大羧化速率 $V_{c,\max}$ 、电子传递速率 J_i 和 g_m).

用曲线拟合法求解 g_m ,首先要确定叶片光合作用过程是受 Rubisco 活性限制还是受 RuBP 再生能力限制,抑或是受 TPU 运载能力限制,过渡状态有时很容易分辨,但很多情况下需要进行人工判断来划分节点.因此,为了避免节点划分对模拟结果的偏差,可对不同的光合作用状态划分方案进行对比,通过降低测点与曲线的方差,选取更合理的方案^[22].

待光合作用状态节点划分后,根据前述的光合作用模型(Farquhar 模型)^[3],利用不同的数据分析方法(回归分析、迭代法等)求解 g_m ^[27].而在诸多求解 g_m 的方法中, Ethier 等^[63-64]建立的二次方程法应用较多,该方法是用 Rubisco 限制及 RuBP 再生能力限制条件下的观测数据来求解 g_m .根据上述模型, A_n 可由以下非直角双曲线进行计算:

$$A_n = \min \{ A_c, A_j \} \tag{12}$$

1) 当 A_n 受到 Rubisco 活性限制时:

$$A_c = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \tag{13}$$

$a = -1/g_m$

$$b = (V_{c,\max} - R_d)/g_m + C_i + K_c(1 + O_i/K_o)$$

$c = R_d [C_i + K_c(1 + O_i/K_o)] - V_{c,\max}(C_i - \Gamma^*)$

2) 当 A_n 受到 RuBP 再生能力限制时:

$$A_j = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \tag{14}$$

$a = -1/g_m$

$b = (J/4 - R_d)/g_m + C_i + 2\Gamma^*$

$c = R_d(C_i + 2\Gamma^*) - J/4(C_i - \Gamma^*)$

2.2.2 曲线拟合法的优缺点 曲线拟合法估算 g_m 的突出优点是测定过程比较简单,只需要借助红外气体分析仪(IRGA)测定叶片的 A_n - C_i 曲线即可.该方法的缺点主要体现在以下 4 方面:1) 该方法要求对光合作用状态进行准确划分,否则会导致光合模型使用上的混乱,从而导致 g_m 估算的错误;2) 该方法依托 A_n - C_i 拟合出多个参数值,其对气体交换测定精确度的要求极高,叶面积较小以及气体流速过快都会造成气体交换的严重误差,实际测量过程一般选取 $\geq 6 \text{ cm}^2$ 的叶面积以及适中的流速($250 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)^[32];3) 根据一条曲线拟合出至少 3 个未知参数(g_m 、 $V_{c,\max}$ 、 J),计算的过程比较复杂,而且为了获得平滑、理想的 A_n - C_i 曲线,试验过程需要进行多点的精确测定,耗时比较长;4) 需要预先知道不含光呼吸的 CO_2 补偿点 Γ^* 以及 Rubisco 的动力学参数 K_c 、 K_o ,而 K_c 和 K_o 一般采用 Bernacchi 等^[51]基于烟草观测给出的参数值,这样取值忽略了物种和观测环境条件引起的差异,从而导致一定误差.

2.3 瞬时碳同位素($^{13}\text{CO}_2$)辨别法

2.3.1 原理与估算公式 该方法主要依托碳同位素辨别能力(Δ)上的差异,即 $^{12}\text{CO}_2$ 和 $^{13}\text{CO}_2$ 分子在气体扩散和羧化速率上存在差异.相较 $^{12}\text{CO}_2$, $^{13}\text{CO}_2$ 在气体和液体中的扩散率较低,它能够在扩散和羧基化过程中被辨别出来.另外,自然条件下, Rubisco 优先结合含有质量较轻的 $^{12}\text{CO}_2$ 分子,导致光合产物普遍富集在较轻的 ^{12}C 中,而质量较重的 $^{13}\text{CO}_2$ 分子就能够被 Rubisco 辨别出来.由于稳定同位素辨别发生在光合作用的 CO_2 固定过程中,因此,可通过叶片气体交换的测定,获取相关的指标来估算 g_m .

利用 ^{13}C 同位素辨别法测定 g_m 在 Evans 等^[15]的著作中被首次提及,之后的几十年里得到了推广和改进^[48, 65-66].目前,最常用的碳同位素测定方法为:1) 同位素比率质谱分析法(IRMS);2) 可调谐二极管激光吸收光谱法(TDLAS)^[67].

借助 Farquhar 模型^[68],碳同位素辨别能力(Δ)

被描述为:

$$\Delta = \frac{a_b(C_a - C_s)}{C_a} + \frac{A(C_s - C_i)}{C_a} + (e_s + a_1) \frac{C_i - C_c}{C_a} + B \frac{\frac{C_c}{C_a} - \frac{eR_d}{k} + f\Gamma^*}{C_a} \tag{15}$$

式中: C_a 、 C_s 、 C_i 分别为大气 CO_2 浓度、叶片表层 CO_2 浓度和胞间 CO_2 浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$); a_b 为叶片边界层分辨 (2.9‰); A 为 CO_2 在空气中的扩散分辨 (4.4‰); e_s 和 a_1 分别为 CO_2 进入溶液 (主要是水) 时的分辨 (1.1‰, 25 °C) 以及其在液体中的扩散分辨 (0.7‰); B 为 C3 植物 Rubisco 和磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 的净分辨 (27‰~30‰); e 和 f 分别为 CO_2 在暗呼吸和光呼吸中的分辨^[69-72]; k 为羧化效率^[73].

如果碳同位素辨别和气体交换测定均在透明度良好的容器中进行, 那么叶片表层或边界层的相关参数均可被忽略, 则方程 (15) 可以简化为:

$$\Delta = \frac{A(C_a - C_i)}{C_a} + (e_s + a_1) \frac{C_i - C_c}{C_a} + B \frac{\frac{C_c}{C_a} - \frac{eR_d}{k} + f\Gamma^*}{C_a} \tag{16}$$

式中: e 、 f 具有一定的不确定性, 其在不同的测定过程会产生不同结果. 早期的间接测定结果表明, e 值近似等于 0, 而之后对暗呼吸期间 e 值的直接测定结果表明, 分别以呼吸底物和以离体原生质体呼出的 CO_2 作为同位素成分构成, 测定出的两个 e 值之间并无差异^[74].

将式 (1) 代入式 (16), 可得:

$$\Delta = \frac{A(C_a - C_i)}{C_a} + B \frac{C_i}{C_a} - \left[\frac{(B - e_s - a_1)A_n}{g_m C_a} + \frac{\frac{eR_d}{k} + f\Gamma^*}{C_a} \right] \tag{17}$$

那么,

$$\Delta_i - \Delta_{\text{obs}} = \frac{(B - e_s - a_1)A_n}{g_m C_a} + \frac{\frac{eR_d}{k} + f\Gamma^*}{C_a} \tag{18}$$

式中: Δ_i 为忽略边界层阻力并假设 g_m 无穷大 ($C_i = C_c$) 时的 Δ 期望值; 而 Δ_{obs} 为 Δ 的实测值. 其中:

$$\Delta_i = \frac{A(C_a - C_i)}{C_a} + B \frac{C_i}{C_a} = A + (B - A) \frac{C_i}{C_a} \tag{19}$$

式 (18) 是“斜率法”估算 g_m 的理论基础. 该方程表明, $(\Delta_i - \Delta_{\text{obs}})$ 与 A_n/C_a 之间呈线性关系, 可以绘制 $(\Delta_i - \Delta_{\text{obs}}) - A_n/C_a$ 曲线, 其斜率即为 $1/g_m$ (叶肉阻力

r_m), 而其在纵坐标上的截距则为植物呼吸作用速率的大小^[15]. 方程 (19) 给出了 Δ_i 与 C_i/C_a 间的线性关系模型, 利用气体交换数据, 该模型多被用以估算碳同位素的辨别能力 Δ .

2.3.2 瞬时碳同位素 ($^{13}\text{CO}_2$) 辨别法的优缺点 该方法要求在封闭的叶室中对叶片气体交换进行精确测定, 并需要在不同的环境条件 (不同的光照、 CO_2 浓度或相对湿度) 下对其进行多次测定, 以获得一系列的 A_n/C_a 值, 另外, 光合作用过程中的 Δ 非常小, 这会降低 g_m 估算的准确度. 常用的解决方法是: 1) 降低气体交换系统的流速; 2) 增大样品的叶面积 ($>10 \text{ cm}^2$). 但气体交换的流速过度降低又会造成气体扩散泄露的问题, 因此把握好合理的气体流速就显得非常重要^[34, 75].

3 结 语

经过几十年的发展, 叶肉导度估算的气体交换与叶绿素荧光相结合方法、曲线拟合方法以及瞬时碳同位素 ($^{13}\text{CO}_2$) 辨别法已经形成了较为完善的技术体系, 具有植物生理机理清晰、实验观测原理明确、数学求解过程经典等特点, 有力推进了光合作用领域生理学和生理生态学相关研究的进步和深入. 本文所述的 3 种观测方法既提高了 g_m 观测的准确性, 也极大推动了 g_m 研究的深入发展, 为光合作用的研究提供了巨大的方法支持. 但是这 3 种方法的成立都存在很多的假设条件和理想化处理. 在自然状态下, 多变的环境条件以及不同的研究对象会降低甚至消除这些假设和理想化处理成立的科学性, 必然会给观测结果带来很大误差. 为提高 g_m 的估算精度, Warren^[76] 建议对研究对象进行多种方法同时观测, 并对观测结果进行差异性检验和敏感性分析, 但这会增加工作量, 并不利于多处理多重复的野外试验观测.

比较来看, 曲线拟合法虽然操作简单, 仅需进行气体交换的测定, 但由于不同状态下的光合模型不同, 在进行曲线拟合时必须严格区分光合作用的发生状态, 因此, 它受光合作用状态的限制较大. 虽然同位素标记技术的使用会增加试验结果的准确性, 但瞬时碳同位素 ($^{13}\text{CO}_2$) 辨别法测定 g_m 的试验过程比较复杂, 对试验操作的要求比较严格, 同时该方法对试验误差的敏感性较差, 可靠性不高^[76]. 随着叶绿素荧光技术的出现以及 Li-6400XT 便携式光合作用观测系统的发明使用, 气体交换与叶绿素荧光相结合方法得到了普遍的推广使用^[14, 50-51, 61, 76-78], 相

较另外两种方法,该方法的可操作性更强,可靠性更高,利于多处理多重重复的大量样本的观测分析;同时,叶绿素荧光技术的使用,既简化了试验步骤,又降低了试验过程中的偶然误差,增加了观测结果的科学性。此外,叶绿素荧光技术能够为叶片提供饱和脉冲活化能,从而最大限度地激发叶片的光合潜能。但该方法也存在很多问题,比如,为提高叶片叶绿素荧光参数的准确程度,试验中需要使用较低的气体流速,但气体流速降低又会增大气体扩散泄漏的风险,所以这种方法对选择合理的气体流速的要求很大。

因此,选择合理的观测方法对于提高试验结果的准确性,保证试验研究的顺利进行极为重要。但从整体上看,气体交换与叶绿素荧光相结合方法较曲线拟合和瞬时碳同位素($^{13}\text{CO}_2$)辨别法更具有普适性,但因环境条件和研究对象而异,叶肉导度的观测方法也应根据实际的试验条件和要求而定。

参考文献

- [1] Flexas J, Brugnoli E, Warren CR. Mesophyll conductance to CO_2 // Flexas J, Loreto F, Medrano H, eds. *Terrestrial Photosynthesis in a Changing Environment: A Molecular, Physiological and Ecological Approach*. Cambridge: Cambridge University Press, 2012: 169–185
- [2] Flexas J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, *et al.* Mesophyll conductance to CO_2 : Current knowledge and future prospects. *Plant, Cell & Environment*, 2008, **31**: 602–621
- [3] Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA. A biochemical model of photosynthetic CO_2 assimilation in leaves of C3 species. *Planta*, 1980, **149**: 78–90
- [4] Han J-M (韩吉梅), Zhang W-F (张旺锋), Xiong D-L (熊栋梁), *et al.* Mesophyll conductance and its limiting factors in plant leaves. *Chinese Journal of Plant Ecology* (植物生态学报), 2017, **41**(8): 914–924 (in Chinese)
- [5] Loreto F, Centritto M, Chartzoulakis K. Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. *Plant, Cell & Environment*, 2003, **26**: 595–601
- [6] Bernacchi CJ, Morgan PB, Ort DR, *et al.* The growth of soybean under free air [CO_2] enrichment (FACE) stimulates photosynthesis while decreasing *in vivo* Rubisco capacity. *Planta*, 2005, **220**: 434–446
- [7] Flexas J, Ribas-Carbó M, Bota J. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO_2 concentration. *New Phytologist*, 2006, **172**: 73–82
- [8] Galmés J, Medrano H, Flexas J. Acclimation of Rubisco specificity factor to drought in tobacco: Discrepancies between *in vitro* and *in vivo* estimations. *Journal of Experimental Botany*, 2006, **57**: 3659–3667
- [9] Galmés J, Medrano H, Flexas J. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytologist*, 2007, **175**: 81–93
- [10] Flowers MD, Fiscus EL, Burkey KO, *et al.* Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and yield of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes differing in sensitivity to ozone. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, **61**: 190–198
- [11] Warren CR, Löw M, Matyssek R, *et al.* Internal conductance to CO_2 transfer of adult *Fagus sylvatica*: Variation between sun and shade leaves and due to free-air ozone fumigation. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, **59**: 130–138
- [12] Diaz-Espejo A, Nicolás E, Fernández JE. Seasonal evolution of diffusional limitations and photosynthetic capacity in olive under drought. *Plant, Cell & Environment*, 2007, **30**: 922–933
- [13] Warren CR. Does growth temperature affect the temperature response of photosynthesis and internal conductance to CO_2 ? A test with *Eucalyptus regnans*. *Tree Physiology*, 2008, **28**: 11–19
- [14] Warren CR, Livingston NJ, Turpin DH. Water stress decreases the transfer conductance of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedlings. *Tree Physiology*, 2004, **24**: 971–979
- [15] Evans JR, Sharkey TD, Berry JA, *et al.* Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO_2 diffusion in leaves of higher plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1986, **13**: 281–292
- [16] Evans JR, Terashima I. Photosynthetic characteristics of spinach leaves grown with different treatments. *Plant and Cell Physiology*, 1988, **29**: 157–165
- [17] Ren B (任博), Li J (李俊), Tong X-J (同小娟), *et al.* Simulation on photosynthetic- CO_2 response of *Quercus variabilis* and *Robinia pseudoacacia* in the southern foot of the Taihang Mountain, China. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2018, **29**(1): 1–10 (in Chinese)
- [18] Monteith JL. Solar radiation and productivity in tropical ecosystem. *Journal of Applied Ecology*, 1972, **9**: 747–766
- [19] Monteith JL, Moss CJ. Climate and the Efficiency of Crop Production in Britain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 1977, **281**: 277–294
- [20] Yu Q (于强), Ren B-H (任保华), Wang T-D (王天铎), *et al.* Simulations of diurnal variation of photosynthesis in C3 Plants. *Chinese Journal of Atmospheric Sciences* (大气科学), 1998, **22**(6): 867–880 (in Chinese)
- [21] Di Marco G, Manes F, Tricoli D, *et al.* Fluorescence parameters measured concurrently with net photosynthesis to investigate chloroplastic CO_2 concentration in leav-

- es of *Quercus ilex* L. *Journal of Plant Physiology*, 1990, **136**: 538–543
- [22] Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, *et al.* Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant, Cell & Environment*, 2007, **30**: 1035–1040
- [23] Sharkey TD, Vassey TL, Vanderveer PJ, *et al.* Carbon metabolism enzymes and photosynthesis in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) having excess phytochrome. *Planta*, 1991, **185**: 287–296
- [24] Loreto F, Harley PC, Marco GD, *et al.* Estimation of mesophyll conductance to CO₂ flux by three different methods. *Plant Physiology*, 1992, **98**: 1437–1443
- [25] Sage RF. A model describing the regulation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase, electron transport, and triose phosphate use in response to light intensity and CO₂ in C3 plants. *Plant Physiology*, 1990, **94**: 1728–1734
- [26] Manter DK, Kerrigan J. A/C_i curve analysis across a range of woody plant species: Influence of regression analysis parameters and mesophyll conductance. *Journal of Experimental Botany*, 2004, **55**: 2581–2588
- [27] Li Y (李 勇), Peng S-B (彭少兵), Huang J-L (黄见良), *et al.* Components and magnitude of mesophyll conductance and its responses to environmental variations. *Plant Physiology Journal* (植物生理学报), 2013, **49**(11): 1143–1154 (in Chinese)
- [28] Guo S-W (郭世伟), Ran W (冉 伟), Zhou Y (周毅), *et al.* On carbon and nitrogen metabolism of rice plants under elevated CO₂ conditions. *Chinese Journal of Rice Science* (中国水稻科学), 2006, **20**(5): 560–566 (in Chinese)
- [29] von Caemmerer S, Evans JR, Hudson GS, *et al.* The kinetics of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in vivo inferred from measurements of photosynthesis in leaves of transgenic tobacco. *Planta*, 1994, **195**: 88–97
- [30] von Caemmerer S. Biochemical Models of Leaf Photosynthesis. Collingwood, Victoria, Australia: CSIRO Publishing, 2000
- [31] Long SP, Bernacchi CJ. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany*, 2003, **54**: 2393–2401
- [32] Warren C. Estimating the internal conductance to CO₂ movement. *Functional Plant Biology*, 2006, **33**: 431–442
- [33] Pons TL, Flexas J, von Caemmerer S, *et al.* Estimating mesophyll conductance to CO₂: Methodology, potential errors, and recommendations. *Journal of Experimental Botany*, 2009, **60**: 2217–2234
- [34] Genty B, Briantais JM, Baker NR. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1989, **990**: 87–92
- [35] Laisk A, Loreto F. Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence. Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase specificity factor, dark respiration in the light, excitation distribution between photosystems, alternative electron transport rate, and mesophyll diffusion resistance. *Plant Physiology*, 1996, **110**: 903–912
- [36] Harley PC, Loreto F, Di Marco G, *et al.* Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO₂ flux by the analysis of the response of photosynthesis to CO₂. *Plant Physiology*, 1992, **98**: 1429–1436
- [37] Pons TL, Westbeek MHM. Analysis of differences in photosynthetic nitrogen-use efficiency between four contrasting species. *Physiologia Plantarum*, 2004, **122**: 68–78
- [38] Seaton GGR, Walker DA. Chlorophyll fluorescence as a measure of photosynthetic carbon assimilation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 1990, **242**: 29–35
- [39] Pons TL, Welschen RAM. Midday depression of net photosynthesis in the tropical rainforest tree *Eperua grandiflora*: Contributions of stomatal and internal conductances, respiration and Rubisco functioning. *Tree Physiology*, 2003, **23**: 937–947
- [40] Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmes J, *et al.* Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. *Plant, Cell & Environment*, 2007, **30**: 1284–1298
- [41] Bonghi G, Loreto F. Gas-exchange properties of salt-stressed olive (*Olea europea* L.) leaves. *Plant Physiology*, 1989, **90**: 1408–1416
- [42] Hassiotou F, Ludwig M, Renton M, *et al.* Influence of leaf dry mass per area, CO₂ and irradiance on mesophyll conductance in sclerophylls. *Journal of Experimental Botany*, 2009, **60**: 2303–2314
- [43] Flexas J, Barón M, Bota J, *et al.* Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted Vitis hybrid Richter-110 (*V. berlandieri* × *V. rupestris*). *Journal of Experimental Botany*, 2009, **60**: 2361–2377
- [44] Vrábl D, Vaskova M, Hronkova M, *et al.* Mesophyll conductance to CO₂ transport estimated by two independent methods: Effect of ambient CO₂ concentration and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, 2009, **60**: 2315–2323
- [45] Yin X, Struik PC, Romero P, *et al.* Using combined measurements of gas exchange and chlorophyll fluorescence to estimate parameters of a biochemical C3 photosynthesis model: A critical appraisal and a new integrated approach applied to leaves in a wheat (*Triticum aestivum*) canopy. *Plant, Cell & Environment*, 2009, **32**: 448–464
- [46] Martins SCV, Galmés J, Molins A, *et al.* Improving the estimation of mesophyll conductance to CO₂: On the role of electron transport rate correction and respiration. *Journal of Experimental Botany*, 2013, **64**: 3285–3298
- [47] Ehleringer J, Pearcy RW. Variation in quantum yield for CO₂ uptake among C3 and C4 plants. *Plant Physiology*,

- 1983, **73**: 555–559
- [48] Evans JR, Loreto F. Acquisition and diffusion of CO₂ in higher plant leaves//Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S, eds, *Photosynthesis: physiology and metabolism*. Advances in photosynthesis. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000: 321–351
- [49] Flexas J, Bota J, Escalona JM, *et al.* Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: An evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology*, 2002, **29**: 461–471
- [50] Grassi G and Magnani F. Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant, Cell & Environment*, 2005, **28**: 834–849
- [51] Valentini R, Epron D, Angelis PDE, *et al.* In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: Diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant, Cell & Environment*, 1995, **18**: 631–640
- [52] Evans JR, Poorter H. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of SLA and nitrogen partitioning in maximising carbon gain. *Plant, Cell & Environment*, 2001, **24**: 755–768
- [53] Laisk AK. Kinetics of photosynthesis and photorespiration in C₃ plants. Moscow, Russia: Nauka Publishing, 1977
- [54] von Caemmerer S, Evans JR. Determination of the average partial pressure of CO₂ in chloroplasts from leaves of several C₃ plants. *Australian Journal Plant Physiology*, 1991, **18**: 287–305
- [55] Peisker M, Apel H. Inhibition by light of CO₂ evolution from dark respiration: Comparison of two gas exchange methods. *Photosynthesis Research*, 2001, **70**: 291–298
- [56] Sun JW, Guan DX, Wu JB, *et al.* Day and night respiration of three tree species in a temperate forest of north-eastern China. *iForest: Biogeosciences and Forestry*, 2015, **8**: 25–32
- [57] Bernacchi CJ, Singsaas EL, Pimentel C, *et al.* Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. *Plant, Cell & Environment*, 2001, **24**: 253–259
- [58] Bernacchi CJ, Portis AR, Nakano H, *et al.* Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis in vivo. *Plant Physiology*, 2002, **130**: 1992–1998
- [59] Atkin OK, Scheurwater I, Pons TL. High thermal acclimation potential of both photosynthesis and respiration in two lowland *Plantago* species in contrast to an alpine congeneric. *Global Change Biology*, 2006, **12**: 500–515
- [60] Thérroux-Rancourt G, Éthier G, Pepin S. Threshold response of mesophyll CO₂ conductance to leaf hydraulics in highly transpiring hybrid poplar clones exposed to soil drying. *Journal of Experimental Botany*, 2014, **65**: 741–753
- [61] Thérroux-Rancourt G, Éthier G, Pepin S. Greater efficiency of water use in poplar clones having a delayed response of mesophyll conductance to drought. *Tree Physiology*, 2015, **35**: 172–184
- [62] Galmés J, Flexas J, Keys AJ, *et al.* Rubisco specificity factor tends to be larger in plant species from drier habitats and in species with persistent leaves. *Plant, Cell & Environment*, 2005, **28**: 571–579
- [63] Ethier GH, Livingston NJ. On the need to incorporate sensitivity to CO₂ transfer conductance into the Farquhar-von Caemmerer-Berry leaf photosynthesis model. *Plant, Cell & Environment*, 2004, **27**: 137–153
- [64] Ethier GH, Livingston NJ, Harrison DL, *et al.* Low stomatal and internal conductance to CO₂ versus Rubisco de activation as determinants of the photosynthetic decline of ageing evergreen leaves. *Plant, Cell & Environment*, 2006, **29**: 2168–2184
- [65] von Caemmerer S, Evans JR. Determination of the average partial pressure of CO₂ in chloroplasts of several C₃ species. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1991, **18**: 287–305
- [66] Lloyd J, Syvertsen JP, Kriedeman PE, *et al.* Low conductances for CO₂ diffusion from stomata to the sites of carboxylation in leaves of woody species. *Plant, Cell & Environment*, 1992, **15**: 873–899
- [67] Bowling DR, Sargent SD, Tanner BD, *et al.* Tunable diode laser absorption spectroscopy for stable isotope studies of ecosystem-atmosphere CO₂ exchange. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2003, **118**: 1–19
- [68] Farquhar GD, O'Leary MH, Berry JA. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1982, **9**: 121–137
- [69] Gillon JS, Griffiths H. The influence of photorespiration on carbon isotope discrimination in plants. *Plant, Cell & Environment*, 1997, **20**: 1217–1230
- [70] Ghashghaie J, Badeck F, Lanigan G, *et al.* Carbon isotope fractionation during dark respiration and photorespiration in C₃ plants. *Phytochemistry Reviews*, 2003, **2**: 145–161
- [71] Igamberdiev AU, Mikkelsen TN, Ambus P, *et al.* Photorespiration contributes to stomatal regulation and carbon isotope fractionation: A study with barley, potato and Arabidopsis plants deficient in glycine decarboxylase. *Photosynthesis Research*, 2004, **81**: 139–152
- [72] Lanigan G, Betson N, Griffiths H, *et al.* Carbon isotope fractionation during photorespiration and carboxylation in Senecio. *Plant Physiology*, 2008, **148**: 2013–2020
- [73] Brooks A, Farquhar GD. Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. *Planta*, 1985, **165**: 397–406
- [74] Lin G, Ehleringer JR. Carbon isotope fractionation does not occur during dark respiration in C₃ and C₄ plants. *Plant Physiology*, 1997, **114**: 391–394
- [75] Shi Z-M (史作民), Feng Q-H (冯秋红), Cheng R-M

(程瑞梅), *et al.* The research progress of mesophyll conductance. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2010, **30**(17): 4792–4803 (in Chinese)

[76] Warren C. Temperature response of photosynthesis and internal conductance to CO₂: Results from two independent approaches. *Journal of Experimental Botany*, 2006, **57**: 3057–3067

[77] Xiong DL, Xi L, Liu LM, *et al.* Rapid responses of mesophyll conductance to changes of CO₂ concentration, temperature and irradiance are affected by N supplements in rice. *Plant, Cell & Environment*, 2015, **38**:

2541–2550

[78] Wang XX, Du TT, Huang JL, *et al.* Leaf hydraulic vulnerability triggers the decline in stomatal and mesophyll conductance during drought in rice. *Journal of Experimental Botany*, 2018, **16**: 4033–4045

作者简介 朱 凯,男,1989 年生,博士研究生.主要从事植物生理生态研究.E-mail: zhukai-1989@ 163.com

责任编辑 杨 弘