

植物生理生态学研究中的控制实验和 测定仪器新进展

张守仁¹ 樊大勇^{1*} Reto J. Strasser²

(1 中国科学院植物研究所植被与环境变化重点实验室, 北京 100093)

(2 Bioenergetics Laboratory, University of Geneva, Jussy-Geneva, CH-1254, Switzerland)

摘要 现代植物生理生态学的发展和测定仪器的进步同步进行的。小型轻便、智能、性能优良和高自动化程度是植物生理生态学仪器发展的必然趋势。该文以光合生理生态学的仪器为例, 概述了该领域测定仪器的发展趋势及对学科发展的重要作用, 并讨论了控制实验和实验设计中的假重复问题。

关键词 生理生态 仪器进展 控制实验

A REVIEW OF PROGRESS IN STUDIES OF PLANT ECOPHYSIOLOGY: CONTROLLED EXPERIMENTS AND INSTRUMENTATION

ZHANG Shou-Ren¹, FAN Da-Yong¹, and Reto J. Strasser²

¹Key Laboratory of Vegetation and Environmental Change, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China, and

²Bioenergetics Laboratory, University of Geneva, Jussy-Geneva, CH-1254, Switzerland

Abstract Development of modern plant ecophysiology is synchronous with progress in instrumentation, with higher quality instruments becoming more portable, capable and automatic. The progress of instrumentation and its important effects on the development of ecophysiology of photosynthesis are described, and problems with controlled experiments and pseudo-replication in experimental design are discussed.

Key words plant ecophysiology, instrumentation progress, controlled environment

1 控制实验和实验设计中的假重复问题

植物生理生态学是研究植物在生物和非生物因素影响下的生命代谢科学(Larcher, 2003)。具体地说植物生理生态学是研究植物对变化环境的生理代谢响应或适应。植物生理生态学既是植物生态学的一个分支, 又是一个交叉学科, 它的出现及迅速发展和 20 世纪 70 年代以来备受关注的全球气候变化及环境胁迫密切相关。研究植物对全球气候变化及环境胁迫的响应始于野外观测, 这些工作从 20 世纪早中期就有不少报道(Maximov, 1929; Billings *et al.*, 1971; Björkman *et al.*, 1972; Kappen *et al.*, 1979; Nobel, 1977; Schulze & Hall, 1982)。但随着研究的深入, 野外的自然环境条件的复杂性越来越满足不了探讨单因子变化的机理研究, 这类实验对环境因子的控制及定量化要求越来越高。进入 20 世纪 80 年代以后, 控制实验越来越多地成为植物生理生态学

研究的主要形式。在此期间主要的控制实验包括: SO₂ 熏蒸实验、酸雨模拟实验、粉尘实验、臭氧熏蒸实验和 CO₂ 增加实验等。其中, CO₂ 增加实验是规模最大、影响最深的模拟全球气候变化的控制实验。实验设备从最初的封闭控制环境因子系统(如玻璃温室)到开顶式人工气候生长室(OTC), 到目前的 FACE(Free-Air CO₂ Enrichment)系统。封闭控制环境因子系统的优点是控制的目标因子容易定量, 并且环境因子比较均匀。但它的缺点也是比较明显的, 封闭环境形成的微环境是静态的, 不同于外界的大气环境。植物对这样静态微环境的响应结果是很难应用于自然开放的大气环境的。开顶式人工气候生长室(OTC)比玻璃温室要更进一步, 由于它的顶部是开放的, 所以开顶式人工气候生长室的光照、气温、湿度比较接近大气环境, 但光照时间和风速仍然小于自然大气环境的数值。由于受到空间的限制,

收稿日期: 2006-10-30 接受日期: 2007-03-27

基金项目: 国家自然科学基金(30590382/C011108 和 40631002)、国家重点基础研究发展规划项目(2006CB403206)和新疆生产建设兵团(石河子大学)绿洲生态农业重点实验室资助

本文的最初思路是由马克平研究员提出, 并在修改过程得到指导

* 通讯作者。 Author for correspondence E-mail: fandayong@ibcas.ac.cn

玻璃温室和开顶式人工气候生长室内的研究对象主要是幼苗或幼树。这一问题对多年生木本植物尤其重要,幼苗或幼树的生长特征与成年树木有很大的不同,两者生理代谢和生长过程对全球变化(如 CO_2 升高)的响应也会有很大的差异。基于幼苗或幼树对全球变化的响应数据建立的预测模型可能是不可靠的(Mousseau & Saugier, 1992)。为解决上述玻璃温室和开顶式人工气候生长室存在的问题(控制环境与大气环境的差异、控制系统的空间限制对成年树木作为研究材料),美国和欧洲的生态学家从 20 世纪 70 年代开始实施早在 20 世纪 20 年代就已经出现的 FACE 思想(Allen, 1992)并获得了成功。FACE 设备顾名思义就是要在自然大气环境单纯加富 CO_2 浓度的设施。它并不改变光照、温度、湿度、风速等气象因子。现代 FACE 从产生已经开展了约 15 年的实验(Ainsworth & Long, 2005)。FACE 实验的结果已经在高水平的国际生物学特别是生态学领域的期刊有了大量的报道,FACE 实验已经成为国际研究全球变化(CO_2 增加)的标志性领先实验。但经过了近 15 年的实验,也发现了 FACE 设备的一些问题。比较突出的一个问题就是 CO_2 加富的均匀性,由于 FACE 设立在野外,风向和风速对 CO_2 加富的均匀性都有很大的影响(Long *et al.*, 2004)。FACE 设备昂贵的维持费用(蒋高明等, 1997; Kimball, 1992),也使得这一前沿性的实验的开展局限在美国和欧洲为数很少的几个大学或国家实验室。

实验数据的重复是进行统计学分析的重要前提,也是生态学研究的基本条件。现在由于硬件技术上的提高,对控制环境条件可以达到很高的精度(比如在玻璃温室内由 CO_2 发生器释放的 CO_2 浓度可以控制在 $1 \sim 2 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$, 人工气候室的温度、相对湿度可以分别控制在 1°C 和 1%),但这并不表示在温室或生长箱水平上可以不重复,尽管在正常情况下(控制系统运行正常,温室间的控制条件一致),温室的效应是不显著的。但不少情况下,这种由温室引起的效应是显著的,因为温室间的控制条件很难保持完全一致(比如温室的通气口附近、 CO_2 发生器和暖器周围等地方都可能会存在不同于大部分空间的微环境),不同生理指标对这种差异的敏感程度是不同的。某些着重研究植物生理学过程的期刊,对实验设计的温室重复性要求不高(特别是研究者使用大公司生产的商品化人工气候室)。这种情况下,实验设计中的植物重复或其它处理的重复被称为假重复,因为从统计学意义上讲,这些重复是不

独立的。举个简单的例子,比如用两个温室 A 和 B 做实验,温室 A 的 CO_2 浓度设为对照($360 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$),温室 B 的 CO_2 浓度设置为加倍($720 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)。温室 A 和 B 内的植物种、数量和生长情况在实验开始是相同的。假如在实验过程中的一段时间内温室 B 由于某种原因发生了故障, CO_2 浓度在一段时间下降为 $360 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$,然后又恢复到 $700 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。这种情况,在 $700 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 温室植物的 CO_2 效应是不准确的,但由于只有一个温室,这种 CO_2 效应的不准确性通过统计学是检查不出来的。在美国亚立桑那州曾经建成了一个引起世人极大关注的超级玻璃温室,号称“生物圈 II 号”,当初的目的是想研究在一个包括森林、草原、海洋、农田、昆虫、动物、微生物、人类等封闭系统里是否可以模拟地球生物圈的物质循环和能量流动及平衡等问题。实验进展了不长就被迫终止,原因之一是封闭系统里的 CO_2 浓度急剧增加,而 O_2 不足。看来自然地球生物圈的物质循环和能量流动及平衡过程是很复杂的,远超过人们的想象,不是简单地把一些地球上主要的生态系统类型放在人造的温室能模拟的。但这样一个耗资巨大的温室后来主要用于科普教育,并没有主要用于科学实验。原因之一是只有一个温室,实验在温室水平上没有重复,这样的实验结果属于假重复。有关实验设计中的假重复问题,Hurlbert (1984)有详细的论述。

2 便携式仪器的出现:室内离体(*in vitro*)分析到野外现场(*in situ*)活体(*in vivo*)测定

早期的生理生态学研究以室内分析为主,材料采自野外或室内盆栽植物。用于室内分析的植物材料一般都是离体材料,分析指标包括酶活性、次生代谢物浓度、色素含量和养分含量等。用于活体材料测定的仪器(如光合作用测定仪、压力室等)一般体积都是比较小的,并且仪器测定的自动化程度也不高。以光合仪为例,早期的光合作用测定系统实际上主要是 CO_2 分析器,叶室体积比较大,待测定的叶片整个放入同化叶室,叶面积需要单独测定。

便携式仪器的出现是和野外生理生态学研究的需求分不开的。特别是近 20 年来,野外生理生态学仪器设备的巨大市场和计算机硬件技术的提高及成本减低是仪器公司开发便携式仪器的动力。在过去的 20 年里,这些新开发的仪器的共同特点是:体积变小、重量变轻,而仪器的功能和自动化程度极大地提高。以光合作用测定系统为例,与早期的同类仪

器相比,新仪器可以实现叶片光合速率、蒸腾速率、气孔导度和胞间 CO_2 浓度等生理指标以及叶片周围微环境(包括光通量密度、气温、叶温、相对湿度等)的测定记录。体积小自动化程度高的便携式仪器的出现也使得现场(*in situ*)和活体(*in vivo*)测定成为可能,使一些局限于实验室内的生理生化指标分析真正实现了野外瞬时分析。以分析 Rubisco(1,5-二磷酸核酮糖羧化加氧酶)活性为例,传统的实验室生化分析方法是先将离体叶片的 Rubisco 提取纯化,然后在合适的温度下加入底物测定酶促反应的速率,作为 Rubisco 的羧化反应速率。整个提取和测定过程非常复杂和繁琐。而使用便携式光合作用测定仪在野外对活体叶片测定光合速率- CO_2 响应曲线(A-C_i curve)利用 Farquhar 等(1980)的生化模型就可以得出瞬间叶片的最大羧化反应速率、最大光合电子传递速率等生化指标。现场(*in situ*)测定对研究模拟控制环境条件下的全球变化也非常重要。比如在控制环境温室或人工气候室内处理的植物,研究人员为了测定方便或由于仪器搬运不方便,将盆栽植物从控制环境温室或人工气候室取出,然后在自然环境中测定生理指标。其实,这样采集的数据是不真实的。因为盆栽植物从控制环境系统转运到自然环境的过程中,植物对突然改变了的新环境要产生一个适应(Acclimation),这种适应也会表现在生理生化水平上。正确的数据采集方法是植物在测定过程中仍然在原位保持原来的环境条件,尽量让植物受到的干扰降低到最低水平。

3 仪器间的联合同步测定和数据的耦合分析

仪器功能上的提高还表现在两种甚至是多种仪器的同步测定。在光合作用生理生态研究领域里,两种仪器联合开发最成功、使用最广泛的是光合仪和叶绿素荧光仪的联合。以 LI-COR 公司的光合作用仪为例,早在 20 世纪 90 年代中期,公司设计的叶室就预留了便携式叶绿素荧光仪探头插入的孔。但这种两台仪器的联合还只是形式上的,因为它们是各自独立工作的。PP 公司的 CIRAS-1 光合仪与 Hansentech 公司的 FMS-I 和 II 便携式饱和和脉冲叶绿素荧光仪的联合,又向前推进了一步。该公司不但在硬件方面通过串口使两个仪器的通信连通,在软件方面在 FMS-II 叶绿素荧光仪的用户应用程序里专门开发了语言模块使两个仪器实现同时采集数据。但真正实现光合仪和叶绿素荧光仪一体化的是

LI-COR 公司 2001 年研制开发配备在 LI-6400 光合作用仪的叶绿素荧光叶室。叶绿素荧光叶室的出现彻底改变了光合仪和叶绿素荧光仪两台仪器物理连接的状况,使光合仪和叶绿素荧光仪从硬件设计到软件实现了真正一体、同步测定。光合仪和叶绿素荧光仪在硬件上的联合应该得益于植物生理学家自 20 世纪 30 年代以来对光合作用碳代谢途径及两个光系统的深入研究,特别是叶绿素荧光动力学现象(Kausky effect)的发现开启了以光物理途径探讨光合作用光反应的过程(Govindjee, 1995; Strasser *et al.*, 2004)。经过众多植物生理学家半个世纪的探索,建立了比较完整的叶绿素荧光理论和计算模型。光合仪和叶绿素荧光仪的联合,不仅表现在物理连接,还体现在数据的耦合分析上。需要说明的是,虽然非调制叶绿素荧光仪和光合仪不能物理连接,即不能和光合仪同步现场(*in situ*)测定,它的测定是独立进行的,但所测定的数据也可以和光合仪测定的数据在一起分析。并且,非调制叶绿素荧光仪由于采样频率高(微秒级,而一般的调制叶绿素荧光仪采样频率是毫秒级),所以,非调制叶绿素荧光技术可能提供了更丰富的光合作用光化学反应过程的信息,基于非调制叶绿素荧光方法建立的 JIP Test 是研究植物胁迫生理的新途径(Strasser *et al.*, 1995, 2004)。光合仪测定的气体交换指标属于“表现性”,叶绿素荧光参数在一定程度上反映光合作用系统(特别是光系统 II)内在性”特点(张守仁, 1999)。从单位量纲上看,气体交换指标是绝对值,而叶绿素荧光参数是相对值(比值)。由于单位量纲上的性质,叶绿素荧光参数在比较不同植物的绝对值或实际值上受到限制。但基于 Genty 等(1989)和 Epron 等(1995)的方法,可以把气体交换指标和叶绿素荧光参数进行耦合分析,计算出总光合电子传递速率、最大羧化反应速率、羧化反应和呼吸反应的电子流分配比例等,从而对整个光合作用过程(包括光化学反应和碳还原反应)进行在活体水平的定量分析。

4 商品化(Commercialized)仪器和自制(Home-made)仪器

商品化仪器与自制仪器之间是一种相辅相成的关系。商品化仪器是在多年自制仪器的经验上产生的。研究者针对光合生理生态研究领域的一些新现象和新问题,在没有相关商品化仪器的前提下,通过自制仪器的方式来进行研究。通常研究者以自制仪器为基础,在对该现象经过多年的研究积累之后,对

于其内禀的生理生态机制已经比较清楚,而且这种自制仪器已经显示出潜在巨大的应用前景。于是,在研究者和专业生产厂家的共同努力下,商品化仪器被设计生产出来。一般情况下,实验室是自制仪器的使用场所。这是因为在对这些现象的研究过程中,需要人为的调整自制仪器的许多设定参数以便找到最佳的参数组合来研究这些现象,比如采样的精度、采样的时间、信噪比、调制频率、放大倍数和通道数量等。而且自制仪器通常所占空间较大,野外使用受到很多限制。而商品化仪器的最大特点一是标准化的测量结果,二是野外实验的便携化和易操作性。因此,对于自制仪器的改良和功能的固化是商品化仪器生产的前提之一。

比如对于叶绿素荧光淬灭分析,在 20 世纪 80 年代以前大部分实验是在实验室内进行的(Govindjee, 1995)。在研究过程中,研究者逐渐认识了叶绿素荧光产生的生理机理,并且认为叶绿素荧光分析是光合生理生态研究领域强有力的研究工具。PAM 公司基于 Schreiber 的脉冲调制式荧光仪的设计原理(Schreiber *et al.*, 1986)生产出第一台脉冲调制式荧光仪(PAM101-102-103 系统),并在随后的改良中逐渐将仪器便携化和多功能化。另一个例子是光合作用- CO_2 响应曲线的研究过程。在 20 世纪 80 年代以前只有一些个别的实验室使用自制仪器进行此方面的研究。研究者发现通过分析 CO_2 饱和曲线可以得到非常丰富的活体叶片光合作用的生化信息(Farquhar *et al.*, 1980),在光合生理生态研究领域具有十分广泛的应用前景。因此到 20 世纪 80 年代中后期,专业生产厂家将测定光合作用- CO_2 响应曲线的功能加入商品化光合作用测定仪器中。目前在野外测定植物的 CO_2 饱和曲线等光合生理生态指标已经是非常容易的事。

自制仪器具有以下特点:

1) 自制仪器具有前瞻性、创新性的特点,往往在光合生理生态过程中对于某些现象只有采用自制仪器来进行研究。比如 Farquhar 等(1980)的光合作用模型,其一个前提是不同叶片组织对光的吸收假设一样。许多研究者对这个前提进行了研究。Vogelmann 和 Björn(1984)率先用自制的光纤探测器探测叶片内部的光吸收曲线,研究结果表明栅栏组织对红光的吸收非常强烈,大约 80% 的红光在 $100 \mu\text{m}$ 范围内被吸收。当然这种技术由于一些技术上的原因对光吸收的测定是非常复杂的,对此,有人用叶绿素荧光影像技术对 DCMU 处理的叶片横截面的叶绿素

荧光进行测量(Takahashi *et al.*, 1994),从而方便地得到沿叶片横截面的光吸收梯度。

20 世纪 70 年代以前由于传感器本身分辨率不够,因此对于光合作用瞬态过程并不是很清楚。Laisk、Percy、Walker 和 Malkin 等在此方面做了很多探索性的工作,他们利用双通道的红外分析管、氧化皓氧气传感器、极谱氧电极技术、光声光谱技术对光合瞬态的放氧和 CO_2 动态曲线进行了研究并得到一些很有意义的结果(Laisk & Oja, 1974; Chazdon & Percy, 1986; Walker, 1987; Malkin, 1987)。比如对于暗适应叶片光诱导期间的瞬态放氧 1987 年以前认为只有一个氧峰,但用自制的快速放氧测定方式可以知道放氧实际是由两个峰组成,而且两个放氧高峰发生的位点并不一样(Percy *et al.* 1996; Fan & Gao, 2005)。这些研究组在研究的过程中对测定技术和方法进行了不断的改进,比如 Laisk 等(2002)的一篇文章中已经将氧化皓氧气传感器的时间分辨率提高到 0.8 s。

对于商品化仪器进行改造来迎合实验的具体要求也是自制仪器的一种类型。对于光诱导过程的研究, Valladares 等(1997)将 LI-6400 标准的叶室改换成 12 cm^2 的叶室,这样扩大了 CO_2 吸收的信号值,更为精确地获取了光诱导的数据。对于木质部空穴化的研究, Alder 等(1997)对实验室常用的离心机进行了改造,用离心的方法逐步增大木质部导管水柱张力梯度,来获得导管空穴化的脆弱性曲线。

2) 自制仪器具有自由空间大的特点。对于所需测定的项目,可以从信号发生、环境条件、放大电路、采样频率、通道数和采样精度等各个方面进行控制,比如 Laisk 和 Oja(1998)通过 3 个通道的气阀来控制其自己设计的气体交换测量系统,在极短时间内可以任意控制进入叶室的气体成分,这对于研究光合生理生态机理上的一些问题是非常重要的。

在光合生理生态研究领域,必须要高度重视自制仪器所起的作用。这是因为创新性前瞻性的一些科学问题(以及相应的技术方法)需要借助自制仪器才能进行研究。如果在某个现象的研究上已经出现商品化仪器,暗示该现象产生的基础生理生态机制已经比较清楚,后续研究可能主要集中在应用该方法和技术上。而在光合生理生态研究领域,技术和方法的创新也是非常重要的研究内容之一。

参 考 文 献

- years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist*, 165, 351 – 372.
- Alder NN, Pockman WT, Sperry JS, Nuismer S (1997). Use of centrifugal force in the study of xylem cavitation. *Journal of Experimental Botany*, 48, 665 – 674.
- Allen Jr LH (1992). Free-air CO₂ enrichment experiments: an historical overview. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 11, 121 – 134.
- Billings WD, Godfrey PJ, Chabot BF, Bourque DP (1971). Metabolic acclimation to temperature in Arctic and alpine ecotypes of *Oxyria digyna*. *Arctic and Alpine Research*, 3, 277 – 290.
- Björkman O, Pearcy RW, Harrison AT, Mooney HA (1972). Photosynthetic adaptation to high temperatures: a field study in Death Valley, California. *Science*, 175, 786 – 789.
- Chazdon RL, Pearcy RW (1986). Photosynthetic responses to light variation in rain forest species. I. Induction under constant and fluctuating light conditions. *Oecologia*, 69, 517 – 523.
- Epron D, Godard D, Cornic G, Genty B (1995). Limitation of net CO₂ assimilation rate by internal resistances to CO₂ transfer in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). *Plant, Cell and Environment*, 18, 43 – 51.
- Fan DY, Gao RF (2005). Where is the site of the “oxygen burst” located during light induction in dark-adapted leaves? A study using photoacoustic techniques. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47, 567 – 578.
- Farquhar GD, Von Caemmerer S, Berry JA (1980). A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta*, 149, 78 – 90.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimistry et Biophysica Acta*, 900, 87 – 92.
- Govindjee (1995). Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Australia Journal of Plant Physiology*, 22, 131 – 160.
- Hurlbert SH (1984). Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs*, 54, 187 – 211.
- Jiang GM (蒋高明), Han XG (韩兴国), Lin GH (林光辉) (1997). Response of plant growth to elevated CO₂: a review on the chief methods and basic conclusions based on experiments in the external countries in past decade. *Acta Phytoecologica Sinica* (植物生态学报), 21, 489 – 502 (in Chinese with English abstract)
- Kappen L, Lange OL, Schulze E-D, Evenari M, Buschbom U (1979). Ecophysiological investigations on lichens of the Negev Desert. VI. Annual course of the photosynthetic production of *Ramalina maciformis* (Del.) Bory. *Flora*, 168, 85 – 108.
- Kimball BA (1992). Costs comparisons among Free-Air CO₂ Enrichment, Open-Top Chamber, and Sunlit Controlled-Environment Chamber methods of CO₂ exposure. *Critical Review in Plant Science*, 11, 265 – 270.
- Laisk A, Oja V, Rasulov H, Romma H, Eichelmann I, Kasparova H, Pettai E, Padu E, Vapaavuori E (2002). A computer-operated routine of gas exchange and optical measurements to diagnose photosynthetic apparatus in leaves. *Plant, Cell and Environment*, 25, 923 – 943.
- Laisk A, Oja V (1998). *Dynamics of Leaf Photosynthesis—Rapid-Response Measurements and Their Interpretations*, CSIRO Publishing House, Cambria.
- Laisk A, Oja V (1974). Leaf photosynthesis under short pulses of CO₂: the carboxylation reaction *in vivo*. *Soviet Plant Physiology*, 21, 1123 – 1131.
- Larcher W (2003). *Physiological Plant Ecology* 4th edn. Springer-Verlag, Berlin.
- Long SP, Ainsworth EA, Rogers A, Ort DR (2004). Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 591 – 628.
- Malkin S (1987). Fast photoacoustic transients from dark-adapted intact leaves: oxygen evolution and uptake pulses during photosynthetic induction—a phenomenology record. *Planta*, 171, 65 – 72.
- Maximov NA (1929). *The Plant in Relation to Water*. Allen and Unwin, London.
- Monteith JL (1965). Light distribution and photosynthesis in field crops. *Journal of Experimental Biology*, 29, 17 – 37.
- Mousseau M, Saugier B (1992). The direct effect of increased CO₂ on gas exchange and growth of forest tree species. *Journal of Experimental Biology*, 43, 1121 – 1130.
- Nobel PS (1977). Water relations and photosynthesis of a barrel cactus, *Ferocactus acanthodes*, in the Colorado Desert. *Oecologia*, 27, 117 – 133.
- Pearcy RW, Krall JP, Sassenrath-Cole GF (1996). Photosynthesis in fluctuating light environment. In: Baker NR ed. *Photosynthesis and the Environment*. Kluwer, Holland, 321 – 346.
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*, 10, 51 – 62.
- Schulze ED, Hall AE (1982). Stomatal responses, water loss and

- CO₂ assimilation rates of plants in contrasting environments. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H eds. *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 12B. Springer, Berlin, 181 – 230.
- Strasser RJ, Srivastava A, Govindjee (1995). Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 61, 32 – 42.
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou G, Govindjee eds. *Series: Advances in Photosynthesis and Respiration* Vol. 19. *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Chapter 12. Springer, P. O. Box17, 3300AA Dordrecht, The Netherlands, 321 – 362.
- Takahashi K, Mineuchi K, Nakamura T, Koizumi M, Kano H (1994). A system for imaging transverse distribution of scattered light and chlorophyll fluorescence in intact rice leaves. *Plant, Cell and Environment*, 17, 105 – 110.
- Valladares F, Allen MT, Pearcy RW (1997). Photosynthetic responses to dynamic light under field conditions in six tropical rainforest shrubs occurring along a light gradient. *Oecologia*, 111, 505 – 514.
- Vogelmann TC, Björn LO (1984). Measurement of light gradients and spectral regime in plant tissue with a fibre optic probe. *Physiologia Plantarum*, 60, 361 – 368.
- Walker DA (1987). *The Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis*. Oxygraphics Limited, Sheffield, UK.
- Zhang SR (张守仁) (1999). Discussion on chlorophyll fluorescence kinetics parameters and its significance. *Chinese Bulletin of Botany (植物学通报)*, 16, 444 – 448. (in Chinese with English abstract)

责任编辑：姜联合