

植物气孔对大气 CO₂ 浓度和温度升高的反应

——基于在 CO₂ 浓度和温度梯度中生长的 10 种植物的观测

左闻韵, 贺金生*, 韩 梅, 吉成均, Dan F. B. Flynn, 方精云

(北京大学环境学院生态学系, 北京大学地表分析与模拟教育部重点实验室, 北京 100871)

摘要: 许多研究表明, 大气 CO₂ 浓度 ([CO₂]) 的升高会导致植物气孔密度 (Stomatal Density, SD) 和气孔指数 (Stomatal Index, SI) 降低。这一关系成为推测地质历史时期大气 [CO₂] 变化的重要古生物指标之一。但是, [CO₂] 不是唯一影响 SD 和 SI 的环境因素。研究利用温度梯度和温度 + [CO₂] 梯度技术, 以 7 种美国中西部地区弃耕地常见草本植物和 3 种美国东部落叶阔叶林优势木本植物为材料, 其中草本包含豆科、非豆科 C₃ 和 C₄ 功能型, 就它们的 SD, SI, 表皮细胞密度 (Epidermal Cell Density, ECD) 和气孔孔径长度 (Stomatal Aperture Length, APL) 对 [CO₂] 和温度升高的反应进行了研究。结果表明, 沿 [CO₂] 梯度, 所研究物种的 SD 比 SI 反应敏感, SD 显示出与 [CO₂] 正相关、负相关和无显著相关性, SI 显示出与 [CO₂] 正相关和无显著相关性; 沿温度梯度, 所研究物种的 SI 比 SD 反应敏感, SI 显示出与温度正相关、负相关和无显著相关性, SD 显示出与温度正相关和无显著相关性。ECD 和 APL 对 [CO₂] 和温度梯度也有不同的响应。这说明, 除 [CO₂] 外, 温度也对 SD, SI, ECD 和 APL 有显著的影响。所以在用气孔特征重建地质历史时期 [CO₂] 的变化趋势时, 除准确建立气孔参数与 [CO₂] 关系外, 还应考虑大气温度对这一关系的影响。

关键词: CO₂ 浓度梯度; 温度梯度; 表皮细胞密度; 气孔密度; 气孔孔径长度; 气孔指数

Responses of plant stomata to elevated CO₂ and temperature: observations from 10 plant species grown in temperature and CO₂ gradients

ZUO Wen-Yun, HE Jin-Sheng*, HAN Mei, JI Chen-Jun, Dan F. B. Flynn, FANG Jing-Yun (Department of Ecology, College of Environmental Sciences, and Key Laboratory for Earth Surface Process of Ministry of Education, Peking University, Beijing 100871, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(3): 565~574.

Abstract: Many studies have reported that increases in atmospheric CO₂ concentration ([CO₂]) lead to decreases in plant stomatal density (SD) and stomatal index (SI). These correlations have become key proxies for the estimation of paleoatmospheric [CO₂]. However, [CO₂] is not the only environmental factor affecting SD and SI. In this study, we conducted an experiment with controlled temperature and [CO₂] gradients to examine the correlation between stomatal characters and both elevated [CO₂] and temperature. The materials used in our study were obtained from seven herbaceous species commonly found in oldfields of the North American Midwest, including legume, non-legume C₃ and C₄ plants, as well as three deciduous tree species from eastern North America. The results showed that SD was more sensitive to [CO₂] changes than SI for all species studied. SD showed either positive, negative or no correlation with [CO₂], whereas the SI showed either a positive or no correlation. In the temperature gradient however, SD responded with less sensitivity than SI. SI showed either positive, negative or no correlation with temperature, whereas the SD showed positive or no correlation. Additionally, correlations between ECD and temperature and between APL and temperature differed. Thus, in addition to

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目(2002CB412502); 国家自然科学基金资助项目(90211016)

收稿日期: 2004-06-03; **修订日期:** 2004-10-25

作者简介: 左闻韵(1981~), 女, 贵州省贵阳市人, 主要从事植物生态学研究。

* 通讯作者 Author for correspondencer. E-mail: jshe@pku.edu.cn

Foundation item: State Key Basic Research and Development Plan of China (No. 2002CB412502), and the National Natural Science Foundation of China (No. 90211016)

Received date: 2004-06-03; **Accepted date:** 2004-10-25

Biography: ZUO Wen-Yun, mainly engaged in plant ecology. E-mail: zuowenyun@mails.gscas.ac.cn

[CO₂], air temperature also affects plant *SD*, *SI*, *ECD* and *APL*. We suggest that, when reconstructing historical atmospheric [CO₂] via analysis of stomatal characteristics, not only must the correlation between [CO₂] and stomatal parameters be examined, but the effect of temperature on the correlation should be considered as well.

Key words: CO₂ gradient; temperature gradient; epidermal cell density; stomatal density; stomatal aperture length; stomatal index

文章编号:1000-0933(2005)03-0565-10 中图分类号:Q948 文献标识码:A

植物对 CO₂ 浓度([CO₂])升高的反应不仅表现在生理过程的变化^[1~3],也表现在形态和解剖结构上的改变^[4]。早在 50 多年前,就有学者注意到植物叶片气孔可以对[CO₂]的变化产生反应^[5]。从那时起,[CO₂]变化对植物叶片结构,特别是叶片气孔特性的影响,一直是植物学探索的内容之一^[6,7]。Woodward 的开创性工作,首次证明在长时间尺度上(200a)的标本植物^[8]和实验室植物^[9]都可以对由于人类活动引起的[CO₂]升高做出反应,并且这种[CO₂]和气孔密度(Stomatal Density, *SD*)的负相关关系,使得通过化石植物的 *SD* 和气孔指数(Stomatal Index, *SI*)来推测地质历史时期大气[CO₂]的变化成为可能。

从第四纪后期(近 400 000 a)以来,冰芯记录了历史时期大气[CO₂]的变化^[10,11]。然而对于第四纪早期,人们需要用其他的办法来测定大气中[CO₂]的变化^[12],因为世界上最古老的冰层也只有 500 000a^[13]。因此,通过 *SD* 及 *SI* 和[CO₂]的关系来推测化石植物所代表的地质历史时期的大气[CO₂]逐步成为重要的古生物方法之一^[13,14]。

然而,有两个主要原因使这一方法的有效性遭到质疑:第一,尽管有大量研究表明 *SD* 随[CO₂]升高而降低^[8,9,15],但也有研究表明 *SD* 随[CO₂]升高而增加^[16,17],或[CO₂]升高对 *SD* 无显著、持续的影响^[17~27]。这些在实验条件下所得到的 *SD* 和 *SI* 与[CO₂]之间的关系,多是基于两个[CO₂]水平,即现在[CO₂]水平和[CO₂]加倍或增加至另一固定[CO₂]水平。由于 *SD* 和 *SI* 对[CO₂]的反应是非线性的,并且当实验所用的[CO₂]高于 350 μmol/mol 时,*SI* 就表现得不够敏感^[28]。因此仅用两个或少数几个[CO₂]得到的 *SD* 和 *SI* 与[CO₂]之间的关系可能存在较大误差,用连续[CO₂]梯度“隧道”技术来研究 *SD* 和 *SI* 与[CO₂]之间的关系就显得非常必要。

第二,除了[CO₂]外,气孔对于其他环境因子也很敏感,如光照^[29]、水分胁迫^[30]、环境温度^[31]等。从标本馆所得到的 *SD* 或 *SI* 数据,除了受到由于人类活动所引起的[CO₂]的改变影响外,其他全球气候变化因素,如温度,也可能与[CO₂]同时起作用。同样,从化石植物得到的 *SD* 或 *SI* 也可能受到除[CO₂]以外的其他环境因素特别是温度波动的影响。因此区分在对 *SD* 和 *SI* 的诸多影响因素中,是否有比[CO₂]变化影响更大的因素,尤其是温度升高的作用是否会超过[CO₂]增加的作用,对于研究 *SD* 和 *SI* 对[CO₂]的响应是至关重要的。

由于人类活动的巨大影响,全球正在经历着人类历史上前所未有的气候变化^[32]。最近的 IPCC 报告就显示,从全球范围来看,20 世纪全球平均温度升高了约 0.6 C,到 2100 年,全球平均温度将升高 1.4~4.9 C^[32]。考虑到全球范围温度升高的不平衡性,陆地温度升高的幅度比海洋大,特别是北半球中高纬度地区温度升高幅度大,而其他地区如热带的部分地区,平均温度反而有所降低^[33],具体到某一地区温度的变化是很显著的。与此同时,全球的[CO₂]也在升高,在过去的 250a 间,[CO₂]已经从 280 μmol/mol 升高到目前的 370 μmol/mol。据预测到 2100 年大气[CO₂]至少升高到 540 μmol/mol,最大幅度可达 970 μmol/mol^[32]。因此研究[CO₂]和温度的共同作用对植物气孔特性和表皮密度的影响是非常必要的。

本研究的目的是,通过自行设计的温度梯度“隧道”(Temperature Gradient Tunnel, TGT)和[CO₂]+温度梯度“隧道”([CO₂]+Temperature Gradient Tunnel, CTGT),控制植物生长的环境因子,实现温度的作用和温度+[CO₂]双因子协同作用的分离,既可模拟温度单因子的连续变化对不同物种的影响,又可分析[CO₂]与温度连续变化下的协同作用,还可通过两者相互比较分析 CO₂ 浓度对不同物种的独立影响。本实验所得到的 *SD* 和 *SI* 与[CO₂]以及温度的关系,不仅可以为 *SD* 和 *SI* 作为古生物手段指示地质历史时期[CO₂]提供重要的参考,还可以拟合出未来[CO₂]在 380~800 μmol/mol 之间任何一个浓度下,所研究植物的不同反应情景。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

本实验的材料包括两大类,一类是 1 年生草本植物,包括 3 个功能型组,即非豆科 C₃ 植物、C₄ 植物和豆科植物共 7 个物种,均是美国中部地区弃耕地的常见种类;另一类是落叶乔

木树种,包括 3 个物种,它们都是美国东部地区落叶阔叶林中的优势树种(表 1)。

该实验的核心设施是美国剑桥哈佛大学校园内两个自行设计的温度梯度“隧道”(Temperature Gradient Tunnel, TGT)和[CO₂]+温度梯度“隧道”([CO₂]+Temperature Gradient Tunnel, CTGT)。两个“隧道”构建时尽量考虑到其它环境因素(光照、水分、和营养)的统一,避免实验结果因它环境因素的不同而受影响。由于本研究的实验结果通过 ANOVA 分析表明, TGT

中区对气孔特性及表皮细胞密度的作用均不显著,因此认为 CTGT 中区的作用主要是由于 [CO₂] 引起的,在以后的论述中,也把 "[CO₂]+温度"的作用简称为 "CO₂ 的作用".

表 1 实验所用的植物种类及其功能型和生长习性

Table 1 The species in the research and their functional group and growth habit

物种 Species	功能型 Functional Group	生长习性 Growth habit
尚麻 <i>Abutilon theophrasti</i>	C ₃	非禾本植物 Forb
美洲豚草 <i>Ambrosia artemisiifolia</i>	C ₃	非禾本植物 Forb
宾州蓼 <i>Polygonum pensylvanicum</i>	C ₃	非禾本植物 Forb
美丽鹧鸪豆 <i>Chamaecrista fasciculata</i>	C ₃ , 豆科 Legume	非禾本植物 Forb
天蓝苜蓿 <i>Medicago lupulina</i>	C ₃ , 豆科 Legume	非禾本植物 Forb
狐尾草 <i>Setaria faberii</i>	C ₁	禾本科植物 Grass
粟 <i>Setaria italica</i>	C ₄	禾本科植物 Grass
红栎 <i>Quercus rubra</i>	C ₃ , 木本 Tree	落叶乔木 Deciduous
北美红枫 <i>Acer rubrum</i>	C ₃ , 木本 Tree	落叶乔木 Deciduous
灰桦 <i>Betula papyrifera</i>	C ₃ , 木本 Tree	落叶乔木 Deciduous

TGT 和 CTGT 相邻构建在土壤成分相对均匀的土地上,每个“隧道”由 17 根标准规格(直径 3.5 cm)的钢管搭建而成,用紫外线的聚乙烯塑料薄膜覆盖。“隧道”长 30 m,宽 1.5 m,高 2 m,分为 7 个区,每个区长 4 m。TGT 和 CTGT 的“隧道”均一端开放,另一端安装根据温度和 [CO₂] 自动调节转速的换气扇,使“隧道”中的空气流通速度保持在 2~4 m/s。由于白天太阳的辐射,“隧道”内自动升温空气的定向匀速流动形成自然的温度梯度(白天最高温差 4.2 C,全天气平均温度相差 2.0 C)。夜间无光照,温度梯度消失。CTGT“隧道”每区之间装配 CO₂ 注入系统,它是由 5 根长 2m、多孔的橡胶管连接到直径 0.64 cm 的 PVC 管向隧道中供应 CO₂,换气扇拉动空气匀速通过隧道,形成距开放端最近的区保持现今 [CO₂] 水平,并随着距离增加 [CO₂] 逐级增加的浓度梯度。每区中央的 [CO₂] 由红外 CO₂ 分析仪 (Infra-red gas analyzer, Li-840, Li-Cor, Lincoln, NE, USA) 每 10 min 测量 1 次并自动保存数据,严格控制 [CO₂] 梯度。7 个区中 [CO₂] 从现今的 370 μmol/mol 增加到高于现今浓度水平 1 倍多的 800 μmol/mol,区间浓度差为 70 μmol/mol。每区 1.3 m 高度处的气温及 5cm 深的土壤温度用热敏电欧检测(每 10 min 测 1 次)并把结果自动储存在 Data Log 中。

TGT 和 CTGT 在 2001 年建成。试运行 1 年以后,于 2002 年 5 月 20 日把草本植物种子直接播种在每区的土壤中。种植密度为 730 株/m²(每株 13.7 cm²)。树木的种子在冬季层积后,早春直接播种在 [CO₂] 和温度可调节的人工气候室内。然后移栽到 TGT 和 CTGT 的每个区。草本植物在花期、木本植物在生长旺盛的 7 月份,对成熟叶片进行取样,每区选择 5 个叶片。木本植物的叶片均取自移栽后新长出的成熟叶片。所有实验材料在干燥剂中干燥后保存在独立的信封中带回,并于 2002 年 9 月~2003 年 6 月在北京大学生态学系植物生态实验室进行分析和测量。

1.2 实验方法

由于不同物种叶片具有不同的特征,因此对其采取不同的实验方法。在本研究中主要使用 3 种方法:

(1) 次氯酸钠法 将叶片沿边缘(均在叶的相同部位)剪下约 1×1 cm² 的小片,用稀释的次氯酸钠溶液(次氯酸钠饱和溶液与水的体积比为 1:9)浸泡约 12 h。然后,于近叶脉处用镊子撕起下表皮,将其展平在干净的载玻片上。每个样品撕取 5 片表皮。用质量百分比浓度为 0.5% 的番红溶液浸泡 1~2 min 染色,再用甘油胶(5g 明胶+30ml 蒸馏水+35ml 甘油+0.5g 石炭酸)封片。对 *Betula alleghaniensis*, *Chamaecrista fasciculata*, *Polygonum pensylvanicum*, *Medicago lupulina* 采用该方法。

(2) 铬酸法 将叶片沿边缘(均在叶的相同部位)剪下约 1×1 cm² 的小片,用质量百分比浓度为 10% 铬酸溶液浸泡约 15h。其后步骤同上。对 *Quercus rubra*, *Setaria faberii*, *Setaria italica* 采用该方法。

(3) 压膜法(印记法) 于干燥的叶片下表面均匀的涂一层透明的指甲油,完全风干后(约 1~2h)用透明胶布取下指甲油印记置于载玻片上,番红染色后用甘油胶封片。对 *Acer rubrum*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Abutilon theophrasti* 采用该方法。对于 *Ambrosia artemisiifolia*, *Abutilon theophrasti*, 先用刀片刮去表皮毛,再取印记。

所有样品用 Motic B5 显微镜及 Motic 显微成像系统测量并照相(放大倍数为 40 倍)。每片表皮选取 5 个视野进行计数和测量。观测指标为 ECD, SI, APL 和 SD。由于覆盖叶表面的表皮毛和蜡质过多,而除去这些附属物又部分地破坏了表皮细胞, *Abutilon theophrasti*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Acer rubrum* 3 种植物的表皮细胞轮廓不甚清晰,为了保证结果的准确,其 ECD 和 SI 数据没有进行进一步的统计分析。剩余 7 种植物仍包括 C₃ 植物(含豆科植物)、C₄ 植物,以及草本植物和木本植物功能型,仍具有一定的代表性。需要指出,本研究的所有测定,均是针对叶片远轴面进行的。具体指标定义为:

ECD 每个视野单位面积表皮细胞的个数(个/mm²),不包括气孔器的保卫细胞(但含气孔器的副卫细胞)。

SD 每个视野单位面积气孔器的个数(个/mm²)。一个气孔器包括两个保卫细胞及其所形成的孔隙。

SI 每个视野单位面积表皮上的气孔器数目除以相应面积上的表皮细胞的数目,即 $SI = SD/ECD$ 。

APL 气孔器两个肾形保卫细胞结合处的长度(μm)。每个视野中所有气孔的平均值。

1.3 数据处理

对于 *SD* 和 *APL*, 所测数据形成 10 种植物 × 2 个“隧道” × 7 个分区 × 5 个样品 × 5 个视野的数据矩阵。而对于 *ECD* 和 *SI*, 则为 7 个物种形成的数据矩阵。对于 *SD* 和 *ECD* 的原始数据进行了对数转换, 而 *SI* 和 *APL* 则用原始数据进行统计分析。将物种、“隧道”、区作为独立因子, 用 SAS 中的 GLM 模块进行 ANOVA 分析^[31], 探讨物种、[CO₂] 和温度的作用, 以及它们之间的相互作用是否对 *ECD*, *SI*, *APL* 和 *SD* 具有显著影响。如果温度和 [CO₂] 的作用显著的, 那么进一步通过回归分析检验其作用是否线性。对于有显著影响的因子, 用 Scheffe *post hoc* 检验进行多重比较。本文中 [CO₂] 是从现在的 380 μmol/mol 到 800 μmol/mol 的连续梯度, 因此把这一梯度的作用整体看作是 CO₂ 处理的结果时, 用 ANOVA 来分析 CO₂ 的作用, 会存在低估 CO₂ 作用的可能, 特别是当 CO₂ 的作用是非线性的时候。因此, 对于那些对 CO₂ 的反应不显著的气孔特性或 *ECD*, 具体到本文是 *SD* 和 *SI*, 用 CO₂ 作用系数 (Enhancement Ratio, *ER*) 来进一步分析 CO₂ 的作用, *ER* 表达为:

$$ER_{SD} = SD_E / SD_A$$

$$ER_{SI} = SI_E / SI_A$$

式中, ER_{SD} 为 CO₂ 对于 *SD* 的作用系数, SD_E 和 SD_A 分别为 [CO₂] 增加和现在 [CO₂] 情况下每一区某种植物或所有植物的 *SD* 的平均值; ER_{SI} 为 CO₂ 对于 *SI* 的作用系数, SI_E 和 SI_A 分别为 [CO₂] 增加和现在 [CO₂] 情况下每一区某种植物或所有植物的 *SI* 的平均值。

2 结果

2.1 不同物种间气孔特性及表皮细胞密度对温度和 [CO₂] 增加的反应

ANOVA 分析 (表 2) 表明, 物种对 *ECD*, *SI*, *APL* 和 *SD* 的作用显著的, 而温度的作用不显著, [CO₂] 的作用主要影响 *ECD* 和 *APL*。从物种、温度和 [CO₂] 的相互作用来看, 物种间 *ECD*, *SI* 和 *APL* 对 [CO₂] 反应趋势有显著差异 (物种 × 隧道), 而 *SD* 对 [CO₂] 反应趋势没有显著差异。物种间气孔特性及 *ECD* 对温度的反应也不一样, 其中对 *SI* 和 *APL* 的反应种间差异显著 (物种 × 区)。[CO₂] 和温度之间的相互作用对气孔特性及 *ECD* 没有显著影响 (隧道 × 区)。

表 2 表皮细胞密度 (*ECD*), 气孔指数 (*SI*), 气孔长度 (*APL*) 和气孔密度 (*SD*) 在不同物种、南北“隧道”、“隧道”内各区间, 以及它们的相互作用的方差分析结果

Table 2 F values resulting from ANOVA on *ECD* (Epidermal Cell Density), *SI* (Stomatal Index), *APL* (Stomatal Aperture Length), *SD* (Stomatal Density). Main factors are species, tunnel, zone and their interactions

	<i>DF</i> ₁	<i>ECD</i>	<i>SI</i>	<i>DF</i> ₂	<i>APL</i>	<i>SD</i>
物种 Species						
物种 Species	6	715.2***	87.94***	9	660.39***	335.54***
隧道 Tunnel	1	29.42***	2.71	1	3.55†	0.06
区 Zone	6	1.28	0.33	6	0.64	0.92
物种 × 隧道 Species × Tunnel	6	26.83***	9.8***	9	7.15***	1.26
物种 × 区 Species × Zone	36	1.04	1.36†	54	2.11***	0.91
隧道 × 区 Tunnel × Zone	6	1.74	0.41	6	1.24	1.59
功能型 Functional groups						
功能型 Functional Group (FG)	1	143.89***	69.17***	1	168.36	352.27***
隧道 Tunnel	1	1.49	0.09	1	0.09	0.02
区 Zone	6	0.06	0.26	6	0.65	0.1
功能型 × 隧道 FG × Tunnel	1	0.95	4.35*	1	1.69	0.4
功能型 × 区 FG × Zone	6	0.16	0.56	6	1.07	0.12
隧道 × 区 Tunnel × Zone	6	0.44	0.33	6	0.13	0.61

† $p < 0.1$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $P < 0.001$; *DF*₁ 为 *ECD* 和 *SI* 分析中的自由度, *DF*₂ 为 *APL* 和 *SD* 分析中的自由度 *DF*₁ is the freedom in *ECD* and *SI* analysis. *DF*₂ is the freedom in *APL* and *SD* analysis

表 3 可以看出 *ECD*, *SI*, *APL* 和 *SD* 在物种间的差异, 以及 [CO₂] 对它们的不同影响。进行 Scheffe *post hoc* 多重比较 (为了简洁, 统计结果没有在本文中列出) 表明, 物种间 *ECD*, *SD* 和 *APL* 差异显著。木本植物的 *ECD* 均大于草本植物, *SD* 只有 *Ambrosia artemisiifolia* 和 *Quercus rubra*, *Polygonum pensylvanicum* 和 *Setaria italica* 之间没有显著差异, 其余均差异显著。在

10 种植物中, APL 只有 *Abutilon theophrasti* 和 *Ambrosia artemisiifolia*, *Chamaecrista fasciculata* 和 *Quercus rubra* 之间没有显著差异, 其余均差异显著; SI 的 ANOVA 分析表明物种间差异显著, 但进一步的多重比较表明不同植物间差异不显著, 表明不同植物的 SI 相对于 ECD, AP 和 SD 来说较为稳定(表 3)。

综合 7 种植物的 ECD 来看, [CO₂] 增加使 ECD 从平均的 2632 ± 136.7SE 减少到 2383 ± 100.7SE, 其差异显著 ($p < 0.001$), 而 APL 也从平均的 14.1 ± 0.22SE 减少到 13.9 ± 0.21SE, 有一定差异 (Marginal significant, $p < 0.1$)。具体到每种植物, 它们对 [CO₂] 增加的反应不同, 如 *Quercus rubra*, [CO₂] 增加使 ECD 显著减小, SD 没有显著差异, SI 显著增加, APL 没有显著差异, 而其他植物的反应有所不同, 但对 [CO₂] 的反应差异不显著(表 3)。

表 3 不同植物间气孔特性及表皮细胞的密度 (ECD)

Table 3 The stomatal characteristics and ECD in different species (0~100cm)

物种 Species	[CO ₂]	ECD (No/mm ²)	SE	SD (No/mm ²)	SE	SI	SE	APL (μm)	SE
<i>Quercus rubra</i>	A	7138a	186.89	1164a	41.25	0.164b	0.0044	14.31a	0.167
	E	5323b	207.42	1155a	44.49	0.224a	0.0076	13.93a	0.191
<i>Betula papyrifera</i>	A	2885a	88.91	635a	18.22	0.223a	0.0042	21.18a	0.227
	E	2828a	96.42	665a	22.03	0.238a	0.0046	20.48a	0.257
<i>Acer rubrum</i>	A	N/A*	N/A*	985a	37.00	N/A*	N/A*	8.72a	0.122
	E	N/A*	N/A*	1084a	43.49	N/A*	N/A*	8.32a	0.112
<i>Abutilon theophrasti</i>	A	N/A*	N/A*	921a	15.29	N/A*	N/A*	10.23a	0.093
	E	N/A*	N/A*	891a	17.01	N/A*	N/A*	11.45a	0.119
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	A	N/A*	N/A*	1116a	28.87	N/A*	N/A*	11.52a	0.169
	E	N/A*	N/A*	1126a	26.63	N/A*	N/A*	10.30a	0.205
<i>Chamaecrista fasciculata</i>	A	2403a	59.45	532a	13.77	0.223a	0.0049	14.11a	0.197
	E	2315a	73.48	526a	14.80	0.229a	0.0049	13.86a	0.269
<i>Medicago lupulina</i>	A	2046a	83.63	624a	18.28	0.313a	0.0086	12.03a	0.351
	E	2098a	72.00	601a	15.86	0.293a	0.0075	11.72a	0.197
<i>Polygonum pensylvanicum</i>	A	1691a	40.42	463a	15.57	0.274a	0.0051	15.23a	0.242
	E	1721a	51.66	460a	17.62	0.267a	0.0047	14.46a	0.189
<i>Setaria faberii</i>	A	954a	26.14	270a	9.13	0.285a	0.0068	18.62a	0.349
	E	896a	12.21	249a	5.86	0.277a	0.0050	18.83a	0.268
<i>Setaria italica</i>	A	1446a	27.91	424a	10.99	0.296a	0.0057	15.88a	0.298
	E	1415a	23.38	401a	9.08	0.287a	0.0076	16.80a	0.285

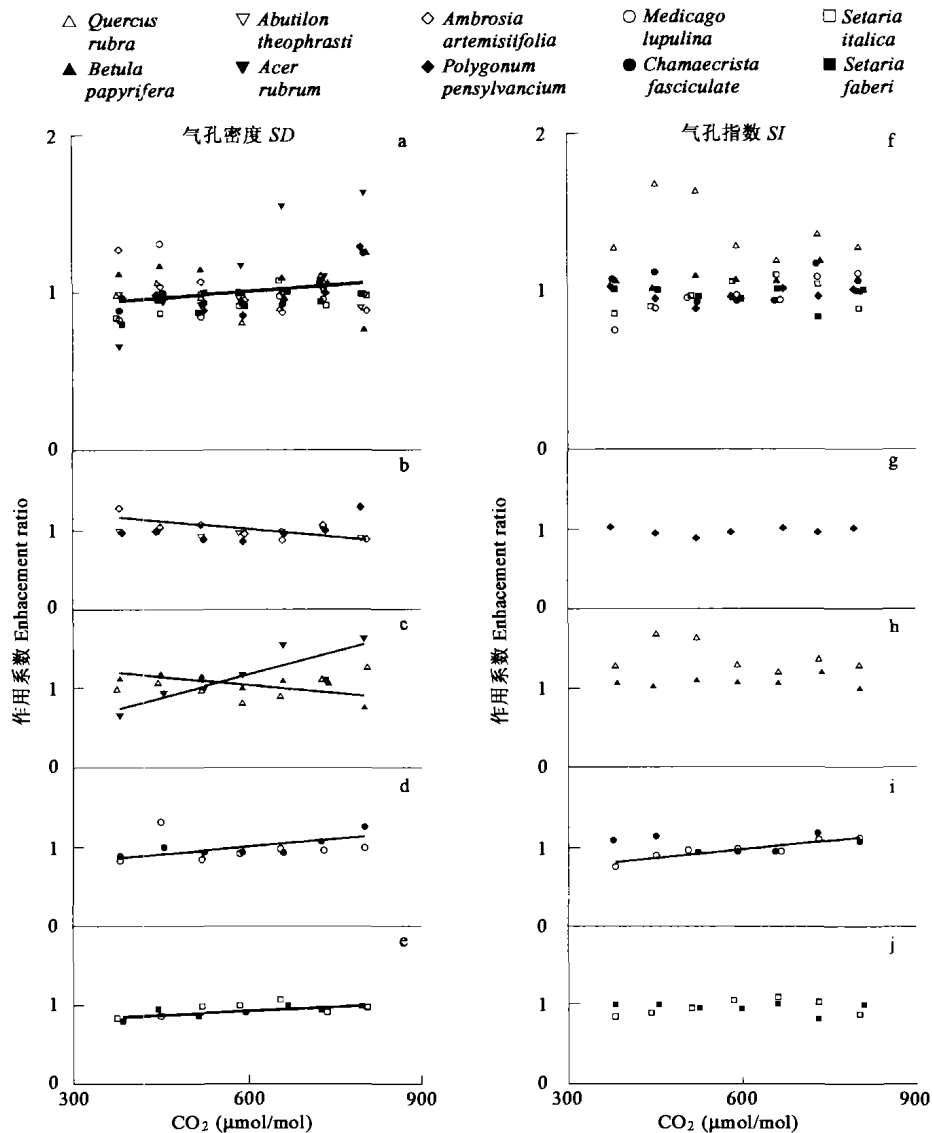
N/A* 无数据 Data not available; A 现在的 Ambient; E 升高的 Elevated; 平均值后不同字母代表温度“隧道”和 [CO₂]“隧道”差异显著 A different letter followed the mean of each species indicate the difference between TGT and CTGT is significant at $p < 0.05$ level by Scheffe *post hoc* test

如前所述, 由于本文中 [CO₂] 是一连续梯度处理, 因此用 ANOVA 来分析 CO₂ 的作用时, 可能会存在低估 CO₂ 作用的可能。因此进一步分析了 CO₂ 对于 SD 和 SI 的作用系数 ER_{SD} 和 ER_{SI} (图 1)。综合 10 个物种来看, ER_{SI} 随 [CO₂] 增加而增加 (图 1a), 7 个物种来看 ER_{SI} 不敏感 (图 1f)。单个物种来看, 不同物种间 ER_{SD} 随 [CO₂] 增加变化不同 (图 1b, 1c, 1d, 1e), 其中 3 个物种 ER_{SD} 随 [CO₂] 增加呈正相关, 2 个物种 ER_{SD} 随 [CO₂] 增加呈负相关, 其余物种相关性不显著。而只有一个物种的 ER_{SI} 随 [CO₂] 增加呈正相关, 其余物种相关性不显著。可见对于 [CO₂] 梯度, 所研究物种的 SD 比 SI 反应敏感。

物种间 SI ($p < 0.1$) 和 APL ($p < 0.05$) 对温度的反应有一定或显著差异 (表 2)。随温度增加不同物种 SI 反应不同, 有正、负相关, 也有呈非线性反应, 如 *Betula papyrifera* 的 SI 随温度增加先降低后升高, 还有无明显变化趋势的 (图 2a, 2b, 2c, 2d)。同样, 不同物种 APL 对温度的反应也不同 (图 2e, 2f, 2g, 2h)。尽管物种和温度的相互作用 (物种 × 区) 在 ECD 和 SD 上作用不显著, 但物种间 ECD 和 SD 对温度的反应趋势仍然存在差异 (图 3)。说明 ECD 和 SD 对温度增加的反应是不一致的。物种间 SI 对温度的反应有一定差异, 而 SD 对温度的反应不显著。可见对于温度梯度, 所研究物种的 SI 比 SD 反应敏感。

2.2 不同功能型植物对温度和 [CO₂] 的反应

如果将物种按照 C₃ 和 C₄ 功能型划分而不考虑功能型内物种的差异, 可以探讨 C₃ 和 C₄ 植物对温度和 [CO₂] 增加的反应。ANOVA 分析表明 (表 2), 针对本文所研究的物种, C₃ 植物和 C₄ 植物在 ECD, SI 和 SD 方面差异显著, 显然这种差异是由于组成物种所引起的。在功能型、[CO₂]、温度以及它们的相互作用方面, 功能型和 [CO₂] 之间的相互作用 (功能型 × 隧道) 对 SI 的作用显著的 ($p < 0.05$), 具体表现在 [CO₂] 增加使 C₃ 植物的 SI 增加, 而使 C₄ 植物的 SI 减低 (图 4)。

图1 CO_2 对于 SD 和 SI 的作用系数Fig. 1 Ratios of SD and SI enhancement by CO_2

图中只有线性相关性通过检验的物种才显示其相关趋势线,不同点表示不同物种的 $[\text{CO}_2]$ 作用系数 ER_{SD} 和 ER_{SI} (虚线处为 1) Only significant ($p < 0.001$) or marginally significant ($p < 0.1$) trend lines were shown. Different dot patterns denote enhancement ratios of different species, as ER_{SD} and ER_{SI} (dashed at 1). a. 所有物种, 呈正相关 All species, positive correlation ($R_2 = 0.0545$, $p = 0.0517$); b. 非豆科 C_3 植物 *Ambrosia artemisiifolia* 呈负相关 Non-legume C_3 plants, *Ambrosia artemisiifolia*, negative correlation ($R_2 = 0.5461$, $p = 0.0577$); c. 木本植物 *Betula papyrifera* 呈负相关, *Acer rubrum* 呈正相关 Trees, *Betula papyrifera*, negative correlation ($R_2 = 0.5648$, $p = 0.0514$), and *Acer rubrum*, positive correlation ($R_2 = 0.7319$, $p = 0.0141$); d. 豆科植物 *Chamaecrista fasciculata* 呈正相关 Legumes, *Chamaecrista fasciculata*, positive correlation ($R_2 = 0.5601$, $p = 0.0530$); e. C_4 植物 *Setaria faberii* 呈正相关 C_4 plants, *Setaria faberii*, positive correlation ($R_2 = 0.5452$, $p = 0.0581$); f. 所有物种 All species; g. 非豆科 C_3 植物 Non-legume C_3 plants; h. 木本植物 Trees; i. 豆科植物 *Medicago lupulina* 呈正相关 Legumes, *Medicago lupulina*, positive correlation ($R_2 = 0.8614$, $p = 0.0026$); j. C_4 植物 C_4 plants

3 讨论

Royer^[28]的综述表明,在已经发表的 176 种 C_3 植物中,其中包括 285 个 SD 数据和 145 个 SI 数据,通过实验手段取得的数据显示有 40% 的 SD 和 36% 的 SI 与 $[\text{CO}_2]$ 浓度呈负相关关系,如果仅考虑化石数据,这种负相关关系将会增加至 88% 和 94%。但是必须指出,与化石植物 SD 和 SI 相对应的 $[\text{CO}_2]$ 数据的获得一般是通过冰芯或其他方法得到的,它们之间存在某种程度的自相关关系,不是完全独立的。在本实验结果中就很难找到这种占主导地位的负相关性,并且除 $[\text{CO}_2]$ 外温度也对气孔特性和 ECD 有显著的影响。

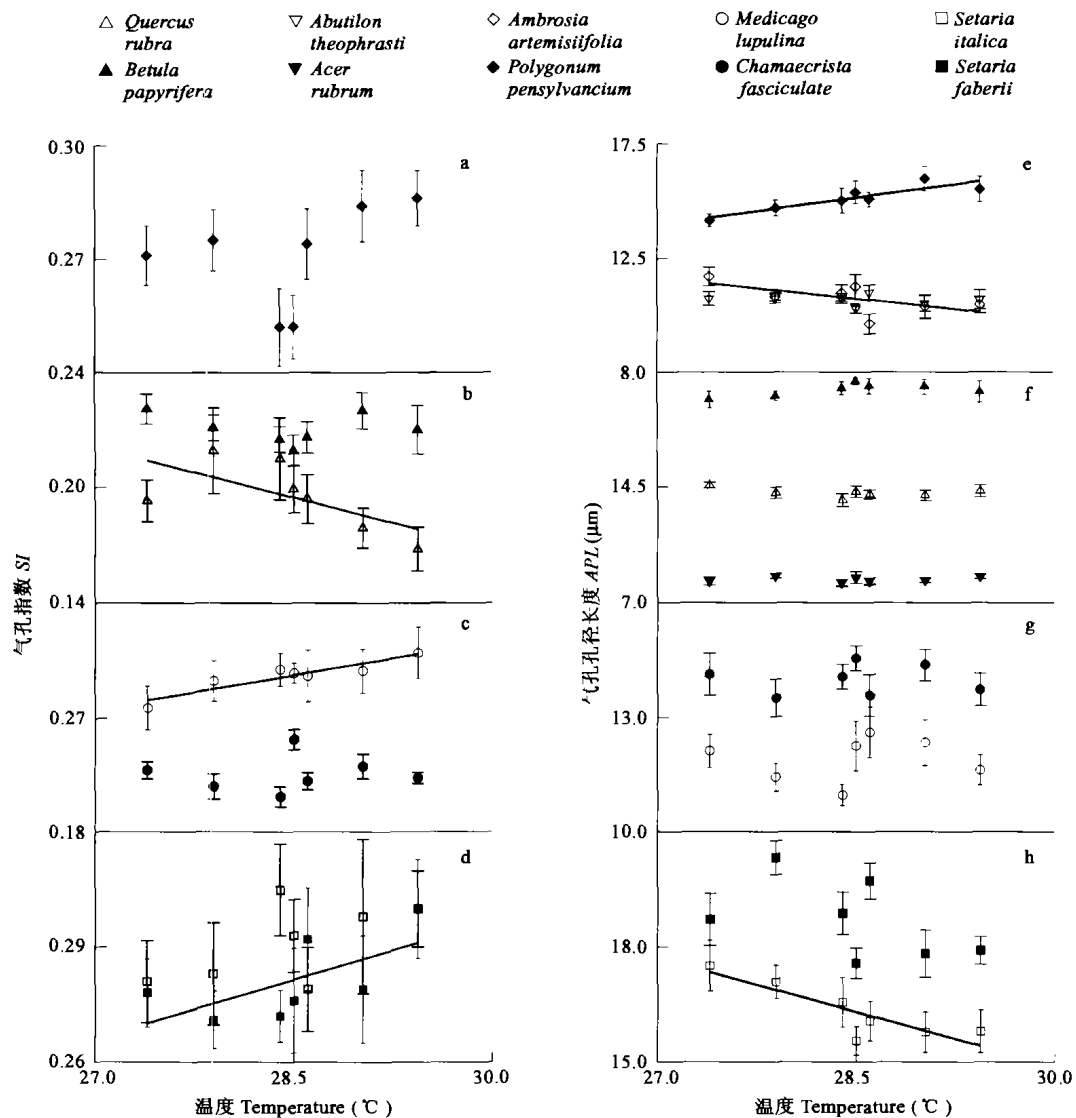


图 2 SI 和 APL 沿温度梯度的变化趋势

Fig. 2 The relationship between temperature and SI & APL

图中只有线性相关性通过检验的物种才显示其相关趋势线,不同点表示不同物种(每个点均为均值和标准误差区间,SI的 $n=50$,APL的 $n \geq 50$) Only significant ($p < 0.001$) or marginally significant ($p < 0.1$) trend lines were shown. Different dot patterns denote different species (for SI, $n=50$; mean ± 1 standard error; for APL, n from 150 to 500; mean ± 1 standard error); a. 非豆科 C₃ 植物 Non-legume C₃ plants; b. 木本植物 *Quercus rubra* 呈负相关 Trees, *Quercus rubra*, negative correlation ($R_2=0.5583$, $p=0.0536$); c. 豆科植物 *Medicago lupulina* 呈正相关 Legumes, *Medicago lupulina*, positive correlation ($R_2=0.6931$, $p=0.0201$); d. C₄ 植物 *Setaria faberii* 呈正相关 C₄ plants, *Setaria faberii*, positive correlation ($R_2=0.5302$, $p=0.0635$); e. 非豆科 C₃ 植物 *Polygonum pensylvanicum* 呈正相关, *Ambrosia artemisiifolia* 呈负相关 Non-legume C₃ plants, *Polygonum pensylvanicum*, positive correlation ($R_2=0.7670$, $p=0.0098$), and *Ambrosia artemisiifolia*, negative correlation ($R_2=0.4648$, $p=0.0916$); f. 木本植物 Trees; g. 豆科植物 Legumes; h. C₄ 植物 *Setaria italica* 呈负相关 C₄ plants, *Setaria italica*, negative correlation ($R_2=0.7389$, $p=0.0131$)

由于气孔是 CO₂ 进入植物体的主要通道,其数量和功能等对大气 [CO₂] 变化非常敏感。大气 [CO₂] 升高,导致细胞间 [CO₂] (C_i) 增加,为保持胞间 CO₂ 分压始终低于大气 CO₂ 分压(约 20%~30%左右),植物通常通过调节气孔开闭程度或减少气孔数量来降低 C_i [33]。研究也表明,暴露在高 [CO₂] 下的植物,其 APL 降低 [36]。这和本研究结果中综合全部 10 个物种来看的趋势相同。但是,本研究结果表明有些物种的 APL 的变化还与温度变化有关,如 *Polygonum pensylvanicum* 的 APL 随温度增加而增加, *Ambrosia artemisiifolia* 和 *Setaria italica* 的 APL 随温度增加而降低,其他物种不显著。这表明物种的 APL 变化不仅受 [CO₂] 的影响,还受温度影响。

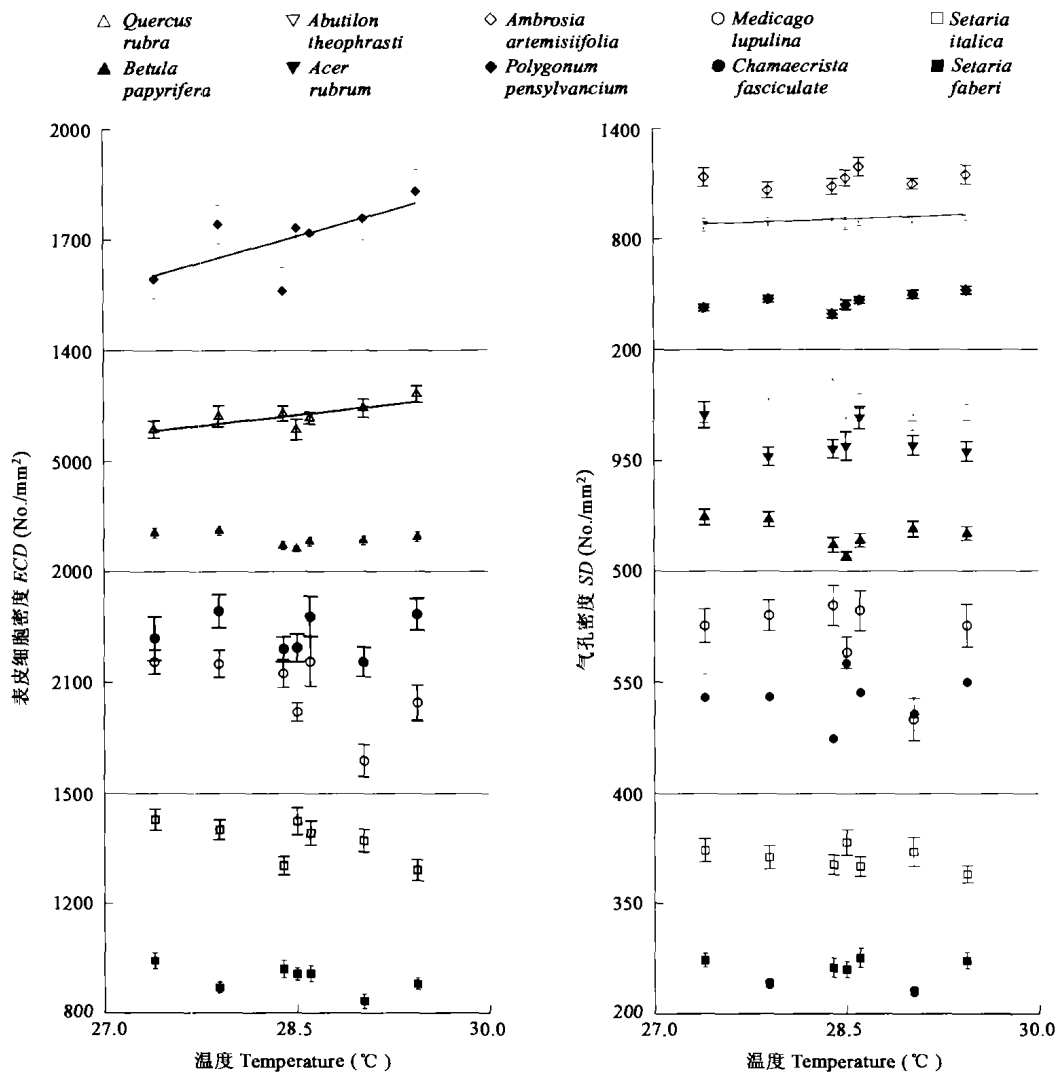


图3 ECD 和 SD 沿温度梯度的变化趋势

Fig. 3 The relationship between temperature and ECD & SD

图中只有线性相关性通过检验的物种才显示其相关趋势线,不同点表示不同物种(每个点均为均值和标准误差区间, $n=50$) Only significant ($p < 0.001$) or marginally significant ($p < 0.1$) trend lines were shown. Different dot patterns denote different species ($n=50$; mean ± 1 standard error); a. 非豆科 C_3 植物 *Polygonum pensylvanicum* 呈正相关 Non-legume C_3 plants, *Polygonum pensylvanicum*, positive correlation ($R_2=0.4671$, $p=0.0905$); b. 木本植物, *Quercus rubra* 呈正相关 Trees, *Quercus rubra*, positive correlation ($R_2=0.6076$, $p=0.0388$); c. 豆科植物 Legumes; d. C_4 植物 C_4 plants; e. 非豆科 C_3 植物, *Abutilon theophrasti* 呈正相关 Non-legume C_3 plants, *Abutilon theophrasti*, positive correlation ($R_2=0.5644$, $p=0.0516$); f. 木本植物 Trees; g. 豆科植物 Legumes; h. C_4 植物 C_4 plants.

从温度和 $[CO_2]$ 对植物叶片的气孔特性和 ECD 的作用来看,如果把所研究的 10 种植物作为一个整体, $[CO_2]$ 增加的作用大于温度增加的作用,主要影响 ECD 和 APL。具体到不同的物种,物种间对温度和 $[CO_2]$ 的反应有显著差异,并且同一个物种的 SD 和 SI 对温度和 $[CO_2]$ 的反应也不一致。这种物种间的差异,可能是因为物种本身叶片结构的差异,例如气孔器类型的不同,也可能是受物种生理特性的影响,因为物种本身对于不同外界影响的生理反应就是有显著差异的。对于同一个物种的 SD 和 SI 的反应不一致可能是由于物种在适应温度和 $[CO_2]$ 变化时,气孔的分化和伸展的速率不同造成的。

根据定义,SD 是一个对于叶片表皮细胞分化和伸展都敏感的指标,而 SI 则仅对表皮细胞分化敏感,因此一般 SI 相对于 SD 对环境条件的改变表现相对稳定。然而在实际工作中,SD 比较容易测定,特别是在表皮细胞的准确测定困难的情况下。SD 通常表现出与温度的正相关关系^[31, 37],但也有例外^[38]。本研究表明,在所研究的物种中,不仅 SD,有些植物的 SI 也对环境温度敏感。对于 SI,有些物种(如 *Setaria faberii*, *Medicago lupulina*)随温度升高而线性增加,有些物种(如 *Quercus rubra*)随温度增加而线性减小,还有些物种(如 *Betula papyrifera*)对温度的反应则是非线性的。而对于 SD,有些物种(如 *Abutilon theophrasti*)

随温度升高而线性增加,有些物种(如 *Betula papyrifera*, *Polygonum pensylvanicum*)表现出非线性反应。APL 对温度的反应也随物种而有较大差异。本研究所得出的温度对 SI 的显著影响,表明温度也影响表皮细胞的分化。尽管大多数植物在温度变动的环境下通过调整叶片发育的时间而正常生长,但本实验结果显示植物也有可能是通过调节其叶表皮细胞分化而适应周围的环境。

Woodward & Kelly^[6]对 100 种植物的 SD 分析表明,生活型(木本植物和非木本植物,乔木和灌木),生境(寒冷和温暖)及植物的系统进化关系都和叶片的 SD 没有显著的相关关系。Royer^[28]的综述也表明,在物种数目 1 种以上的属中,有 19% (16 属)和 14% (7 属)的属内植物对 [CO₂] 具有相同的反应趋势(正相关、负相关或不敏感)。本研究结果表明,不同生活型间(草本和木本植物)SD 和 SI 对 [CO₂] 和温度的反应没有明显差异,这进一步证明植物[气孔对 [CO₂] 和温度的响应与其生活型无关。但是对于 C₃、C₄ 不同功能型的植物其 SI 对 [CO₂] 的反应有明显的差异。

综上所述,不同物种的气孔特征对于温度和 [CO₂] 升高的反应是不同的,并且有些物种的反应是非线性的。由于这种不同,所以在用单一的气孔特征重建地质历史时期的 [CO₂] 时,除准确建立气孔参数与 [CO₂] 关系外,准确掌握大气温度对这一关系的影响,以及其他各种相关条件下气孔特征的变化,会大大提高重建的准确性。

References:

- [1] Korner C. Biosphere responses to CO₂ enrichment. *Ecol. Appl.*, 2000, **10**: 1590~1619.
- [2] Norby R J, Wullschlegel S D, Gunderson C A, et al. Tree responses to rising CO₂ in field experiments: implications for the future forest. *Plant Cell Environ.*, 1999, **22**: 683~714.
- [3] Long S P. Understanding the impacts of rising CO₂: the contribution of environmental physiology. In: MC Press, JD Scholes, GM Barker, eds. *Physiological Plant Ecology*. Oxford, UK: Blackwell Science, 1999. 263~282.
- [4] Pritchard S G, Rogers H H, Prior S A, et al. Elevated CO₂ and plant structure: a review. *Glob. Change Biol.*, 1999, **5**: 807~837.
- [5] Heath O V S. Control of stomatal movement by reduction in the normal carbon dioxide content of the air. *Nature*, 1948, **161**: 179~181.
- [6] Woodward F I, Kelly C K. The influence of CO₂ concentration on stomatal density. *New Phytol.*, 1995, **131**: 311~327.
- [7] Morison J I L. Stomatal response to increased CO₂ concentration. *J. Exp. Bot.*, 1998, **49**: 443~452.
- [8] Woodward F I. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre-industrial levels. *Nature*, 1987, **327**: 617~618.
- [9] Woodward F I, Bazzaz F A. The responses of stomatal density to CO₂ partial pressure. *J. Exp. Bot.*, 1988, **39**: 1771~1781.
- [10] Petit J R, Jouzel J, Raynaud D, et al. Climate and atmospheric history of the past 420 000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, 1999, **399**: 429~436.
- [11] Shackleton N J. The 100 000 year ice-age cycle identified and found to lag temperature, carbon dioxide, and orbital eccentricity. *Science*, 2000, **289**: 1897~1902.
- [12] Royer D L, Wing S L, Beerling D J, et al. Paleobotanical evidence for near present-day levels of atmospheric CO₂ during part of the Tertiary. *Science*, 2001, **292**: 2310~2313.
- [13] Beerling D J, Royer D L. Reading a CO₂ signal from fossil stomata. *New Phytol.*, 2002, **153**: 387~397.
- [14] Retallack G J. A 300-million-year record of atmospheric carbon dioxide from fossil plant cuticles. *Nature*, 2001, **411**: 287~290.
- [15] Beerling D J, Chaloner W G. The impact of atmospheric CO₂ and temperature change on stomatal density: observations from *Quercus robur* Lammas leaves. *Annals of Botany*, 1993, **71**: 231~235.
- [16] Beerling D J, Chaloner W G, Huntley B, et al. Variations in the stomatal density of *Salix herbacea* L. under the changing atmospheric

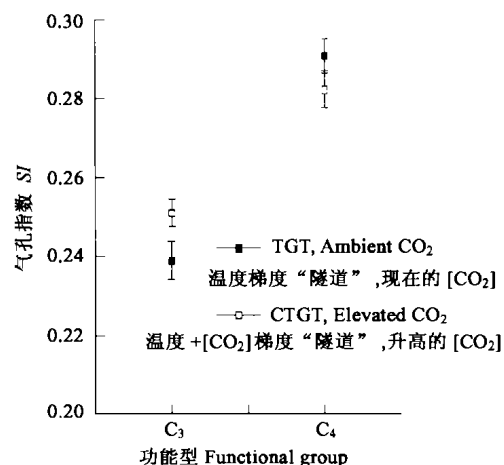


图4 C₃和C₄两个功能型的SI对[CO₂]变化的响应

Fig. 4 The effect of elevated [CO₂] on SI of C₃ and C₄ functional groups (FG)

将物种按照 C₃ 和 C₄ 功能型划分而不考虑功能型内物种的差异,功能型和 [CO₂] 之间的相互作用(功能型 × 隧道)对 SI 的作用是显著的 ($p < 0.05$) (每个点均为均值和标准误差区间,对于 C₃, $n = 875$; C₄, $n = 350$) Species were divided into C₃ and C₄ plants functional groups without considering species identity. Correlation between functional group SI and [CO₂] (FG × tunnel) was significant ($p < 0.05$) (for C₃, $n = 875$; mean ± 1 standard error; C₄, $n = 350$; mean ± 1 standard error)

- CO₂ concentrations of late-glacial and postglacial time. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.*, 1992, **336**: 215~224.
- [17] Knapp A K, Cocker M, Hamerlynck E P, *et al.* Effect of elevated CO₂ on stomatal density and distribution in a C-4 grass and a C-3 forb under field conditions. *Annals of Botany*, 1994, **74**: 595~599.
- [18] Korner C. Does global increase of CO₂ alter stomatal density. *Flora*, 1988, **181**: 253~257.
- [19] Ryle G J A, Stanley J. Effect of elevated CO₂ on stomatal size and distribution in perennial ryegrass. *Annals of Botany*, 1992, **69**: 563~565.
- [20] Ferris R, Taylor G. Stomatal characteristics of 4 native herbs following exposure to elevated CO₂. *Annals of Botany*, 1994, **73**: 447~453.
- [21] Dixon M, Lethiec D, Garrec J P. The growth and gas-exchange response of soil planted norway spruce [*Picea abies* (L.) Karts] and red oak (*Quercus rubra* L.) exposed to elevated CO₂ and to naturally occurring drought. *New Phytol.*, 1995, **129**: 265~273.
- [22] Bettarini I, Vaccari F P, Miglietta F. Elevated CO₂ concentrations and stomatal density: observations from 17 plant species growing in a CO₂ spring in central Italy. *Glob. Change Biol.*, 1998, **4**: 17~22.
- [23] Tognetti R, Minnocci A, Penuelas J, *et al.* Comparative field water relations of three Mediterranean shrub species co-occurring at a natural CO₂ vent. *J. Exp. Bot.*, 2000, **51**: 1135~1146.
- [24] Lodge R J, Dijkstra P, Drake B G, *et al.* Stomatal acclimation to increased CO₂ concentration in a Florida scrub oak species *Quercus myrtifolia* Willd. *Plant Cell Environ.*, 2001, **24**: 77~88.
- [25] Estiarte M, Penuelas J, Kimball B A, *et al.* Elevated CO₂ effects on stomatal density of wheat and sour orange trees. *J. Exp. Bot.*, 1994, **45**: 1665~1668.
- [26] Pritchard S G, Mosjidis C, Peterson C M, *et al.* Anatomical and morphological alterations in longleaf pine needles resulting from growth in elevated CO₂: interactions with soil resource availability. *Int. J. Plant Sci.*, 1998, **159**: 1002~1009.
- [27] He X Q, Lin Y H, Lin J X, *et al.* Relationship between stomatal density and the changes of atmospheric CO₂ concentrations. *Chin. Sci. Bull.*, 1998, **43**: 928~930.
- [28] Royer D L. Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 2001, **114**: 1~28.
- [29] Furukawa A. Stomatal frequency of *Quercus myrsinaefolia* grown under different irradiances. *Photosynthetica*, 1997, **34**: 195~199.
- [30] Clifford S C, Black C R, Roberts J A, *et al.* The effect of elevated atmospheric CO₂ and drought on stomatal frequency in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *J. Exp. Bot.*, 1995, **46**: 847~852.
- [31] Reddy K R, Robana R R, Hodges H F, *et al.* Interactions of CO₂ enrichment and temperature on cotton growth and leaf characteristics. *Environ. Exp. Bot.*, 1998, **39**: 117~129.
- [32] Houghton J T, Ding Y, Griggs D J, *et al.*, eds. *Climate change 2001: The scientific basis*. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. 892.
- [33] Wigley T M L, Raper S C B. Interpretation of high projections for global-mean warming. *Science*, 2001, **293**: 451~454.
- [34] SAS Institute. *SAS/STAT User's guide, Version 8.01 (On-line Docs)*. Cary, NC: SAS Institute, 1999.
- [35] Farquhar G D, Sharkey T D. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 1982, **33**: 317~347.
- [36] Morison J I L. Response of plants to CO₂ in water-limited conditions. *Vegetatio*, 1993, **104/105**: 193~209.
- [37] Ferris R, Nijs I, Behaeghe T, *et al.* Elevated CO₂ and temperature have different effects on leaf anatomy of perennial ryegrass in spring and summer. *Annals of Botany*, 1996, **78**: 489~497.
- [38] Apple M E, Olszyk D M, Ormrod D P, *et al.* Morphology and stomatal function of Douglas fir needles exposed to climate change: Elevated CO₂ and temperature. *Int. J. Plant Sci.*, 2000, **161**: 127~132.