

重碳酸盐胁迫下3种能源的生理特性 及无机碳利用能力对比研究

王瑞^{1,2}, 吴沿友^{1,3,*}, 邢德科³, 杭红涛¹, 刘莹¹,
张开艳¹, 姚凯¹

(1. 中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002;
2. 贵阳学院食品与制药工程学院, 贵阳 550003; 3. 江苏大学农业工程
研究院现代农业装备与技术省部共建教育部重点实验室, 江苏 镇江 212013)

摘要:以诸葛菜、芥菜型油菜和续随子为研究对象,通过模拟喀斯特高浓度 HCO_3^- (10 mmol/L) 逆境,将植物生理生化、地球化学技术应用生物质能源领域,用于喀斯特边际土地能源植物的筛选。在 210 d 的实验期内,定期测定三种植物叶片中脯氨酸、丙二醛、叶绿素、叶绿素荧光、光合日变化、碳酸酐酶活力、叶片稳定碳同位素组成和生物质产出。通过对比发现, HCO_3^- 胁迫条件下,诸葛菜、芥菜型油菜较续随子更为敏感,但续随子的生长易受低温影响。结果表明,诸葛菜以较高的喀斯特适生性、高碳酸酐酶活力而表现出最高的无机碳利用能力,综合诸葛菜适宜的生物质产出可推荐其作为喀斯特边际土地生物质能源植物。

关键词:喀斯特; 重碳酸盐; 胁迫; 生物质能源植物

中图分类号: Q5 文献标识码: A 文章编号: 1672-9250(2015)01-0021-10 doi: 10.14050/j.cnki.1672-9250.2015.01.004

近年来,石化能源的日益枯竭、价格飞涨和环境污染等矛盾日益凸显。生物质能源作为可再生、环境友好的替代能源而受到世界范围内的广泛关注。“不与人争粮,不与人争地”已成为公认的生物质能源可持续发展的必经之路,其中以不适合粮经作物生长的边际土地发展生物质能源成为热点^[1-2]。统计表明,我国拥有 $4.375 \times 10^6 \text{ km}^2$ 边际土地可用于生物质能源植物种植,若该面积的 10% 得以合理开发利用,每年可产出 $13.39 \times 10^7 \text{ t}$ 生物燃料^[3]。我国西南喀斯特地区以贵州为中心,面积达五十多万平方千米,是全球三大喀斯特集中连片区中面积最大、喀斯特作用发育最强烈的典型地区^[4]。喀斯特地貌因存在石漠化、干旱溶岩、土地瘠薄、高 pH、高钙、高重碳酸盐等限制因素而被认定为一种特殊的脆弱生境,严重地影响植物的生长发育^[5]。事实证明,有些植物在喀斯特逆境中是能够很好的生长发

育的,其机理在于当植物遭受喀斯特逆境(岩溶干旱、高钙、pH、重碳酸盐以及低无机营养等)后,喀斯特适生植物的叶片中的碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA, EC 4.2.1.1)活力升高,可经 CA 的催化作用交替地使用大气中的 CO_2 和土壤中的重碳酸盐经进行光合作用,正常生长^[6-8]。

续随子(*Euphorbia lathyris* L.)、芥菜型油菜(*Brassica juncea* L.)和诸葛菜(*Orychophragmus violaceus* L.)作为生物质能源植物已得到相关研究和报道^[9-11]。其中,诸葛菜是典型的喀斯特适生草本植物,具有高 CA 活力和高 HCO_3^- 利用能力。通过测定诸葛菜和甘蓝型油菜叶片 HCO_3^- 利用能力发现,前者 HCO_3^- 的利用能力为 $4.49 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,而后者仅为 $0.09 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ^[7];另外,该植物耐荫性强于芥菜型油菜,其作用机制为诸葛菜凭借自身高 CA 活力诱导高水分利用效率^[12]。但

收稿日期:2014-07-14;改回日期:2014-09-29

基金项目:中国博士后科学基金第 52 批面上资助项目(2012M521720),国家自然科学基金(NSFC41201577),国家自然科学基金(NSFC31070365),国家自然科学基金项目(NSFC31301243)。

第一作者简介:王瑞(1979-),男,博士,副教授,研究方向:生物质能源。E-mail: wangrui060729@126.com.

*通讯作者:吴沿友(1966-),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:生物地球化学。E-mail: wuyanyou@mail.gyic.ac.cn.

该植物因种子产量低而没有广泛用于粮经作物,而在园艺、绿化领域得到应用;芥菜型油菜为云贵川地方品种,也因产量低而逐渐被淘汰,但在云贵川三省喀斯特地区具有相当适应性;续随子已在贵州喀斯特地区引种,其生长情况受气温影响较大。

使用喀斯特边际土地种植能源植物,不仅可发展生物质能源产业,协调能源危机与食品安全矛盾,还对喀斯特生态系统的修复和改善极具意义。碳源是植物赖以生长的重要营养物质,但喀斯特生境中高浓度的 HCO_3^- 不仅会导致该地区的土壤 pH 值偏高,还是喀斯特地区作物生长主要的伤害因子,浓度可达 4.8 mmol/L,严重地影响植物的生长发育^[13-14]。因此,喀斯特适生能源植物的选择是这一技术领域的共性关键技术之一。本研究基于(1)喀斯特适生植物可借助 CA 的催化作用交替利用土壤中的 HCO_3^- 和空气中的 CO_2 作为无机碳源进行光合作用^[7]; (2)稳定碳同位素的强烈分馏特征可用于识别植物体无机碳来源、份额^[15],为理论基础;将植物生理生化、地球化学技术用于生物质能源领域。以芥菜型油菜 (*Brassica juncea* L.)、续随子 (*Euphorbia lathyris* L.)、诸葛菜 (*Orychophragmus violaceus* L.) 为研究对象,人工模拟喀斯特高 HCO_3^- 生长条件,以已知 $\delta^{13}\text{C}$ 值的 NaHCO_3 为无机碳源,定期测定分析同等条件下三种植物叶片 CA 活力、叶绿素含量、净光合速率、叶绿素荧光及光合日变化特征参数、稳定碳同位素组成等指标,根据双标记法测定三种植物的无机碳利用份额^[16],结合生物质产出对三种能源植物在喀斯特边际土地中适生性和潜质进行比较和讨论。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

芥菜型油菜 (*Brassica juncea* L., 藏油 5 号)、续随子 (*Euphorbia lathyris* L.) 和诸葛菜 (*Orychophragmus violaceus* L.) 种子分别由贵州省油菜研究所、贵州省亚热带作物研究所、中国科学院地球化学研究所提供。试验过程中所使用试剂均为分析纯。碳源标记物 NaHCO_3 的 $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ 值由中国科学院地球化学研究所 MAT-252 质谱仪测定,测量精度为小于 $\pm 0.1\%$ 。

1.2 试验设计与处理

实验于中国科学院地球化学研究阳光房内进行,于 2012 年 9 月 25 日将上述三种植物种子经

5% H_2O_2 消毒处理 30 min,经蒸馏水洗涤后直接放入培养盆中萌发、培养。每种植物共计种植 16 盆,分为 2 组(8 盆/组),每组分别加入 $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ 值为 -27.38% 、 -18.81% 的 NaHCO_3 用于标记,每盆栽种植株 4 株。培养盆(直径:21 cm、高:24 cm)内装入 4 kg 蛭石、石英砂混合物(按质量 1:1 混合,石英砂使用前经 0.5 mol/L 盐酸浸泡、自来水冲洗、蒸馏水冲洗 3 次),混合物浇入经改性霍格兰营养液,阴干后使培养土内含有 KNO_3 (6 mmol/kg)、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (4 mmol/kg)、 MgSO_4 (2 mmol/kg)、 $\text{Fe}(\text{Na})\text{EDTA}$ (2 mmol/kg)、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0.25 mmol/kg)、 NH_4Cl (0.75 mmol/kg)、 KCl (2 mmol/kg)、 H_3BO_3 (0.05 mmol/kg)、 MnSO_4 (0.04 mmol/kg)、 ZnSO_4 (0.04 mmol/kg)、 CuSO_4 (0.02 mmol/kg)、 $\text{Mo}(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (0.02 mmol/kg)、 NaHCO_3 (10 mmol/kg), pH 8.3。根据文献报道数据^[13-14],整个实验期间培养基内 HCO_3^- 浓度维持在 10 mmol/L 水平,每 5 d 经称重法使用蒸馏水保持培养基中含水率为 25%,每 15 d 根据 Zuo 等^[17]报道方法测定培养基中碳酸氢根离子浓度,浇入补足 NaHCO_3 量的上述 1/4 改性霍格兰营养液。阳光房通过换气扇使室内温度与外界一致。整个实验期内平均温度为 11.5 °C,最低、最高气温分别为 -4 °C、26 °C,其中 17 d 低于 0 °C;平均最大光强为 1100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。分别于 50、100、150、180 d 测定各植物相关指标,210 d 时将所有植株采收,整个实验周期为 210 d。

1.3 生化指标和植物叶片 $\delta^{13}\text{C}$ 测定

按文献报道方法分别于 50、100、150、180 d 测定植株叶片叶绿素、丙二醛、脯氨酸含量^[18];植物叶片 CA 活力、稳定碳同位素组成及无机碳利用份额按吴沿友等报道方法测定、计算^[7]。

1.4 生物量、种子含油率、油酸值

实验至 210 d 后,按地上部分、地下部分分别采收,于 80 °C 真空干燥 48 h 后称重后得生物量;三种植物种子含油率按 GB/T 14488.1-2008 测定,油酸值按 GB/T 5530-2005 测定。

1.5 光合作用、光合日变化特征及叶绿素荧光测定

三种植物叶片的光合作用日变化特征参数于 2013 年 3 月 6 日(多云)测定。选取健康、第 4 片完全展开叶进行测定(测定时用缓冲瓶使 CO_2 浓度相对稳定,每处理测定 3 植株,每植株测定 3 叶片,每叶片测 5 次,取平均值。使用 Li-6400 光合仪(美国

LI-COR 公司)每隔 1 h 测定光合作用日变化特征参数,具体包括:净光合速率(P_n , $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)、蒸腾速率(T_r , $\text{mmol H}_2\text{O}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)、气孔导度($Cond$, $\text{mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)、胞间 CO_2 浓度(C_i , $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol}$)等特征参数,并计算出叶片光能利用率(LUE , 即 P_n/Par , %)和瞬时水分利用效率(WUE , 即 P_n/T_r , $\mu\text{molCO}_2/\text{mmol}$)。

当日光合有效辐射达到并保持 $0 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 1 h 后,利用美国 Li-6400-40 便携式荧光仪及配套的 Li-6400-40 荧光叶室进行叶绿素荧光测定。按 Kooten^[19]报道方法测定以下荧光参数指标:初始荧光(F_0)、最大荧光(F_m)并计算出 PS II 最大光化学效率(F_v/F_m)= $(F_m-F_0)/F_m$ 及 PS II 潜在活性(F_m-F_0)/ F_0 。

1.6 数据处理

数据使用 SPSS 13.0 和 Origin 8.0 软件对数据进行方差分析和作图。各指标结果以平均值 \pm 标准偏差表,并经 Duncans 多重比较做显著性差异分析($P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著, $P > 0.05$ 表示差异不显著)。

2 结果与分析

2.1 植物叶片脯氨酸含量

植物体内脯氨酸含量在一定程度上可以反映植物对环境的抗逆性,且成正比^[20]。由图 1 可见,随着 HCO_3^- 胁迫的积累,三种植物叶片中的脯氨酸含量总体呈逐渐升高趋势。其中,诸葛菜叶片中脯氨酸含量相对于其他两种植物一直处于较高水平,由 $94.67 \pm 3.40 \mu\text{g/g}$ (50 d) 上升至 $297.24 \pm 7.14 \mu\text{g/g}$ (180 d)。续随子叶片中脯氨酸表现出先下降,后上升的趋势。50 d 时,续随子叶片中脯氨酸含量为 $30.44 \pm 2.29 \mu\text{g/g}$,至 100 d 时为 $17.91 \pm 2.01 \mu\text{g/g}$,随后急剧上升,至 180 d 时,上升至 $336.28 \pm 6.55 \mu\text{g/g}$,推测其原因在于续随子为喜暖植物,抗寒性差^[21]所致。实验期 50 d、100 d 气温分别为 $12 \sim 16 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $-3 \sim 0 \text{ }^\circ\text{C}$ 导致其叶片中脯氨酸含量降低;而在 150 d 和 180 d,气温分别为 $11 \sim 17 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $14 \sim 21 \text{ }^\circ\text{C}$,随着气温上升,续随子在 HCO_3^- 胁迫积累下抗性大幅上升。

2.2 植物叶片丙二醛含量

丙二醛作为植物器官发生膜脂过氧化作用的产物之一,其含量可以反映植物器官衰老或逆境条件下的过氧化和对逆境条件的反应程度^[18]。由图 2

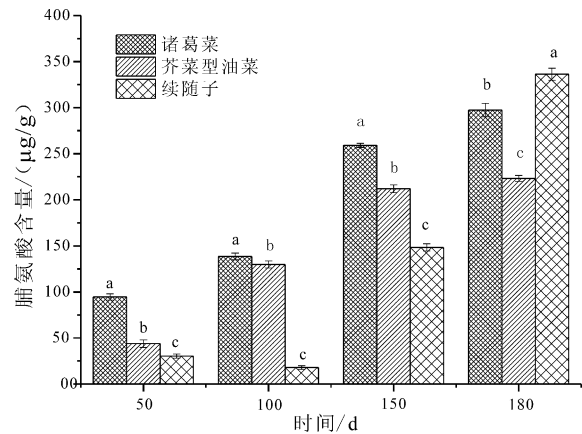


图 1 HCO_3^- 胁迫下三种植物叶片的脯氨酸含量变化(不同字母表示差异达 0.05 显著水平)

Fig. 1 Changes of proline contents in the three plant leaves under HCO_3^- stress (Different letters mean significant difference at the 0.05 level)

可见,随着 HCO_3^- 胁迫的积累,诸葛菜和芥菜型油菜叶片中丙二醛含量呈上升趋势,芥菜型油菜叶片中丙二醛含量上升幅度最大,说明该植物叶片中细胞衰老程度最为严重。整个实验期中,诸葛菜叶片中平均丙二醛含量最低($2.91 \mu\text{mol/L}$),其次为续随子($3.90 \mu\text{mol/L}$),芥菜型油菜最高($4.15 \mu\text{mol/L}$)。100 d 时,续随子叶片丙二醛含量升至 $6.55 \mu\text{mol/L}$,结合脯氨酸含量变化趋势(图 1)可推测续随子除受 HCO_3^- 胁迫影响外,低温条件对其生长也有影响。

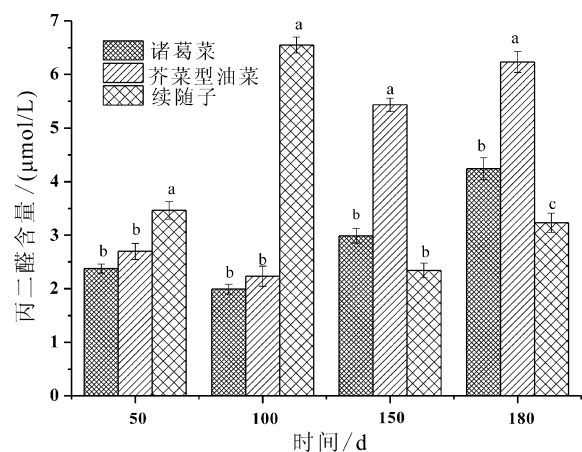


图 2 HCO_3^- 胁迫下三种植物叶片的丙二醛含量变化(不同字母表示差异达 0.05 显著水平)

Fig. 2 Changes of malondialdehyde contents in the three plant leaves under HCO_3^- stress (Different letters mean significant difference at the 0.05 level)

2.3 植物叶片净光合速率

光合作用是植物最重要的生理活动之一,与其生物量直接相关,也受植物生长环境影响。由图3可见,胁迫初期(50 d)续随子叶片净光合速率最高($10.92 \pm 0.36 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$),芥菜型油菜次之($10.22 \pm 0.18 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$),诸葛菜最低($7.51 \pm 0.29 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)。100 d时,三种植物叶片的净光合速率均有所降低,其中以续随子降低幅度最大(77.93%),而诸葛菜降低幅度最小(46.53%)。150 d时,续随子和诸葛菜叶片净光合速率上升,续随子上升幅度较大,而芥菜型油菜叶片的略有下降。随着 HCO_3^- 胁迫的积累,诸葛菜和芥菜型油菜叶片的净光合速率均有所下降,而续随子几乎没有变化。结合丙二醛、脯氨酸含量(图1、图2)可推测低温条件对于续随子植株的影响较大。

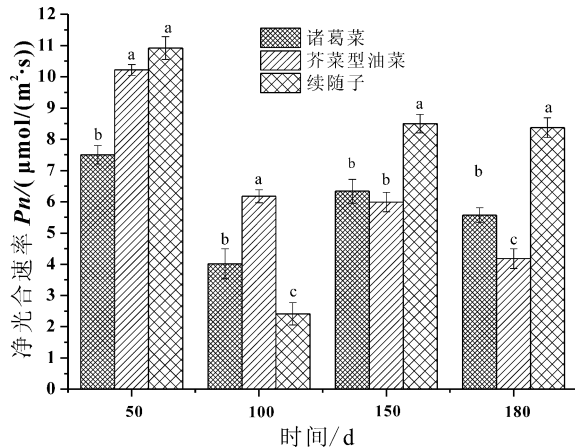


图3 HCO_3^- 胁迫下三种植物叶片的净光合速率(P_n)变化(不同字母表示差异达0.05显著水平)

Fig. 3 Changes of P_n in the three plant leaves under HCO_3^- stress (Different letters mean significant difference at the 0.05 level)

2.4 植物叶片叶绿素含量与叶绿素荧光参数

叶绿素含量是影响植物叶片光合速率的重要因素之一,一定程度上能反映植物叶片的光合能力,直接影响植物的生长^[22]。由图4可见,在整个胁迫过程中,续随子叶片中叶绿素a、叶绿素b及叶绿素总含量处于最高水平,诸葛菜次之,芥菜型油菜最低。随着胁迫的积累,三种植物叶片中叶绿素a/b值均表现出不同程度下降。150 d时,诸葛菜、芥菜型油菜叶片的叶绿素a/b值较100 d明显降低(分别为18.85%、22.28%);180 d时诸葛菜叶片中叶绿素a/b值小幅上升,芥菜型油菜则大幅降低了24.10%;而150 d以后,续随子叶片叶绿素a/b下降幅度较小,180 d时较100 d下降了10.97%。叶

绿素a/b值大小可以反映捕光色素复合体II在叶绿素结构中的份额^[23],由图4(C)可说明续随子、诸葛菜光色素复合体II含量高于芥菜型油菜。结合叶绿素a、b及含量数据说明,诸葛菜、续随子更有利于在逆境下对光能的捕获。

叶绿素荧光可与光合特性、水分代谢等特性互补,用于植物对环境生态适应性机制的揭示^[22]。由图5可见,三种植物叶片在胁迫条件下初始荧光(F_0)与植物叶片中叶绿素含量(图4(D))变化趋势大致相似。整个实验周期过程中,三种植物叶片的初始荧光(F_0)、最大荧光(F_m)由大至小顺序为诸葛菜>续随子>油菜,且差异显著($P < 0.05$)。研究表明,非逆境下植物叶片的 F_v/F_m 值应低于 0.832 ± 0.004 ,而逆境下大多数植物的 F_v/F_m 值会显著降低^[24]。由图5可见,150 d以前,三种植物叶片的 F_v/F_m 值均小于 0.832 ± 0.004 ,说明三种植物对 HCO_3^- 胁迫均表现出一定反应。180 d时,三种植物叶片的PSII最大光化学效率降低,且发生差异变化($P < 0.05$),推测 HCO_3^- 胁迫积累所致。结合三种植物PSII潜在活性(F_v/F_0)情况,可推测诸葛菜、芥菜型油菜较续随子对 HCO_3^- 更为敏感。

2.5 三种植物光合作用日变化特征

2.5.1 净光合速率(P_n)和光能利用率(LUE)日变化特征

植物的光合作用是植物正常生长的基础,而光合作用的效率高低可用来描述植物光合作用运作的程度以及作为反映植物的生产力和产出的根本因素。由图6所示,这三种植物的叶片净光合速率(P_n)日变化走势不同,其中诸葛菜和芥菜型油菜叶片的净光合速率(P_n)日变化走势大致相似,呈“单峰”曲线,且这两种植物叶片的 P_n 值都是从8:00~10:00迅速上升并于10:00达到最大值,分别为 $8.56 \pm 0.67 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和 $6.89 \pm 0.64 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,之后呈迅速下降走势。而续随子叶片的 P_n 日变化走势呈“双峰”曲线,在10:00、12:00出现两个峰值,分别为 $9.19 \pm 0.27 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和 $9.29 \pm 0.49 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,并在11:00时出现低谷,“午休”现象较为明显,而诸葛菜和芥菜型油菜没有出现“午休”现象,之后三种植物 P_n 值逐渐下降,均在18:00达到最低值。由诸葛菜、芥菜型油菜和续随子的日均 P_n 值(续随子: $6.85 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、诸葛菜: $4.87 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、芥菜型油菜: $3.48 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)可见,续随子的光合日均生产力高于其他两种植物,

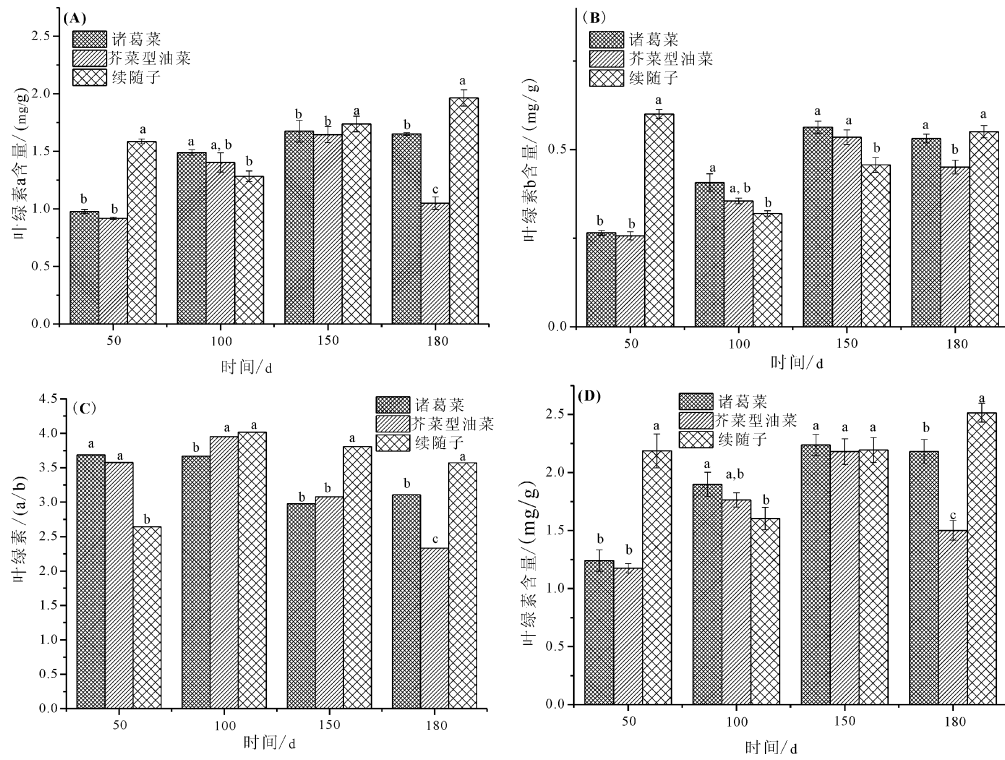


图 4 HCO_3^- 胁迫下三种植物叶片:(A)叶绿素 a 含量,(B)叶绿素 b 含量,(C)叶绿素 a/b,(D)叶绿素含量 (不同字母表示差异达 0.05 显著水平)

Fig. 4 Changes of the three plant leaves under HCO_3^- stress; (A) Chlorophyll a content, (B) Chlorophyll b content, (C) Chlorophyll a/b, (D) Chlorophyll content. (Different letters mean significant difference at the 0.05 level)

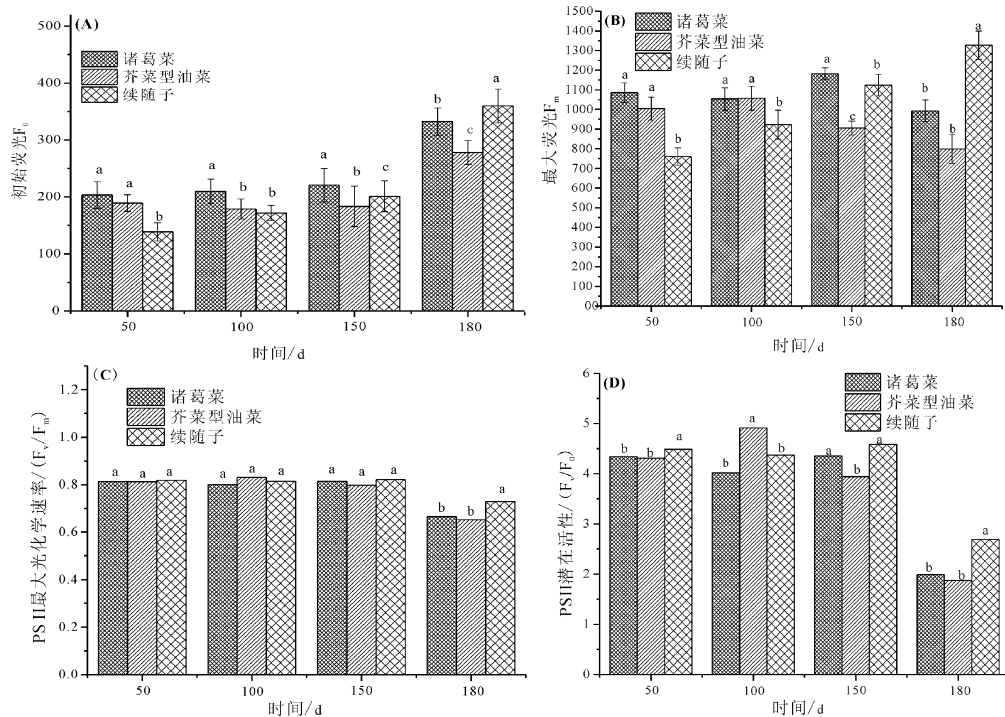


图 5 HCO_3^- 胁迫下三种植物叶片:(A)初始荧光(F_0);(B)最大荧光(F_m);(C)PSII 最大光化学效率(F_v/F_m); (D)PSII 潜在活性(F_v/F_0)(不同字母表示差异达 0.05 显著水平)

Fig. 5 Changes of the three plant leaves under HCO_3^- stress; (A) Initial fluorescence (F_0); (B) Maximum fluorescence (F_m); (C) PSII maximum photochemistry efficiency (F_v/F_m); (D) PSII potential activity (F_v/F_0). (Different letters mean significant difference at the 0.05 level)

且与诸葛菜、芥菜型油菜存在差异 ($P < 0.05$)。LUE 能够反映植物在一定时间内对光合作用的利用效率。在光能利用效率方面,三种植物均表现上午高中午低,下午升高傍晚再次下降的变化趋势,三种植物除了芥菜型油菜在 9:00,其他两种植物光能利用效率峰值在 8:00 均达到最高值。由三种植物叶片的日均 LUE 值可推断出续随子的对于光强的利用能力高于诸葛菜、芥菜型油菜。这与三种植物的净光合速率的日均值比较得出的结果相对应。

2.5.2 气孔导度(Cond)和胞间 CO₂ 浓度(Ci)日变化特征

叶片上的气孔在控制 CO₂ 吸收和水分损失的平衡中起着关键作用^[25]。尤其是在高温、低温、高光强及土壤干旱等环境下引起植物叶片的气孔部分关闭或光呼吸加强等原因导致了植物的“午休”或光能利用效率低的表现。而光合速率的降低不但与气孔导度有关,而且还与叶肉细胞羧化能力相关。由图 7 可见,测试时间内,上午 8:00 时三种植物叶片

的 Cond 值基本处于最高值(续随子:0.13 mmol/(m²·s)、诸葛菜:0.08 mmol/(m²·s)、芥菜型油菜:0.08 mmol/(m²·s)),为适应高光强和高温条件,三种植物的 Cond 发生相同趋势的变化:三种植物叶片 Cond 值均表现出逐渐下降的变化趋势。从上午 8:00~10:00,续随子和芥菜型油菜 Cond 值于 9:00 处于一低谷值,而诸葛菜却处于峰值。根据光合仪所记录光强数据,判定为环境光强变化而导致。而 10:00~14:00,三种植物叶片 Cond 值逐渐下降至低谷值,推测是由于植物受到高光强和高温环境抑制所致。14:00 之后的叶片 Cond 值小幅度上升然后下降,这是由于空气温度的下降而使植物叶片部分气孔打开,但整体对植物的光合作用的没有较大影响。而胞间 CO₂ 浓度(Ci)变化与 Cond 相反,说明随着时间的推移,空气温度和光强逐步增强,叶片的 Cond 也在增加,那么 CO₂ 的消耗量逐渐增大,Ci 降低,但温度上升到植物的阈值,高光强的抑制使得植物叶片叶肉细胞羧化能力下降和气孔部分关

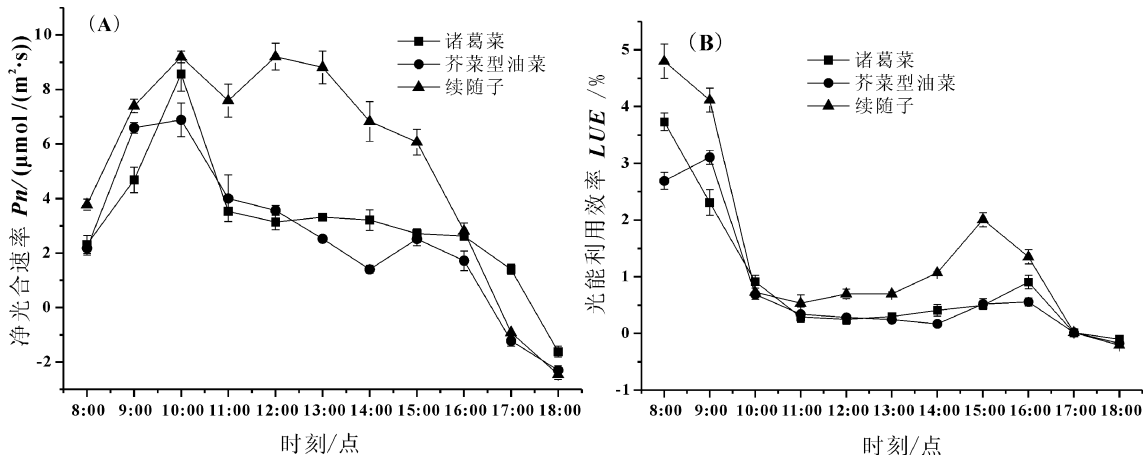


图 6 三种植物叶片(A)净光合速率(P_n)和(B)光能利用率(LUE)日变化
Fig. 6 Diurnal changes of Pn and LUE for the three plant leaves

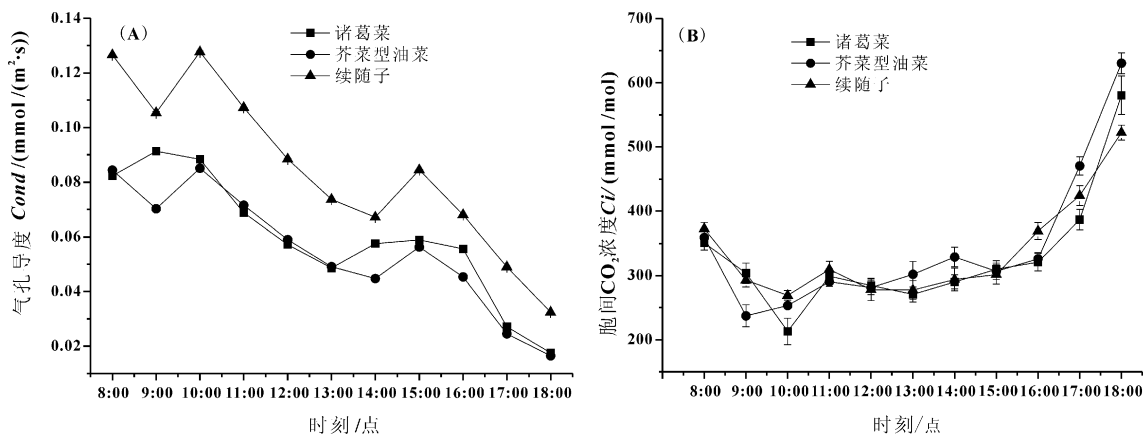


图 7 三种植物叶片(A)气孔导度(Cond)、(B)胞间 CO₂ 浓度(Ci)日变化
Fig. 7 Diurnal changes of Cond and Ci for the three plant leaves

闭,导致 C_i 保持在相对稳定的水平,而后,光照减少,温度下降, $Cond$ 一定程度上打开,但此时光强的减少限制了植物的光合能力。随后植物的暗呼吸增加,而光强逐渐减少,气孔也渐渐关闭,致使 C_i 保持较高的浓度。

2.5.3 蒸腾速率 (T_r) 和瞬时水分利用效率 (WUE) 日变化特征

本研究采用了瞬时水分利用效率 (WUE) 来衡量植物在一天内的水分利用情况。如图 8 所示,三种植物的 WUE 总体上呈现下降的趋势,8:00~9:00 内,三种植物的 WUE 上升,这表明植物的光合作用上升的幅度大于植物的蒸腾作用的上升幅度。而随后三种植物的 WUE 逐步下降,这是由于植物的光合作用的上升幅度小于植物的蒸腾作用的上升幅度。同时也可以看出,续随子相对于其他两种植物 WUE 较高,而诸葛菜和芥菜型油菜在 8:00~10:00 内, WUE 值表现出一定差异,说明诸葛菜比芥菜型油菜更能充分利用光源进行光合作用,这与诸葛菜的高效光合利用效率有关。

本研究发现,同等条件下三种植物的光合日变化有一定差异。续随子叶片的 P_n 、 LUE 、 $Cond$ 、 C_i 、 T_r 、 WUE 均高于两种植物。结合三种植物叶片 100 d 时脯氨酸、丙二醛、叶绿素荧光等数据可推测出低温环境对续随子生长的负面影响相对于其他两种植物较大。

2.6 植物叶片 CA 活力与 HCO_3^- 利用份额

喀斯特适生植物可借助 CA 的催化作用交替利用土壤中的 HCO_3^- 和空气中的 CO_2 作为无机碳源进行光合作用^[7]。由图 9(A)可见,三种植物叶片中 CA 活力随着 HCO_3^- 胁迫积累均呈上升趋势。其中以芥菜型油菜叶片中 CA 活力处于最高水平,诸

葛菜次之,续随子最低。对于 HCO_3^- 利用份额而言,诸葛菜在整个胁迫过程中都处于最高水平,续随子次之,芥菜型油菜最低。180 d 时,三种植物叶片中 HCO_3^- 利用份额分别为 15.45%、11.91% 和 12.94%。结合脯氨酸、丙二醛、净光合速率、叶绿素和叶绿素荧光数据(图 1—5)可见,诸葛菜、油菜对 HCO_3^- 胁迫更为敏感;在光合日变化特征(图 6—8)方面,诸葛菜、芥菜型油菜在 HCO_3^- 胁迫条件下表现出较续随子低的 P_n 、 LUE 、 $Cond$ 、 C_i 、 T_r 、 WUE 。从诸葛菜、芥菜型油菜的高 HCO_3^- 利用份额可推测,本研究设置的 HCO_3^- 胁迫条件下诸葛菜、芥菜型油菜叶片内的碳酸酐酶较续随子易被激活,从而更多地凭借高 CA 活力交替利用土壤中的 HCO_3^- 和空气中的 CO_2 作为无机碳源进行光合作用。虽然芥菜型油菜在整个胁迫过程中表现出最高 CA 活力,但该植物的 HCO_3^- 利用能力并不是最高的。吴沿友等认为,喀斯特逆境下植物对碳酸氢根离子的利用能力的大小与碳酸酐酶活力以及植物的喀斯特适生性有关^[7]。Fabre 等^[25] 研究发现,位于植物细胞质和细胞膜上的碳酸酐酶共同参与催化无机碳 (HCO_3^-) 用于叶绿体的光合作用,但不同植物、不同组织的碳酸酐酶同工酶的功能尚不清晰。而各同工酶对催化无机碳 (HCO_3^-) 贡献可能有所差异。而本研究中测定的是植物叶片中的总碳酸酐酶活力,目前尚不明确各同工酶的功能和贡献。因此,总碳酸酐酶活力不一定与无机碳 (HCO_3^-) 利用能力成正比。

2.7 三种植物生物量、种子含油率及种子油酸值

纤维素、半纤维素、木质素及植物油是重要的生物基化学品原来来源。由表 1 可见,在同等胁迫条件下,64 株芥菜型油菜总生物量(干重)最高(140.79 g),诸葛菜次之(116.62 g),续随子最低

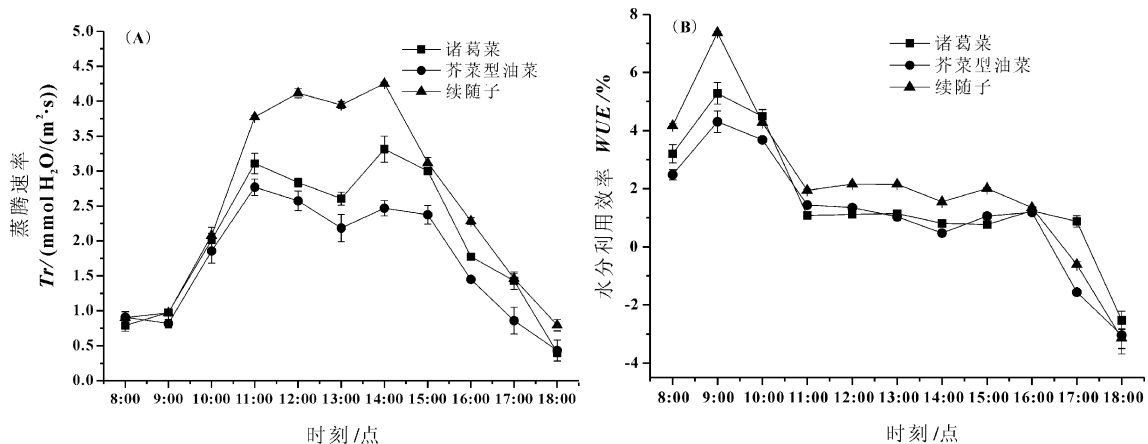


图 8 三种植物叶片(A)蒸腾速率(T_r)和(B)水分利用效率(WUE)日变化

Fig. 8 Diurnal changes of T_r and WUE for the three plant leaves

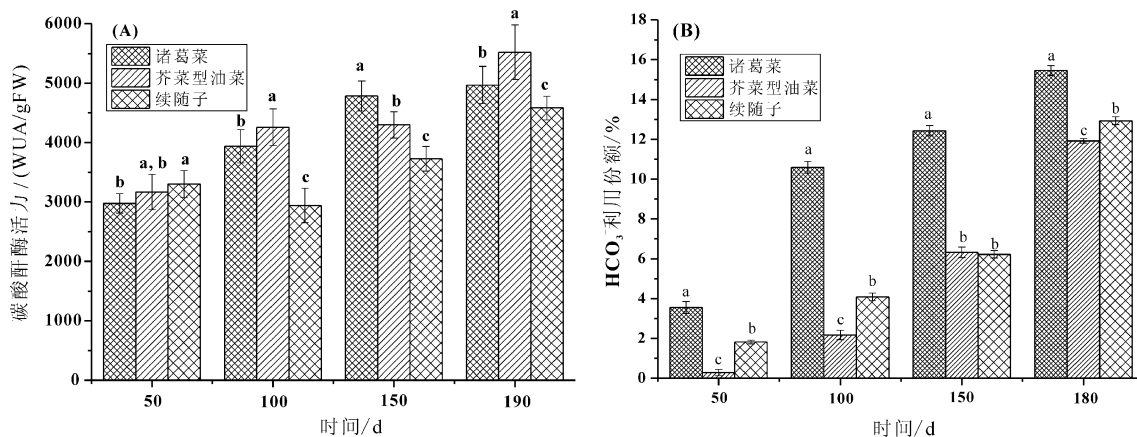


图9 三种植物叶片(A)碳酸酐酶活力与(B)HCO₃⁻利用份额(不同字母表示差异达0.05显著水平)

Fig.9 (A) CA activity and (B) HCO₃⁻ use proportion of the three plant leaves (Different letters mean significant difference at the 0.05 level)

(76.88 g)。而续随子种子产出量最高(9.41 g),芥菜型油菜最低(5.67 g)。从三种植物的丙二醛含量、净光合速率变化(图2、3)和生长周期看,芥菜型油菜在100 d以前的净光合速率处于最高水平,这个阶段正是植物根茎生长期。而150 d以后,随着胁迫的积累,种子生长受到抑制。因此,芥菜型油菜的根茎生物量最大,种子量最小。而诸葛菜叶片的丙二醛含量、净光合速率(图2、3)并没有较大幅度变化,因此该植物的根茎、种子生物量较为平衡。以此类推,续随子的总生物量最小,但种子量最大。三种植物种子含油率以诸葛菜含量最高(34.21±2.21%),与芥菜型油菜和续随子的种子含油率差异显著($P<0.05$);三种植物种子油的酸值也存在显著差异($P<0.05$),以续随子种子油酸值最高(7.82±0.17 mg KOH/g油)。作为生物质能源,纤维素、半纤维和木质素都可作为平台化合物的基本原料,而油脂则可作为生物柴油催化转化的原料,但较高的酸值不利于生物柴油的碱催化转化。将三种植物叶片的净光合速率(图3)、CA活力、无机碳利用份额(图9)和生物量(表1)对比可发现,三种植物的生物量和各自的CA活力成正比。由此说明HCO₃⁻胁迫下,芥菜型油菜、诸葛菜虽然净光合速率降低,

但可不同程度地利用碳酸酐酶应对逆境,交替利用碳酸氢根离子和大气中的二氧化碳进行光合作用,而高无机碳利用份额植物有利于在喀斯特逆境下固碳增汇。

3 结论

以喀斯特边际土地发展于生物质能源植物种植是一条新的生物质能源产业发展之路,而高浓度HCO₃⁻是喀斯特逆境中最为普遍的胁迫因素。本研究通过人工模拟喀斯特逆境(HCO₃⁻)考察了诸葛菜、芥菜型油菜和续随子整个生长周期的喀斯特适生能力、生物质能产出和HCO₃⁻利用能力。结果表明,在HCO₃⁻胁迫条件下,诸葛菜、芥菜型油菜更易较续随子更易受到胁迫,诸葛菜较芥菜型油菜和续随子表现出最高的HCO₃⁻利用能力。油脂、纤维素、半纤维和木质素是重要的生物质能源原料。三种植物在重碳酸盐胁迫下,芥菜型油菜的生物质产物最多,以根、茎、叶产出最多(95.97%),油脂产出(1.27%)最低,该植物更适合纤维素、半纤维和木质素原料植物利用。诸葛菜生物质产出次之,根、茎、叶产出占92.85%,油脂产出占2.45%,且酸值居中(3.91±0.09 mg KOH/g油),适合作为纤维素、半

表1 三种植物生物量及种子油酸值

Table 1 Acid value and biomass production of the three plants

植物	地上生物量 ¹ /g	地下生物量 ¹ /g	总生物量 ¹ /g	种子质量 ¹ /g	种子含油率 ² /%	酸值 ² /(mg KOH/g油)
诸葛菜	97.98	18.64	116.62	8.34	34.21±2.21a	4.79±0.12b
芥菜型油菜	121.70	19.09	140.79	5.67	31.42±1.93b	3.91±0.09c
续随子	55.58	21.31	76.88	9.41	29.83±2.33a	7.82±0.17a

注:¹为三种植物总生物量;²为平均值±标准偏差;同列数据后不同字母表示差异达0.05显著水平。

纤维和木质素和生物柴油兼顾原料植物。续随子在较高温度条件下表现出最强的耐胁迫能力,但生物质产出最低,虽有最高的油脂产出(3.65%),但种子油酸值最高(7.82±0.17 mg KOH/g 油),若作为

制备生物柴油原料将增加生产成本。结合本课题组对诸葛菜喀斯特适生性的前期研究结果,该植物以其高喀斯特适生性、高碳酸酐活力及生物质产出可推荐作为喀斯特边际土地生物质能源植物。

参 考 文 献

- [1] Gelfand I, Sahajpal R, Zhang X, *et al.* Sustainable bioenergy production from marginal lands in the US Midwest [J]. *Nature*, 2013, 493(24): 514–517.
- [2] Zhang Q, Ma J, Qiu G, Li L, *et al.* Potential energy production from algae on marginal land in China [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 109: 252–260.
- [3] Zhuang D, Jiang D, Liu L, Huang Y. Assessment of bioenergy potential on marginal land in China [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2011, 15(2): 1 050–1 056.
- [4] Liu C Q. Biogeochemical processes and the surface material cycle: The cycles of biogenic elements of soil-vegetation system in the southwestern Karst China [M]. Science Press, Beijing, China, 2009.
- [5] Yan J, Li J, Ye Q, *et al.* Concentrations and exports of solutes from surface runoff in Houzhai Karst Basin, southwest China [J]. *Chemical Geology*, 2012, 304-305: 1–9.
- [6] Hu H, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordstrom M, *et al.* Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells [J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12: 87–93.
- [7] 吴沿友, 邢德科, 刘莹. 植物利用碳酸氢根离子的特征分析 [J]. *地球与环境*, 2011, 39(2): 273–277.
- [8] Wu Y Y, Liu C Q, Li P P, *et al.* Photosynthetic characteristics involved in adaptability to Karst soil and alien invasion of paper mulberry (*Broussonetia papyrifera* (L.) Vent.) in comparison with mulberry (*Morus alba* L.) [J]. *Photosynthetica*, 2009, 47(1): 155–160.
- [9] Wang R, Hanna M A, Zhou W W, *et al.* Production and selected fuel properties of biodiesel from promising non-edible oils: *Euphorbia lathyris* L., *Sapium sebiferum* L. and *Jatropha curcas* L. [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102, 1 194–1 199.
- [10] Wilkes M A, Takei I, Caldwell R A, *et al.* The effect of genotype and environment on biodiesel quality prepared from Indian mustard (*Brassica juncea*) grown in Australia [J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 48: 124–132.
- [11] Wang R, Wu Y Y, Hang H T, *et al.* *Orychophragmus violaceus* L., a marginal land-based plant for biodiesel feedstock: Heterogeneous catalysis, fuel properties, and potential [J]. *Energy Conversion and Management*, 2014, 84: 497–502.
- [12] Wu Y Y, Li P, Zhao Y, Wang J, Wu X. Study on photosynthetic characteristics of *Orychophragmus violaceus* related to shade-tolerance [J]. *Scientia Horticulturae*, 2007, 113(2): 173–176.
- [13] Zhang C, Wang J, Pu J, Yan J. Bicarbonate daily variations in a Karst river: The carbon sink effect of subaquatic vegetation photosynthesis [J]. *Acta Geologica Sinica-English Edition*. 2012, 86: 973–979.
- [14] Yang X, Römheld V, Marschner H. Effect of bicarbonate on root growth and accumulation of organic acids in Zn-inefficient and Zn-efficient rice cultivars (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Soil*, 1994, 164(1): 1–7.
- [15] Edwards G E, Mohamed A K. Reduction in carbonic anhydrase activity in zinc deficient leaves of *Phaseolus vulgaris* L. [J]. *Crop Science*. 1973, 13: 351–354.
- [16] 吴沿友, 邢德科, 李海涛, 等. 利用双标记获取植物利用无机碳源份额的方法 [P]. 2013, CN102511362B.
- [17] Zuo Y, Ren L, Zhang F, *et al.* Bicarbonate concentration as affected by soil water content controls iron nutrition of peanut plants in a calcareous soil [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45: 357–364.
- [18] 李合生, 孙群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验技术原理 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000, 248–250.
- [19] Kooten O, Snel J F H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology [J]. *Photosynthesis Research* 1990, 25, 147–150.
- [20] Kosová K, Vitámvása P, Prášila I T, *et al.* Plant proteome changes under abiotic stress-Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response [J]. *Journal of Proteomics*, 2011, 74(8): 1 301–1 322.

- [21] 李兴国, 孟庆伟, 赵世杰. 强光胁迫下银杏叶片的光抑制及其防御机制[J]. 林业科学, 2004, 40(3): 56—59.
- [22] Anderson J M, Aro E M. Grana stacking and protection of photosystem II in thylakoid membranes of higher plant leaves under sustained high irradiance: an hypothesis[J]. Photosynthesis research, 1994, 41(2): 315—326.
- [23] 冯建灿, 胡秀丽, 毛训甲. 叶绿素荧光动力学在研究植物逆境生理中的应用[J]. 经济林研究, 2002, 20(4): 14—18.
- [24] Sun C X, Qi H, Hao J J, *et al.* Single leaves photosynthetic characteristics of two insect-resistant transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) varieties in response to light [J]. Photosynthetica, 2009, 47(3), 399—408.
- [25] Fabre N, Reiter I M, Becuwe-linka N, *et al.* Characterization and expression analysis of genes encoding α and β carbonic anhydrases in Arabidopsis[J]. Plant, Cell & Environment, 2007, 30(13): 617—629.

Physiological Characteristics and Inorganic Carbon-usage Capacity of Three Biomass Plants under Simulative Karst Adversity (Bicarbonate Stress)

WANG Rui^{1,2}, WU Yanyou^{1,3,*}, XING Deke³, HANG Hongtao¹,
LIU Ying¹, ZHANG Kaiyan¹, YAN Kai¹

(1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; 2. Food and Pharmaceutical Engineering Institute, Guiyang College, Guiyang 550005, China; 3. Key Laboratory of Modern Agricultural Equipment and Technology, Ministry of Education & Jiangsu Province, Institute of Agricultural Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: To screen available energy plant for the Karst marginal land, plant physiological and biochemical and geochemical technique were introduced into biomass field. *Orychophragmus violaceus* L., *Brassica juncea* L., and *Euphorbia lathyris* L. were stressed under HCO_3^- (10 mmol/L), a simulative Karst adversity. During the whole experiment, index of three kind of plant leaves were determined regularly, including proline, malondialdehyde, chlorophyll, chlorophyll fluorescence, diurnal variation of photosynthesis, carbonic anhydrase activity, stable carbon isotope composition of leaves, and biomass production. In contrast, *Orychophragmus violaceus* L. and *Brassica juncea* L. are more sensitive than *Euphorbia lathyris* L. under HCO_3^- stress, but *Euphorbia lathyris* L. is easily affected by low temperature. *Euphorbia lathyris* L. shows stronger resistance and photosynthetic performance at proper temperature. Results show that *Orychophragmus violaceus* L. shows the highest inorganic carbon-usage capacity because of high Karst adaptability and carbonic anhydrase activity. Considering that the high biomass production, *Orychophragmus violaceus* L. is highly recommended as a biomass feedstock in Karst marginal land.

Key words: Karst environment; bicarbonate; stress; biomass plant