

# 牛耳朵对不同光照环境的生理响应

孙国胜<sup>1</sup>, 邓 敏<sup>2</sup>, 方 俊<sup>1</sup>, 李 谦 盛<sup>1</sup>

(1. 上海应用技术学院 生态学院, 上海 201418; 2. 中国科学院 上海辰山植物科学研究中心, 上海辰山植物园, 上海 201602)

**摘 要:**以 6 个月苗龄牛耳朵组培苗为试材, 置于温室高光、低光和室内条件下栽培 4 个月, 每月测定叶片叶绿素含量、比叶重、含水量等生理指标及快速光响应曲线。结果表明: 在温室低光条件下牛耳朵叶片单位叶面积叶绿素含量较高光条件下显著增加, 室内弱光条件下则在后 2 个月显著下降; 温室低光和室内弱光下牛耳朵叶片含水量不断升高, 比叶重则逐渐降低; 叶片变薄, 栅栏组织变薄而海绵组织细胞排列更紧密; 叶片下表皮气孔密度随光照强度的减弱而减少。快速光响应曲线参数  $\alpha$ 、最大电子传递速率( $ETR_{max}$ )和半饱和光强( $I_k$ )在温室低光和室内弱光条件下均随着处理时间的延长而降低。以上结果表明, 牛耳朵可以通过改变叶片色素、形态结构和光合性能来适应弱光环境。

**关键词:**苦苣苔; 弱光; 快速光响应曲线; 叶片解剖结构

**中图分类号:**S 681.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)22-0069-05

牛耳朵(*Chirita eburnea* Hance)属苦苣苔科唇柱苣苔属多年生草本植物, 主要分布于广西、广东、湖南、湖北、四川及贵州等地, 别名为石三七、石虎耳等。其野生资源主要生长在阴暗的石灰岩山林石缝或沟边林下, 具有莲座叶, 叶片肉质, 具绒毛; 顶端聚伞花序呈伞状排列, 有花 5~13 朵, 花序基部有 2 片苞叶, 蓝紫色或紫色的花冠管圆柱状, 花期 4—5 月<sup>[1]</sup>。牛耳朵为广西、云南等地民间常用药材, 有补虚、止咳、止血、除湿的功效, 近年来其有效成分甾类和萜类等活性物质不断得到了分离鉴定<sup>[2-4]</sup>。牛耳朵花叶俱美, 极耐阴, 作为室内观赏花卉具有良好开发潜力, 其观赏价值已受到关注<sup>[5]</sup>。牛耳朵不仅因其有特殊的观赏美感, 而且具有较强的光能利用能力与适应能力, 为开发引种的优选品种<sup>[6]</sup>。此外, 前人对于牛耳朵的组培快繁体系也进行了初步研究, 为这一野生花卉的大规模生产奠定了基础<sup>[7]</sup>。但目前我国对苦苣苔科植物的研究主要集中于系统分类学、组培

快繁和药用植化方面, 对于栽培及相关生理等园艺方面的研究尚鲜见报道。苦苣苔科植物具有非常特殊的生境, 它们大多喜生于阴湿的山坡石缝中或岩洞附近, 也有许多种类生长在条件恶劣的崖壁上, 并且绝大多数种类具有极强的耐阴性, 分布于背阴或散射光线处, 其耐阴性机理的研究有助于明确这一类植物园艺生产的光照要求<sup>[8]</sup>。

课题组前期对牛耳朵在低温胁迫下的生理响应进行了研究, 认为牛耳朵生长的低温极限为 0~5℃<sup>[9]</sup>, 为牛耳朵人工栽培的温度要求提供了理论依据。现利用广西引种的野生牛耳朵经组培快繁后得到的大量 6 个月龄的组培苗为试材, 研究其在温室高光和低光条件及在室内栽培时叶片的叶绿素含量、叶片含水量、比叶重、快速光响应曲线的变化, 观察不同光照强度下牛耳朵的生长状况, 并对处理后作牛耳朵叶片形态结构进行解剖观察, 旨在为牛耳朵人工栽培的光照要求和作为室内花卉应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为用野外采集的牛耳朵为母本进行组织培养获得的组培苗, 将组培瓶苗移栽至 72 孔穴盘进行驯化栽培 2 个月, 然后移栽至上口径 70 mm、高 80 mm 的方形塑料盆, 缓苗后备用。

**第一作者简介:**孙国胜(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向为花卉栽培与育种。E-mail:sgs8725@163.com.

**责任作者:**李谦盛(1975-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为植物资源与设施栽培。E-mail:qianshengli@126.com.

**基金项目:**上海市自然科学基金资助项目(14ZR1441000); 上海市绿化和市容管理局科技攻关资助项目(F122414); 上海应用技术学院大学生科技创新资助项目(PE2015105)。

**收稿日期:**2015-07-31

## 1.2 试验方法

挑选长势大小基本一致的幼苗分成3组,每组40株,2组于温室内不同光强下进行栽培试验,即高光(HL,最大光量子通量密度PPFD为 $530 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )、低光(LL,最大PPFD为 $240 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ),另一组置于室内(IN,最大PPFD为 $9 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,日光灯)。每月测量每处理不同植株上的6片叶片的单位叶片叶绿素含量、比叶重、含水量、快速光响应曲线,处理4个月后做石蜡切片观察叶片的横切切片,观察处理4个月后新叶的气孔密度。

## 1.3 项目测定

**叶绿素含量测定:**取直径6 mm打孔器打出的4个圆孔,用5 mL 95%乙醇浸提24 h,用分光光度计测定光度值,按照LICHENTHALER<sup>[10]</sup>的公式计算叶绿素含量,每处理重复6次。

**叶片比叶重及含水量的测定:**取不同光照处理下完全展开的成熟的叶片各6片,用便携式叶面积仪测定叶面积(S),称取其鲜重 $M_1$ ,80℃烘干至恒重后称取其重量 $M_2$ ;计算比叶重= $M_2/S$ ,叶片含水量(%)=( $M_1 - M_2$ )/ $M_1 \times 100$ 。

**石蜡切片:**取处理4个月之后的牛耳朵叶片,用FAA固定后采用王金发等<sup>[12]</sup>的方法制作常规石蜡切片,用Leica PM 2016切片机对叶片进行纵切,切片厚度为16~18  $\mu\text{m}$ ,用Motic Research plus光学显微镜在4×物镜下观察并拍照。

**气孔数量测定:**处理4个月之后,参考刘明智等<sup>[13]</sup>的指甲油法,将指甲油涂抹在不同光照处理后完全展开的新叶叶片背面,待指甲油干了之后,撕下指甲油涂层用Motic Research plus显微镜观察,用20×物镜拍照并统计气孔密度,每个处理测定3片叶片,每个叶片统计6个视野。

**快速光响应曲线:**用PAM-2500型叶绿素荧光仪内置程序测定快速光响应曲线(RLC),拟合计算得到初始斜率 $\alpha$ 、最大电子传递速率( $\text{ETR}_{\text{max}}$ )和半饱和光强( $I_k$ )<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 叶绿素含量变化

从图1可以看出,温室高光下栽培的植株叶片叶绿素含量在4个月的栽培过程中基本保持不变,温室遮阴弱光条件下栽培的植株叶片叶绿素含量则在前2个月先升高然后略有降低,而室内栽培的植株叶片叶绿素含量在前2个月基本不变,后2个月逐渐降低。温室低光条件下叶片单位面积叶绿素含量显著高于高光条件下

的植株,说明在低光条件下叶绿素含量增加,但随着处理时间的延长,由于叶片变薄,单位面积的叶绿素含量又呈现下降趋势。在室内弱光条件下长时间栽培则由于光照影响了干物质的积累,使叶片变薄,从而导致单位叶面积叶绿素含量下降。

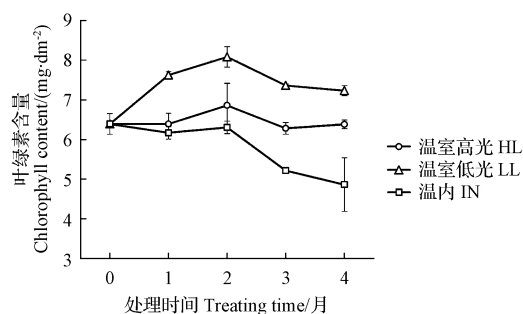


图1 牛耳朵在温室高光(HL)、温室低光(LL)和室内(IN)栽培的叶绿素含量变化

Fig. 1 Change of chlorophyll content of *C. eburnea* growing under greenhouse high light (HL), low light (LL) and indoor (IN) conditions

### 2.2 叶片含水量变化

由图2可知,叶片含水量随着栽培时间的延长逐渐递增,温室高光条件下植株的叶片含水量最低,室内栽培叶片含水量增加最为显著。说明弱光降低了牛耳朵叶片的蒸腾速率,使叶片含水量提高。

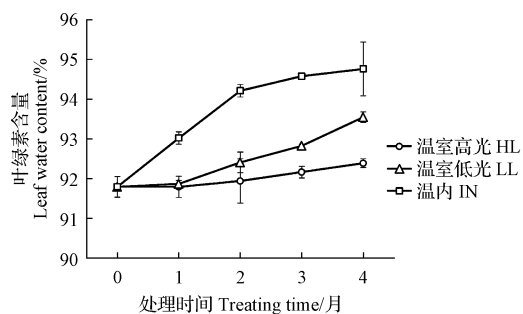


图2 牛耳朵在温室高光(HL)、温室低光(LL)和室内(IN)栽培的叶片含水量变化

Fig. 2 Change of leaf water content of *C. eburnea* growing under greenhouse high light (HL), low light (LL) and indoor (IN) conditions

### 2.3 比叶重变化

从图3可以看出,牛耳朵植株叶片比叶重在温室遮阴和室内弱光条件下栽培时,随着栽培时间的延长,叶片的比叶重显著下降,温室弱光条件的植株比叶重由 $63.3 \text{ g/m}^2$ 降到 $50.5 \text{ g/m}^2$ ,室内栽培的植株则更是降到了 $39.6 \text{ g/m}^2$ ;而温室高光条件下的植株比叶重则比较稳定,没有降低。这与叶片含水量的变化趋势正好相

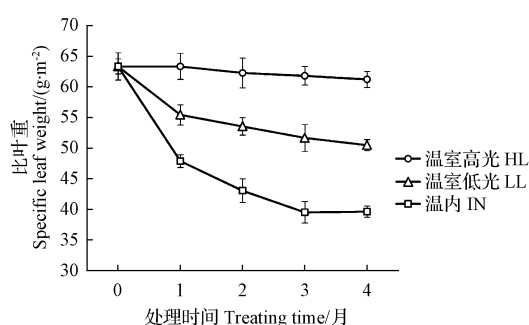
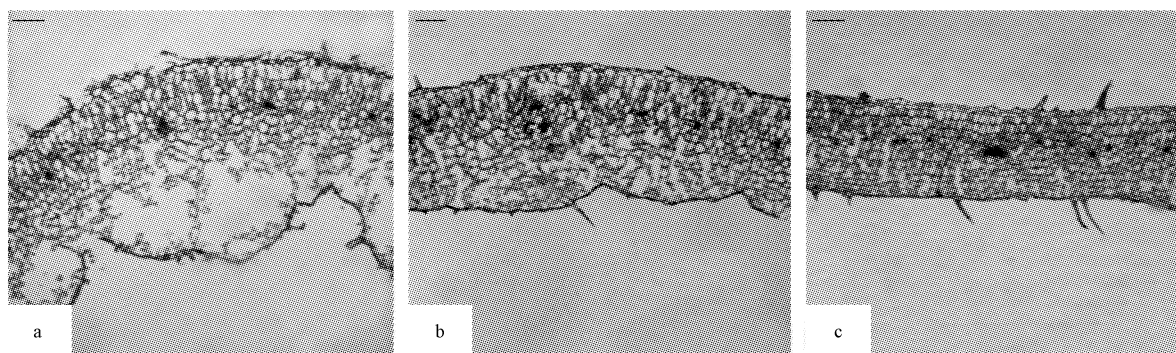


图3 牛耳朵在温室高光(HL)、温室低光(LL)和室内(IN)栽培的比叶重变化

Fig. 3 Change of specific leaf weight content of *C. eburnea* growing under greenhouse high light (HL), low light (LL) and indoor (IN) conditions

反,说明在弱光条件下,叶片比叶重降低一方面是由于叶片变薄,另一方面是由于叶片含水量增加。



注:标尺=20 μm。

Note: Bar=20 μm.

图4 牛耳朵在温室高光(HL,a)、温室低光(LL,b)和室内(IN,c)栽培的植株叶片结构变化

Fig. 4 Change of leaf transverse section of *C. eburnea* growing under greenhouse with high light (HL,a), low light (LL,b) and indoor (IN,c) conditions

## 2.5 气孔密度变化

由图5可知,气孔密度温室高光条件下栽培的植株最高,为128个/mm²,室内弱光栽培气孔密度只有

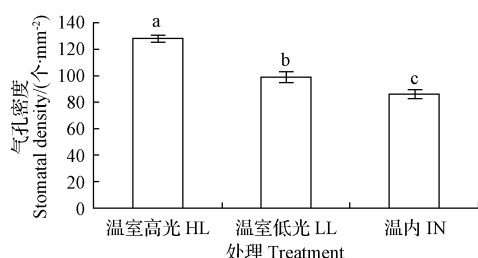


图5 牛耳朵在温室高光(HL)、温室低光(LL)和室内(IN)栽培的植株叶片气孔密度的变化

Fig. 5 Change of leaf stomatal density of *C. eburnea* growing under greenhouse high light (HL), low light (LL) and indoor (IN) conditions

## 2.4 叶片解剖结构变化

从图4可以看出,温室强光条件下植株的叶片明显厚于温室弱光和室内条件栽培的植株,室内栽培的植株叶片厚度最薄。通过比较3种不同光照处理叶片中的栅栏组织可以看出,温室高光下叶片的栅栏细胞大(图4a),且层数多于其它2种处理。温室遮阴和室内弱光下处理的叶片栅栏组织层数减少,且细胞较小,排列较紧凑(图4b),室内栽培的植株叶片栅栏组织为排列整齐紧凑的3层细胞,细胞较温室的叶片小(图4c)。温室高光栽培的植株叶片海绵组织排列最为疏松,海绵组织下部有较大的气孔下室;温室遮阴栽培的叶片海绵组织排列较温室高光栽培的样品要紧,而且细胞要小,层数也比温室高光栽培下多。室内栽培的植株叶片具有排列最为紧密的海绵组织,细胞较其它2种样品最小,且层数相比于2种光处理条件下多。

86个/mm²,温室遮阴低光条件下为99个/mm²。牛耳朵叶片气孔密度随着栽培环境光照强度的减弱而降低。

## 2.6 快速光响应曲线参数变化

快速光响应曲线反映了电子传递速率(ETR)随光合有效辐射(PAR)的变化,通过曲线拟合计算得出最大潜在电子传递速率  $ETR_{max}$ 、初始斜率  $\alpha$  和半饱和光强  $I_k$  等参数,比较这些参数可以很好地反映样品对强光的耐受力。

在4个月处理中,温室高光条件下的植株快速光响应曲线的  $\alpha$ (初始斜率)、 $ETR_{max}$ (最大电子传递速率和  $I_k$ (半饱和光强)没有大的变化,仅在第4个月时降低;而在温室低光条件和室内弱光条件下的植株光响应曲线的  $\alpha$ 、 $ETR_{max}$  和  $I_k$  均在栽培过程中逐渐降低,特别是前2个月降幅很大,后2个月则趋于平缓,可能牛耳朵逐渐适应了弱光条件。



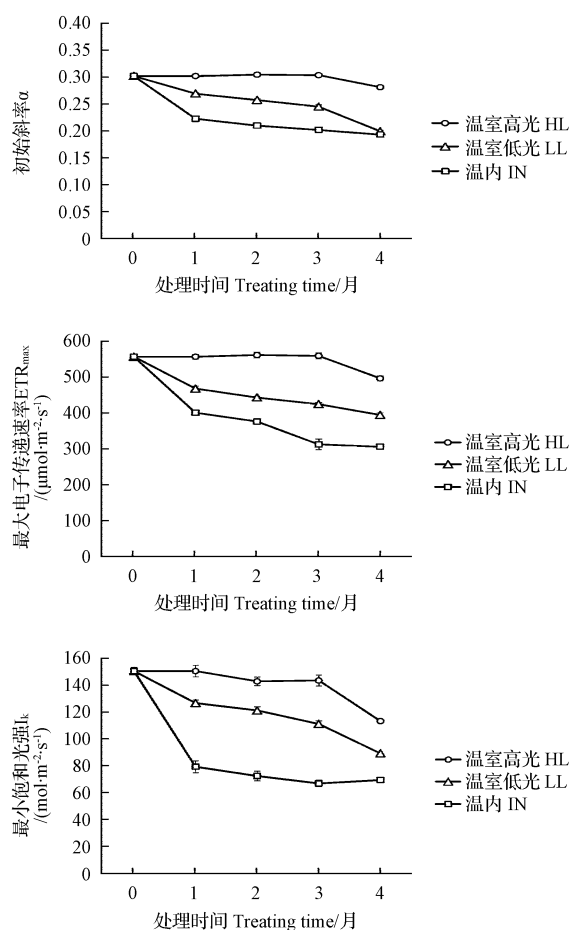


图6 牛耳朵在温室高光(HL)、温室低光(LL)和室内(IN)栽培的快速光响应曲线参数变化

Fig. 6 Change of RLC parameters of *C. eburnea* growing under greenhouse high light (HL), low light (LL) and indoor (IN) conditions

### 3 讨论与结论

叶绿素含量的变化是衡量一种植物耐阴性高低的重要生理指标。温室低光栽培的牛耳朵叶片单位叶面积的叶绿素含量在前2个月呈现随着遮阴时间的增加而增加,与很多已经发表的结果一致<sup>[14-15]</sup>。植物为了适应遮阴带来的影响,增加自身叶绿素含量,从而能够在光照强度弱的条件下生长<sup>[16]</sup>。ATANASOVA等<sup>[17]</sup>指出,遮阴条件下叶绿素含量上升还与叶绿体中基粒变大,基粒片层垛叠程度高相关。但随着处理时间的延长,由于长时间弱光影响了干物质的积累而使温室低光和室内弱光下2种处理的牛耳朵叶片变薄导致了单位叶面积的叶绿素含量降低。叶片的变薄,叶片比叶重的显著下降,牛耳朵可能通过减小叶片厚度增加叶面积,以能够捕捉到更多的光能来适应弱光下的生存<sup>[18]</sup>。

无论是温室低光还是室内弱光条件,随着处理时间的增加,牛耳朵的叶片含水量上升,比叶重下降,与其它文献结果相同<sup>[19-20]</sup>,叶片含水量的降低可能因为弱光条

件下干物质积累量下降而导致的。同样的情况也在长茎毛茛苔(*Aeschynanthus longicaulis*)中发现<sup>[8]</sup>。

叶片中栅栏组织和海绵组织的厚度、层数对叶片的光合效率有必然的联系,栅栏组织影响叶绿体的分布,方形或椭圆形的栅栏组织细胞能够提高近轴面和侧面叶绿体的分布密度,有利于植物适应弱光环境<sup>[21]</sup>。所以叶片的解剖结构可以用于研究植物在不同生境下的结构和适应性<sup>[22]</sup>。牛耳朵的叶片解剖结构显示温室高光下牛耳朵叶片的栅栏组织要厚于其它2种处理,室内弱光下最薄;牛耳朵叶片解剖结构可以看出,室内栽培的海绵组织层数多于温室高光与低光栽培,与刘世彪等<sup>[23]</sup>得出的随着光强减弱海绵组织的厚度明显增加一致。叶肉的厚度一定程度上能够反映出植物对光的适应性,一般认为厚叶和发达的栅栏组织是强光生境下叶片的典型特征;相反,薄叶和发达的海绵组织是叶片对弱光环境的一种适应特性<sup>[24]</sup>,以上结论在牛耳朵3种光照处理中得到了验证。

牛耳朵叶片单位面积的气孔数量随着栽培光强的降低而显著下降,这与其它植物的研究结论<sup>[25]</sup>一致。在弱光条件下叶片最大净光合速率下降导致叶片气体交换量下降而使气孔的密度下降,同时这种表现也是对 $\text{CO}_2$ 扩散阻力减小的一种体现<sup>[26]</sup>。当然,室内弱光下牛耳朵叶片气孔密度的显著降低也可能与室内空气湿度较室内低有关。

快速光响应曲线是用PSII相对电子传递速率(ETR)随光合有效辐射变化的关系来测定植物光合与光照直接关系的一种快速有效方法<sup>[11]</sup>,ETR值由光照强度、叶片吸收光系数和有效荧光产量三者计算得到的,可比较光化学反应中用于碳同化的电子传递情况<sup>[27]</sup>。牛耳朵植株在不同条件处理的4个月中,温室高光下植株的 $ETR_{max}$ 一直最大而且保持稳定,只有在第4个月时出现降低。在温室低光和室内弱光条件下 $\alpha$ 、 $ETR_{max}$ 、 $I_k$ 均随着处理时间的增加显著降低,说明长时间的弱光降低了牛耳朵PSII电子传递速率,这些植株一旦重新暴露于高光环境下,将出现严重的光抑制现象<sup>[8]</sup>。

牛耳朵在温室低光或室内弱光条件下均能通过改变叶片形态结构,如叶片变薄增大叶面积、减少比叶重、减少气孔密度、栅栏组织变薄、海绵组织变厚等叶片外形态和内部结构,降低光合系统最大电子传递速率和半饱和光强等来适应弱光环境。这一较强的弱光适应性特点是牛耳朵作为室内植物园艺应用的重要理论基础。

### 参考文献

- [1] 李振宇,王印政. 中国苦苣苔科植物[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2004.
- [2] 蔡祥海,邓德山,马云保,等. 牛耳朵的化学成分[J]. 中草药,2005,36

- (4):510-514.
- [3] 陈文娟,文永新,陈月圆,等.牛耳朵脂溶性成分的 GC-MS 分析[J].广西科学,2009,16(2):174-176.
- [4] CAI X H, LUO X D, ZHOU J, et al. Quinones from *Chirita eburnea* [J]. J Nat Prod, 2005, 68(5):797-799.
- [5] 胡小三,唐新霖,李怀福.美丽的野生牛耳朵[J].中国花卉盆景,2008(6):16-17.
- [6] 郑月萍,沈宗根,姜波,等.4种苦苣苔科植物光合特性的比较[J].浙江师范大学学报(自然科学版),2012,35(4):446-452.
- [7] 温放,李湛东,张启翔.牛耳朵的离体培养和快速繁殖[J].植物生理学报,2006,42(5):906.
- [8] LI Q S, DENG M, XIONG Y S, et al. Morphological and photosynthetic response to high and low irradiance of *Aeschynanthus longicaulis* [J]. The Scientific World Journal, 2014, doi:10.1155/2014/347461.
- [9] 孙国胜,邓敏,李谦盛,等.牛耳朵幼苗对低温胁迫的生理响应[J].南方农业学报,2013,44(6):918-923.
- [10] LICHTENTHALER H K. Chlorophylls and carotenoids-pigments of photosynthetic biomembranes [J]. Methods in Enzymology, 1987, 148:350-382.
- [11] WHITE A, CRITCHLEY C. Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus[J]. Photosynthesis Research, 1999, 59:63-72.
- [12] 王金发,何炎明.细胞生物学实验教程[M].北京:科学出版社,2003:42-50.
- [13] 刘明智,努尔巴衣·阿布都沙力克,潘晓玲.指甲油涂抹撕取法制取植物叶气孔装片[J].植物学通报,2005,40(10):44.
- [14] 丁印龙,杨盛昌,廖启科,等.遮荫对13种盆栽棕榈植物生长的影响[J].亚热带植物科学,2002,31(增刊):51-56.
- [15] 杨华,宋绪忠,陈磊.不同遮阴处理的三叶崖爬藤光合作用特性[J].林业科技开发,2010,24(5):57-59.
- [16] 李晓征,彭峰,徐迎春,等.不同光强下6种常绿阔叶树幼苗的生理特性[J].广西农业科学,2005,36(4):312-315.
- [17] ATANASOVA L, STEFANOV D, YORDANOV I. Comparative characteristics of growth and photosynthesis of sun and shade leaves from normal and pendulum walnut (*Juglans regia* L.) trees[J]. Photosynthetica, 2003, 41(2):289-292.
- [18] 王俊峰,冯玉龙,梁红柱.紫茎泽兰光合特性对生长环境光强的适应[J].应用生态学报,2004,15(8):1373-1377.
- [19] LEROUX X, WALCROFT A S, SINOQUET H, et al. Photosynthetic light acclimation in peach leaves: importance of changes in mass: area ratio, nitrogen concentration, and leaf nitrogen partitioning [J]. Tree Physiology, 2001, 21(6):377-386.
- [20] THOMPSON W A, KRIEDEMANN P E, CRAIG I E. Photosynthetic response to light and nutrients in sun-tolerant and shade-tolerant rainforest trees. I. Growth, leaf anatomy and nutrient content [J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1992, 19(1):1-18.
- [21] LEE D W, BONE R A, TERSIS S L, et al. Correlates of leaf optical properties in tropical forest sun and extreme shade plants [J]. American Journal of Botany, 1990, 77:370-380.
- [22] 覃凤飞,李强,崔焯茗,等.越冬期遮阴条件下3种不同秋眠型紫花苜蓿品种叶片解剖结构与其光生态适应性[J].植物生态学报,2012,36(4):333-345.
- [23] 刘世彪,胡正海.遮荫处理对绞股蓝叶形态结构及光合特性的影响[J].武汉植物学研究,2004,22(4):339-344.
- [24] 李芳兰,包维楷.植物叶片形态解剖结构对环境变化的响应与适应[J].植物学通报,2005,22(增刊):118-127.
- [25] ABRAM M D. Leaf structural and photosynthetic pigments characteristics of three gallery-forest hardwood species in Northeast Kansas[J]. For Ecol Manage, 1987, 22(3-4):261-266.
- [26] MOTT K A, GIBSON A G, O'LEARY J W. The adaptive significance of amphistomatic leaves [J]. Plant, Cell and Environment, 1982, 5(6):455-460.
- [27] GENTY B, BRIANTAIS J M, BAKER N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1989, 990(1):87-92.

## Physiological Response of *Chirita eburnea* Hance Under Different Light Environment

SUN Guosheng<sup>1</sup>, DENG Min<sup>2</sup>, FANG Jun<sup>1</sup>, LI Qiansheng<sup>1</sup>

(1. School of Ecology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418; 2. Shanghai Chenshan Plant Science Research Center, Chinese Academy of Sciences, Shanghai Chenshan Botanical Garden, Shanghai 201602)

**Abstract:** Taking six months old seedlings of *Chirita eburnea* from tissue culture liners as experimental material, seedlings were grown under three different light environments, that was high light and low light in greenhouse, and indoor for 4 months. The chlorophyll content, specific leaf weight, leaf water content and rapid light response were measured monthly. The results showed that chlorophyll content of plants under greenhouse high light condition was increased significantly compared with greenhouse low light plants; while the chlorophyll content of indoor plants significantly decreased especially 2 months later. The leaf water contents of plants under greenhouse low light and indoor condition were increased gradually; on the contrary, the specific leaf weight decreased. The leaf blade became thinner as the thickness of palisade parenchyma decreased but the spongy cells were more compact. The stomata density in the lower epidermis decreased with the decreasing of light intensity. The parameters of rapid light curves,  $\alpha$ ,  $ETR_{max}$ , and  $I_k$ , were decreased in the greenhouse low light and indoor seedlings during the treatment. These results indicated that *C. eburnea* Hance could adapt to low light environment through the change of leaf pigments, structure and photosynthetic performance.

**Keywords:** *Chirita eburnea* Hance; low light; rapid light curve; leaf anatomical structures