

LI-6800

新一代光合作用全自动测量系统

实验手册

Version 2.0



北京力高泰科技有限公司

基因有限公司农业环境科学部

北京力高泰科技有限公司即基因有限公司农业环境科学部主要代理农林业、生态、环境等领域的国际先进科研仪器，为国内科研单位提供售后服务。基因有限公司是1992年成立于香港的一家高科技公司，长期致力于引进及研发国际先进科研仪器，并为国内科研工作者提供系统解决方案。公司多年代理美国 LI-COR 公司、Dynamax 公司、METER 公司(原美国 Decagon 和德国 UMS 公司)、意大利 VELP 的产品。高品质产品、高素质团队和高质量服务一直是我们努力的方向。

高品质产品

力高泰先后为科技部973、863项目，国家211、985工程，农业部、国家林业局948项目、中国生态系统研究网络(CERN)、中国森林生态系统定位研究网络(CFERN)等提供了大量先进的仪器设备。例如：

- 经典畅销产品 LI-6400/XT 光合仪在中国大陆地区的数量近2000台；新一代光合仪 LI-6800 也有近600台工作在科研一线；
- LI-7500 系列开路式 CO₂/H₂O 分析仪（涡度相关研究设备中全球占有率95%以上）国内安装超过500套；
- LI-7700 开路式 CH₄ 分析仪为全球首款开路式、低功耗甲烷分析仪，迄今仍是全球涡度协方差研究设备中甲烷监测的佼佼者。

高素质团队

- 秉承“让专才为专家服务 / LET PROFESSIONALS SERVE PROFESSIONALS” 的一贯宗旨；
- 由博士、硕士组建的、具备专业研究背景的技术支持和市场推广团队，为广大科研人员提供切实可行的研究方案，并在第一时间解答来自科研一线的咨询；
- 具备多年维修经验的维修工程师团队快速、高效地解决产品问题；
- 定期邀请国内、外专家进行内部培训，提高专业素质。

高质量服务

- 一贯以提供优质、专业的售后服务为工作重心；
- 定期在全国各地举办仪器使用培训班；
- 每年邀请厂家和国内相关专家为广大用户举办高级研讨会；
- 通过网站、微信公众平台（力高泰服务号）和邮件系统及时提供国内外最新技术和研究进展等。

联系我们

电话：010-66001566

网址：www.ecotek.com.cn

邮箱：info@ecotek.com.cn

地址：北京市西城区西直门南大街2号成铭大厦A座22F



目 录

实验一、光合日动态、季节动态调查实验	1
实验二、植物光合特征和光合效率测量实验.....	3
实验三、光合光响应曲线 <i>Light Curve</i> 测量实验.....	6
实验四、传统光合 CO ₂ 响应曲线 <i>A-Ci</i> 测量实验	9
实验五、使用动态吸收测量技术 DAT 测量 <i>RACiR</i> 曲线	13
实验六、光呼吸的测量实验	19
实验七、叶肉导度 g_m 与羧化位点 CO ₂ 浓度 C_c 测量实验	22
实验八、光合的温度适应与温度响应曲线	28
实验九、植物叶片的气孔行为与水汽压亏缺 <i>VPD</i> 的响应	32
附录 1、LI-6800 缓冲瓶的正确使用方法.....	35
附录 2、低氧气瓶连接方法	37
附录 3、用户自定义变量的使用技巧	39
附录 4、Range Match 匹配方法.....	40

郑重声明:

1. 本手册为附加赠送品, 仅供初学者参考! 所有实验是力高泰技术支持部查阅资料收集整理, 可能存在信息不全等情形, 请实验人员或研究人员根据自己的实验目的, 自行查阅文献确定实验方案, 本公司对此不担负任何法律责任。敬请理解!
2. 本手册中涉及的仪器设置均为举例或常规设置, 请实验人员或研究人员务必根据自己的实验对象、实验条件和实验设计要求调整相应参数设置。本公司对此不担负任何法律责任。敬请理解!

实验一、光合日动态、季节动态调查实验

光合作用是植物生长发育的基础和生产力高低的决定性因素，同时又是一个对环境条件变化很敏感的过程，光合作用主要受到光合有效辐射、环境温湿度、CO₂浓度、叶片生理成熟度以及不同栽培措施等的影响。光合速率与植物的产量密切相关，已被广泛用来作为筛选高产品种的重要标准。

调查式测量(Survey Measurement)主要是为了描述一个植物群体的特征，通常通过短时间内对大量叶片进行取样测量来达到此目的，这便意味着在单个叶片测量上耗用尽量少的的时间，以求在有限时间内尽可能获取最大的样品量信息。

光合日动态和季节动态(Diurnal and Seasonal change)特性测量是对植物光合特征在一天和一年的时间尺度内动态变化情况的调查式测量。自然条件下，植物的光合作用会表现出明显的日变化和季节变化，在全天的时间尺度内，植物光合表现可能有单峰型、双峰型或三峰型，而在全年尺度上，植物光合也可能表现为夏秋强，秋冬弱等特点。研究不同植物光合作用的日动态和季节动态变化特征有利于反映其遗传特性和对环境的适应能力,明确植物的生态学特性。

光合气体交换测量是光合研究中最重要研究方法之一，通过 LI-6800 便携式光合测量系统能够快速准确得到植物光合原位研究中的关键数据，包括净光合速率 ($A, \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)、气孔导度($g_{sw}, \text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)、胞间 CO₂ 浓度 ($C_i, \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$)、蒸腾速率 ($E, \text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)、叶片饱和蒸气压亏缺 (VPD_{leaf}, kPa)、瞬时光合有效辐射强度($Q_{in}, \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)、空气温度 ($T_{air}, ^\circ\text{C}$)、大气相对湿度 ($RH, \%$)等指标，通过间接计算可得到水分利用效率(WUE)、光能利用效率(LUE)、碳同化量子效率(Φ_{CO_2})、气孔限制值(L_s)等其他指标。

实验条件

时间：8:00~18:00 (根据当地日照时间（日出~日落）灵活设定)

天气条件：晴朗少云

材料：根据实验需要选择合适的样品叶（一般选择无遮挡、受光照条件好的新完全展开叶或冠层顶端叶），每个处理至少选 10 个样品叶为重复，叶片在动态测量过程中不要更换（许大全，《光合作用学》，2013）。

实验步骤

1. 光合动态调查实验推荐选用 6800-12 透明叶室 (3cm×3cm)，实验过程中对叶室环境无需控制。
2. 主机进气口连接缓冲瓶，具体方法详见[附录 1: LI-6800 缓冲瓶正确使用方法](#)。
3. 点击 Environment 标签，设置流速和混合扇。
 - a) 设置 Flow: On; Pump Speed: Auto; Flow: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$; ΔP : 0.1 kPa 或 0.2 kPa。
 - b) 设置 Fan: Mixing fan: On; Fan Speed: 10,000 rpm。
 - c) 设置 H₂O: On; RH_{air}: 50%~75% (也可设置 VPD_{leaf} 来控制叶室内的湿度状态)
 - d) 其他设置: Off
4. 点击 Log Setup 标签，设置 Stability (仅供参考，可以在 Measurements 下观察参数的实时变化图来确保稳定)。

Variables	Slope Limit	Period(s)
CO ₂ R & CO ₂ S. Meas	2	20
H ₂ O R & H ₂ O S. Meas	2	20
A.GasEx	1	20
gsw.GasEx	0.1	20

5. 点击 Log Setup 标签，设置记录文件和记录选项。
 - a) 设置 Logging Options: 保持默认，检查确保选中 Also log data to Excel file，检查屏幕右下角“Check to log as a row”区域，确认“Const: S”选框没有被勾选。
 - b) 设置 Match Options: 对仪器使用不熟练者，建议 CO₂ 选择 Only match if:
 - i. $\Delta CO_2 < '10 \text{ ppm}' \mid CO_2_r - CO_2_s \mid$
 - ii. Reference change > '100 ppm' Change in CO₂_r since last CO₂ match
 - iii. Time > '10 min' Elapsed since last CO₂ match
 H₂O match 为 Never match;
 对仪器使用熟练者，CO₂ 和 H₂O 可以选择 Never match; 每隔 10~20 分钟匹配一次，或者环境改变较大匹配一次，在 Measurements 界面按 Match IRGAs，点击 Auto Match，待匹配结束后按 Match IRGAs，退回到 Measurements 界面。为减少匹配次数，提高实验效率，建议使用 Range Match 功能，具体方法详见附录 4: Range Match 匹配方法。
 - c) 打开记录文件 Open a Log File: 点击 New Folder，建立数据文件夹，选中并打开建好的文件夹后，点击 New File，输入文件名称，点击 OK，记录文件打开，可以开始测量了。
6. 开始测量: 夹上叶片，点击 Measurements 测量界面，观察左侧图形，按不同字母切换多参数的实时图，或查看 Log Setup 标签下 Stability 功能中设置的稳定性参数，当显示为 4/4 时，数据稳定，点击右上角的 Log 键记录数据;
7. 更换叶片，重复 6 步骤; 直到本组测量完成。
8. 测量结束，点击 Log Setup 下 Logging to 功能，点击右下角的 Close Log 关闭记录文件。
9. 插入 U 盘，点击 Tools 标签，选择 Manage Files 功能，在 USB 选项，Files: copy files to USB 找到自己建立的文件夹，打开，选择数据文件，点击 Copy，将数据推送到 U 盘，完成。

注意事项与相关研究信息参考

1. 夹好叶片，适度调整叶室角度，让阳光能够直射到叶室内，确保叶室内不会因叶室壁遮挡产生阴影。
2. 不同植物“午休”现象和生理特性的差别，可表现出光合的单峰或双峰、甚至多峰的趋势，这与其生理生态特性有关。
3. 从植物的光合时间特征和环境因子变化的相关性上，可以得出不同植物对环境因子的响应模式。
4. 从胞间 CO₂ 浓度 C_i 和净光合速率 A 的变化趋势，可以在时间尺度上得到植物受到气孔限制的情况。
5. 从气孔导度 g_{sw}、蒸腾速率 E、叶片饱和水汽压亏缺 VPD_{leaf}、水分利用效率 WUE 的变化趋势，可以得到植物对水分的利用情况和其气孔的调节能力.....

参考文献

1. 许大全，光合作用学[M]，2013.
2. 刘娟，梁军生，陈晓鸣等，思茅松干季光合生理日动态及光响应特征分析[J]，林业科学研究，2009,22(5):677-682.
3. W. Q. YANG, R. MURTHY et al, Diurnal changes in gas exchange and carbon partitioning in needles of fast- and slow-growing families of loblolly pine (Pinus taeda) [J], Tree Physiology 22, 489-498.

实验二、植物光合特征和光合效率测量实验

光合作用在地球上占有十分重要的地位。它是地球上最重要的化学反应，是生命的发动机，是地球生物圈形成与运转的关键环节，是生物演化的强大加速器，也是新绿色革命的核心问题，更是未来能源的希望。面对地球上人口日益增加和耕地日益减少的问题，为了满足日益增长的食物需求，人们正试图通过改善光合作用来大幅度地提高作物的单位面积产量，新的或者说第二次绿色革命正在兴起。改善光合效率已经成为第二次绿色革命的核心问题。光合作用的研究成果不仅为第一次绿色革命的成功奠定了坚实的理论基础，而且也为第二次绿色革命展示了获得胜利的靶标（许大全，2013）。

在光合作用研究中，气体交换测量历来都发挥着不可替代的重要作用。例如：M. Calvin 在 20 世纪四五十年代揭示了植物光合作用碳同化途径的过程中，利用 CO_2 、 O_2 气体交换测量技术，成功为植物体内光合作用过程是由 1 分子 *RuBP* 和 1 分子 CO_2 形成 2 分子 *PGA* 的论断提供了重要证据。即使在光合作用研究已经深入到分子水平的 21 世纪，提高作物光合潜力，验证转基因植物的光合效率有无改善，都需要通过测量光合作用气体交换速率来验证。另外气体交换测量为研究者量化植物叶片表面与大气间的碳水交换过程，使得越来越多的植物生理学和植物生态学，以及农学、林学、园艺学和遗传学等研究都涉及到叶片碳水气体交换的测量。

实验条件

时间：野外自然环境一般选择上午 8:30~11:30，避开可能的“午休”，及“午休”对以后测量的影响；全天环境恒定气候控制室内，则可以全天实验；

天气条件：晴朗，阳光充足

材料：根据实验需要选择合适的样品叶（一般选无遮挡、受光照条件好的新完全展开叶或冠层顶端叶），每个处理至少选 10 个样品叶为重复（许大全，《光合作用学》，2013）。

实验步骤

1. 测量光合效率，叶室选用 6800-02 红蓝光源（ $3\text{cm}\times 3\text{cm}$ ； $2\text{cm}\times 3\text{cm}$ ； $1\text{cm}\times 3\text{cm}$ ）或 6800-01A 荧光叶室（圆形， 6cm^2 或 2cm^2 ）进行实验，叶室环境条件根据具体实验目的自行选择控制。
2. 建议使用 CO_2 钢瓶控制稳定一致的 CO_2 浓度，并在主机进气口连接缓冲瓶，可以更好的保证在脏乱不堪的环境中主机气路的干净。具体操作请见第 3 步 Environment 中的 CO_2 控制；如果没有 CO_2 钢瓶，主机进气口连接 4L 以上的缓冲瓶，具体方法详见[附录 1：LI-6800 缓冲瓶正确使用方](#)法。
3. 点击 Environment 标签，进行环境设置(Flow 和 Fan 必须选择 On)
 - a) 设置 Flow: On; Pump Speed: Auto; Flow: $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$; ΔP : 0.1 kPa 或 0.2 kPa。
 - b) 设置 H_2O : On; RH_{air}: 50%~75% (也可设置 VPD_{leaf} 来控制叶室内的湿度)
 - c) 设置 CO_2 : 如果没有安装 CO_2 钢瓶，此处设置 CO_2 为 Off; 如果安装有 CO_2 钢瓶: CO_2 injector: On; CO_2s : $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (或其他实验目标浓度)
 - d) 设置 Mixing fan: On; Fan Speed: 10,000 rpm

- e) 设置 Temperature: 温度控制可根据具体实验目的确定, 并满足仪器实现的可能性, 例如高温高湿的环境下, 控温太低, 可能会在仪器壁上凝结水珠, 仪器会报警。

Temperature: On; Tleaf: 举例, 25 °C (或根据环境温度 Tair 设置一个相近的温度)

- f) 设置光强 Light: 对于处理间光合特性对比实验, 需排除外界变化的光照对植物光合的影响, 因此需设置一个稳定的光强, 设置方法如下:

6800-01A 荧光叶室:

设置 Light: 选择 Fluorometer: Control Mode: Setpoint; Setpoint: 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (或根据实验目的设置光强); Color Sepec: r90 (90%红光)

6800-02 红蓝光源:

设置 Light: 选择 Head Light Source: Control Mode: Setpoint; Setpoint: 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (或根据实验目的设置光强); Color Sepec: r90 (90%红光)

4. 点击 Log Setup 标签, 设置 Stability (仅供参考, 可以在 Measurements 下观察参数的实时变化图来确保稳定)。

Variables	Slope Limit	Period(s)
CO ₂ R & CO ₂ S. Meas	1 (使用 CO ₂ 小钢瓶) 或 2 (不使用 CO ₂ 小钢瓶)	20
H ₂ OR & H ₂ OS. Meas	1	20
A.GasEx	1	20
gsw.GasEx	0.1	20

5. 点击 Log Setup 标签, 设置记录文件和记录选项。
- a) 设置 Logging Options: 保持默认, 检查确保选中 Also log data to Excel file, 检查屏幕右下角“Check to log as a row”区域, 确认“Const: S”选框 **没有被勾选**。
- b) 设置 Match Options: **对仪器使用不熟练者**, 建议 CO₂ 选择 Only match if; H₂O 为 Never match; 对仪器使用熟练者, CO₂ 和 H₂O 可以选择 Never match; 自己凭经验去匹配; 建议使用 Range Match 功能, 具体方法详见[附录 4: Range Match 匹配方法](#)。
- c) 打开记录文件 Open a Log File: 点击 New Folder, 建立自己的数据文件夹, 选中并打开建好的文件夹后, 点击 New File, 输入文件名称, 点击 OK, 记录文件打开, 可以开始测量了。
6. 开始测量: 夹上叶片, 点击 Measurement 标签, 进入测量界面, 观察左侧图形, 按不同字母可见多个参数的稳定性实时图, 也可以查看 Log Setup 标签下 Stability 功能中设置的稳定性参数, 当显示为 4/4 时, 为数据稳定, 点击右上角的 Log 键记录数据;
7. 更换叶片, 重复 6 步骤; 直到本组测量完成。
8. 测量结束后, 点击 Log Setup 标签下 Logging to 功能, 点击右下角位置的 Close Log 关闭记录文件。
9. 插入 U 盘, 点击 Tools 标签, 选择 Manage Files 功能, 在 USB 选项, Files: copy files to USB 找到自己建立的文件夹, 打开, 选择数据文件, 点击 Copy, 将数据推送到 U 盘, 完成。

注意事项与相关研究信息参考

1. 如果仪器控制的叶室环境(尤其是光照强度 Q_{in})与外界环境 (Q_{amb_out}) 间有较大差异的话, 植物自身需要一定时间适应叶室内的新环境, 时间长短取决于差异大小。
2. 如果所控环境与植物原来所处环境相差很大, 处于诱导或适应期的植物响应速度不同, 因此当仪器的 Stability 显示为 4/4 时, 植物自身可能仍然处于适应过程, 并未达到该叶室环境下的稳态光合, 需观察 Measurements 下的实时图来判断是否真正稳定。
3. 在控制叶片温度时, 尤其是控制较低温度, H_2O 控制界面可能会出现 dewpoint 红线。这是由于温度较高的气体在接触到温度较低的分析器气室壁时, 会出现结露, 而液态水对 IRGA 分析器有损伤, 因此控温不能低于露点温度(dewpoint temperature), 否则系统会自动出现 Autodry 的提示界面。
4. 不同植物在时间尺度上的光合动态变化差异很大, 这与其生理生态特性有关。因此在测量过程中同一处理的不同重复要均匀分布在整個比较实验的测量过程中。
5. 根据已有文献, C3(木本)在饱和光强下净光合速率多在 $5\sim 15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 内; C3(草本)和 C4 植物饱和光强下净光合速率分别在 $20\sim 25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 和 $30\sim 40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 内, 如测定结果异常超出常见范围, 应分析是否植物处于非健康状态或者测量期间是否未匹配或叶室漏气等操作错误造成。
6. 对于大多数植物来讲, 气孔导度 g_{sw} 一般在 $0\sim 1 \text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 之间, 如 g_{sw} 出现 0.0xx 或 0.00xx 的情况, 可能是由于植物受到水分胁迫或喜阴植物在低光照时的 g_{sw} , 或者植物还需进一步进行光诱导驱使气孔逐渐打开。而且, 也有个别植物种类或品种会出现 $g_{sw}>1 \text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 这种类型的植物往往光合和蒸腾速率也会处在较高的水平上。
7. 多数情况, 对于未受到气孔胁迫的植物, 胞间 CO_2 浓度 C_i 和环境 CO_2 浓度 CO_2_s 的比值在 0.7~0.8 附近。在稳态光合作用期间, C4 植物和 C3 植物的 C_i 一般分别为叶片外空气 CO_2 浓度的 30%和 66%左右(许大全, 2013)。当空气的 CO_2 浓度和叶肉导度 g_m 恒定不变时, C_i 的变化是气孔导度变化和叶肉细胞光合活性变化的总结果。
8. 碳同化量子效率 Φ_{CO_2} 指的是光合机构吸收一个光量子同化 CO_2 的分子数量, 因此量子效率也是表征植物体光合效率高低的一个重要参数, 在普通空气(400 ppm CO_2 , 21% O_2)中, $25\sim 30^\circ\text{C}$ 下, 不同光合途径植物的量子效率如下(Skillman, 2008):

C3 植物: 0.052 ± 0.003 (N=61); C4 植物: 0.057 ± 0.006 (N=56); CAM 植物: 0.033 ± 0.017 (N=6)

参考文献

1. 许大全, 光合作用学[M], 2013.
2. Skillman J.B.2008. Quantum yield variation across the three pathways of photosynthesis: Not yet out of the dark. J Exp Bot, 59: 1647-1661.

实验三、光合光响应曲线 *Light Curve* 测量实验

植物进行光合作用的动力和能量来源就是光，光是制约光合速率高低的重要环境因子。根据生长环境和日照时间的不同，植物会暴露在不同的光照强度下。光能够为同化作用提供其所需要的能量；光能够活化参与光合作用的某些酶；光能够调节光合机构的发育。

气体交换与叶绿素荧光同步测量可以同时得到植物光合生理特性和光合能量利用两个方面数据，来探究不同条件和处理下植物光合作用对光的响应机制。

在完全黑暗的环境下，光合作用无法进行，叶片对最开始出现的少量光量子吸收的效率最高，而后随着光强的增加，吸收效率降低，最后光强增加，光合速率增加幅度很小或不再增加。因此，光响应曲线气体交换参数部分可以提供以下信息：

- 暗呼吸速率：即线粒体呼吸，无光时的同化速率；
- 光补偿点：光合作用与呼吸作用平衡时对应的光量子通量密度；
- 量子效率：同化速率的最初斜率；
- 最大净光合速率： A_{sat} 。

与阳生植物相比，阴生植物暗呼吸速率往往偏低，光补偿点也低，最大光合速率也较低，但是具有较高的量子效率。

实验条件

时间：野外自然环境一般选择上午 8:30~11:30，避开可能的“午休”，及“午休”对之后测量的影响；全天环境恒定气候控制室内，则可以全天实验；如进行荧光光响应曲线，植物材料需提前进行暗适应。

天气条件：晴朗，阳光充足

材料：根据实验需要，选择合适的样品叶(一般选用无遮挡、受光照条件好的新完全展开叶或冠层顶端叶)，由于每条曲线测量时间较长，取样数量不宜过多，防止不同处理间由于时间差异造成的误差。

实验步骤

光响应曲线测量可分为快速光响应曲线（只测量气体交换）、荧光快速光响应曲线（只测量叶绿素荧光）、慢速光响应曲线（气体交换与叶绿素荧光同步测量）三种。

快速光响应曲线：光合器官对于光强的变化响应是最快的，尤其是光强从高到低改变时，基本上是实时响应的。快速测量方法是叶片从较强光照下开始测量，逐步降低光强，每个光强梯度至少等待 2 min。当进行快速光响应曲线测量时，气孔无法随着光强的变化进行及时响应，在弱光下开放程度要比正常情况下偏大一些，因此快速光响应曲线得到的气孔导度 (g_{sw}) 数据是非平衡下的数值。

1. 快速光响应曲线可使用 6800-01A 荧光叶室（圆形， 6cm^2 或 2cm^2 ）或 6800-02 红蓝光源叶室（ $3\text{cm}\times 3\text{cm}$ ； $2\text{cm}\times 3\text{cm}$ ； $1\text{cm}\times 3\text{cm}$ ）进行测量。
2. 使用 CO_2 钢瓶，整个光响应曲线测量过程中保证 CO_2 浓度稳定不变。并在主机进气口连接缓冲瓶，可以更好的保证在脏乱不堪的环境中主机气路的干净。

3. 点击 Environment 标签，进行环境设置

- a) 设置 Flow: On; Pump Speed: Auto; Flow: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$; ΔP : 0.1 kPa 或 0.2 kPa。
- b) 设置 H₂O: On; RH_{air}: 50%~75% (也可设置 VPD_{leaf} 来控制叶室内的湿度状态)
- c) 设置 CO₂: CO₂ injector: On; CO₂_s: 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (或实验目标浓度);
- d) 设置混合扇 Mixing fan: On; Fan Speed: 10,000 rpm;
- e) 设置 Temperature: 温度控制可根据具体实验目的确定，并满足仪器实现的可能性，例如高温高湿的环境下，控温太低，可能会在仪器壁上凝结水珠，仪器会报警。

Temperature: On; T_{leaf}: 举例 25 °C (或根据环境温度 T_{air} 设置一个相近的温度)

- f) 设置光强 Light: 实验开始前先将光强设置为曲线的最大光强。

6800-01A 荧光叶室:

设置 Light: 选择 Fluorometer: Control Mode: Setpoint; Setpoint: 1800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (或根据实验目的设置光强); Color Sepec: r90 (90%红光)

6800-02 红蓝光源:

设置 Light: 选择 Head Light Source: Control Mode: Setpoint; Setpoint: 1800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (或根据实验目的设置光强); Color Sepec: r90 (90%红光)

4. 点击 Log Setup 标签，设置 Stability (仅供参考，可以在 Measurements 下观察参数的实时变化图来确保稳定)

Variables	Slope Limit	Period(s)
CO ₂ R & CO ₂ S. Meas	1	20
H ₂ OR & H ₂ OS. Meas	1	20
A.GasEx	1	20
gsw.GasEx	0.1	20

5. 点击 Log Setup 标签，设置记录文件和记录选项。

- a) 设置 Logging Options: 保持默认，检查确保选中 Also log data to Excel file，检查屏幕右下角“Check to log as a row”区域，确认“Const: S”复选框没有被勾选。如果使用 6800-01A 荧光叶室 (圆形，6cm² 或 2cm²)，并且同时想获取叶绿素荧光参数，选择 Fluorometer Options 标签，在 Flr Action at log 选择“1:FoFm(dark)or FsFm’ (light)”。
- b) 设置 Match Options: CO₂ 选择 Always match 或 Only match if; H₂O 为 Never match; 推荐使用 Range Match，详见附录 4: Range Match 匹配方法;
- c) 打开记录文件 Open a Log File: 点击 New Folder，建立自己的数据文件夹，选中并打开建好的文件夹后，点击 New File，输入文件名称，点击 OK，记录文件打开，可以开始测量了。

6. 开始测量:

- a) 夹上叶片，点击 Measurement 标签，观察左侧图形，按不同字母可见多个参数的稳定性实时图，也可以查看 Log Setup 标签下 Stability 功能中设置的稳定性参数，当显示为稳定，开始建立自动程序;

- b) 点击 Programs 标签，选择 Light_Response。

Qin values: 从高到低设置光强梯度，例如: 1800,1500,1200,900,600,300,200,150,100,70,30,0;

Min.wait: 60 sec; Max.wait: 200 sec; 勾选 Allow early matching;

- c) 点击 Start 开始测量。

7. 图像设置（可以在曲线测量过程中看到光响应曲线图）：点击 Measurements 标签，查看 G 图，默认为光响应曲线图，曲线测定过程中所记录的数据将在图上显示。
8. 测量完成后，进入 Log Setup 标签 Logging to 界面下，点击 Close Log 关闭记录文件。
9. 更换叶片，重复 5c)~8 步骤。注意：每次夹叶片之前首先确保光强 Light 为高光强，如 1800，然后再夹叶片重复 5c)~8 步骤，直到所有样品测量结束。
10. 插入 U 盘，点击 Tools 标签，选择 Manage Files 功能，在 USB 选项，Files: copy files to USB 找到自己建立的文件夹，打开，选择数据文件，点击 Copy，将数据推送到 U 盘，完成。

注意事项与相关研究信息参考

1. 快速光响应曲线适用于原本处于高光强环境的植物，如果植物处于较低光强，如几百，则建议首先进行光诱导，时间大概在 20 min~1 h，目的是为了使叶片气孔充分打开，使测量过程中光合速率不会受到气孔限制的影响，只随光强变化而变化。如果植物在室内，光强低于 10 的环境，建议采用慢速光响应曲线，即光强从 0 开始逐步增强，每个梯度都要最少适应 5 分钟以上。
2. 光诱导方法：一种是将植物放置在阳光充分的环境中进行批量诱导，节约电和时间。或者使用仪器光源进行诱导：每次夹叶片之前首先确保光强 Light 为光响应曲线中的最大光强，如 1800，然后夹入叶片，等待植物适应。可在 Measurements 下面观察 A 值和 g_{sw} 值在不同时间尺度的实时图，来判断是否稳定。
3. 光响应曲线数据的拟合模型主要有直角双曲线模型、非直角双曲线模型、指数模型和直角双曲线修正模型等几种，研究者可根据实验选择适合的模型来拟合数据。直角双曲线和非直角双曲线都是以双曲线为基础的模型，由于算法原因可能会造成估算的最大净光合速率 A_{max} 远大于真实值，饱和光强 I_{sat} 远小于真实值。
4. 对于 C3 植物来讲，每固定 1 分子 CO_2 ，至少需 8 分子光量子，因此光响应曲线估算的表观量子效率最大不会超过 0.125。

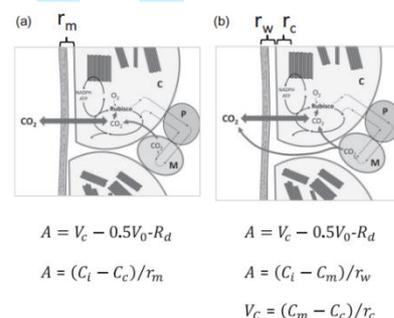
参考文献

1. 许大全，2013，光合作用学[M]，科学出版社。
2. 叶子飘，于强，2008，冬小麦旗叶光合速率对光强度和 CO_2 浓度的响应[J]，扬州大学学报，第 29 卷第 3 期
3. 叶子飘，2010，光合作用对光和 CO_2 响应模型的研究进展[J]，植物生态学报 2010, 34 (6): 727-740
4. Ye Z.P., 2007. A new model for relationship between irradiance and the rate of photosynthesis in *Oryza sativa*. *Photosynthetica* 45 (4): 637-640.
5. E. Ogren and J.R. Evans., 1993. Photosynthetic light-response curves I. The influence of CO_2 partial pressure and leaf inversion. *Planta* 189:182-190.

实验四、传统光合 CO₂ 响应曲线 A-Ci 测量实验

Farquhar, von Caemmerer 和 Berry 1980 年首次提出 C₃ 植物光合模型 (FvCB 模型) 来解释植物叶片 CO₂ 同化的气体交换过程。该模型被用于预测不同环境条件下 (如光、热、CO₂ 和 O₂ 分压等), 植物叶片的稳态 CO₂ 同化速率。同时, 该模型也用来通过气体交换测量数据对植物叶片生化特性进行反向预测。另外, 它还被当做子模型嵌入其他模型的构建中, 如作物产量模型、全球碳循环模型和陆生生态系统对气候条件的反馈模型等。FvCB 模型还是 C₃ 植物光合一系列其他模型的一个重要组成成分, 如它可以与气孔控制模型相结合, 也可以嵌入 C₄ 光合模型中对 C₄ 植物叶片 CO₂ 同化过程进行模拟; 另外, 该模型还是其他一些光合模型的基础, 如 C₃-C₄ 中间体植物光合模型, C₄ 植物单一细胞光合模型等。最近, 该模型还被修改以研究叶绿体膜上的碳酸氢盐转运体。在验证光合碳同位素分馏理论中, FvCB 模型也起到了重要的作用。

C₃ 光合模型描述了 CO₂ 在植物叶片的整个扩散通路, 以及其与光反应、碳还原和光呼吸循环的相互关系。右图中, C 是叶绿体, M 是线粒体, P 是过氧化物酶体。图 a 描述了 CO₂ 扩散在细胞壁和叶绿体表面受到阻力 r_m , 使得 Rubisco 酶羧化与光呼吸和其他 CO₂ 释放发生在同一场所。这一过程可通过 CO₂ 同化速率 A, Rubisco 酶的羧化和氧化速率 V_c 、 V_o , 线粒体呼吸速率以及细胞间隙和叶绿体内的 CO₂ 浓度 C_i 、 C_c 之间的公式来模拟。图 b 描述了细胞壁质膜阻力 (r_w) 和叶绿体阻力 (r_c) 对 CO₂ 扩散的影响, 光呼吸和线粒体呼吸产生的 CO₂ 被释放到叶肉细胞溶质内, 此处的 CO₂ 浓度为 C_m , 该过程由 b 图中的三个公式来表征描述。



该模型可以通过气体交换测量的 CO₂ 响应曲线来推断叶绿体的生物化学过程。同样, 它也可以非常简便地获得 Rubisco 酶的最大羧化速率 V_{cmax} 和最大潜在电子传递速率 J_{max} , 而不用复杂地实地检测。CO₂ 同化速率在低 CO₂ 分压下受到 Rubisco 酶限制, 而在高 CO₂ 分压下受电子传递能力的限制, 但不同限制条件间的转化有温度依赖性。电子传递的限制到磷酸丙糖限制的阶段在实际样地实验中并不常发生, 且不易诊断。关于来自气体交换的 CO₂ 响应曲线数据的相关方法有很多, 研究人员可根据自身实验需要选择合适的模型对数据进行拟合。虽然光响应曲线和 CO₂ 响应曲线经常被同时测量, 但现在还没有较好的方法将两条曲线整合到一起, 但也有一些模型实例, 尝试将光响应曲线和 CO₂ 响应曲线同时包括进去。

实验条件

时间: 野外自然环境一般选择上午 8:30~11:30, 避开可能的“午休”, 及“午休”对以后测量的影响; 全天环境恒定气候控制室内, 则可以全天实验。

天气条件: 晴朗, 阳光充足。

材料: 根据实验需要, 选择合适的样品叶 (一般选用无遮挡、受光照条件好的新完全展开叶或冠层顶端叶), 由于每条曲线测量时间较长, 取样数量不宜过多, 防止不同处理间由于时间差异造成的误差。

实验步骤

1. CO₂ 响应曲线可使用 6800-01A 荧光叶室（圆形，6cm² 或 2cm²）或 6800-02 红蓝光源叶室（3cm×3cm；2cm×3cm；1cm×3cm）进行测量；
2. 需要 CO₂ 小钢瓶为叶室提供不同浓度的 CO₂ 气体，并在主机进气口连接缓冲瓶，可以更好的保证在脏乱不堪的环境中主机气路的干净。。
3. 点击 Environment 标签，进行环境设置
 - a) 设置 Flow: On; Pump Speed: Auto; Flow: 500 μmol·s⁻¹; ΔP: 0.1 kPa 或 0.2 kPa。
 - b) 设置 H₂O: On; RH_{air}: 50%~75%(也可设置 VPD_{leaf} 来控制叶室内的水分状态)
 - c) 设置 CO₂: CO₂ injector: On; CO₂_s: 400 μmol·mol⁻¹ (Soda Lime: Scrub Auto);
 - d) 设置混合扇: Mixing fan: On; Fan Speed: 10,000 rpm
 - e) 设置温度: 由于 $FvCB$ 模型参数的温度依赖性，因此测量最好在温度相对稳定的环境下进行，可对叶片进行控温。温度设定可根据具体实验目的确定，并满足仪器实现的可能性，例如高温高湿的环境下，控温太低，可能会在仪器壁上凝结水珠，仪器会报警。

Temperature: On; Tleaf: 举例 25 °C (或根据环境温度 Tair 设置一个相近的温度)

f) 设置光强: 设置一个对植物没有光限制的恒定光强(也可根据实验目的设置)。

6800-01A 荧光叶室:

设置 Light: 选择 Fluorometer: Control Mode: Setpoint; Setpoint: 1800 μmol·m⁻²·s⁻¹ (或根据实验目的设置光强); Color Sepc: r90 (90%红光)

6800-02 红蓝光源:

设置 Light: 选择 Head Light Source: Control Mode: Setpoint; Setpoint: 1800 μmol·m⁻²·s⁻¹ (或根据实验目的设置光强); Color Sepc: r90 (90%红光)

4. 点击 Log Setup 标签，设置 Stability (仅供参考，可以在 Measurements 下观察参数的实时变化图来确保稳定)

Variables	Slope Limit	Period(s)
CO ₂ R & CO ₂ S. Meas	1	20
H ₂ OR & H ₂ OS. Meas	1	20
A.GasEx	1	20
gsw.GasEx	0.1	20

5. 点击 Log Setup 标签，设置记录文件和记录选项。
 - a) 设置 Logging Options: 保持默认，检查确保选中 Also log data to Excel file，检查屏幕右下角“Check to log as a row”区域，确认“Const: S”选框没有被勾选。如果使用 6800-01A 荧光叶室（圆形，6cm² 或 2cm²），并且同时想获取叶绿素荧光参数，选择 Fluorometer Options 标签，在 Flr Action at log 选择“1:FoFm(dark)or FsFm’ (light)”，如果不需要荧光参数，则在 Flr Action at log 选择“0:Nothing”。
 - b) 设置 Match Options: CO₂ 选择 Always match 或 Only match if; H₂O 为 Never match; 推荐使用 Range Match，详见附录 4: [Range Match 匹配方法](#)。
 - c) 打开记录文件 Open a Log File: 点击 New Folder，建立自己的数据文件夹，选中并打开建好

的文件夹后，点击 New File，输入文件名称，点击 OK，记录文件打开，可以开始测量了。

6. 开始测量：

a) 夹上叶片，点击 Measurement 标签，观察左侧图形，按不同字母可见多个参数的稳定性实时图，也可以查看 Log Setup 标签下 Stability 功能中设置的稳定性参数，当显示为稳定，开始建立自动程序；

b) 点击 Programs 标签，选择 CO₂ Response。

CO₂ Target: CO₂_r 或 CO₂_s 都可以；

CO₂ Values: 以环境浓度开始，先降低浓度，再返回环境浓度，最后增加至最高浓度。

如：400,300,200,100,50,400,600,800, 1000,1200,1500,1800,2000 μmol·mol⁻¹

Min.wait: 60 sec; Max.wait: 200 sec; 勾选 Allow early matching;

c) 点击 Start 开始测量。

7. 图像设置（可以在曲线测量过程中看到 CO₂ 响应曲线图）：点击 Measurements 标签，查看 H 图，默认为 A-Ci 图，曲线测定过程中所记录的数据将在图上显示。

8. 测量完成后，进入 Log Setup 标签 Logging to 界面下，点击 Close Log 关闭记录文件。

9. 更换叶片，重复 5c)~8 步骤。但是要注意，每次夹叶片之前首先将 CO₂ 浓度确保在 400μmol·mol⁻¹ 开始，然后再夹叶片重复 5c)~8 步骤，直到所有样品测量结束。

10. 插入 U 盘，点击 Tools 标签，选择 Manage Files 功能，在 USB 选项，Files: copy files to USB 找到自己建立的文件夹，打开，选择数据文件，点击 Copy，将数据推送到 U 盘，完成。

注意事项与相关研究信息参考

1. CO₂ 响应曲线设置的光强不应该对植物产生光限制，可使用植物的饱和光强。如设置光强与植物当时所处光环境相近，则无需光诱导；否则需要进行光诱导。
2. 数据的拟合模型有很多，但基础都是 FvCB 模型，研究者可根据自身实验需要和课题组其他相关研究选择合适自己实验的模型。从 FvCB 模型中我们可以得到 Rubisco 酶的最大羧化速率 V_{max} ，潜在最大电子传递速率 J_{max} ，磷酸丙糖利用效率 V_{TPU} ，气孔限制，羧化限制，CO₂ 补偿点，叶肉导度 g_m 等相关参数。
3. Rubisco 酶的最大羧化速率 V_{max} ，表明 Rubisco 的表观羧化活性，其大小取决于 Rubisco 的数量和活化程度，也就是活化的 Rubisco 酶的数量，是植物光合能力高低的特性参数； J_{max} 是植物电子传递链潜在最大电子传递速率。Miao 对 109 种不同植物种类(农作物、树木、杂草和沙漠植物等)的 V_{max} 和 J_{max} 进行了统计，发现其大小变化很大， V_{max} 为 6~194 μmol·m⁻²·s⁻¹， J_{max} 在 17~372 μmol·m⁻²·s⁻¹ 之间， J_{max}/V_{max} 值为 1.47~1.67(Miao et al., 2009)。
4. 在很高 C_i 下，有时光合速率不仅不随 C_i 的升高而升高，反而还会下降，此时表明发生了磷酸丙糖(TPU)的限制，但在自然条件下，由于 CO₂ 浓度往往是非饱和的，很少会出现 TPU 限制，Miao 根据 127 套叶片气体交换数据统计， V_{TPU} 约为 4.69 ± 1.06 μmol·m⁻²·s⁻¹(Miao et al., 2009)。
5. 通过 CO₂ 响应曲线可以估算叶肉导度 g_m 和羧化位点的 CO₂ 浓度 C_c (具体测量方法详见实验七)，叶肉导度 g_m 对植物叶片内 CO₂ 的扩散过程和植物—大气碳循环同样起到重要的限制作用，这种

限制在热带地区更为明显。

6. 一般的 CO_2 响应曲线采用的是 $A-C_i$ 进行数据分析，这样可以消除边界层导度和气孔导度对结果的影响，但是忽略了叶肉导度 g_m 的影响；可以通过 $A-C_c$ 进行 CO_2 响应曲线的数据分析来消除叶肉导度 g_m 的影响。
7. 数据的模型拟合可使用 R 语言 Plantecophys 包实现。

参考文献

1. 许大全, 2013, 光合作用学[M], 科学出版社。.
2. S von Caemmerer., 2013. Steady-state models of photosynthesis [J], Plant, Cell and Environment 36, 1617–1630
3. G.D. Farquhar, S. von Caemmerer, and J.A. Berry., 1980. A Biochemical Model of Photosynthetic CO_2 Assimilation in Leaves of C_3 Species[J]. Planta 149, 78-90.
4. S. P. Long and C. J. Bernacchi., 2003, Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error[J]. J Exp Bot, 54: 2393-2401.
5. 叶子飘, 2010, 光合作用对光和 CO_2 响应模型的研究进展[J], 植物生态学报 2010, 34 (6): 727–740
6. 叶子飘, 于强, 2009, 光合作用对胞间和大气 CO_2 响应曲线的比较[J], 生态学杂志, 28 (11): 2233- 2238.
7. S von Caemmerer., 2000. Biochemical models of leaf photosynthesis[M].

实验五、使用动态吸收测量技术 DAT 测量 $RACiR$ 曲线

通过分析植物重要的生理参数，研究者可以筛选出具备优良性状的品种，如高产或高水分利用效率。在众多的筛选工具中，叶片水平的气体交换测量（Gas Exchange Measurement）是最可靠的一种方法。二氧化碳响应曲线 $A-Ci$ Curve 可以提供碳同化过程中有关生化限制的机制信息。这些信息可用于植物和全球植被生长模型中（Farquhar et al. 1980; Duursma & Medlyn 2012; Oleson et al. 2013）。

测量 $A-Ci$ 曲线后，利用模型可以计算得到最大羧化速率 V_{max} 以及最大电子传递速率 J_{max} （Sharkey et al. 2007），这两个参数在评估作物性状时非常有用。 $FvCB$ 是用于解释 $A-Ci$ Curve 的一个稳态模型（Farquhar et al. 1980）。

实验四介绍了传统 $A-Ci$ Curve 测量过程，叶片在每个 CO_2 浓度梯度都要适应几分钟后完成一个稳态测量（Long & Bernacchi 2003），这种传统测量方式的缺点就是测量时间太长，一条完整的 $A-Ci$ Curve 大约需要 20-30mins。在样本量多，重复数多的情况下，用这种方法作为筛选工具几乎没有可行性。而且，在整个测量过程中，酶的激活状态会有变化，叶绿体会移动，气孔开度也会有所改变。

表观的光合速率 A 由同步测量的样品室和参比室 CO_2 浓度差决定，这个浓度差有以下潜在来源：

- 1) 叶片对 CO_2 的吸收；
- 2) 系统误差，例如由于快速测量不进行匹配，随着参比室 CO_2 浓度的升高或降低，未匹配下 $IRGAs$ 的误差会逐渐积累；系统误差是由整个系统特性决定的，与叶室内有无叶片无关；
- 3) 非稳态状态，在 CO_2 浓度改变时，样品室 CO_2 和参照室 CO_2 在未达到稳态时呈现出的差值；

能否进行快速 CO_2 响应（*Rapid ACi Response*，简称 $RACiR$ ）曲线的测量，需要仪器做到以下几点：第一，仪器有能力在规定时间内按照设定速度改变叶室内的 CO_2 浓度；第二，气体分析器可以对这种快速变化的 CO_2 浓度进行精准测量；第三，系统具有消除这些系统误差的能力。

全新设计的 LI-6800，分流装置位于分析器头部，IRGA 的测量响应频率非常快，结合仪器独有的 Auto Control 功能实现按照设定时间/速度改变 CO_2 浓度，新增的全量程匹配（Range Match）功能提前修正各 CO_2 浓度的系统误差，以及 LI-6800 独有的动态吸收测量技术（Dynamic Assimilation™ Technique，简称 DAT）等，使得 LI-6800 对叶室内 CO_2 实现精准控制、误差消除和真实快速测量。

LI-6800 全新光合-荧光测量系统可以将传统二氧化碳响应曲线 $A-Ci$ Curve 的测量时长缩短至 5min 以内，这大大提高了其测量效率，可用于大批量样品优良性状或突变体筛选。

实验条件

时间：野外自然环境一般选择上午 8:30~11:30，避开可能的“午休”，及“午休”对以后测量的影响；全天环境恒定气候控制室内，则可以全天实验。

天气条件：晴朗，阳光充足

材料：根据实验需要，选择合适的样品叶（一般选用无遮挡、受光照条件好的新完全展开叶或冠层顶端叶）。

实验步骤:

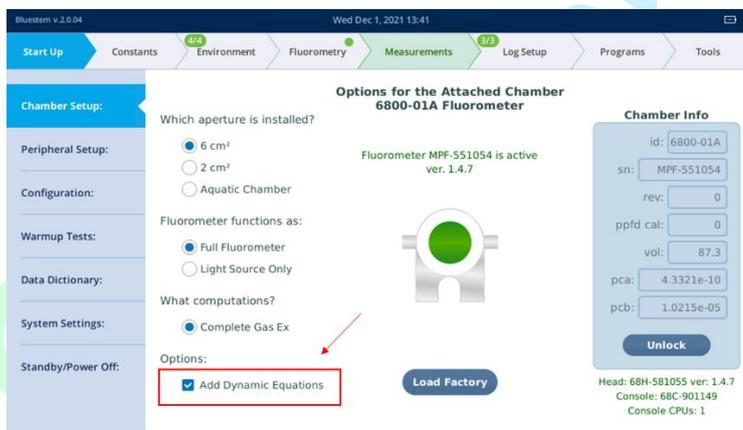
1. 有效 Range Match

因为 Rapid AC_i Response Curve (简称 RAC_iR), 是在连续的 CO_2 浓度变化下进行快速的测量, 连续的浓度变化仅使用一个浓度点匹配值来修正分析器间的差异显然不如在每个浓度下进行修正准确, 因此, 建议首先对 LI-6800 进行正确的 Range Match, 见附录 4, 也可以关注公司微信公众号查看指导视频。之前已做过 Range Match 且自检 Range Match 全通过的, 无需再做。

2. 启用 A_{dyn} 并进行相关校准

2.1 A_{dyn} 的启用

对于 BLUE > 1.5 的系统版本, 在 Start Up → Chamber Setup 下勾选 Add Dynamic Equations, 见下图。



2.2 环境参数设置

- Flow:** 对于多数测量而言, $300-800 \mu\text{mol s}^{-1}$ 之间的流速对测量几乎没有影响, 此处以流速为 $500 \mu\text{mol s}^{-1}$ 举例。
- H_2O :** 建议控制 H_2O_r , 通常 20 mmol mol^{-1} 左右的浓度数值对应的相对湿度在 60% 左右, 这里可根据实际需要进行修改。
- CO_2 :** 必须控制是 CO_2_r , 具体控制浓度由实际需要来定, 这里以 $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ 为例。
- Fan:** 通常设置为 10000 rpm, 或者保证足够高的风扇转速的 BLC (风扇转速在 10000 rpm 左右即可, 但不要低于 5000 rpm)。
- Temperature:** 首先要满足 LI-6800 的控温范围, 若环境温度稳定, 可以选择控制 Tleaf, 否则建议控制 Txchg, 避免测量过程中外界环境温度的波动导致水汽波动大。
- Light:** 光照强度要设置高于测量叶片饱和点的光强, 但不可过高产生光抑制。

注意: 所有环境参数设置好之后, 在开始 RAC_iR 测量前, 要先让待测叶片对目前环境设置进行足够时间的适应, 等气孔导度 g_{sw} 与光合 A 稳定后, 再开始进行 RAC_iR 测量。

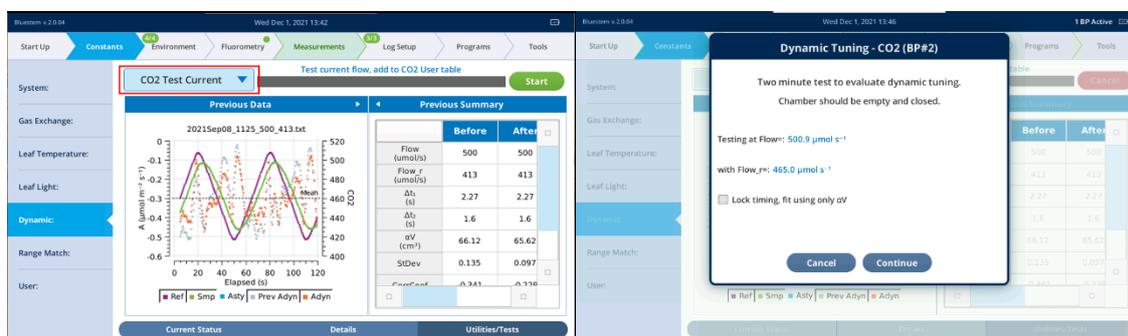
2.3 相关校准

2.3.1 CO_2 相关校准:

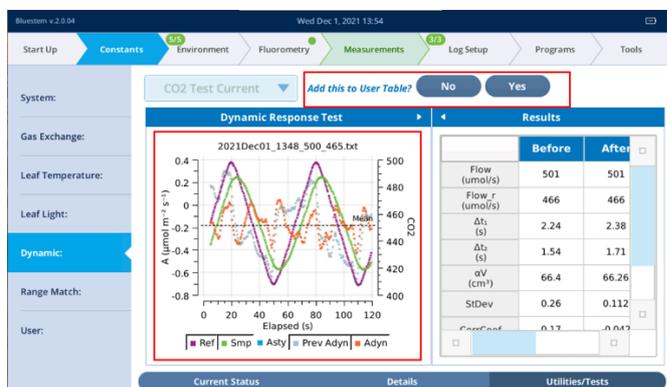
分为两个, 单个流速下校准或多个流速的校准, 进入 Constants → Dynamic → Utilities/Tests 即可查看。

单个流速下的 CO₂ 校准:

点击 CO₂ Test Current 右侧的 start。正常情况下，不要做任何勾选，直接点击 Continue 即可（开始前确保仪器自检通过）。

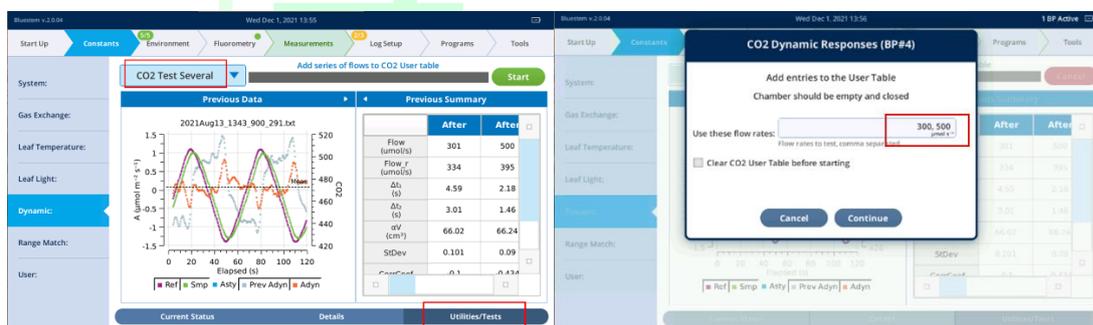


测量完成后，若中间的图形数据点正常（可参考仪器默认的数据，例如上右图灰色数据点，新的红色数据点，噪音明显小于灰色），直接选择 Yes 接受即可。



多个流速下的 CO₂ 校准:

点击 CO₂ Test Several 右侧的 start，与上面不同的是需要输入多个流速值，适用于需要修改流速的测量，或者多设置几个流速后，进行预实验，确定合适的流速值。此外，该结果无需确认，仪器自动应用，例如右图输入了两个流速，以逗号分隔，与单个流速情况类似，这里一般也不需要进行相关勾选，直接点击 Continue 开始即可。

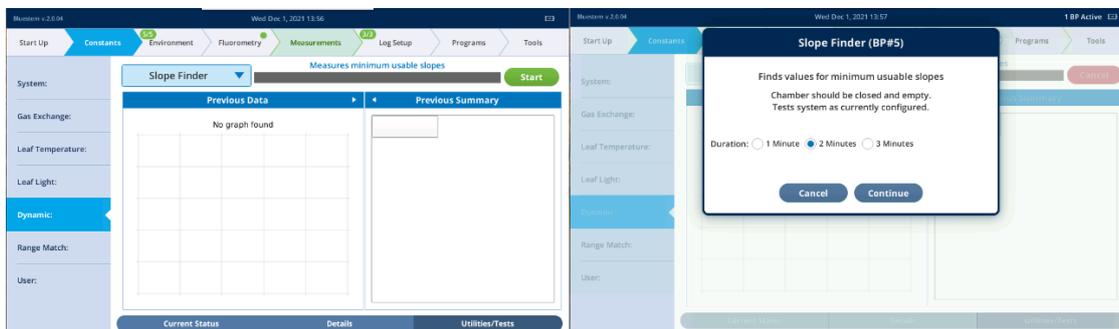


2.3.2 H₂O 相关校准:

同样分为单个流速的校准和多个流速的校准。方法与 CO₂ 单个流速和多个流速的校准相似，此处不再赘述。

2.3.3 斜率查找:

斜率的确定是 $RACiR A_{dyn}$ 计算的核心算法，必须要准确，点击 **Start** 开始（下左图），会出现一个时间选项，一般使用默认设置即可（下右图）。



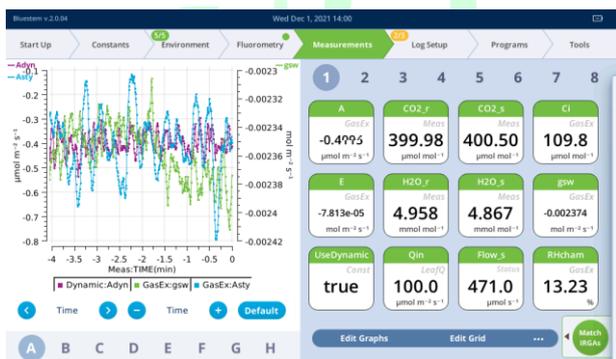
点击 **Continue** 进行查找。结束后，多数情况 **Yes** 确认即可（开机自检能通过）。



3. 使用 DAT 开始测量 $RACiR$ 的操作

3.1 测量前确认

校准完成后，在测量界面 A 图可检查上面校准参数的结果，正常情况下， A_{dyn} 与 A_{sty} 有很好的重合度，如下图空叶室实时图。

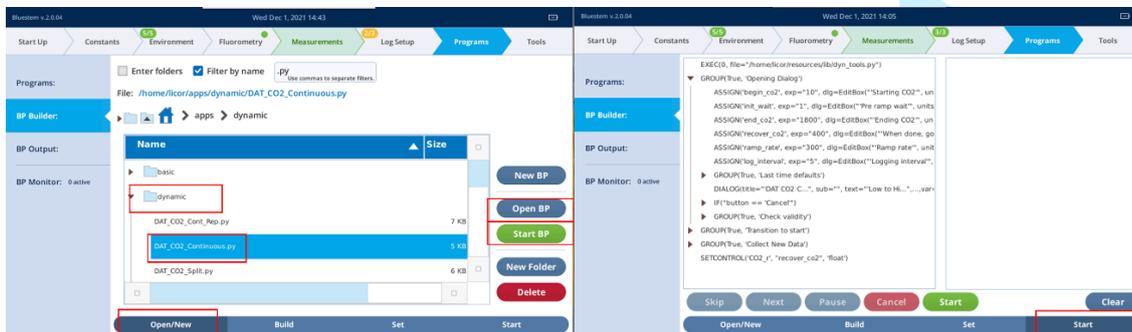


3.2 Log Setup 的相关设置

- Logging Options 下必须勾选 **Also log data to excel file**，不能勾选 **Use additional averaging time**（推荐设置，若使用默认的 BP 程序，仪器会根据需要自动确定）。
- Matching Options 下 **CO2 Match** 和 **H2O Match** 都要选择 **Never match**。
- Fluorometer Options 下 **Flr Action at log**：选择 **0:Nothing**。提示：一般建议每个叶片的数据单独新建一个数据文件 Log File 存放。

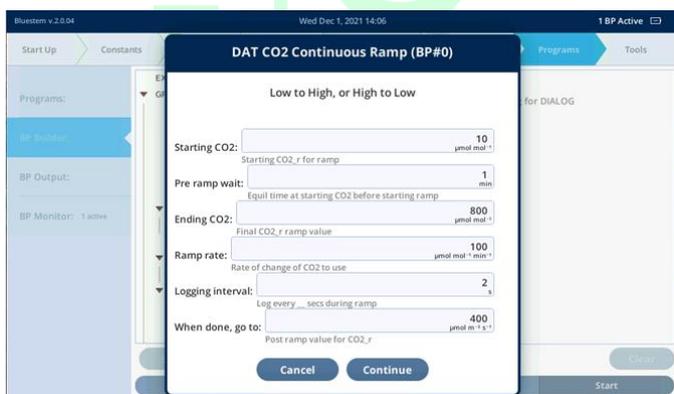
3.3 使用 BP 测量 RAC_iR

进入 BP，在 Programs 下选择 BP Builder，在 Open/View 下找到 dynamic 文件夹下的 DAT_CO2_Continuous.py，并选中。可以直接点击 Start BP 直接进入开始测量的参数设置对话框，也可以先点击 Open BP，进入 start 界面，查看程序，再点击绿色的 Start 键进入开始测量的参数设置对话框。



开始测量的参数设置对话框，见右图，各个参数的含义为：

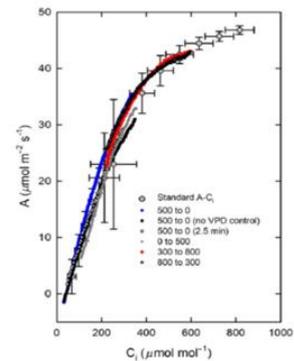
- Starting CO₂:** 正式测量的 RAC_iR 曲线起始二氧化碳浓度，一般设置一个较小的值但不建议设置 0。
- Pre ramp wait:** 因为通常我们在当前的外界 CO₂ 浓度下进行诱导并达到光合稳定，例如通常设置的 CO₂_r 值为 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ，那么从 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ 降低到上面的 starting CO₂ 需要时间，这部分数据不记录，一般我们设置 1 min 或 2 min，无需过高。
- Ending CO₂:** 与起始浓度相对，是测量结束的浓度，这个可根据预实验设定，为方便时间计算，通常我们设置的值要考虑起始浓度，例如起始浓度为 20 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ，结束浓度我们希望为 800，此处我们通常设置为 820。这样方便我们确定记录数据的时间，但并不强制。
- Ramp rate:** 推荐设置为 100 $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 。
- Logging interval:** 记录数据的时间间隔，一般建议 2 s。
- When done, go to:** 测量结束后，控制 CO₂_r 浓度值，一般是设置为外界大气浓度，通常为 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ，这样方便我们后面继续其他叶片的测量。



曲线测量完成，数据分析使用 A_{dyn} 与 C_i 分析作图即可。利用 $A-C_i$ 模型处理计算出 V_{cmax} , J_{max} 。

$A-C_i$ 模型有很多，例如 2015 年发表的 R 软件包 (Duursma R.A. (2015) Plantecophys – an R package for analyzing and modelling leaf gas exchange data. PLoS ONE 10, e0143346.) 分析 $A-C_i$ 数据曲线，如下页图：

Figure 1. The rapid A–C_i response (RACiR) technique generates data that, when corrected with washout regions trimmed, overlay well onto the standard A–C_i response for *Populus deltoides*. For clarity, sample data for one individual of *P. deltoides* are shown. Data for the standard A–C_i are presented as the mean ± standard error of the mean (s.e.m.) for three measured responses on the same leaf of a single seedling, while RACiRs were replicated once per CO₂ range per seedling on the same leaf and same location as the standard A–C_i. The best RACiRs are shown in blue (500 to 0) and red (300 to 800). See Table 1 for a statistical comparison of the RACiR and standard A–C_i response fits. (图片来源: Stinziano, 2017)



注意事项与相关研究信息参考

1. 快速 CO₂ 响应曲线测量技术是观测光合生化限制的一项技术性突破，并且将光合碳代谢研究从稳态研究推向了动态研究领域。
2. 根据实验所设置的光强，选择光诱导时间，如设置光强与环境相近，则无需光诱导。
3. CO₂ 浓度的变化方向对模型预测无影响，这与传统 A-C_i 曲线观点相悖，这可能是由于测量速度足够快，避免了由酶活性改变、叶绿体移动、以及由气孔导度改变和水势改变引起的其他潜在问题而造成的模型预测误差 (Stinziano, 2017)。
4. 在给定环境条件下，快速 CO₂ 响应曲线可能会给出更为准确的光合生化和生理限制的模型预测，但这还需要进一步的实验验证。
5. 由于数据采集频率较高，测量过程中无需进行点匹配 (确保 Match Options 中 CO₂ 和 H₂O 均选择 Never match)，使用 Range Match 即可。根据测试，水分控制与否对结果拟合无影响，但由于不同实验中植物材料和所处环境的差异，水分条件是否影响测量，需研究者提前进行预实验验证。
6. 经测试，CO₂ 浓度的变化范围(500 ppm ~0 ppm; 20 ppm ~ 820 ppm)对结果模拟影响不大，可自行选测浓度跨度。由于不同实验中植物材料和所处环境的差异，浓度跨度范围是否影响测量，需研究者提前进行预实验验证。

参考文献

1. Joseph R. Stinziano, Patrick B. Morgan et al., 2017. The rapid A-C_i response: photosynthesis in the phenomic era[J]. Plant, Cell and Environment. doi: 10.1111/pce.12911
2. S von Caemmerer., 2013. Steady-state models of photosynthesis [J], Plant, Cell and Environment 36, 1617–1630
3. G.D. Farquhar, S. von Caemmerer, and J.A. Berry., 1980. A Biochemical Model of Photosynthetic CO₂ Assimilation in Leaves of C₃ Species[J]. Planta 149, 78-90.
4. S. P. Long and C. J. Bernacchi., 2003, Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error[J]. J Exp Bot, 54: 2393-2401.
5. Duursma R.A. & Medlyn B.E., 2012, MAESPA: a model to study interaction between water limitation, environmental drivers and vegetation function at tree and stand levels, with an example application to [CO₂] × drought interactions[J]. Geoscientific Model Development 5, 919–940.
6. Oleson K.W., Lawrence D.M., Bonan G.B. et al., 2013, Technical Description of Version 4.5 of the Community Land Model (CLM). National Center for Atmospheric Research, Boulder, CO.
7. Duursma R.A. (2015) Plantecophys – an R package for analyzing and modelling leaf gas exchange data. PLoS ONE 10, e0143346.

实验六、光呼吸的测量实验

光呼吸是 C3 植物的一个重要生理过程，但光呼吸的运转会消耗大量植物固定的 CO₂ 和吸收的能量。光呼吸是光合作用的初始酶 *Rubisco* 酶(1,5 二磷酸核酮糖羧化氧化酶)，在光下与氧气反应放出 CO₂ 的过程。在光呼吸过程中，*RuBP* 氧化的产物磷酸乙醇酸经过一系列反应部分氧化成为 CO₂ 释放、部分转化为磷酸甘油酸又回到光合碳还原循环中去，构成光呼吸碳氧化循环(PCOC)。

在 30°C 下，光呼吸 CO₂ 释放速率大约占净 CO₂ 同化速率的 25%，因此光呼吸也被认为是一个能量和碳的浪费过程。在全球粮食需求日益迫切，可用耕地日益紧张的环境下，越来越多的研究者把研究重点直接放在了增加农业粮食产量上。区域尺度模型估算结果称光呼吸每年分别会造成全美大豆和小麦 36% 和 20% 的产量损失。当前，一系列的研究方法帮助研究者们通过最小化光呼吸速率来达到最大化光合碳同化的目的，包括增加可利用光呼吸产生的 CO₂ 的库容，改变 *Rubisco* 酶的动力学特征，将 C4 的碳浓缩机制引入 C3 植物中等等。光呼吸速率的定量为研究者们提供了一个达到改善作物产量目的的重要工具。

定量光呼吸及其相关反应速率的方法有很多，Sharkey (1988) 综述了 4 个不同的定量叶片光呼吸速率的方法，但这四种方法均在不同程度上对光呼吸速率测量造成误差，本文将介绍一种低 O₂ 浓度抑制光呼吸的测量方法，另外还将介绍一种通过光合仪数据估算光呼吸速率的方法：*Rubisco* 酶动力学推算法。

实验条件

时间：野外自然环境一般选择上午 8:30~11:30，避开可能的“午休”，及“午休”对之后测量的影响；全天环境恒定气候控制室内，则可以全天实验；

天气条件：晴朗，阳光充足。

材料：根据实验需要，选择合适的样品叶(一般选用无遮挡、受光照条件好的刚刚完全展开叶或冠层顶端叶)。低 O₂ 浓度抑制光呼吸法需要低氧气瓶(O₂ 浓度<5%，多数文献采用 2%O₂ 98%N₂)为系统供气。

实验步骤

低 O₂ 浓度抑制光呼吸法测量思路：分别在正常 O₂ 浓度和低 O₂ 浓度下测净光合速率 A，求二者的差值。

正常 O₂ 浓度下测得净光合速率的步骤：

可使用 6800-01A 荧光叶室(圆形, 6cm² 或 2 cm²) 或 6800-02 红蓝光源叶室(3cm×3cm; 1cm×3cm; 2cm×3cm) 进行测量，需要 CO₂ 小钢瓶为叶室提供 CO₂，并在主机进气口连接缓冲瓶，可以更好的保证在脏乱不堪的环境中主机气路的干净。

1. 点击 Environment 标签，进行环境设置。

- a) 设置流速：Flow: On; Flow: 500 μmol·s⁻¹; ΔP: 0.1 kPa 或 0.2kPa。
- b) 设置 H₂O: On; RH_{air}: 50%~75% (也可设置 VPD_{leaf} 来控制叶室湿度状态)
- c) 设置 CO₂: CO₂ injector: On; Soda Lime: Scrub Auto; CO₂_s: 400 μmol·mol⁻¹
- d) 设置混合扇: Mixing fan: On; Fan Speed: 10,000 rpm
- e) 设置温度: 可根据具体实验目的为叶片设置一个稳定的温度环境，并满足仪器实现的可能

性，高温高湿的环境下控温太低，可能会在仪器壁上凝结水珠，仪器会报警。

Temperature: On; Tleaf: 25 °C (根据环境温度 Tair 设置一个相近的温度)

f) 设置光强: 设置一个对植物没有光限制的恒定光强(也可根据实验目的设置)。

6800-01A 荧光叶室:

设置 Light: 选择 Fluorometer: Control Mode: Setpoint; Setpoint: 1800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (或根据实验目的设置光强); Color Sepc: r90 (90%红光)

6800-02 红蓝光源:

设置 Light: 选择 Head Light Source: Control Mode: Setpoint; Setpoint: 1800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (或根据实验目的设置光强); Color Sepc: r90 (90%红光)

2. 点击 Log Setup 标签, 设置 Stability (仅供参考, 可以在 Measurements 下观察参数的实时变化图来确保稳定)

Variables	Slope Limit	Period(s)
CO ₂ R & CO ₂ S. Meas	1	20
H ₂ OR & H ₂ OS. Meas	1	20
A.GasEx	1	20
gsw.GasEx	0.1	20

3. 点击 Log Setup 标签, 设置记录文件和记录选项。
 - A. 设置 Logging Options: 保持默认, 检查确保选中 Also log data to Excel file, 检查屏幕右下角“Check to log as a row”区域, 确认“Const: S”选框 **没有被勾选**。
 - B. 设置 Match Options: CO₂ 选择 Always match 或 Only match if; H₂O 为 Never match; 建议使用 range match, 详见[附录 4: Range Match 匹配方法](#)。
 - C. 打开记录文件 Open a Log File: 点击 New Folder, 建立自己的数据文件夹, 选中并打开建好的文件夹后, 点击 New File, 输入文件名称, 点击 OK, 记录文件打开, 可以开始测量了。
4. 夹上叶片, 点击 Measurement 标签, 观察左侧图形, 按不同字母可见多个参数的稳定性实时图, 也可以在 Log Setup 标签下查看 Stability 功能中设置的稳定性参数, 当显示为稳定, 点击 Log 记录数据 (打开文件时, 右上角的 Tools 转变为 Log, 此时可以记数; 若未打开文件, 则不显示 Log 键, 无法记数); 完成在正常 O₂ 浓度下的净光合速率 A 的测定。

低 O₂ 浓度下测定净光合速率的步骤:

5. 使用低氧气瓶 (配置减压阀, 压力表和流速计), 将钢瓶气路连接在光合仪主机背面的进气口或者辅助进气口 Auxiliary air Inlet 处。具体气瓶连接方法, 请见[附录 2: 低氧气瓶连接方法](#)。注意气瓶进气流速最高不能超过 2.5L·min⁻¹, 最大压强不能超过 28 kPa。
6. 点击 Environment 标签, 如果低氧气瓶连接到辅助进气口 Auxiliary air inlet, Flow 要设置为: Off。如果低氧气瓶连接到主进气口 Air inlet, Flow 要设置为: On, Flow: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$; ΔP : 0.1 kPa 或 0.2 kPa。其他设置 (H₂O; Fan; CO₂; Light) 不变, 同步骤 1。
7. 点击 Constants 标签, 在 System 下更改 O₂ 浓度: Oxygen: 2%(根据钢瓶气体实际浓度设定)。
8. 夹上步骤 4 中的样品叶, 点击 Measurement 标签, 观察各项参数的稳定性, 结合 Log Setup 标签下 Stability 功能中设置的稳定性参数, 当数据稳定, 点击 Log 记录数据。
9. 测量结束后, 点击 Log Setup 标签下 Logging to 功能, 点击 Close Log 关闭记录文件。
10. 插入 U 盘, 点击 Tools 标签, 选择 Manage Files 功能, 在 USB 选项, Files: copy files to USB 找

到自己建立的文件夹，打开，选择数据文件，点击 Copy，将数据推送到 U 盘，完成。

11. 计算出正常 O₂ 浓度与低 O₂ 浓度下净光合速率 A 的差值，即植物光呼吸速率的大小。

注意事项与相关研究信息参考

1. 目前已知的估算光呼吸的方法均有假设条件和限制。研究者可选择符合自己实验目的和科学问题的技术方法。
2. 通过多种研究方法的结合，可得到关于光呼吸耗碳速率、Rubisco 酶氧化速率、光呼吸去羧化速率、以及对光呼吸过程各代谢反应的追踪。
3. 光呼吸速率的定量可以帮助我们通过对改善作物光呼吸特性来实现产量的提升。当特定植物形态学特征和酶活性特征确定后，测量的光呼吸速率可以帮助我们通过对光合生化模型来预测未来大气 CO₂ 浓度升高条件下的气候环境与作物产量。
4. 采用低氧气体测量光呼吸的方法需注意以下几点：
 - a) 该方法假设由于光呼吸造成的光合速率降低仅与 O₂ 浓度有关。
 - b) 使用 LI-6800，改变进气气体的 O₂ 浓度时，需要更改 Constants 中的氧气浓度设置，因为氧气浓度的变化会对 CO₂ 的红外吸收产生影响，需要重新校正。
 - c) 低氧气瓶必须配备限流阀和流速计。特别注意的是气瓶的最大进气流速不可超过 2.5L·min⁻¹，最大压强不可超过 28 kPa。否则对仪器会造成损伤。
5. 不采用低 O₂ 环境测量，而采用 Rubisco 酶动力学推算法(F.A. Busch., 2012):

Rubisco 酶是一个双向功能酶，催化 RuBP 羧化反应，即 CO₂ 固定的第一步。当一些模型参数已知时，光呼吸速率可以通过 Rubisco 酶的动力学特性模拟得出。光呼吸速率 R_{PR} 等于 0.5 倍的氧化速率：

$$R_{PR} = 0.5 V_O = \frac{A + R_d}{\frac{C_c}{\Gamma^*} - 1}$$

由上式可知，净光合速率 A 和暗呼吸速率 R_d 可以通过气体交换的方法测量得出(实验二)， C_c 可通过叶肉导度 g_m 计算得到(详见实验七)， Γ^* 不易测量，且方法很多，如原位气体交换实测，通过 C_i 值估算等，但都有各自的优缺点，也有文献认为 Γ^* 在大多数 C₃ 植物中是恒定的常数，研究者可自行取舍。本文简介第二种估算方法，估算公式如下：

$$\Gamma^* = C_i + \frac{R_d}{g_m}$$

参考文献

1. 许大全，2013，光合作用学[M]，科学出版社。
2. B.J. Walker, A. VanLooke et al., 2016. The Costs of Photorespiration to Food Production Now and in the Future[J]. Annu. Rev. Plant Biol. 67:107-129
3. F.A. Busch., 2012, Current methods for estimating the rate of photorespiration in leaves[J]. Plant Biology ISSN 1435-8603, doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00694.x
4. S von Caemmerer., 2013. Steady-state models of photosynthesis [J], Plant, Cell and Environment 36, 1617-1630
5. G.D. Farquhar, S. von Caemmerer, and J.A. Berry., 1980. A Biochemical Model of Photosynthetic CO₂ Assimilation in Leaves of C₃ Species[J]. Planta 149, 78-90.
6. S. P. Long and C. J. Bernacchi., 2003, Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error[J]. J Exp Bot, 54: 2393-2401.
7. Bellasio et al., 2014, A high throughput gas exchange screen for determinin rates of photorespiration or regulation of C₄ activity[J]. J Exp Bot, 65: 3769-3779.
8. A. B. Cousinset al., 2000, Reduced photorespiration and increased energy-use efficiency in young CO₂-enriched sorghum leaves[J]. New Phytologist, 150: 275-284.

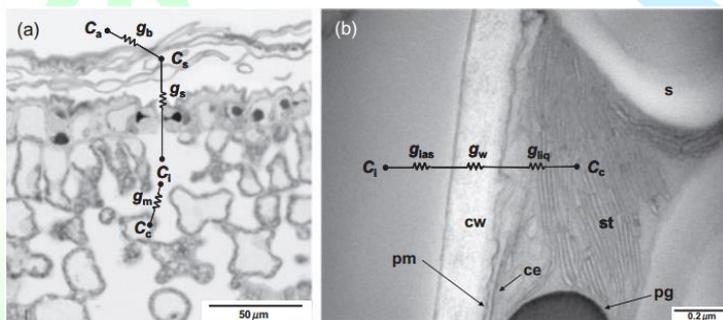
实验七、叶肉导度 g_m 与羧化位点 CO_2 浓度 C_c 测量实验

植物体内的光合是由数个相互关联的生物学过程组成，这些反应发生在植物叶片中的不同部位。生物物理过程包括 CO_2 通过叶片和气孔的传递，生物化学过程则发生在叶绿体类囊体膜、基质、线粒体和细胞溶质中，两个过程共同影响着净 CO_2 同化速率 A 。这些生理生化过程和环境因子对光合速率有着不同程度的影响，因此判断影响植物光合的因素是先天的、后天的还是环境造成的就变得十分困难。通过光合参数的计算来分类剖析生物物理和生物化学因子就变成了一个研究光合生物学，以及预测环境和基因对植物产量影响的一个重要工具。

在光合作用过程中， CO_2 从大气经过边界层到达叶片表面，再经过气孔到达气孔内腔，最后在经过叶片叶肉细胞到达叶绿体基质内的羧化位点。根据芬克第一定律，稳态下的净光合速率(A_N)可以表示为：

$$A_N = g_s \times (C_a - C_i) = g_m \times (C_i - C_c)$$

其中， g_s 和 g_m 分别是 CO_2 扩散时的气孔导度和叶肉导度， C_a , C_i , C_c 分别是大气、胞间和羧化位点的 CO_2 浓度。根据 F_vCB 模型，多数气体交换研究通常假设 g_m 很大且恒定，因此 $C_i = C_c$ 。然而，近年来的研究表明 g_m 足够小会造成 C_c 相对于 C_i 显著减小，而且 g_m 并不是恒定不变的，它具有明显植物种间特异性，并对外界环境因子变化有不同的响应模式，其响应机制可能的生理学基础包括水通道蛋白和碳酸酐酶等。此外， g_m 对环境变量的响应速度与 g_s 相当，甚至更快（在数秒到数分之间）。



叶肉导度 g_m 的测量方法有很多，大多数常见的测量方法均需要光合气体交换测量系统，如稳定性同

图 a 是橄榄叶片背面的显微镜图片，描述了 CO_2 在大气和植物叶片内的扩散过程： C_a 、 C_s 、 C_i 、 C_c 分别是大气、叶表面、气孔腔和叶绿体内（羧化位点）的 CO_2 浓度。 g_b 、 g_s 、 g_m 分别为边界层导度、气孔导度和叶肉导度。

图 b 是葡萄藤叶片的电子显微镜图片，描述了 CO_2 从气孔腔向叶绿体内扩散的过程：整个扩散通路由三部分组成气孔腔导度(g_{ias})、细胞壁导度(g_w)和细胞内液相组织的导度(g_{liq})。

位素和气体交换同步测量法、气体交换与叶绿素荧光同步测量法（稳定电子流法和变化电子流法）、曲线拟合法等。不同的方法都依赖一系列相关的假设，且有的方法中需要的参与计算的参数有时并不易获得。研究者可根据自身实验目的与条件选择合适自己的估算方法，本文将介绍气体交换与叶绿素荧光同步测量法和曲线拟合法。

实验条件

时间：野外自然环境一般选择上午 8:30~11:30，避开可能的“午休”，及“午休”对之后测量的影响；全天环境恒定气候控制室内，则可以全天实验；如进行荧光光响应曲线，植物材料需提前进行暗适应。

天气条件：晴朗，阳光充足。

材料：根据实验需要选择合适的样品叶(如无遮挡、受光照条件好的刚刚完全展开叶或冠层顶端叶)。

方法一、变化电子流法(variable J)

气体交换与叶绿素荧光同步测量：

1. 使用 6800-01A 荧光叶室（圆形，6cm² 或 2 cm²）进行测量，需要小钢瓶为叶室提供 CO₂，并在主机进气口连接缓冲瓶，可以更好的保证在脏乱不堪的环境中主机气路的干净。
2. 叶肉导度 g_m 的测量和计算，需要测量净光合速率 A 、胞间 CO₂ 浓度 C_i 、光下线粒体呼吸速率 R_d 、线性电子传递速率 J_a 和叶绿体羧化位点 CO₂ 补偿点 Γ^* ，计算公式如下：

$$g_m = \frac{A}{C_i - \frac{\Gamma^*(J_a + 8(A + R_d))}{J_a - 4(A + R_d)}}$$

3. 点击 Environment 标签，进行环境设置
 - a) 设置流速：Flow: On; Flow: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$; ΔP : 0.1 kPa 或 0.2kPa。
 - b) 设置 H₂O: 湿度控制可根据具体实验目的确定，对于不涉及水分胁迫处理的实验，可以设置一个稳定的湿度环境，来排除水分条件对植物气孔行为的影响。
H₂O: On; RH_{air}: 50%~75%; 也可控制 VPD_{leaf} ;
 - c) 设置 CO₂: CO₂ injector: On; Soda Lime: Scrub Auto; CO₂_s: 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (也可根据自己的实验目的设置响应的 CO₂ 浓度)
 - d) 设置混合扇: Mixing fan: On; Fan Speed: 10,000 rpm
 - e) 设置温度: g_m 计算公式中常数有较高的温度敏感性。温度控制可根据具体实验目的确定，为叶片设置一个稳定的温度环境，并满足仪器实现的可能性，高温高湿的环境下控温太低，可能会在仪器壁上凝结水珠，仪器会报警。
Temperature: On; Tleaf: 25 °C (根据环境温度 Tair 设置一个相近的温度)
 - f) 设置光强: 设置一个对植物没有光限制的恒定光强(也可根据实验目的设置)。

6800-01A 荧光叶室:

设置 Light: 选择 Fluorometer: Control Mode: Setpoint; Setpoint: 1800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (或根据实验目的设置光强); Color Sepc: r90 (90%红光)

点击 Fluorometry 标签，设置 Settings 功能:

Measuring: Measuring Beam: On; Dark mod rate: 500 Hz; Light mod rate: 20 kHz; Flash mod rate: 250 kHz; Averaging: 15 s; MultiPhase: Red target: 8000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Phase 1: 300 ms; Phase 2: 300 ms; Phase 3: 300ms; Ramp: 30%; Output rate: 200; Margin: 5 points

4. 点击 Log Setup 标签，设置 Stability (仅供参考，可以在 Measurements 下观察参数的实时变化图来确保稳定)。

Variables	Slope Limit	Period(s)
F. FlrLS	10	20
CO ₂ R & CO ₂ S. Meas	1	20
H ₂ OR & H ₂ OS. Meas	1	20
A.GasEx	1	20
gsw.GasEx	0.1	20

5. 点击 Log Setup 标签，设置记录文件和记录选项。
 - a) 设置 Logging Options: 保持默认，检查确保选中 Also log data to Excel file。
 - b) 设置 Match Options: CO₂ 选择 Always match 或 Only match if; H₂O 为 Never match; 建议使用 range match, 详见附录 4: Range Match 匹配方法。
 - c) 设置 Fluorometer Options, 在 Flr Action at log 选择“1:FoFm(dark) or FsFm'(light)”; Flash type: MultiPhase。
 - d) 检查屏幕右下角“Check to log as a row”区域，确认“Const: S”选框 没有被勾选。
 - e) 打开记录文件 Open a Log File: 点击 New Folder, 建立自己的数据文件夹，选中建好的文件夹后，点击 New File, 输入文件名称，点击 OK, 打开记录文件。
6. 夹上叶片，点击 Measurement 标签，观察左侧图形，按不同字母可见多个参数的稳定性实时图，也可以点击 Log Setup 标签下查看 Stability 功能中设置的稳定性参数，当显示为稳定，点击 Log 记录数据。
7. 更换叶片，重复操作第 6 步，测量结束后，点击 Log Setup 标签下 Logging to 功能，点击 Close Log 关闭记录文件。
8. 插入 U 盘，点击 Tools 标签，选择 Manage Files 功能，在 USB 选项，Files: copy files to USB 找到自己建立的文件夹，打开，选择数据文件，点击 Copy, 将数据推送到 U 盘，完成。
9. 注意事项:
 - a) 变化电子流法需要植物材料有正常的光呼吸存在，光呼吸速率与光合速率比值越大，测量效果越准确。
 - b) 由于除光呼吸外的其他电子库的存在，以及实际测量的叶绿素荧光是由叶片表面发出而非整个叶片，所以荧光参数 ETR (相对电子传递速率) 与计算公式中实际所需的线性电子传递速率 J_a 之间有一定误差。
 - c) 通过在低氧气浓度 (1~2% O₂) 下对 ETR 和 J_a 进行“校准曲线”的方法，可以部分消除二者间的误差。
 - d) Γ^* 的大小对 g_m 的估算结果有一定影响，有研究认为 Γ^* 在不同种类的 C3 植物中变化不大，可认为是一个常数，也可通过其他方法进行估算，详见实验 6。
 - e) 光下线粒体呼吸 R_d 的大小对 g_m 的估算结果也有一定影响，现在多数研究者采用夜间暗呼吸速率 R_n 来代替 R_d ，也可通过其他方法估算(Laisk 法)，但耗时较长。

方法二、稳定电子流法(constant J)

气体交换测量法:

1. 使用 6800-02 红蓝光源叶室 (3cm×3cm; 2cm×3cm; 1cm×3cm) 进行测量，需要小钢瓶为叶室提供 CO₂。并在主机进气口连接缓冲瓶，可以更好的保证在脏乱不堪的环境中主机气路的干净。
2. 叶肉导度 g_m 的测量和计算，需要测量净光合速率 A 、胞间 CO₂ 浓度 C_i 、光下线粒体呼吸速率 R_d 和叶绿体羧化位点 CO₂ 补偿点 Γ^* ，计算公式如下：

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

3. 点击 Environment 标签，进行环境设置
 - a) 设置流速 Flow: On; Pump Speed: Auto; Flow: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$; ΔP : 0.1 kPa 或 0.2kPa。
 - b) 设置 H₂O: On; RH_air: 50%~75%; 也可控制 VPD_{leaf} ;

- c) 设置 CO₂: CO₂ injector: On; Soda Lime: Scrub Auto; CO₂_s: 600 μmol·mol⁻¹(浓度需设定为植物光合速率只受到 RuBP 再生速率影响时的 CO₂ 浓度)
- d) 设置混合扇: Mixing fan: On; Fan Speed: 10,000 rpm
- e) 设置温度: g_m 计算公式中常数有较高的温度敏感性。

Temperature: On; Tleaf: 25 °C (根据环境温度 Tair 设置一个相近的温度)

- f) 设置光强: 设置一个对植物没有光限制的恒定光强(也可根据实验目的设置)。

6800-02 红蓝光源设置 Light:

选择 Head Light Source: Control Mode: Setpoint; Setpoint: 1800 μmol·m⁻²·s⁻¹ (或根据实验目的设置光强);

Color Sepc: r90 (90%红光)

- 4. 点击 Log Setup 标签, 设置 Stability 功能 (仅供参考, 可以在 Measurements 下观察参数的实时变化图来确保稳定)

Variables	Slope Limit	Period(s)
CO ₂ R & CO ₂ S. Meas	1	20
H ₂ OR & H ₂ OS. Meas	1	20
A.GasEx	1	20
gsw.GasEx	0.1	20

- 5. 点击 Log Setup 标签, 设置记录文件和记录选项。

- a) 设置 Logging Options: 保持默认, 检查确保选中 Also log data to Excel file, 检查屏幕右下角 “Check to log as a row” 区域, 确认 “Const: S” 选框 没有被勾选。
- b) 设置 Match Options: CO₂ 选择 Always match 或 Only match if; H₂O 为 Never match; 建议使用 range match, 详见附录 4: Range Match 匹配方法。
- c) 打开记录文件 Open a Log File: 点击 New Folder, 建立自己的数据文件夹, 选中建好的文件夹后, 点击 New File, 输入文件名称, 点击 OK, 打开记录文件。

- 6. 夹上叶片, 点击 Measurement 标签。观察 Log Setup 标签下 Stability 功能中设置的稳定性参数, 当显示为 4/4 时, 为数据波动稳定, 点击 Log 记录数据。

- 7. 点击 Environment 标签, 更改 CO₂ 浓度设置。

CO₂_s: 700 μmol·mol⁻¹ (更换一个植物光合速率只受到 RuBP 再生速率影响时的 CO₂ 浓度)

- 8. 点击 Measurement 标签。观察 Log Setup 标签下 Stability 功能中设置的稳定性参数, 当显示为 4/4 时, 为数据波动稳定, 点击 Log 记录数据。

- 9. 重复操作第 7~8 步, 更换 3 个以上的 CO₂ 浓度点, 测量结束后, 点击 Log Setup 标签下 Logging to 功能, 点击 Close Log 关闭记录文件。

- 10. 插入 U 盘, 点击 Tools 标签, 选择 Manage Files 功能, 在 USB 选项, Files: copy files to USB 找到自己建立的文件夹, 打开, 选择数据文件, 点击 Copy, 将数据推送到 U 盘, 完成。

- 11. 由于更换不同 CO₂ 浓度过程中, 电子传递速率 J_a 并未发生变化, J_a 可根据记录点数据计算得出:

$$J_a = \sum_{i=1}^n (J_x - J_i)^2 / (n - 1)$$

其中, J_x 为几次记录点数据计算的 J_a 的平均值, J_i 为每个记录点计算的 J_a 值, n 为记录点数。

12. 将计算得到的 J_a 代入步骤 2 中, 求得的 g_m 结果中的最小值为实际的 g_m (详细计算方法见 Warren, 2006)。
13. 注意事项:
 - a) 稳定电子流法只有在电子传递速率恒定且植物光合只受到 *RuBP* 再生限制的影响时有效, 因此可通过 Φ_{PSII} 或 *ETR* 的 CO_2 响应曲线找到合适的 CO_2 浓度设定范围(或根据经验判断, 一般出现在高 C_i 情况下)。
 - b) 由于计算过程中不涉及到相对电子传递速率 *ETR* 和实际线性电子传递速率 J_a 的相互关系转化, 所以对于叶绿素荧光的假设比变化电子流法宽松。
 - c) 因为测量过程中需测量多个气体交换数据, 因此对估算的准确性上略高于变化电子流法。
 - d) 由于测量过程不需要实际测量叶绿素荧光参数, 因此可使用 6800-02 红蓝光源叶室 (3cm×3cm; 2cm×3cm; 1cm×3cm) 进行实验。
 - e) Γ^* 和 R_d 对结果的影响与变化电子流法相同。

方法三、曲线曲率法(curvature method)

1. 使用 6800-02 红蓝光源叶室 (3cm×3cm; 2cm×3cm; 1cm×3cm) 进行测量, CO_2 小钢瓶为叶室提供 CO_2 , 并在主机进气口连接缓冲瓶, 可以更好的保证在脏乱不堪的环境中主机气路的干净。
2. 该方法使用 *A-C_i Curve* 的初始斜率变化来估算叶肉导度 g_m , 因此操作方法与 CO_2 响应曲线相同(详见实验四)。
3. 注意事项:
 - a) 低准确度的 A 和 C_i 的计算会对 *A-C_i Curve* 的曲率估算造成较大的误差, 进而影响 g_m 的估算结果, 因此高精度的气体交换测量是此方法准确性的必要保证。
 - b) 在叶面积过小或流速过大的情况下, 会对气体交换结果造成较大误差, 因此叶室内的叶片面积不应小于 6 cm², 系统流速应适中(500 μmol·s⁻¹), 但对于 LI-6800 而言, 高精度的气体分析器可使叶面积和流速的限制影响降低, 从而扩大实际实验条件范围。
 - c) 曲线拟合的准确性同时也依赖于测量点的多少, 建议不同 C_i 测量点梯度变化不应大于 25 μmol·mol⁻¹。

注意事项与相关研究信息参考

1. 本章介绍了三种使用 LI-6800 测量植物叶肉导度的方法: 方法 1, LI-6800 需配备 6800-01A 荧光叶室(圆形, 6cm² 或 2cm²), 方法 2 和方法 3 只需要 LI-6800 配置 6800-02 红蓝光源叶室 (3cm×3cm; 2cm×3cm; 1cm×3cm) 即可, 研究者可根据自身仪器配置情况选择合适的方法, 关于叶肉导度测量的其他方法详见 Warren 2006 “Estimating the internal conductance to CO_2 movement”。
2. 通过叶肉导度的测量, 可以估算植物叶片(或化 C_c 点)的 CO_2 浓度 C_c , 公式为:

3. 叶肉导度在不同植物生长阶段并不恒定，叶片从未展开到成熟， g_m 与叶片光合能力呈平行增加趋势。相反，在叶片老化过程中 g_m 减少，另外， g_m 减少似乎是老化叶片光合早期降低的主要原因。同时，胁迫环境条件(如弱光、干旱)都会引起 g_m 和光合速率的降低。
4. 在不同的遗传与生理背景下， g_m 与最大气孔导度、 CO_2 同化能力成正相关。细胞质膜上的水通道蛋白在 CO_2 扩散进入叶绿体的过程中发挥作用，因此也与 g_m 有着密切联系。反义抑制水通道蛋白基因 (NtAQP1) 的实验结果表明，该基因表达水平与 g_m 正相关。
5. 叶肉导度随植物种类和胁迫因子变化有很大的变异性，下表为不同种类植物的叶肉导度范围 (Ethier and Livingston, 2004)。

种类	g_m 范围	种类	g_m 范围
水稻	0.39~0.50	美洲黑杨	0.5
小麦	0.32~0.53	桃树	0.27~0.43
夹竹桃	0.22	夏栎	0.07~0.27
苍耳	0.37~0.60	草莓	0.16
烟草	0.19~0.50	山茶	0.07~0.12
虎杖	0.08~0.19	柠檬	0.15~0.18
槭木	0.07~0.15	桉树	0.11~0.12
胡桃	0.08~0.22	青冈栎	0.07~0.08

参考文献

1. 许大全, 2013, 光合作用学[M], 科学出版社。
2. J FlexasL et al., 2008. Mesophyll conductance to CO_2 : current knowledge and future prospects [J]. Plant, Cell and Environment 31, 602–621
3. Warren., 2006, Estimating the internal conductance to CO_2 movement [J]. Functional Plant Biology, 33, 431–442.
4. T. L. Pons, J. Flexas., 2009. Estimating mesophyll conductance to CO_2 : methodology, potential errors, and recommendations [J], J Exp Bot, 60: 2217–2234.
5. G.D. Farquhar, S. von Caemmerer, and J.A. Berry., 1980. A Biochemical Model of Photosynthetic CO_2 Assimilation in Leaves of C_3 Species[J]. Planta 149, 78-90.
6. G.J. Ethier, N.J. Livingston., 2004, On the need to incorporate sensitivity to CO_2 transfer conductance into the Farquhar–von Caemmerer–Berry leaf photosynthesis model [J]. Plant, Cell and Environment 27, 137–153.
7. 史作民, 冯秋红等, 2010 年, 叶肉导度研究综述[J]. 生态学报, 30(17): 4792-4803.

实验八、光合的温度适应与温度响应曲线

由于温室效应造成的全球大气温度升高，植物对于不断升高的温度的响应日益成为一个备受关注的领域。在研究光合作用对环境因子的响应过程中，应用最广的光合模型是 F_vCB 模型(详见实验四)。然而，许多模型研究均忽视了种间和种内的光合温度特异性。建立一个完整参数化且广受认可的光合温度响应模型也是现在光合研究者的一个主要研究方向。

在自然界中，植物的环境温度存在着日变化和季节波动。周围温度波动对植物光合作用的多种生理生化过程有直接的影响。这些过程包括：光合碳固定、还原，蔗糖合成，光合产物的运输与分配，以及受可移动的电子传递体质体醌、质体蓝素扩散限制的两个光系统间的电子传递。

生长温度可以改变植物光合作用的温度依赖性，这种现象称为植物的温度适应或温度驯化。对于大多数植物品种，最大化光合作用的最适温度随着植物生长所经历的温度的增加而增加。通过植物光合的温度响应曲线，研究者可以解释造成温度驯化的生理机制。根据光合的生物化学模型，温度响应曲线的变化主要来自于四个因素：胞间 CO_2 浓度(C_i)、*Rubisco* 的最大羧化速率(V_{cmax})时所需的活化能、*RuBP* 最大再生速率(J_{max})、以及 J_{max} 和 V_{cmax} 的比值。

对于多数植物而言，饱和光下的光合速率在极端低温和极端高温时很低，而在中间温度下有一个光合速率最高的最适温度。随着植物生长过程中所处的环境温度的改变，许多植物在其光合特性上表现出相当程度的表型可塑性。一般来说，植物生长环境的温度越高，其光合速率的最适温度也会越高。

光合的温度依赖性的改变归因于光合器官活性和数量的变化，或羧化位点 CO_2 浓度(C_c)的变化。但对于光合参数对温度的响应曲线来看，每一个光合特征参数在种间均表现出明显的特异性。

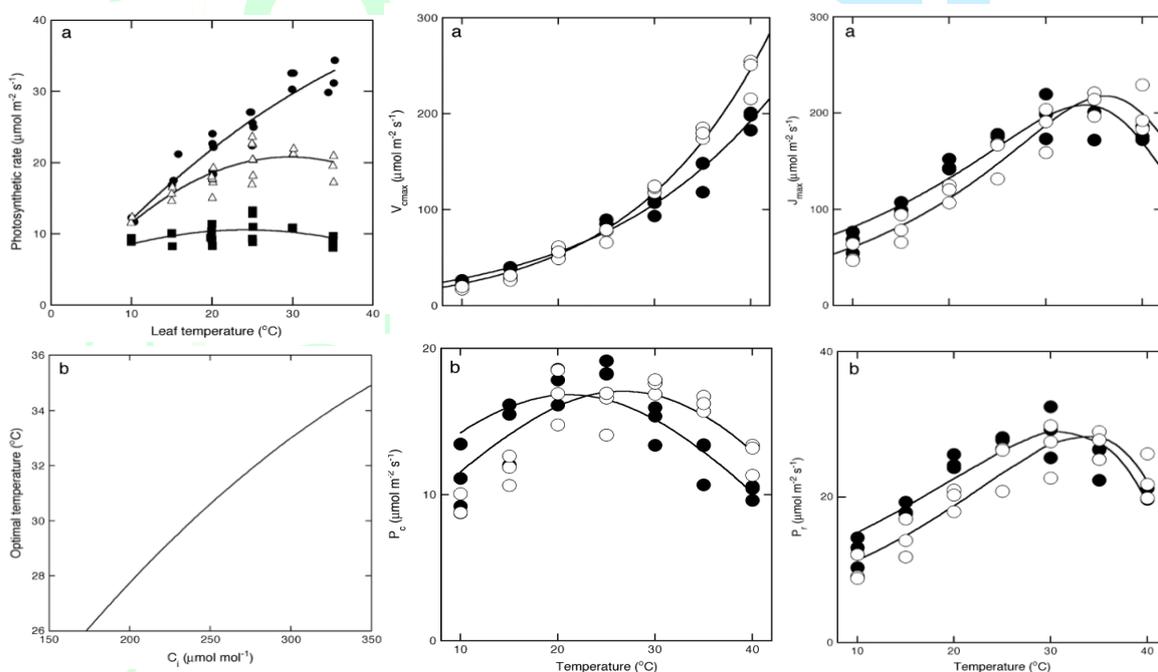


图 2：光合特征参数对温度变化的响应。其中 P_c ：Rubisco 酶限制下的光合速率、 P_j ：RuBP 再生限制下的光合速率

(图片数据来源：K. Hikosaka, K. Ishikawa et al., 2006)

实验条件

时间：野外自然环境一般选择上午 8:30~11:30，避开可能的“午休”，及“午休”对之后测量的影响；全天环境恒定气候控制室内，则可以全天实验。

天气条件：晴朗，阳光充足。

材料：根据实验需要，选择合适的样品叶（一般选用无遮挡、受光照条件好的刚刚完全展开叶或冠层顶端叶）。

实验步骤

1. 温度响应曲线可使用 6800-01A 荧光叶室（圆形，6cm² 或 2 cm²）或 6800-02 红蓝光源叶室（3cm×3cm；2cm×3cm；1cm×3cm）进行测量。
2. 建议使用 CO₂ 钢瓶控制稳定一致的 CO₂ 浓度，并在主机进气口连接缓冲瓶，可以更好的保证在脏乱不堪的环境中主机气路的干净。具体操作请见第 3 步 Environment 中的 CO₂ 控制；如果没有 CO₂ 钢瓶，主机进气口连接缓冲瓶，具体方法见[附录 1: LI-6800 缓冲瓶正确使用方法](#)。
3. 点击 Environment 标签，进行环境设置
 - a) 设置流速 Flow: On; Pump Speed: Auto;
Flow: 500 μmol·s⁻¹; ΔP: 0.1 kPa 或 0.2kPa。
 - b) 设置 H₂O: On; RH_air: 50%~75%(也可设置 VPD_{leaf}来控制叶室内的水分状态)
 - c) 使用 CO₂ 小钢瓶，需要设置 CO₂: CO₂ injector: On; Soda Lime: Scrub Auto; CO₂_s: 400 μmol·mol⁻¹（注：如没有小钢瓶，使用缓冲瓶，设置 CO₂ injector: Off）
 - d) 设置混合扇: Mixing fan: On; Fan Speed: 10,000 rpm
 - e) 设置温度: Temperature: Off;
 - f) 设置光强: 测量过程中光强保持恒定，设置一个对植物没有光限制的光强(也可根据实验目的设置)。

6800-01A 荧光叶室:

设置 Light: 选择 Fluorometer: Control Mode: Setpoint; Setpoint: 1800 μmol·m⁻²·s⁻¹（或根据实验目的设置光强）; Color Sepc: r90（90%红光）

6800-02 红蓝光源:

设置 Light: 选择 Head Light Source: Control Mode: Setpoint; Setpoint: 1800 μmol·m⁻²·s⁻¹（或根据实验目的设置光强）; Color Sepc: r90（90%红光）

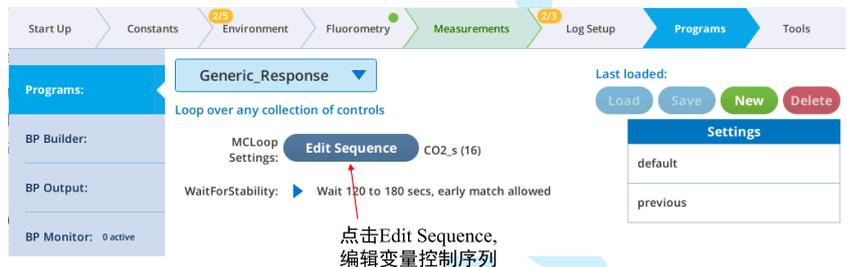
4. 点击 Log Setup 标签，设置 Stability 功能（仅供参考，可以在 Measurements 下观察参数的实时变化图来确保稳定）

Variables	Slope Limit	Period(s)
CO ₂ R & CO ₂ S. Meas	1（使用 CO ₂ 小钢瓶）或 2（不使用 CO ₂ 小钢瓶）	20
H ₂ OR & H ₂ OS. Meas	1	20
A.GasEx	1	20
gsw.GasEx	0.1	20

5. 点击 Log Setup 标签，设置记录文件和记录选项。

- A. 设置 Logging Options: 保持默认, 检查确保选中 Also log data to Excel file, 检查屏幕右下角“Check to log as a row”区域, 确认“Const: S” 选框 **没有被勾选**。
 - B. 设置 Match Options: CO₂ 选择 Always match 或 Only match if; H₂O 为 Never match; 建议使用 range match, 详见附录 4: [Range Match 匹配方法](#)。
 - C. 打开记录文件 Open a Log File: 点击 New Folder, 建立自己的数据文件夹, 选中并打开建好的文件夹后, 点击 New File, 输入文件名称, 点击 OK, 记录文件打开, 可以开始测量了。
6. 夹上叶片, 点击 Measurement 标签, 进入测量界面, 观察左侧图形, 按不同字母可见多个参数的稳定性实时图, 也可以查看 Log Setup 标签下 Stability 功能中设置的稳定性参数, 当显示为 4/4 时, 为数据稳定。
7. 开始测量温度响应曲线

1) 点击 Programs 标签, 在 Programs 功能中选择 Generic Response。



a) 点击 Edit Sequence, 建立环境变量控制序列。

b) 设置 Control, 选择 Env Temp Tleaf, 控制叶片温度。(也可点击左上角+Row, 可以添加一个新的控制变量, 或点击左上角+Col, 添加变量梯度)



c) 点击设置的变量行, 按 Edit Row 按钮, 输入控制的温度(或其他变量)变化梯度范围。



- 2) 设置 WaitForStability: Min.wait: 360 sec; Max.wait: 600 sec; 勾选 Allow early matching
- 3) 点击 Start 开始测量

8. 图像设置，点击 measurements 标签，选择 Graph A~H，点击 Edit Graphs，对 A 和 Tleaf 进行图像设置。查看曲线。
9. 更换叶片，重复第 6~7 步，测量结束后，点击 Log Setup 标签下 Logging to 功能，点击右下角位置的 Close Log 关闭记录文件。
10. 插入 U 盘，点击 Tools 标签，选择 Manage Files 功能，在 USB 选项，Files: copy files to USB 找到自己建立的文件夹，打开，选择数据文件，点击 Copy，将数据推送到 U 盘，完成。

注意事项与相关研究信息参考

1. 当外界湿度较大时，叶室的低温控制范围会变小，因为当控制的低温达到当前进气的露点温度时，气体中的水气结露对红外气体分析器造成影响，此时仪器会自动弹出 AutoDry 的报警提示。
2. 在不同 CO₂ 浓度限制下，光合的温度依赖性会表现出相应的 Rubisco 酶限制和 RuBP 限制的特异性，因此可通过 Nested Response 多层嵌套自动测量来探究不同 CO₂ 限制下的光合温度响应。
3. 由于光合的温度响应曲线受到植物叶片的 V_{max} 、 J_{max} 等的影响，所以在探究光合对温度响应的同时，CO₂ 响应曲线也是一个重要的实验环节，关于 C3 植物的生化模型的相关实验详见实验四。
4. 温度响应曲线大体成抛物线形，曲线的顶点所对应的温度，是光合作用的最适温度。在温度低于最适温度区间，温度升高促进光合速率，在一定范围内(10~30°C)，温度每升高 10°C 光合速率会成倍增高， $Q_{10}=1.5\sim 2.0$ ；当温度超过最适温度，温度的继续升高会抑制光合速率，起初这种抑制是可逆的，主要是由于光呼吸、暗呼吸的加强，也涉及热引起的 Rubisco 失活，而后这种抑制成为不可逆的，原因是光合机构遭受了短期内难以恢复的破坏。
5. 光合作用的最适温度因物种不同而异，通常 C3 植物为 25°C，而 C4 植物为 30~35°C，同一环境中生长的后者比前者高 10°C 左右。同时光合最适温度还受到多种因素的影响，如：生长温度、空气湿度、光呼吸等。
6. 在大多数情况下，最适温度下的光合速率是受到 Rubisco 酶羧化限制的，因此 Rubisco 酶的羧化对温度的依赖也决定了光合速率最适温度的高低。
7. 在现在的多数研究中， K_c 、 K_o 和 Γ^* 不受植物种类和生长环境变化的影响。
8. 光合的温度依赖性可归因于 C_i 、 V_{cmax} 的活化能、 J_{max} 的活化能和 J_{max}/V_{cmax} 。

参考文献

1. 许大全，2013，光合作用学[M]，科学出版社。
2. K. Hikosaka, K. Ishikawa et al., 2006. Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate[J]. J Exp Bot, 57, 291–302.

实验九、植物叶片的气孔行为与水汽压亏缺 VPD 的响应

水是植物光合作用的一种重要的原料，直接参与光合作用。植物体内绝大部分的水，是为植物的生存和生长发育创造一个必不可少的合适环境。植物遭遇的水分胁迫包括多种不同的形式：土壤水分亏缺、土壤水分过多和空气水分亏缺，本节实验主要讨论空气水分亏缺对植物光合和气孔的影响。

气孔是植物光合作用器官叶片与外界进行 CO_2 、 O_2 和 H_2O 等气体交换的最主要通道。光合的基本底物 CO_2 主要是通过气孔从周围空气中进入光合器官的。因此，光合器官表面上气孔的密度、开度和气孔导度对光合作用的 CO_2 供应以至叶片的净光合速率有重要的影响。由于气孔有调节叶片与大气碳水交换的功能，因此气孔在许多植物和生态系统过程中都扮演着举足轻重的角色。气孔的开关运动受多种内外因素的调节。其响应的时间为几秒至几小时。通常，光、高空气湿度和低 CO_2 浓度促进气孔的开放，而黑暗、低湿度、高温和高 CO_2 浓度以及激素脱落酸促进气孔的关闭。不过，景天酸代谢(CAM)植物例外，白天气孔关闭，而夜晚气孔开放。近十数年来，关于气孔导度 g_{sw} 和其对环境变量因子的响应一直是生理生态学研究的重点内容。然而，尽管有大量的实验和模型方法，但是准确的气孔对确定环境外界刺激的反应机制仍然众说纷纭。

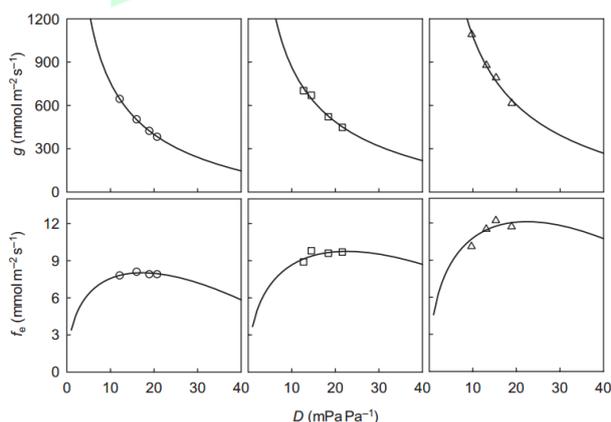


图 3：表明蒸腾速率与气孔导度随饱和水汽压 VPD 变化，以及预测模型曲线。其中 f_e ：蒸腾速率； g ：气孔导度； D ：饱和水汽压亏缺 (图片数据来源：G.G. Katul., S. Palmroth and R. Oren.,2009.)

实验条件

时间：野外自然环境一般选择上午 8:30~11:30，避开可能的“午休”，及“午休”对之后测量的影响；全天环境恒定气候控制室内，则可以全天实验。

天气条件：晴朗，阳光充足。

材料：根据实验需要，选择合适的样品叶(一般选用无遮挡、受光照条件好的刚刚完全展开叶或冠层顶端叶)。

实验步骤

1. g_{sw} - VPD 响应曲线可使用 6800-01A 荧光叶室 (圆形, $6cm^2$ 或 $2cm^2$) 或 6800-02 红蓝光源叶室 ($3cm \times 3cm$; $2cm \times 3cm$; $1cm \times 3cm$) 进行测量。
2. 建议使用 CO_2 钢瓶控制稳定一致的 CO_2 浓度，并在主机进气口连接缓冲瓶，可以更好的保证在脏乱不堪的环境中主机气路的干净。具体操作请见第 3 步 Environment 中的 CO_2 控制；如果没有 CO_2

钢瓶，主机进气口连接缓冲瓶，具体方法见[附录 1: LI-6800 缓冲瓶正确使用方法](#)。

3. 点击 Environment 标签，进行环境设置
 - a) 设置流速 Flow: On; Pump Speed: Auto; Flow: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$; ΔP : 0.1 kPa 或 0.2 kPa。
 - b) 设置 H₂O: Off;
 - c) 设置 CO₂: 如果使用 CO₂ 小钢瓶，设置 CO₂: CO₂ injector: On; CO_{2_s}: 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$
如果不使用 CO₂ 小钢瓶，必须使用缓冲瓶，设置 CO₂ injector: Off
 - d) 设置混合扇: Mixing fan: On; Fan Speed: 10,000 rpm
 - a) 设置温度: 温度控制可根据具体实验目的确定，叶片设置一个稳定的温度环境，并满足仪器实现的可能性，高温高湿的环境下控温太低，可能会在仪器壁上凝结水，仪器会报警。
Temperature: On; Tleaf: 25 °C (根据环境温度 Tair 设置一个相近的温度)
 - e) 设置光强: 测量过程中光强保持恒定，设置一个对植物没有光限制的光强(也可根据实验目的的设置)。

6800-01A 荧光叶室:

设置 Light: 选择 Fluorometer: Control Mode: Setpoint; Setpoint: 1800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (或根据实验目的设置光强); Color Sepec: r90 (90%红光)

6800-02 红蓝光源:

设置 Light: 选择 Head Light Source: Control Mode: Setpoint; Setpoint: 1800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (或根据实验目的设置光强); Color Sepec: r90 (90%红光)

4. 点击 Log setup 标签，设置 Stability 功能 (仅供参考，可以在 Measurements 下观察参数的实时变化图来确保稳定)

Variables	Slope Limit	Period(s)
CO ₂ R & CO ₂ S. Meas	1 (使用 CO ₂ 小钢瓶) 或 2 (不使用 CO ₂ 小钢瓶)	20
H ₂ OR & H ₂ OS. Meas	1	20
A.GasEx	1	20
gsw.GasEx	0.1	20

5. 点击 Log Setup 标签，设置记录文件和记录选项。
 - a) 设置 Logging Options: 保持默认，检查确保选中 Also log data to Excel file，检查屏幕右下角“Check to log as a row”区域，确认“Const: S”选框 **没有被勾选**。
 - b) 设置 Match Options: CO₂ 选择 Always match 或 Only match if; H₂O 为 Never match; 建议使用 range match，详见[附录 4: Range Match 匹配方法](#)。
 - c) 打开记录文件 Open a Log File: 点击 New Folder，建立自己的数据文件夹，选中并打开建好的文件夹后，点击 New File，输入文件名称，点击 OK，记录文件打开，可以开始测量了。
6. 夹上叶片，点击 Measurement 标签，进入测量界面，观察左侧图形，按不同字母可见多个参数的稳定性实时图，也可以查看 Log Setup 标签下 Stability 功能中设置的稳定性参数，当显示为 4/4 时，为数据稳定。
7. 开始测量。
 - a) 点击 Programs 标签，在 Programs 功能中选择 Generic_Response。控制变量: VPD_{leaf} 具体控

制变量的设置方法，请详见实验八。

b) 点击 Start 开始测量。

8. 图像设置，点击 measurements 标签，选择 Graph A~H，点击 Edit Graphs，对 A 或 g_{sw} 和 VPD_{leaf} 进行图像设置。查看曲线。
9. 更换叶片，重复第 6~7 步，直到所有叶片测完，点击 Log Setup 标签下 Logging to 功能，点击右上角位置的 Close Log 关闭记录文件。
10. 插入 U 盘，点击 Tools 标签，选择 Manage Files 功能，在 USB 选项，Files: copy files to USB 找到自己建立的文件夹，打开，选择数据文件，点击 Copy，将数据推送到 U 盘，完成。

注意事项与相关研究信息参考

1. VPD 控制范围与温度有关，湿度控制过高时出现 AutoDry 警示，可适当提高温度(T_{leaf} 或 T_{xchg})。
2. 湿度控制时，需要整管新鲜的干燥剂和水分充足的加湿剂。如控制高湿环境时，控湿界面 Humidifier 阀达到 100%仍无法继续加湿，请考虑向加湿剂中添加蒸馏水 5~10 ml。现在有新型的加湿管，里面需要加入过滤水，建议增加。
3. 由于气孔开关同时受 CO_2 浓度的影响，因此可通过 Nested Response 多层嵌套自动测量来探究不同 CO_2 限制下的光合或气孔对 VPD 的响应(具体操作详见实验八的相关介绍)。
4. 不同植物的气孔对外界环境条件变化的响应时间差异很大，从几秒到几小时不等，以上实验步骤的时间设置仅供参考。可通过提前预实验来估计所测植物合适的测量间隔时长。
5. 气孔开度变小引起的气孔导度降低，是植物对水分亏缺或干旱的最早响应。它可以使植物免于水分的过度损失，否则会导致细胞脱水、木质部导管内产生气穴，甚至引起叶片、植株的死亡。
6. 干旱条件下的气孔关闭涉及两个不同的机制：一是被动机制，即在遭遇干热空气时，缺乏角质层保护的保卫细胞因通过表面散失水分而失去膨压，导致气孔关闭。二是主动机制，依赖细胞代谢，通常由叶肉细胞水势降低所引发，并涉及植物激素脱落酸。

参考文献

1. 许大全，2013，光合作用学[M]，科学出版社。
2. G.D. Farquhar and T.D. Sharkey., 1982. Stomatal conductance and photosynthesis[J]. Annu. Rev. Plant. Physiol. 33:317-345.
3. J.W.H. Yong, S.C. Wong and G.D. Farquar., 1997. Stomatal responses to changes in vapour pressure difference between leaf and air[J], Plant, Cell and Environment 20, 1213-1216.
4. H. Maherali, H.B. Johnson and R.B. Jackson., 2003, Stomatal sensitivity to vapour pressure difference over a subambient to elevated CO_2 gradient in a C3/C4 grassland[J]. Plant, Cell and Environment 26, 1297-1306
5. G.G. Katul., S. Palmroth and R. Oren., 2009, Leaf stomatal responses to vapour pressure deficit under current and CO_2 -enriched atmosphere explained by the economics of gas exchange[J]. Plant, Cell and Environment 32, 968-979.
6. T.N. Buckley 2005, The control of stomata by water balance[J]. New Phytologist 168: 275-292

附录 1、LI-6800 缓冲瓶的正确使用方法

使用缓冲瓶保证进气稳定的注意事项

- 1) **缓冲瓶要求：**干净、干燥的无色或浅色空水桶（如纯净水或矿泉水桶等），塑料桶，有盖能密封，体积越大越好；野外工作考虑到携带方便性，至少 4L 体积。**不可使用装过化学药剂的桶。**
- 2) **缓冲瓶的制作：**盖上打两个孔，一个孔径为进气管的外径，能够将进气管用力推到桶的底部（此处孔径大小要注意，不可太大，否则会导致周边漏气不利于缓冲，而且移动时进气管会和缓冲瓶脱开）；另一个洞孔径为进气管的内径大小，暴露在空气中，实现缓冲瓶内外气相通，如下左图与中图；或者这个洞的孔径同外径，连接一小段管子进气，另一个孔连接进气管，如下右图；拧紧盖子，确保缓冲瓶除了这两个洞以外，其余地方无破损。



- 3) **缓冲瓶的放置：**所测环境之中且空气扰动相对小的地方。在野外测定时，缓冲瓶应放置在距离人相对较远且位于人的上风向位置，并高出地面为好（如绑在一根杆上，离地面 1 米左右位置），避免人为扰动和土壤呼吸的影响。在室内或温室大棚，由于是密闭环境，人的呼吸与活动导致 CO₂ 浓度波动很大，缓冲瓶可放在一个较大的近乎封闭的空箱子中来确保进气稳定。
- 4) **如何判断进气浓度的稳定性？**观察 CO₂r 是否稳定。

LI-6800 正确连接缓冲瓶的方法

LI-6800 缓冲瓶接头配件（300-02547）如右图所示：

- 1) 取下加湿管与苏打管，露出 LI-6800 主机的黑色进气口（Filter Access Air Inlet），见下左图，在黑色模块下端有一个螺孔，连接上图的配件 300-02547，见下中图。安装进气管，一端连接缓冲瓶，一端连接到 LI-6800 主机的进气口上，见下右图。

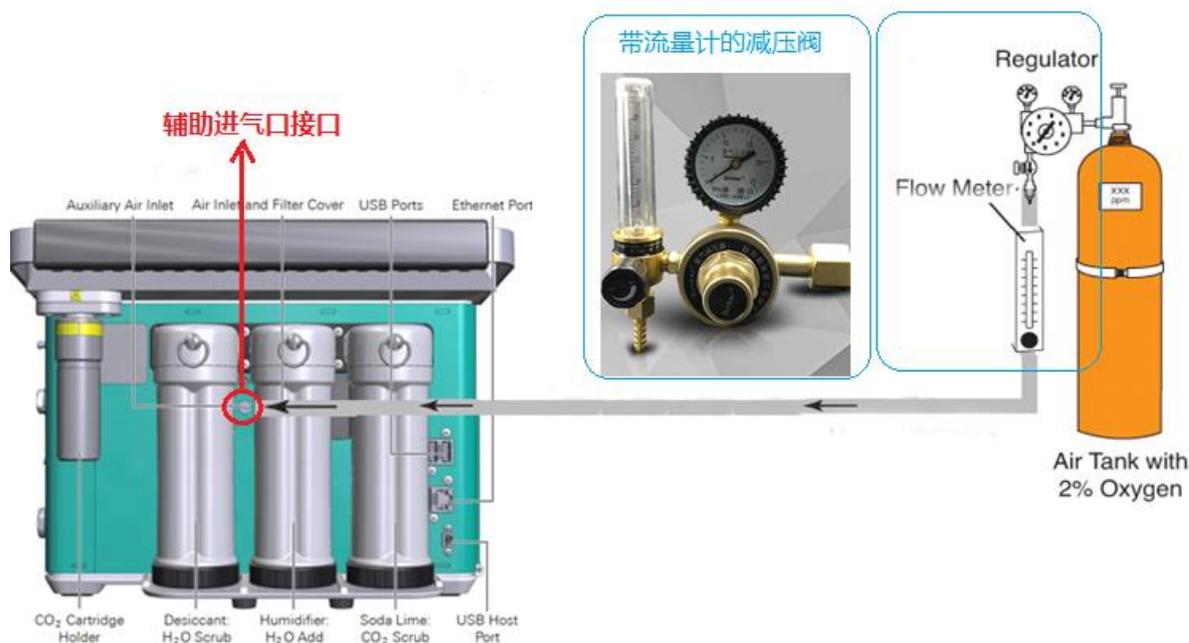


- 2) 把苏打管和加湿管安装到原来的位置，连接好主机、分析器、叶室等，即可开机。
- 3) 开机后先进行 Warmup/System Tests，确保仪器正常运行（注意：使用缓冲瓶，此处的检查会出现 CO₂ 浓度控制出现 fail, test 2: is full CO₂_r > 1500 ppm? Measures -0.8 (Replace CO₂ cylinder), 原因是不使用 CO₂ 小钢瓶是无法控制 CO₂ 浓度的)。
- 4) 设定环境变量
 - a、 Flow: ON; Flow: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ 或 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$; $\Delta P=0.1\text{kPa}$ 或 0.2kPa ;
 - b、 H₂O: ON; 控制 RH_{air} 为 50%~70%;
 - c、 **CO₂ 设为 OFF 状态; soda Lime 为 off 状态;**
 - d、 一般植物 Fan Speed 设定在 10000 即可，某些植物的气孔开放程度对气流扰动较为敏感，这种情况可适当降低 Fan 的转速。
 - e、 光强根据实验进行设定。
- 5) 在 Log Setup 选择 Match Options : Only match CO₂ if; Never match H₂O;
- 6) 在 Log Setup 选择 Open a log file 创建文件，等待数据稳定即可开始进行测量。

附录 2、低氧气瓶连接方法

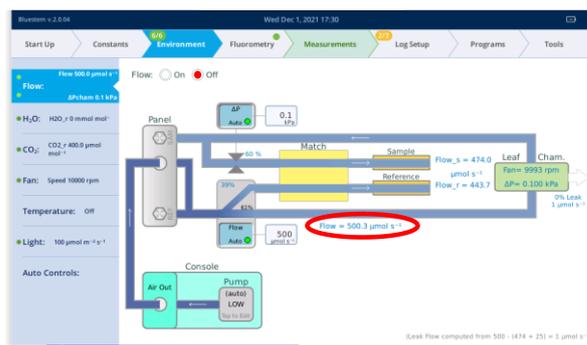
方法一、使用辅助进气接口

- 1) 气路连接如下图所示：LI-6800 的辅助进气口可用于自制混合气体的输入。在选配气瓶减压调节阀以及使用减压阀控制压强或流速时需要注意：**辅助进气口进气的流速不能超过 2.5 L/min，最大压强不能超过 28 KPa**。推荐购买**带流速计的减压阀**或者在气路上安装一个可调节的流速计，对进入主机的气体的量进行精确控制。



- 2) 软件操作：使用外接气瓶连接到辅助进气口接口，需要关闭主机的泵，在 **Environment** 菜单下将 **Flow** 设置为 **off**。

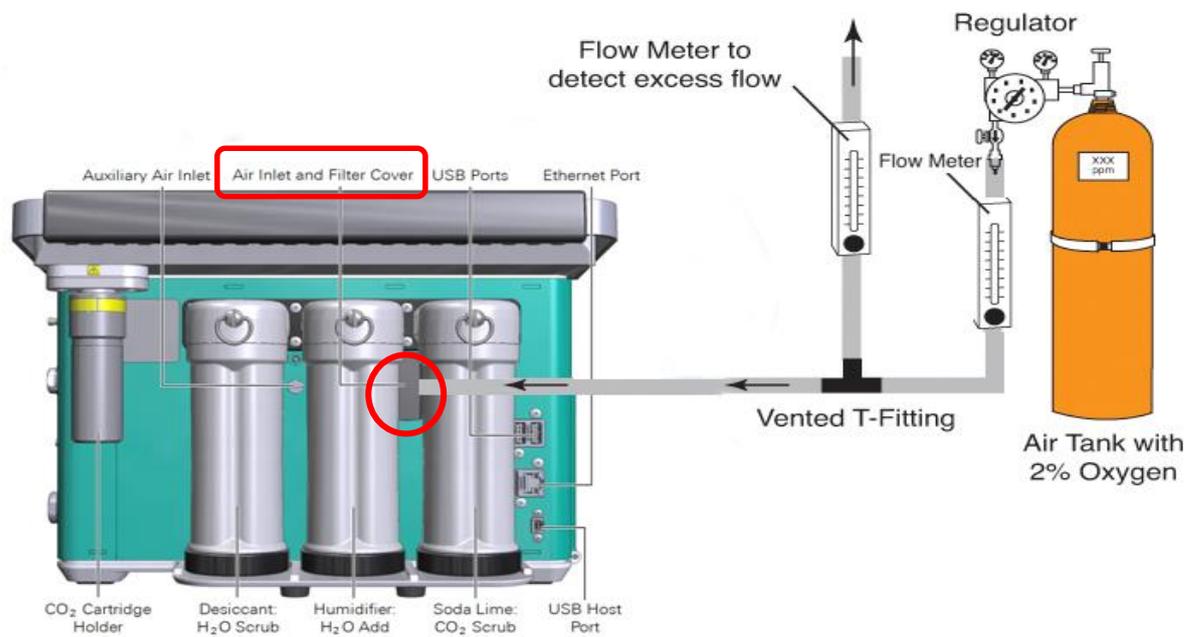
- 3) 打开气瓶，调节减压阀，首先将输出压力和流速调节在最低，然后在 **Environment** 菜单下观察 Flow (下图红圈内)，慢慢调节减压阀和流量计，以确定最终设定位置，例如流速调到 500 $\mu\text{mol/s}$ 。注意：**输出压力控制一定要控制在 28 kPa 以内，流速也一定要控制在 2.5 L/min 以内**。



注意：由于使用的混合气体和环境条件的差异，可以通过以下网站将不同单位进行转换，得到气体钢瓶输出的摩尔流速：<http://www.cactus2000.de/uk/unit/massflc.shtml>。

方法二、使用主进气接口

- 1) 气路连接如下图所示：低氧气瓶经过减压和流量控制后出来的气体，需要先经过一个 T 型接头，形成一个额外的泄压通路，然后再连接到主进气口为系统提供低氧气体。使用主进气口需要使用主机的泵，为满足泵的需求，气瓶的输出气量要略大于泵的吸入量，为避免仪器内部的泵与外部气瓶输入气压的“对抗”，T 型接头连接的泄压通路会将多余的气体排放到外部环境中。理想条件下，泄压通路的流速表应为零（即气瓶放出气体的量和泵的吸入量相等），实际操作中无法实现，因此，需要泄压通路的流速表有一个略微向外的压力（即部分低氧气体排放到大气中），保证外界气体不会流入主系统。
- 2) 打开气瓶，调节减压阀与进气气路的流速计到一个较小的值，使气体开始流入主机。在 Environment 标签下设置 Flow: On, Flow: $500 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$; ΔP : 0.1 kPa 或 0.2 kPa。观察泄压通路流速表（Flow meter to detect excess flow）读数与气路走向。开始时进气压力较小，无法满足主机需求，会有大气进入气路，逐步缓慢增大减压阀和进气气路流速计的读数，直到泄压通路略微有气体排出到大气中时，表明设置的流速略大于泵的流速，设置合理。



附录 3、用户自定义变量的使用技巧

在 Constants 菜单下的 User 选项中，用户可以用 User 功能来进一步描述数据文件中各个数据的详细测量信息和实际样地情况，方便以后的进一步数据处理与分析。



5、编辑变量名称 6、编辑变量单位 4、用户自定义

6、变量描述

7、自定义
标签列表

8、添加新
标签

9、编辑标
签名

10、删除标签



附录 4、Range Match 匹配方法

使用 Range Match 前提条件

1. 安装 CO₂ 钢瓶。
2. 干燥管和苏打管药品有效，加湿管水汽充足。
3. 仪器充分预热，开机持续工作 2 小时以后。

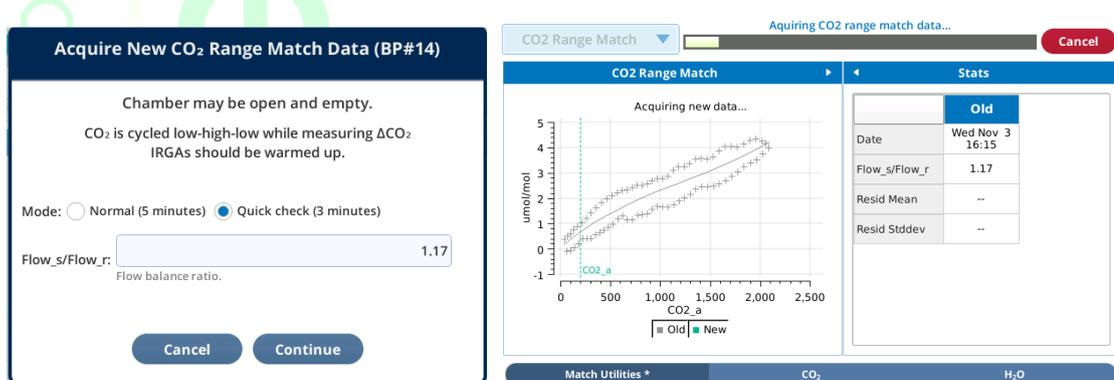
Range Match 操作方法

1. CO₂ Range Match:

- a) 在 Constants 标签下，Range Match 功能，点击 Match Utilities 界面左上角的三角符号展开 Range Match 列表，选择要做 Range Match 的变量，点击 Start 获取新的 Range Match 数据。

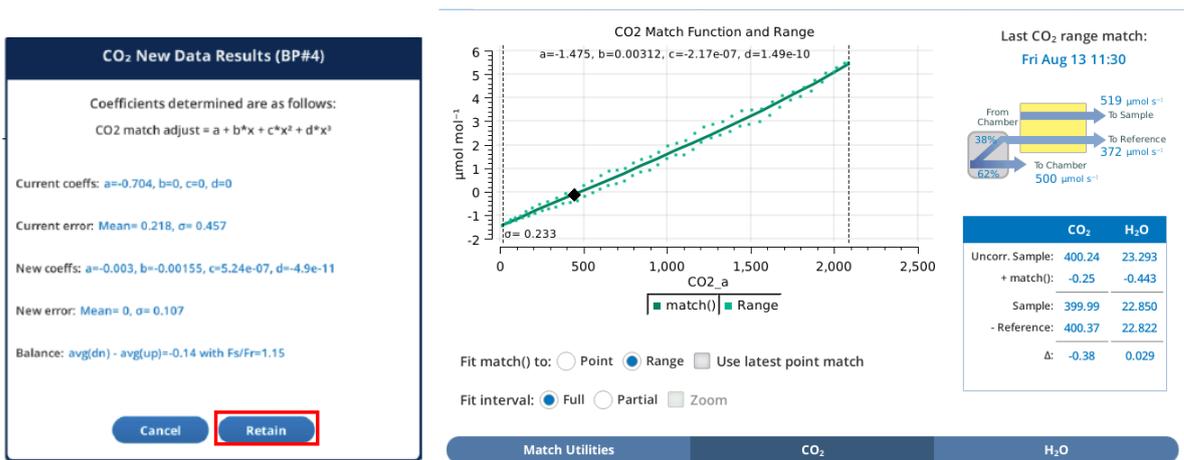


- b) 选择 Mode: Normal (5 minutes), Flow_s/Flow_r: 1.17 (在 1.1~1.2 之间选一个值), 点击 Continue, 系统自动调节 CO₂ 浓度从低→高→低循环, 测量一系列 ΔCO₂。

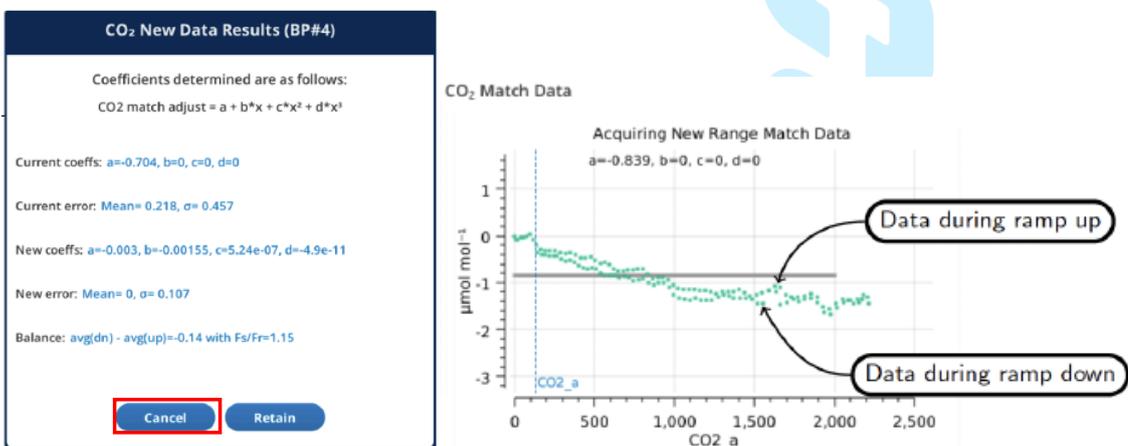


- c) 等待仪器完成 Range Match 后，点击 Retain, 完成 CO₂ Range Match。点击到 CO₂ 界面选择

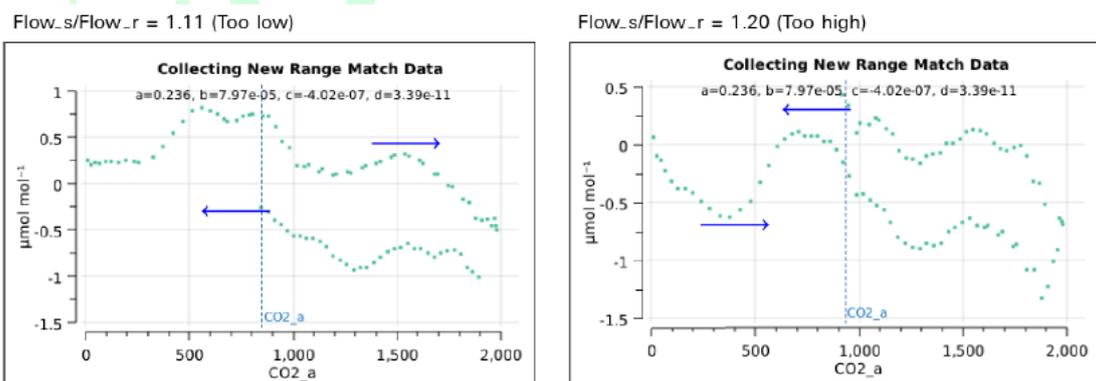
Fit match() to: Range, Fit interval: Full.



d) 理想 range match 数据为 CO₂ 浓度上升曲线和下降曲线重叠，若拟合曲线不理想，可在仪器完成 Range Match 后，点击 cancel，新 Range Match 拟合数据自动清除，再重新拟合。



e) 若拟合曲线不重叠，呈分离态，可调节 Flow_s/Flow_r 参数，选择 Quick check (3 minutes)，找到合适的数值，再选择 Normal (5 minutes) 模式完成拟合。



使用技巧：当返回的下降曲线高于上升曲线，需降低 Flow_s/Flow_r；当返回的下降曲线低于上升曲线，需增大 Flow_s/Flow_r。

2. H₂O Range Match:

在 Match Utilities 界面下，选择 H₂O Range Match，除了 Flow_s/Flow_r 的比值在 1.30~1.40 之间选值，剩余操作与 CO₂ Range Match 一致。

生态系统“全方位”监测解决方案

- 多种尺度碳循环监测
- 植物生理监测测量
- 土壤理化分析
- 气象指标监测



微信公众号



DEX
果实-树木茎干生长测量仪

- Growth of Plant Stems
- Growth of Fruits



LI-600
荧光-气孔测量仪

- Stomatal Conductance
- F_o
- F_m
- F_v/F_m
- F_s
- F_m'
- E_{TR}
- Φ_{PSII}
- ...



LI-6800
高级光合/荧光测量系统

- Assimilation Rate
- Stomatal Conductance
- Transpiration Rate
- Rapid A-Ci Response Curves
- OJIP
- $F_o, F_m, F_s, F_m', F_o'$
- E_{TR}
- Φ_{PSII}
- NPQ
- g_m
- ...



TEROS 12
土壤水分、温度、电导率

- Soil Water Content
- Soil Temperature
- Soil Electrical Conductivity



TEROS 21
土壤水势

- Soil Temperature
- Soil Water Potential



Drain Gauge G3
土壤入渗仪

- Drainage
- Water Depth
- Electrical Conductivity
- Temperature



SFL
小型蒸渗仪

- True Field Evapotranspiration
- Water Balance
- Soil Water Potential
- Volumetric Water Content
- Soil Temperature
- ...



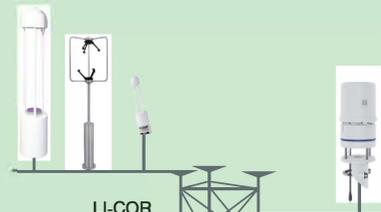
FLGS-TDP
热扩散针式植物液流计

- Sap Flow Velocity



Flow32-1K™
包裹式植物液流计

- Sap Flow Velocity



LI-COR
生态系统温室气体
通量测量系统

- Net Ecosystem Exchange
- Ecosystem Respiration
- Ecosystem CH_4 Flux
- Ecosystem Water Balance
- ...

Profile Inlet 5

Profile Inlet 4

Profile Inlet 3

Profile Inlet 2

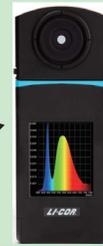
Profile Inlet 1

ATMOS 41
集成式气象站

- Solar Radiation
- Precipitation
- Vapor Pressure
- Relative Humidity
- Air Temperature
- Barometric Pressure
- Wind Speed
- Wind Direction
- ...

LI-8250
土壤温室气体 N_2O 、 CH_4 、 CO_2 通量测量系统

- Soil N_2O , CH_4 , CO_2 Flux
- Net Ecosystem Exchange
- Soil Temperature
- Soil Water Content
- ...



LI-180
植物光谱测量仪

- Photosynthetic Photon Flux Density (PPFD)
- Photon Flux Density (PFD)
- Irradiance (W/m^2)
- ...



SRS NDVI/PRI
植被指数测量仪

- Normalized Difference Vegetation Index (NDVI)
- Photochemical Reflectance Index (PRI)



LI-3000C
便携式叶面积仪

- Leaf Area
- Leaf Max Width
- Leaf Average Width
- Leaf Length



LAI-2200C
植物冠层分析仪

- Leaf Area Index (LAI)
- Diffuse Non-interception (DIFN)
- Mean Tilt Angle (MTA)
- Apparent Clumping Factor (ACF)
- Standard Error LAI (SEL)
- ...



北京力高泰科技有限公司

让专才为专家服务

电话: 010-66001566

网址: www.ecotek.com.cn

北京市西城区西直门南大街2号成铭大厦A座22F

基因有限公司农业环境科学部

ecotek
A Gene Group Company



微信号：Gene-ecotek

北京力高泰科技有限公司

北京总部

电话: 010-66001566

网址: www.ecotek.com.cn

技术支持邮箱: support@ecotek.com.cn

地址: 北京市西城区西直门南大街2号成铭大厦A座22F

邮编: 100035

广州办事处

电话: 020-85576373

地址: 广州市天河区东郊工业园路建工路8号6楼B室

成都办事处

电话: 138 1093 8447

地址: 成都市武侯区磨子街7号新棕北商务大厦1606室

武汉办事处

电话: 139 1163 2420

地址: 武汉市洪山区珞瑜路95号融科珞瑜中心T1-2座1208室