

伏牛山栓皮栎叶绿素含量野外测量与 实验室分析数据集

王正兴*, 李 芳

中国科学院地理科学与资源研究所资源与环境信息系统国家重点实验室, 北京 100101

摘 要: 叶片叶绿素含量 (Chl, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 是研究植物健康水平及其变化的重要指标, 但是在实验室对叶绿素直接测量费时费力, 难以大规模开展。替代办法是先在野外测量叶绿素相对值, 随后在实验室测量绝对值, 通过建立野外相对值与实验室绝对值的统计关系, 开展大面积植被叶绿素的研究。2018年9月19日, 在河南省栾川县伏牛山采集栓皮栎 (*Quercus variabilis* bl.) 叶片31组样本, 使用 SPAD-502 型叶绿素仪测量叶片的叶绿素含量相对值; 然后密封运送至实验室测量叶绿素含量绝对值。分析样片来自野外 SPAD 测量相同部位, 叶绿素提取与分析采用邱念伟等 (2016) 方法, 即使用二甲基亚砜 (DMSO) 在 65 °C 高温提取、冷却后用 80% 丙酮稀释的两步快速浸提法, 得到单位面积叶绿素含量。数据相关分析结果表明, 野外测量的叶绿素相对值与实验室测量的叶绿素绝对值之间存在指数相关关系, 决定系数 (R^2) 为 0.927。伏牛山栓皮栎叶绿素含量野外测量与实验室分析数据集包括: (1) 样本采集地地理位置; (2) 野外测量的叶片叶绿素相对值 (SPAD)、实验室测量的叶绿素 a 含量、叶绿素 b 含量、总叶绿素含量和叶绿素 a 与叶绿素 b 含量的比值。数据集存储为 .shp、.xlsx 和 .kmz 格式, 由 8 个数据文件组成, 数据量为 31.6 KB (压缩为 2 个文件, 28.4 KB)。

关键词: 叶绿素; 相对值; 绝对值; 野外测量; 实验室分析; 统计模型; 栓皮栎

DOI: 10.3974/geodp.2018.04.11

1 前言

叶绿素是绿色植被进行光合作用的物质基础。植物叶片中叶绿素的浓度 (Chl, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 以及叶绿素内部成分的比例 (Chla/Chlb), 是研究植物特征及其健康水平的重要指标。传统的叶绿素浓度的测定方法是采集叶片送实验室分析, 由于费时费力, 只适合开展小规模叶绿素研究。一种替代方法是利用便携式仪器在野外测量叶片叶绿素相对值, 然后在实验室测量叶绿素绝对值, 通过建立相对值与绝对值的统计关系, 实现对大面积植物叶绿素的研究。

SPAD 是测量叶绿素相对值的一个仪器系列, 其测量值是一个介于 0 与 100 的无量纲的数字 (SPAD 值), 其中 SPAD-502 型号至少在 1989 年就投入使用^[1]。国内 SPAD 在 1991

收稿日期: 2018-12-01; 修订日期: 2018-12-10; 出版日期: 2018-12-24

基金项目: 中华人民共和国科学技术部 (2016YFA0600201)

*通讯作者: 王正兴 L-5255-2016, 中国科学院地理科学与资源研究所, wangzx@igsrr.ac.cn

数据引用方式: [1] 王正兴, 李芳. 伏牛山栓皮栎叶绿素含量野外测量与实验室分析数据集[J]. 全球变化数据学报, 2018, 2(4): 442–447. DOI: 10.3974/geodp.2018.04.11.

[2] 王正兴, 李芳. 伏牛山栓皮栎叶绿素含量野外测量与实验室分析数据集[DB/OL]. 全球变化科学研究数据出版系统, 2018. DOI: 10.3974/geodb.2018.07.16.V1.

年开始使用^[2]，之后在农作物、蔬菜、水果、烟叶等研究领域被广泛使用，主要目的是通过检测叶片叶绿素，诊断土壤肥力水平，优化化肥管理。但是，利用 SPAD-Chl 关系研究森林植被叶绿素的报道比较晚而且少。例如，2005 年才开始出现 SPAD-Chl 用于森林研究的报道^[3]，在中国主要森林中，以壳斗科为主要建群种的“栎林”在中国所有优势树种森林类型中排名第一（总面积达 161,271 km²，占中国森林总面积的 9.80%），覆盖全国主要森林生态系统。但是，目前有关栎林的叶绿素 SPAD-Chl 研究报道主要局限在东北和华北北部，研究的栎类林包括蒙古栎、辽东栎、槲栎、板栗等^[4-6]。本数据集涉及的栓皮栎，把栎林的叶绿素 SPAD-Chl 研究向南推进到暖温带南部的河南伏牛山地区。为促进未来对同一科属植物种在不同地区、不同季节 SPAD-Chl 关系的集成研究，对野外观测、实验室分析数据进行出版。

2 数据集元数据简介

伏牛山栓皮栎叶绿素含量野外测量与实验室分析数据集^[7]的主要元数据要素见表 1。

表 1 伏牛山栓皮栎叶绿素含量野外测量与实验室分析数据集元数据简表

条 目	描 述
数据集名称	伏牛山栓皮栎叶绿素含量野外测量与实验室分析数据集
数据集短名	Chlorophyll_Quercus variabilis bl_Mt.Funiu
作者信息	王正兴 L-5255-2016, 中国科学院地理科学与资源研究所, wangzx@igsnr.ac.cn 李 芳 L-3424-2018, 中国科学院地理科学与资源研究所, lif@igsnr.ac.cn
地理区域	河南省栾川县新南村水库北坡, 采样点经纬度 33°52'34.16"N, 111°45'10.79"E
采样时间	2018 年 9 月 19 日
数据格式	.dbf、.prj、.sbn、.sbx、.shp、.shx、.xlsx、.kmz
数据量	31.6 KB（压缩后 28.4 KB）
数据集组成	数据集由 8 个数据文件组成，具体包括： （1）采样点空间位置: 1 个.shp 文件组（含 6 个文件），1 个.kmz 文件 （2）野外观测、实验室分析及 SPAD-Chl 关系模型，1 个.xlsx 文件
基金项目	中华人民共和国科学技术部（2016YFA0600201）
出版与共享服务平台	全球变化科学研究数据出版系统 http://www.geodoi.ac.cn
地址	北京市朝阳区大屯路甲 11 号 100101，中国科学院地理科学与资源研究所
数据共享政策	全球变化科学研究数据出版系统的“数据”包括元数据（中英文）、实体数据（中英文）和通过《全球变化数据学报》（中英文）发表的数据论文。其共享政策如下：（1）“数据”以最便利的方式通过互联网系统免费向全社会开放，用户免费浏览、免费下载；（2）最终用户使用“数据”需要按照引用格式在参考文献或适当的位置标注数据来源；（3）增值服务用户或以任何形式散发和传播（包括通过计算机服务器）“数据”的用户需要与《全球变化数据学报》（中英文）编辑部签署书面协议，获得许可；（4）摘取“数据”中的部分记录创作新数据的作者需要遵循 10% 引用原则，即从本数据集中摘取的数据记录少于新数据集总记录量的 10%，同时需要对摘取的数据记录标注数据来源 ^[8]

3 数据开发方法

3.1 栓皮栎叶片样品野外采集与叶绿素相对值测量

（1）野外采样时间和地点见表 1。首先需要说明，本研究中野外采集样品的目的是为了建立 SPAD-Chl 关系，而不是为了研究某个特定样地的叶绿素水平。这决定了要尽量采

集叶绿素浓度多元化的叶片，而不是样地内最有代表性的叶片。实际采样时，以表 1 中地理位置为中心，在附近采集不同年龄、树冠不同部位的叶片。叶片离开树冠后，其他处理应该在阴凉处进行，避免直射光，减少暴露时间。

(2) 栓皮栎叶片预处理：采集到的叶片需要用清水洗净，用吸水纸吸干。

(3) 排序与分组：根据绿度对所有叶片排队和分组。每组 4-6 个叶片，以防保鲜损伤和实验室分析额外需求。

(4) 叶绿素相对值 (SPAD) 测量：避开主脉和叶片边缘，每个叶片测量 10 个点取均值。组内各叶片 SPAD 均值差异应该在 1 以内，超出则调整到其他对应组。然后组内平均。

(5) 装袋密封：测量 SPAD 后各组装塑料袋密封，粘贴标签。

3.2 叶片样品的保鲜与运输

叶片保鲜的原则是避光、保湿、低温，最理想的方法是使用液氮或干冰。但是这两种保鲜剂都是受公共交通管制的危险品。在前期试验基础上，本次使用传统恒温箱和湿冰保鲜：用湿毛巾包裹叶片密封袋，用干毛巾包裹冰盒，隔离冰与叶片，以防叶片冻伤降解。3 小时内送入实验室，立即进行叶绿素绝对值实验室分析。

3.3 叶片样品叶绿素绝对值的实验室分析

叶绿素绝对值有重量法 ($\mu\text{g/g}$) 和面积法 ($\mu\text{g/cm}^2$) 两种表示方法。虽然国内大部分文献依然使用重量法，但本实验采用面积法，原因有二：第一，面积法可避免叶片离开树冠后水分剧烈变化引起的分析误差，减少不同叶片厚度引起的不确定性；第二，面积法可以直接与叶面积指数结合，进行更大尺度的叶绿素研究^[9]。

使用面积法计量叶绿素浓度时，使用直径 9 mm 的打孔器，参照野外测量 SPAD 的方法，避开主脉和边缘打孔取样 (小圆盘)。按照分析采样重量 0.05 g，控制需要打孔的数量。

虽然叶绿素绝对值的实验室测量是植物生理学研究的基础之一，但至今并未发展出一套操作标准。在分析文献基础上，本实验采用邱念伟等^[10]提出的两步快速浸提法：打孔取得的叶片圆盘剪成 1 mm 细条，先使用 2 mL 二甲基亚砜 (DMSO) 在 65 °C 高温提取叶绿素，在样品完全变白或者透明后，等待冷却，然后用 80% 丙酮稀释定容至 10 mL，最后用分光光度计测量吸光度。利用吸光度计算叶绿素浓度的计算公式为：

$$\text{Chla (mg/L)} = 12.27A_{663.6} - 2.52A_{646.6} \quad (1)$$

$$\text{Chlb (mg/L)} = 20.10A_{646.6} - 4.92A_{663.6} \quad (2)$$

$$\text{Chl (mg/L)} = \text{Chla} + \text{Chlb} = 7.35A_{663.6} + 17.58A_{646.6} \quad (3)$$

式中，Chl (mg/L) 是总叶绿素浓度， $A_{663.6}$ 和 $A_{646.6}$ 分别是在 663.6 nm 和 646.6 nm 波长处的吸光度。根据各样品面积把叶绿素浓度换算成单位面积叶绿素含量 ($\mu\text{g/cm}^2$)。实验室分析，每个样品 3 次重复，这样，31 个野外样品共计 93 个实验室分析。

3.4 统计分析

本实验分析了叶绿素野外相对值 SPAD 和实验室绝对值 (Chl) 的基本特征，比较了 4 种 SPAD-Chl 相关与回归关系，选择其中决定系数最高的关系建立野外相对值 SPAD 与实验室绝对值 (Chl) 的回归模型。

4 栓皮栎叶绿素数据测量与分析结果

已经整理发表的数据集^[7]包括 3 个文件：1 个.xlsx 文件（野外测量相对值与实验室分析绝对值，1 个样地位置.shp 文件，和 1 个样地位置.kml 文件。现对野外测量叶绿素相对值（SPAD）与实验室分析叶绿素绝对值（Chl， $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）简要介绍如下。

4.1 叶绿素野外测量相对值（SPAD）与实验室分析绝对值（Chl）的基本特征

叶绿素野外测量相对值与实验室分析绝对值的统计见表 2。野外测量 31 个样本的相对值（SPAD），值域 10.6–56.6，均值 41.84；实验室分析 Chl 时做 3 次重复，计 93 个分析，Chl 值域为 8.64–72.17 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，大于野外相对值的值域。与此对应，野外相对值的标准误是 29.23%，而实验室绝对值的标准误是 37.16%。这一方面说明二者值域的大小，另一方面也说明实验室绝对值分析涉及因素较多，各个测量之间的波动也大。

表 2 野外观测与实验室分析数据基本特征

指标	统计参数						
	样本数	最小值	最大值	均值	中位数	标准差	标准误（CV%）
SPAD	31	10.6	56.6	41.84	45.5	12.23	29.23
Chl（ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）	93	8.64	72.17	42.63	42.77	15.84	37.16

4.2 叶绿素相对值与叶绿素绝对值关系

以野外测量相对值 SPAD 为 x ，实验室绝对值 Chl（ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）为 y ，分别对叶绿素 a（Chla）、叶绿素 b（Chlb）和总叶绿素（Chl）进行相关和回归分析（表 3）。结果显示，按总叶绿素计，指数关系相关性最好，决定系数（ R^2 ）为 0.927。如果按照叶绿素内部两种成分计，叶绿素 a 的相关性全部高于叶绿素 b。图 1 显示叶绿素相对值与绝对值的 SPAD-Chl 指数关系。总体看，叶绿素绝对值与相对值的关系由叶绿素 a 决定，决定系数 $R^2=0.98$ 。

表 3 伏牛山栓皮栎 9 月份 SPAD-Chl 回归关系： $y=\text{Chl}(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ ， $x=\text{SPAD}$ （无单位）

叶绿素 y	线性： $y = ax + b$	乘幂： $y = ax^b$	指数： $y = ae^{bx}$	对数： $y = a\ln(x) + b$
叶绿素 a（Chla）	$y = 0.903x - 8.852$ $R^2 = 0.862$	$y = 0.265x^{1.246}$ $R^2 = 0.914$	$y = 3.815e^{0.045x}$ $R^2 = 0.948$	$y = 23.04\ln(x) - 55.46$ $R^2 = 0.719$
叶绿素 b（Chlb）	$y = 0.274x + 2.197$ $R^2 = 0.661$	$y = 1.626x^{0.568}$ $R^2 = 0.621$	$y = 5.146e^{0.022x}$ $R^2 = 0.741$	$y = 6.759\ln(x) - 11.07$ $R^2 = 0.514$
总叶绿素（Chla+Chlb）	$y = 1.177x - 6.653$ $R^2 = 0.826$	$y = 1.150x^{0.962}$ $R^2 = 0.856$	$y = 8.712e^{0.035x}$ $R^2 = 0.927$	$y = 29.80\ln(x) - 66.53$ $R^2 = 0.678$

4.3 叶绿素内部成分比例关系（Chla/Chlb）及其生理学意义

除了叶绿素浓度之外，叶绿素内部两种成分的比例也能反映叶片的健康水平。图 2a 是以叶绿素绝对值表达的叶绿素总量与叶绿素比值（Chla/Chlb）的关系。当叶绿素浓度大约在 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上时，叶绿素比值（Chla/Chlb）基本是在 2–2.5 之间波动；当叶绿素浓度在 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下时，叶绿素总量减少与比值减少为线性相关。图 2b 是以相对值表达的叶绿素总量与叶绿素比值（Chla/Chlb）的关系。当 SPAD>35 时，Chla/Chlb 比值基本在 2–2.5 之间波动；当 SPAD<35 时，SPAD 减少与 Chla/Chlb 比值减少呈线性相关。不同的是，使用绝对值时，Chla/Chlb 比值稳定区对应的叶绿素总量 Chl 在 30–72 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之间，范围较宽；而使用相

对值时，Chla/Chlb 比值稳定区对应的 SPAD 在 35-57 之间，值域较窄。总体上，在 9 月 19 日，当地大部分栓皮栎叶片的叶绿素内部成分比较稳定，只有少数黄色叶片叶绿素开始降解。

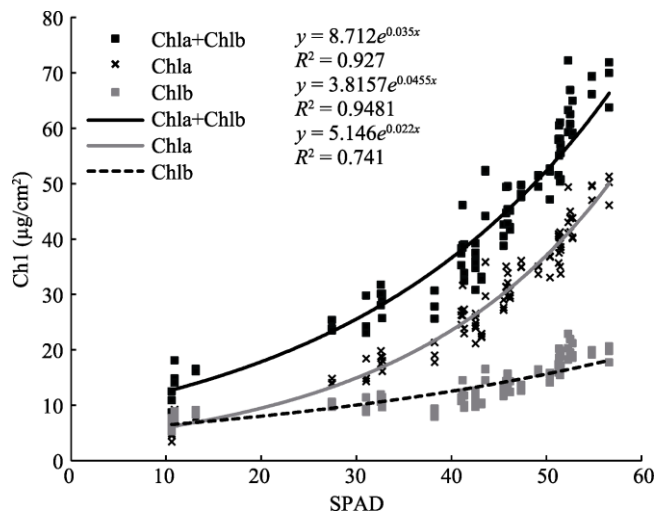


图 1 伏牛山 9 月份叶绿素相对值（SPAD）与叶绿素绝对值的指数关系

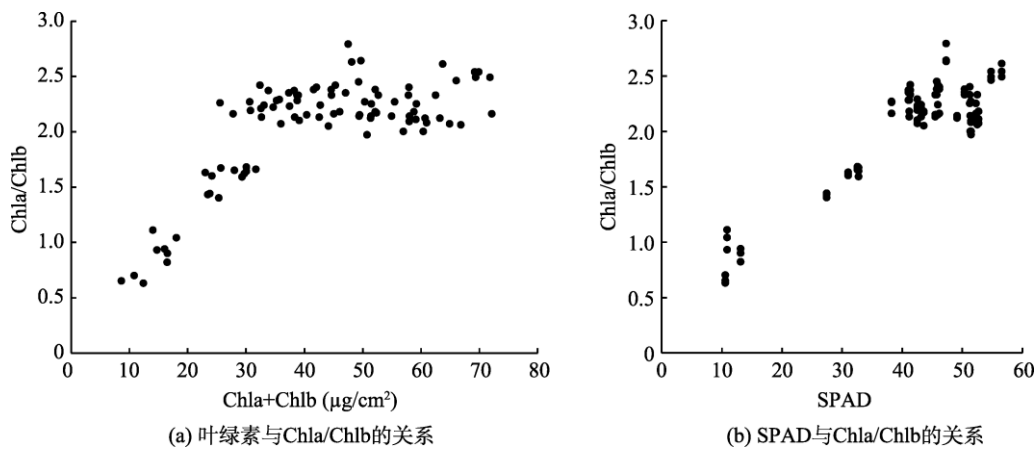


图 2 叶绿素密度与 Chla/Chlb 比值的关系

4.4 数据精度与验证

叶绿素相对值测量仪（SPAD）的设计原理就是利用叶绿素在特定波段的吸收和反射特性定量表达植物叶片的叶绿素含量，因此叶绿素相对值（SPAD）与叶绿素绝对值（Chl）存在因果关系。本次实验在 4 个 SPAD-Chl 回归关系中优选指数关系，其决定系数 $R^2 = 0.927$ ，说明利用 SPAD 可以解释 92.7% 的 Chl 变化，是个相当可靠的回归模型。

5 讨论和总结

（1）SPAD-Chl 模型的可靠性与适用性：2018 年 9 月 19 日对伏牛山栓皮栎测量叶绿素相对值并进行实验室绝对值测定，两者之间的指数关系决定系数 $R^2 = 0.927$ ，即利用 SPAD

可以解释 92.7% 的 Chl 变化。这说明可以通过野外测量相对值, 大面积推算该地区该季节栓皮栎叶绿素的绝对值。该模型是否可推广到其他地区和其他季节, 还需要进一步研究。

(2) SPAD-Chl 模型的综合使用: 尽管该模型在其他地区和季节的适用性有待研究, 但是, 它现在就可以与其他已经发表的模型进行集成, 对不同植被类型的叶绿素特征继续比较分析^[11]。在这一点上, 使用以数字形式出版的本数据集比传统的出版物(只有模型和图片)更加便捷和精准。

(3) 进一步提高 SPAD-Chl 模型精度的途径: 本实验在两个细节上还可以进一步改进。未来在野外测量相对值 SPAD 时, 可以考虑每个叶片一个样本, 同时加大样本量, 以便在实验室打孔取样不够时, 再使用与 SPAD 均值最接近的样本。在实验室打孔时, 使用直径较小(5–6 mm)的打孔器, 这样就更容易满足野外测量的叶片位置与打孔处的叶片位置一一对应。

作者分工: 王正兴负责总体设计并撰写数据论文; 李芳负责野外叶片采集、叶绿素相对值测量、保鲜运输。

致谢: 感谢河南科技大学农学院曾占奎和王征宏两位老师帮助进行栓皮栎叶绿素实验室分析。

参考文献

- [1] Minolta Camera Co. Ltd. Chlorophyll Meter SPAD-502 Instructional Manual [M]. Minolta, Osaka, Japan, 1989.
- [2] 张文安. SPAD-501 型叶绿素仪在测定水稻叶绿素含量中的应用[J]. 贵州农业科学, 1991(4): 37–40.
- [3] 姜丽芬, 石福臣, 王化田等. 叶绿素计 SPAD-502 在林业上应用[J]. 生态学杂志, 2005, 24(12): 1543–1548. DOI: 10.13292/j.1000-4890.2005.0197.
- [4] 刘孝良, 赫英姿, 于庭洪等. 柞树叶片 SPAD 值与叶绿素含量相关性的分析[J]. 北方蚕业, 2016, 37(4): 16–19, 24.
- [5] 李改艳. 东北东部主要阔叶树种叶绿素与 SPAD 值模型及影响因素[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2016.
- [6] 李田, 韩霞, 魏永阳等. 三种板栗叶片 SPAD 值与叶绿素含量相关性分析[J]. 山东林业科技, 2017(1): 23–27.
- [7] 王正兴, 李芳. 伏牛山栓皮栎叶绿素含量野外测量与实验室分析数据集[DB/OL]. 全球变化科学研究数据出版系统, 2018. DOI: 10.3974/geodb.2018.07.16.V1.
- [8] 全球变化科学研究数据出版系统. 全球变化科学研究数据共享政策[OL]. DOI: 10.3974/dp.policy.2014.05 (2017 年更新).
- [9] 许大全. 叶绿素含量的测定及其应用中的几个问题[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(9): 896–898.
- [10] 邱念伟, 王修顺, 杨发斌等. 叶绿素的快速提取与精密测定[J]. 植物学报, 2016, 51(5): 667–678.
- [11] Parry, C., Blonquist, Jr. J. M., Bugbee, B. In situ measurement of leaf chlorophyll concentration: analysis of the optical/absolute relationship [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2014: 37: 2508–2520. DOI: 10.1111/pce.12324.