

# 烟叶生长发育过程中叶片光合特性及叶绿体超微结构的变化

王婵娟<sup>1</sup>, 刘国顺<sup>1\*</sup>, 张彩霞<sup>3</sup>, 贺凡<sup>1</sup>, 李延涛<sup>2</sup>, 吴俊林<sup>1</sup>, 史宏志<sup>1</sup>

(1. 河南农业大学 国家烟草行业栽培重点实验室, 河南 郑州 450002; 2. 河南省平顶山市郟县烟草分公司, 河南 郟县 467100; 3. 黑龙江省烟草工业有限责任公司, 黑龙江 哈尔滨 150001)

**摘要:**在豫中烟区以 NC89 为材料研究烤烟叶片发育过程中光合特性及叶绿素含量的变化规律, 并同步观察叶绿体超微结构的变化。结果表明: 叶片发育过程中净光合速率值呈现先上升后下降的趋势, 气孔导度、气孔限制值与净光合速率呈极显著相关关系, 胞间  $\text{CO}_2$  浓度与净光合速率呈显著负相关关系。叶绿素含量同净光合速率变化趋势一致, 结合叶绿体超微结构观察结果, 可知净光合速率的变化与叶绿体超微结构的发育及叶绿素含量密切相关, 叶绿体结构逐步完善及叶绿素含量升高是导致净光合速率上升的主要原因, 净光合速率下降的过程中, 叶绿体超微结构的逐步解体, 烤烟叶片的衰老主要是非气孔限制因素引起的。

**关键词:** 烤烟; 发育; 光合特性; 叶绿体超微结构

中图分类号: S572 文献标识码: A 文章编号: 1000 - 2286(2010)02 - 0254 - 06

## Changes in Photosynthetic Characteristics and Chloroplast Ultrastructure during the Development of Tobacco Leaf

WANG Chan-juan<sup>1</sup>, LIU Guo-shun<sup>1\*</sup>, ZHANG Cai-xia<sup>3</sup>, HE Fan<sup>1</sup>,  
LI Yan-tao<sup>2</sup>, WU Jun-lin<sup>1</sup>, SHI Hong-zhi<sup>1</sup>

(1. National Tobacco Cultivation, Physiology & Biochemistry Research Center, Zhengzhou 450002, China; 2. Jiaxian Tobacco Company of Henan Province, Jiaxian 467100, China; 3. Heilongjiang Tobacco Industry Limited Liability Company, Haerbin 150001, China)

**Abstract:** Changes in photosynthetic characteristics, and chlorophyll content were studied in the developing process of tobacco leaves, and the chloroplast microstructure was observed simultaneously. The results showed that: the photosynthetic rate showed a downward trend after the first rise during the developing process. Stomatal conductance ( $C_s$ ) and transpiration rate ( $T_r$ ) were significantly correlated with photosynthetic rate, intercellular  $\text{CO}_2$  concentration ( $C_i$ ) and photosynthetic rate ( $P_n$ ) were significantly negatively correlated. Chlorophyll changed in the same trend with  $P_n$ . Combined with the results of chloroplast ultrastructure, it could be concluded that the changes in  $P_n$  were closely related to the development of chloroplast ultrastructure and chlorophyll content. Gradual improvement of chloroplast ultrastructure and chlorophyll content were the main reason for the increase of  $P_n$ , chloroplast microstructure was disintegrated gradually during the descending process of  $P_n$ . It was non-stomatal limitation that caused the decrease of  $P_n$ .

**Key words:** flue-cured tobacco; development; photosynthetic characteristic; chloroplast microstructure

收稿日期: 2009 - 12 - 09 修回日期: 2010 - 03 - 04

基金项目: 国家烟草专卖局重点研究项目 (110200401021)

作者简介: 王婵娟 (1986 - ), 女, 硕士生, 主要从事烟草栽培与生理研究, E-mail: chanjuan522@163.com; \* 通讯作者: 刘国顺, 教授, 博士生导师, E-mail: liugsl851@163.com.

烤烟是我国的重要经济作物,主要以叶片作为收获目标<sup>[1]</sup>。光合作用是烟草产量和品质提高的基础,深入研究烟草的光合作用具有重要意义。以往这方面的研究主要集中在光合色素和光合速率<sup>[2-4]</sup>以及对烟叶光合机构及有关光合酶的研究<sup>[5]</sup>上,对烟叶细胞超微结构的研究也多集中在病毒侵染<sup>[6-9]</sup>和水分胁迫<sup>[10-11]</sup>等逆境条件下叶片细胞超微结构的变化,而将光合特性变化规律与叶绿体超微结构二者结合进行研究的比较少。本文在研究烟叶生长发育过程中叶片光合特性及叶绿素含量变化规律的基础上,进一步观察叶绿体超微结构的变化情况,从细胞学角度进一步研究烤烟光合特性,探究发育过程中色素含量和超微结构对光合生理的响应机制,找出有效调控烟叶光合生理代谢的关键时期,从而最大可能的挖掘烟叶质量潜力。

## 1 材料与方 法

试验于 2008 年在平顶山市郟县堂街镇进行,材料为烟草品种 NC89,试验地土壤类型为褐土,质地为中壤,土壤 pH 7.88,有机质含量 16.2 g/kg,全氮 0.76 g/kg,碱解氮 77 mg/kg,速效磷 8.4 mg/kg,速效钾 105.8 mg/kg。

烤烟移栽期为 5 月 10 日,施氮量为 52.5 kg/hm<sup>2</sup>,肥料比例为  $w_N : w_{P_2O_5} : w_{K_2O} = 1 : 2 : 3$ ,大田管理依据优质烟栽培管理规范进行。根据田间长势长相选择具有代表性的烟株 50 株,挂牌标记,以叶长 0.5 cm 时记叶龄,取第 11 位叶片作为试验样品,约在 40 d 叶龄时长成(相当于叶片全展,基本定型)。自叶龄 10 d 起,每隔 10 d 用美国制 LI-6400 便携式光合仪于当日 09:00~11:00,测量标记叶片的净光合速率( $P_n$ )、胞间 CO<sub>2</sub> 浓度( $C_i$ )、蒸腾速率( $T_r$ )、气孔导度( $C_s$ )。测定时光强设置值为 1 000  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,CO<sub>2</sub> 浓度为 400  $\mu\text{L}/\text{L}$ ,温度为 28  $^{\circ}\text{C}$ 。测定点均在叶片中部主脉右侧。

光合速率高值持续期又叫光合功能可逆衰退期,指叶片全展后至光合速率下降到全展时的 50% 的天数。光合功能速降期又称光合功能不可逆衰退期,是指从高值期结束到叶片枯死的天数。光合功能衰退的转折点是指光合速率从高值期进入速降期的时刻<sup>[12-13]</sup>。

测量后切取叶肉细胞用于电镜观察。具体取样方法为:取第 6~8 条侧脉间的叶肉组织,取样时用刀片将叶肉组织切成 1 mm  $\times$  2 mm 小片,迅速投入体积分数为 2.5% 戊二醛固定液中,抽气至完全下沉,4  $^{\circ}\text{C}$  下保存,后用磷酸缓冲液(pH 7.6)洗涤 3 次,每次 20 min。再将该材料转移到 10 g/L 钨酸中,置 4  $^{\circ}\text{C}$  下固定 4 h,蒸馏水洗涤 3 次,每次 20 min;随后经梯度乙醇脱水,环氧树脂 618 包埋,LKB-V 型超薄切片机(瑞典 LKB 公司)切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,在 Hitachi H-600 透射电子显微镜(日本 HITACHI 公司)下观察并拍照。

并同步取鲜烟叶,去除主脉,用于叶绿素的测定。测定时,用体积分数为 80% 丙酮研磨提取,以 UV-754 型分光光度计(上海亚研电子科技有限公司)测定 663,646,470 nm 处的 OD 值,然后计算叶绿素含量<sup>[14]</sup>。

图表数据采用 Microsoft Excel 处理,拟合方程由 DPS v6.55 分析求出,数据的相关性分析采用 SPSS 17.0 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 叶片发育过程中各光合参数的变化规律

2.1.1 叶片发育过程中净光合速率( $P_n$ )的变化 由图 1 可以看出,随着生育期的推进, $P_n$  呈先增加后降低的趋势。30 d 叶龄以前为迅速增长期, $P_n$  呈直线型快速增长。30~50 d 叶龄的净光合速率增长趋势缓慢,保持在一个较高的水平,该期间叶片处于旺盛的光合生理功能期。从 50 d 叶龄起, $P_n$  开始迅速减小,60 d 叶龄时  $P_n$  比 50 的叶龄时降低了 40.2%。烤烟叶片发育过程中  $P_n$  变化曲线呈二次抛物线型(拟合方程见表 1)。经计算可求出在叶

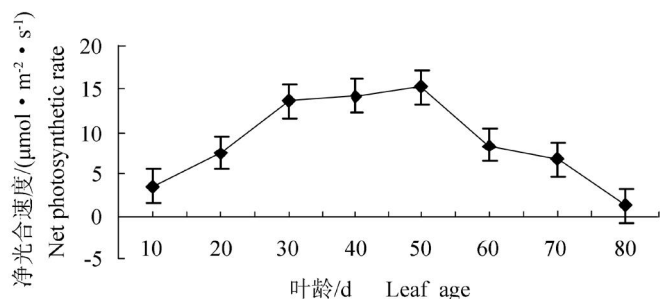


图 1 烟草叶片发育过程中净光合速率( $P_n$ )的变化

Fig 1 Changes of net photosynthetic rate ( $P_n$ ) during process of tobacco leaves

龄 43.4 d 时  $P_n$  达到最大值,在 69.4 d 时  $P_n$  降至最大值的一半,烤烟叶片光合功能可逆衰退期为 40 ~ 69.4 d。69.4 d 叶龄时为叶片光合功能衰退的转折点,由可逆衰退期进入不可逆衰退期。

表 1 叶片发育过程中叶片净光合速率 ( $P_n$ )、气孔导度 ( $C_s$ )、胞间  $CO_2$  浓度 ( $C_i$ )、气孔限制值 ( $L_s$ ) 以及叶绿素总量 ( $Chl a + Chl b$ ) 变化的拟合方程

Tab 1 Fitting equation of changes of net photosynthetic rate ( $P_n$ ), stomatal conductance ( $C_s$ ), intercellular  $CO_2$  concentration ( $C_i$ ), limiting value of stomata ( $L_s$ ) and chlorophyll content in developing process of tobacco leaves

项目 Item	方程 Equation	概率 $P(t)$
净光合速率 Net photosynthetic rate	$Y = 4\ 513\ 3 + 0\ 864\ 128x - 0\ 009\ 947x^2$	0.001 0
气孔导度 Stomatal conductance	$Y = -0\ 115\ 335 + 0\ 017\ 872x - 0\ 000\ 192x^2$	0.048 4
胞间 $CO_2$ 浓度 Intercellular $CO_2$ concentration	$Y = 386\ 050\ 0 - 6\ 150\ 4x + 0\ 071\ 206x^2$	0.019 1
气孔限制值 Limiting value of stomata	$Y = -0\ 003\ 693 + 0\ 015\ 655x - 0\ 000\ 172x^2$	0.000 6
叶绿素总量 Chlorophyll content	$Y = 0\ 844\ 464 + 0\ 089\ 588x - 0\ 001\ 033x^2$	0.008 8

2.1.2 叶片发育过程中胞间  $CO_2$  ( $C_i$ ) 浓度、气孔导度 ( $C_s$ )、和气孔限制值 ( $L_s$ ) 的变化规律 烤烟叶片

发育过程中  $C_i$ 、 $C_s$  和  $L_s$  变化曲线也呈二次抛物线型 (拟合方程见表 1)。由图 2 可知,  $C_s$  和  $L_s$  的变化规律和  $P_n$  基本一致, 都表现出先增大后降低的趋势, 50 d 叶龄时达到最大值, 由相关分析结果 (表 2) 可知,  $C_s$ 、 $L_s$  与  $P_n$  呈极显著相关关系;  $C_i$  的变化规律则与  $P_n$  完全相反, 表现出先降低后增加的趋势, 50 d 叶龄时为最小值,  $C_i$  与  $P_n$  呈显著负相关关系。50 d 叶龄之后,  $P_n$  值开始逐步减小,  $C_s$  逐步下降, 但  $C_i$  却逐步上升, 气孔限制值 ( $L_s$ ) 也逐步减小, 表明非气孔限制是  $P_n$  降低的主要因素。

2.2 叶片发育过程中叶绿素总量 [Chl(a+b)] 的变化

图 3 表明, Chl(a+b) 在叶片生长发育过程中也呈二次抛物线型, 30 d 叶龄之前, 都表现出缓慢增加的趋势。到 40 d 和 50 d 叶龄时, Chl(a+b) 含量都较高。50 d 叶龄之后, Chl(a+b) 迅速下降。由拟合方程可求出, Chl(a+b) 在 39.5 d 叶龄时达到最大值, 随着生育期的推进, Chl(a+b) 含量降到 50% 时天数为 72.1 d。由表 2 可知, Chl(a+b) 与  $P_n$  呈极显著相关关系, 表明叶绿素含量是影响叶片光合作用的重要指标之一。

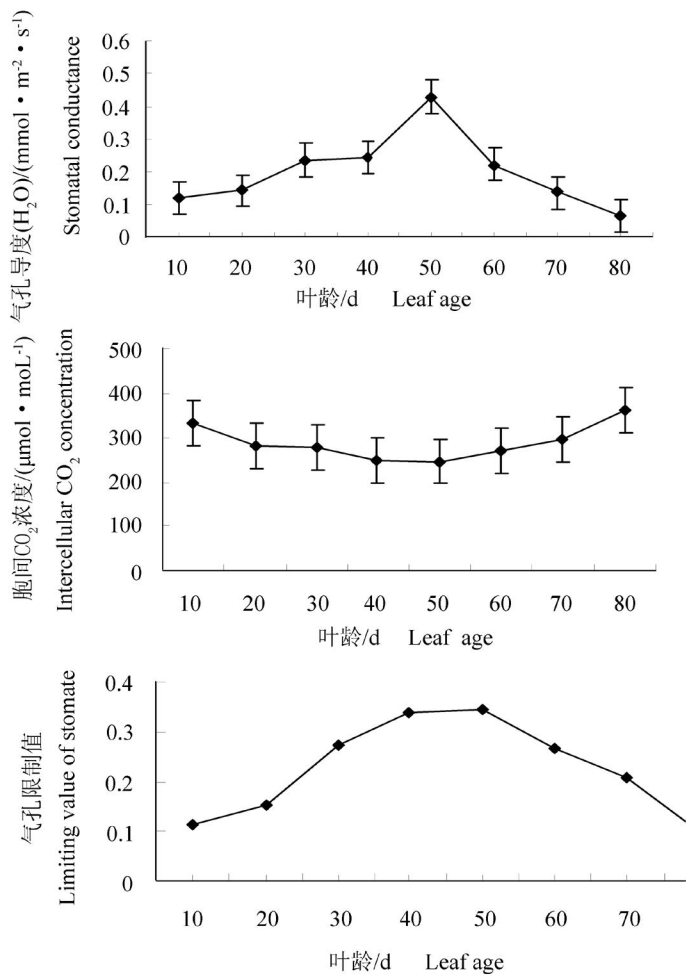


图 2 烤烟叶片发育过程中气孔导度 ( $C_s$ )、胞间  $CO_2$  浓度 ( $C_i$ )、气孔限制值 ( $L_s$ ) 的变化

Fig 2 Changes of net photosynthesis rate ( $P_n$ ), stomatal conductance ( $C_s$ ), intercellular  $CO_2$  concentration ( $C_i$ ) and limiting value of stomata ( $L_s$ ) in developing process of tobacco leaves

### 2.3 叶绿体超微结构的变化

电子显微镜观察不同叶龄烤烟叶片叶绿体超微结构的结果(图 4)表明:10 d 叶龄时,叶绿体呈梭形,类囊体片层较少但清晰可见,沿叶绿体长轴方向排列,其中含少量淀粉粒,有些含高电子致密物;20 d 叶龄时,淀粉粒比前一时期有增大趋势,能明显观察到大量深色嗜钨颗粒;30 d 叶龄时,叶绿体体积明显增大,片层结构清晰,淀粉粒比前期明显增大,嗜钨颗粒也有增大趋势;40 d 叶龄时,叶绿体中淀粉粒比前一时期有所增大、增多,有部分叶绿体有肿胀现象,但嗜钨颗粒体积比上一时期有所减小。50 d 叶龄时,淀粉粒体积增大且能观察到大量的嗜钨颗粒,类囊体片层相对减少,但结构清晰排列有序。60 d 叶龄时,片层结构开始解体,嗜钨颗粒体积比前一时期明显增大。70 d 叶龄时,淀粉粒体积比前一时期有所增大,并部分发生游离。嗜钨颗粒总体含量基本没有增多,但有增大和电子密度减弱的趋势。叶绿体类囊体开始肿胀,类囊体片层结构清晰程度下降,结构开始松散。到 80 d 叶龄时,叶绿体外膜已经消失,其中的淀粉粒和嗜钨颗粒散落在细胞中,片层结构已完全解体。

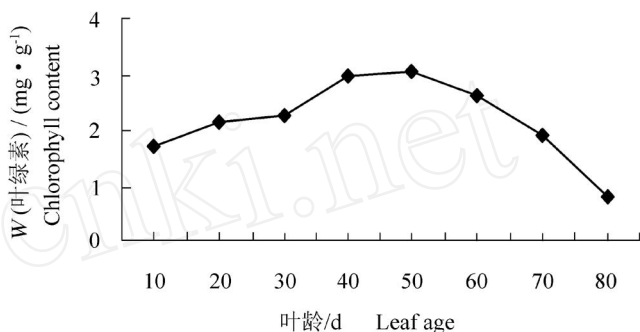


图 3 烤烟叶片发育过程中 Chl(a+b)的变化

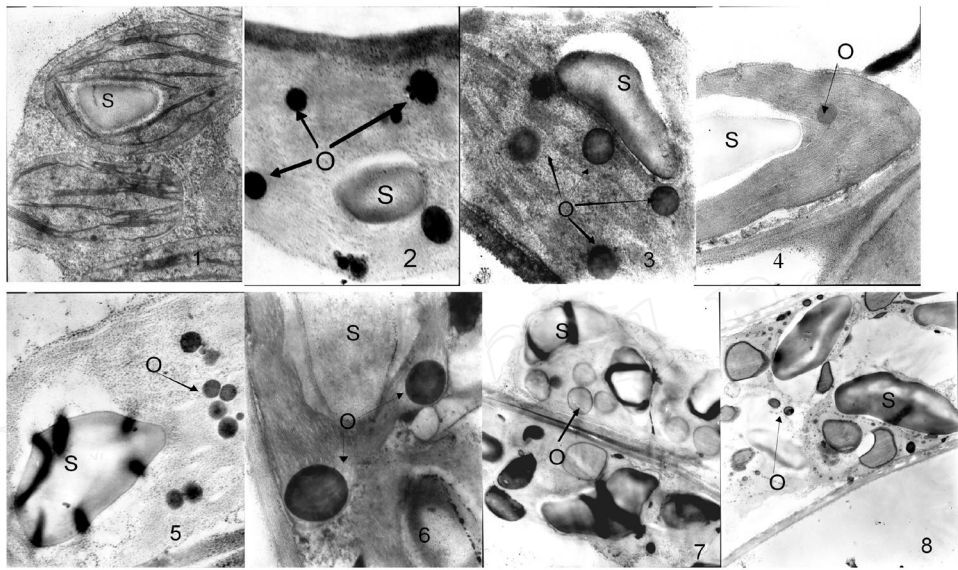
Fig 3 Changes of Chlorophyll content in developing process of tobacco leaves

表 2 烤烟叶片发育过程中气孔导度 ( $C_s$ )、胞间  $CO_2$  浓度 ( $C_i$ )、

气孔限制值 ( $L_s$ )、叶绿素含量 (Chl(a+b))及净光合速率 ( $P_n$ )的相关性分析结果

Tab 2 Correlation analysis results of net photosynthesis rate ( $P_n$ ), stomatal conductance ( $C_s$ ), intercellular  $CO_2$  concentration ( $C_i$ ) and limiting value of stomata ( $L_s$ ) in developing process of tobacco leaves

	气孔导度 Stomatal conductance	胞间 $CO_2$ 浓度 Intercellular $CO_2$ concentration	气孔限制值 Limiting value of stomata	叶绿素总量 Chlorophyll content	净光合速率 Net photosynthetic rate
气孔导度 Stomatal conductance	1				
胞间 $CO_2$ 浓度 Intercellular $CO_2$ concentration	- 0.742*	1			
	0.035				
气孔限制值 Limiting value of stomata	0.864**	- 0.930**	1		
	0.006	0.001			
叶绿素总量 Chlorophyll content	0.763*	- 0.786*	0.899**	1	
	0.028	0.021	0.002		
净光合速率 Net photosynthetic rate	0.849**	- 0.895**	0.936**	0.915**	1
	0.008	0.003	0.001	0.001	



1. 叶龄 10 d ( ×25 000); 2 叶龄 20 d ( ×25 000); 3 叶龄 30 d ( ×25 000); 4 叶龄 40 d ( ×25 000); 5. 叶龄 50 d ( ×25 000); 6 叶龄 60 d ( ×25 000); 7. 叶龄 70 d ( ×8 000); 8 叶龄 80 d ( ×8 000)。

1. the tenth day of leaf age ( ×25 000); 2 the twentieth day of leaf age ( ×25 000); 3 the thirtieth day of leaf age ( ×25 000); 4. the fortieth day of leaf age ( ×25 000); 5, the fiftieth day of leaf age ( ×25 000); 6 the sixtieth day of leaf age ( ×25 000); 7. the seventieth day of leaf age ( ×8 000); 8 the eightieth day of leaf age ( ×8 000)。

Chl(Chloroplast) —叶绿体; V (Vacuole) —液泡; IS(Cell Gap) —细胞间隙; O (Osmiophilic particles) —嗜饿颗粒; S(starch granules) - 淀粉颗粒。

图 4 烤烟叶片发育过程中叶绿体超微结构的变化

Fig 4 Ultrastrual changes of chlroplast in developing process tobacco leaves

### 3 讨 论

$P_n$  高低是叶片光合性能优劣的最终体现,  $P_n$  值的大小是反应叶片光合性能高低的重要指标<sup>[15]</sup>。试验研究表明, NC89 的光合功能可逆衰退期为 40 ~ 69.4 d 叶龄, 江力等<sup>[16]</sup>的研究结果为 35 ~ 70 d, 这可能是栽培条件不同等环境因素导致的。烤烟叶片光合功能衰退的转折点为叶片 69.4 d 叶龄时, 之后叶片进入不可逆衰退期, 这与前人结果<sup>[16]</sup>较为一致。在叶片生长发育过程中,  $C_s$ 、 $C_i$  及  $L_s$  也随着生育期的推进呈现规律性的变化。 $P_n$  降低是叶片衰老的重要指标<sup>[15]</sup>, 叶片 43.4 d 叶龄时  $P_n$  达到最大值, 之后叶片开始逐步衰老, 结合  $C_s$ 、 $C_i$  及  $L_s$  的变化可知, 烤烟叶片衰老过程中  $P_n$  的降低主要是叶绿体结构解体、膜脂过氧化作用加强、相关酶类代谢活性下降等非气孔限制因素导致的。

叶绿素含量是光合作用的基础, 本试验结果表明, Chl(a + b) 含量的变化是导致  $P_n$  上升或下降的十分重要的原因, 叶片衰老前,  $P_n$  的提高主要是叶绿素含量升高的结果。但  $P_n$  较叶绿素含量早一步开始速降, 表明除了叶绿素含量外, 其它生理因素 (如叶绿体结构破坏等) 可能是导致叶片衰老过程中  $P_n$  下降的主要原因。研究结果同时表明, 在烤烟叶片光合速率可逆衰退期, 以叶绿素为基础, 通过合理的调控措施, 提高  $P_n$  或者减缓其下降速度是可行的。

叶绿体是进行光合作用的细胞器<sup>[17]</sup>, 其数量多少及结构好坏与光合能力密切相关。在叶绿体基质中, 有一类易与钨酸结合的颗粒, 称为嗜饿颗粒或脂滴, 通常是脂肪性质的, 嗜饿颗粒在质体中出现通常被认为是积累脂类物质的标志<sup>[18-19]</sup>, 嗜饿颗粒是叶绿体的脂类仓库, 正当片层进行合成需要脂类时, 便从嗜饿颗粒调用, 嗜饿颗粒减小, 当叶绿体衰老, 片层解体时, 嗜饿颗粒体积的增大是类囊体片层结构开始解体和叶绿体开始衰老的一个重要标志<sup>[17]</sup>。电子显微镜观察结果表明, 叶片发育过程中叶绿体超微结构发生一系列变化, 其结构的逐步完善与叶片光合能力的逐步上升密切相关。叶龄 10 d 时, 叶片已初步具有光合能力, 叶片 20 d 叶龄时, 能明显观察到嗜饿颗粒, 此时的细胞超微结构表明, 细胞的光合合成能力逐步增强, 且开始大量积累脂类物质。叶片 30 d 叶龄之前, 随着叶绿体结构的完善和叶绿素

含量的增加,  $P_n$  增长迅速。到 40 d 叶龄时, 淀粉粒体积增大, 而嗜锲颗粒体积变小。表明此时期的光合能力较 30 d 叶龄时更为旺盛。50 d 叶龄时, 嗜锲颗粒增多但没有增大, 此时叶片仍保持较强的光合能力,  $P_n$  值较高。60 d 叶龄时, 嗜锲颗粒有增大、但无增多趋势, 表明此时叶绿体已经开始衰老,  $P_n$  值比前一时期降低了 45%。随着叶绿体的进一步衰老, 到 80 d 叶龄时片层结构已完全解体, 此时期叶片的光合能力非常微弱,  $P_n$  值接近 0。江力等<sup>[16]</sup>的研究表明, NC89 在 90 d 叶龄时  $P_n$  才降为负值。烤烟叶片生长发育过程中, 叶绿体作为细胞最重要的细胞器之一, 其超微结构的变化直接反映了叶片光合能力的大小, 要有效调控叶片衰老, 延长叶片光合功能期, 要注意调控叶绿体结构的衰老解体, 以保证光合功能的正常有效进行。

#### 参考文献:

- [1] 左天觉. 烟草的生产、生理和生物化学 [M]. 朱尊权, 译. 上海: 远东出版社, 1993: 83.
- [2] 刘贞琦, 伍贤进, 刘振业. 土壤水分对烟草光合生理特性的影响 [J]. 中国烟草学报, 1995, 2(3): 44 - 49.
- [3] 刘雪松, 刘贞琦, 赵德刚, 等. 烤烟成熟过程中光合特性的变化 [J]. 贵州农学院学报, 1991, 10(1): 1 - 6.
- [4] Weybrew J A. Estimation of the plastid pigments in tobacco [J]. Tobacco Science, 1970(1): 1 - 5.
- [5] 江力, 刘义新, 张荣铎. 烟叶成熟衰老过程中光合电子传递和光合酶活性变化的研究 [J]. 华中农业大学学报, 2000, 12(6): 533 - 536.
- [6] 陈斐斐, 杜志游, 刘歆, 等. 黄瓜花叶病毒 2b 蛋白对寄主光合速率和叶绿体结构的影响 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(8): 889 - 896.
- [7] 郭兴启, 冯焯, 李向东, 等. PVY/PVX 协生作用对病毒浓度及寄主细胞超微结构的影响 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(3): 281 - 286.
- [8] 刘国顺, 张彩霞, 王婵娟, 等. 受烤烟花叶病病毒侵染后叶中保护酶活性和超微结构的变化 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(5): 49 - 463.
- [9] 黄遵锡, 李红. 感染烟草花叶病毒烟叶超微结构的观察 [J]. 南京大学学报, 1995, 15(2): 58 - 67.
- [10] 汪逸群, 周发俊, 曾少娇. 淹水对烟草叶肉细胞伤害的超微结构观察 [J]. 重庆科技学院学报: 自然科学版, 2008, 6(3): 35 - 38.
- [11] 张华, 赵百东, 冀浩, 等. 水分胁迫对烤烟腺毛超微结构的影响 [J]. 中国烟草学报, 2008, 10(5): 45 - 47.
- [12] 邓志瑞, 陆巍, 张荣铎, 等. 水稻叶片光合功能衰退过程中内肽酶活力的变化 [J]. 中国水稻科学, 2003, 17(1): 47 - 51.
- [13] 匡廷云. 作物光能利用效率与调控 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2004: 93.
- [14] 郇琦. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 134 - 137.
- [15] 李向东, 王晓云, 余松烈, 等. 花生叶片衰老过程中光合性能及细胞超微结构变化 [J]. 中国农业科学, 2002, 35(4): 384 - 389.
- [16] 江力, 曹树青, 张荣铎. 两个品种烟草叶片发育过程中几种光合参数变化的比较 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 12(6): 1050 - 1054.
- [17] 潘瑞炽, 王小菁, 李娘辉. 植物生理学 [M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2004: 57 - 59.
- [18] 卡特 E G 植物解剖学 [M]. 李正理, 张新英, 译. 北京: 高等教育出版社, 1984: 18 - 20.
- [19] Fahn 植物解剖学 [M]. 吴树明, 刘德仪, 译. 天津: 南开大学出版社, 1990: 16 - 18, 417 - 420.
- [20] Fahn A, Benayoun J. Ultrastructure of resin ducts in *Pinus halepensis* development possible site of resin synthesis and mode of its elimination from the protoplast [J]. Ann Bot, 1975, 40(4): 857 - 863.