

# 叶绿素荧光动力学在植物抗逆性研究中的应用

鲁松

(四川省自然资源科学研究院,四川成都 610015)

**摘要:** 叶绿素荧光动力学技术被称为研究植物光合功能的快速、无损伤探针,已成为研究环境胁迫对植物光合作用影响的重要手段。本文就叶绿素荧光动力学的原理及其在植物抗逆性研究中的应用作简要综述。

**关键词:** 叶绿素荧光动力学; 植物抗逆性

**中图分类号:** S718.4      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1003-5508(2013)04-0069-03

## Application of Chlorophyll Fluorescence Kinetics in Researches on Plant Stress Resistance

LU Song

(Sichuan Nature Resources Science Academy, Chengdu 610015, Sichuan, China)

**Abstract:** Chlorophyll fluorescence kinetics is named as a quick and harmless probe in the plant photosynthesis research. It has been an important method in studying the influence of stress on the plant photosynthesis. In this article a summary description is given of the theory of chlorophyll fluorescence kinetics and its application in researches on plant stress resistance.

**Key words:** Chlorophyll fluorescence kinetics, Plant stress resistance

叶绿素荧光动力学技术在测定叶片光合作用过程中光系统对光能的吸收、传递、耗散、分配等方面具有独特的作用。与“表现性”的气体交换指标相比,叶绿素荧光参数更具有反映“内在性”特点。因此,叶绿素荧光动力学技术被称为测定叶片光合功能快速、无损伤的探针。本文简要概述了叶绿素荧光动力学的基本原理及其在植物抗逆性实验中的应用。

### 1 叶绿素荧光动力学的基本原理

将绿色植物含叶绿素的部分组织,如叶片、芽、嫩枝条、茎或单细胞藻类悬液放在暗处适应片刻,或用近红外光预照射,然后在可见光下激发,并用荧光计检测,结果就会发现植物绿色组织会发出一种微弱的暗红色强度随时间不断变化的荧光信号,这种荧光信号绝大部分是来自叶绿体光系统 II (PSII) 的天线色素蛋白复合体中的叶绿素 a 分子,这过程即为叶绿素荧光动力学。由于这个现象最早是由

Kautsky 发现的<sup>[1]</sup>,因此,它有时也被称为 Kautsky 效应。

经暗适应的绿色植物样品突然受到可见光照射时,其体内叶绿素分子可在纳秒(ns)级时间内发出一定强度的荧光,此时的荧光称为固定荧光( $F_0$ ),然后荧光强度增加的速度减慢,因而在 $F_0$ 处形成拐点,接着以毫秒级速度形成一个缓台阶,数秒后荧光强度可达最高点,称为“P”峰。若所用激发光强度达到或超过被测样品光反应的光饱和点时,P峰即趋于或等于最大荧光产量( $F_m$ ), $F_m$ 可反映通过PSII的电子传递情况。荧光强度超过 $F_0$ 那一部分的荧光称为可变荧光( $F_v$ )。在P峰之后,植物荧光通常经1次~2次阻尼振荡(称较大峰“ $M_1$ ”和“ $M_2$ ”),才降到接近 $F_0$ 的稳定的水平。荧光强度下降的过程现称为荧光淬灭。体内叶绿素荧光动力学有两个显著的特点:一是它可将植物发出的荧光区分为性质上完全不同的两个部分——固定荧光( $F_0$ )部分和可变荧光( $F_v$ )部分。固定荧光( $F_0$ )代表不参与PSII光化学反应的光能辐射部分,也称初

收稿日期:2013-03-11

基金项目:四川省属科研机构基本科研业务费项目及四川省科技支撑计划项目资助(2010SZ0189)。

作者简介:鲁松(1979-),男,助理研究员,博士,主要从事植物学方向研究,E-mail: lusong@cib.ac.cn。

始荧光或基础荧光,是光系统 II (PSII) 反应中心处于完全开放时的荧光产量,它与叶片叶绿素浓度有关;可变荧光( $F_v$ )代表可参与 PSII 光化学反应的光能辐射部分。根据可变荧光( $F_v$ )在总的最大荧光( $F_m = F_v + F_o$ )中所占的比例( $F_v/F_m$ ),即可简便地得出植物 PSII 原初光能转换效率。 $F_v/F_m$  是 PSII 最大光化学量子产量,反映 PSII 反应中心内光能转换效率或称最大 PSII 的光能转换效率,在叶片暗适应 20min 后测得,非胁迫条件下该参数的变化极小,不受物种和生长条件得影响,胁迫条件下该参数明显下降。另一个特点是,荧光动力学是测定植物从暗中转到光下,其光合作用功能从休止钝化状态转为局部活化状态,直到全部正常运转状态过程中的荧光动态变化,而它包含着十分丰富的光合信息,这远不是一般静态荧光测量所能比拟的。另外,如果叶片不经过暗适应可在光下直接测定实际荧光产量,常用  $F_v/F_m$  表示 PSII 有效光化学量子产量,它反映开放的 PSII 反应中心原初光能捕获效率;而  $(F_m - F)/F_m$  即 PSII 实际光化学量子产量则反映 PSII 反应中心在有部分关闭情况下的实际原初光能捕获效率<sup>[2]</sup>。

在体内叶绿素荧光动力学测定中,当样品的叶绿素浓度和荧光计的激发光强恒定时,PSII 原初电子受体  $Q_A$  的氧化状态是决定体内叶绿素荧光强弱的主要因素。当植物经一段时间暗适应,或用优先为光系统 I (PSI) 所利用的长波光照射后,其体内 PSII 的  $Q_A$  和随后的电子受体  $Q_B$  和 PQ 库等均完全失去电子而被氧化,这时 PSII 反应中心可接受光电子,即处于“开放”状态,这时荧光强度最弱,即为  $F_o$ ,当植物被饱和光激发,使 PSII 电子受体  $Q_A$ 、 $Q_B$  和 PQ 库等完全被还原时,PSII 反应中心不再接受光电子,即处于“关闭”状态,这时荧光强度最强,即为  $F_m$ 。植物经短暂照光达到“P”峰后,由于一些光合酶系逐渐被活化,使 PSI 开始运转,而将 PSII 还原侧的还原态的电子受体  $Q_A^-$ 、 $Q_B^-$  和  $PQH_2$  等再氧化,从而引起荧光强度的淬灭,这称为光化学淬灭 ( $qP$ )。植物在光的持续照射下,紧接着光化学淬灭的增加,在光合膜的两侧逐渐建立起质子梯度和形成膜高能态,它们也可造成荧光淬灭,这种淬灭称为能量淬灭,或  $qE$  淬灭<sup>[2]</sup>,另外,当激发能在 PSI 和 PSII 之间分配变化时,分配给光系统 II 的激发能的量降低,这引起的淬灭称为  $qT$ ,与光合作用的光抑制(photoinhibition)有关的淬灭为  $qI$ ,这三者造成的淬灭合称非光化学淬灭( $qN$ )。 $qP$  淬灭是因为由  $Q_A^-$  等再氧化所造成,因而它与光合电子传递、光合放氧等过程直接相关,反映的 PSII 天线色素吸收的

光能用于光化学电子传递的份额,要保持较高的光化学淬灭就是要使 PSII 反应中心处于“开放”状态,所以光化学淬灭又在一定程度上反映了 PSII 反应中心的开放程度,以光化学系数  $qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_o)$  表示, $qP$  愈大, $Q_A$ —重新氧化形成  $Q_A$  的量愈大,即 PSII 的电子传递活性越大。而  $qN$  淬灭是因为是由质子梯度和膜高能态等所引起,因而它与 ATP 的形成、积累以及与光合膜的状态有关,它反映的是 PSII 天线色素吸收的光能不能用于光合电子传递而以热的形式耗散掉的光能部分。非光化学淬灭的计算有两种表示方法<sup>[3]</sup>,  $NPQ = F_m/F_m' - 1$  或  $qN = 1 - (F_m' - F_s) / (F_m - F_o) = 1 - F_v'/F_v$ 。在植物受到环境胁迫时,PSII 天线色素吸收的过量光能如果不能及时耗散,将对光合结构造成失活或破坏,所以非光化学淬灭是一种自我保护机制<sup>[4]</sup>。

## 2 叶绿素荧光动力学在植物抗逆性研究中的应用

叶绿素 a 荧光与光合作用各种反应紧密相关,任何逆境对光合作用某过程的影响都可通过叶绿素荧光诱导动力学反映出来。因此,叶绿素荧光诱导动力学对于研究逆境胁迫对植物的影响具有十分重要的意义。逆境胁迫对植物光合作用的影响是多方面的,不仅直接引发光合机构的损伤,同时也影响光合电子传递及与暗反应有关的酶活性,利用叶绿素荧光动力学方法可以快速、灵敏、无损伤探测逆境对植物光合作用的影响。许多研究表明,逆境胁迫的轻重与  $F_m/F_o$ 、 $F_v/F_m$ 、 $qP$ 、 $qN$  的参数值被抑制的程度之间存在着正相关, $F_v/F_o$ 、 $F_v/F_m$  分别代表 PSII 的潜在活性和 PSII 原初光能转化效率,非光化学能量耗散易造成  $F_o$  的降低,而光合机构被破坏又使其升高,所以这些参数的变化趋势可作为植物抗逆的指标。

### 2.1 光抑制

光抑制是指植物的光合机构所接受的光能超过光合作用所能利用的能量时而引起的光合功能降低。目前,人们对光抑制的机理有两种认识:其一,通过增强非辐射能量耗散来消耗过剩的光能,使光合机构免受破坏(伴随  $F_o$  降低);其二,光合机构的 PSII 反应中心受到强光破坏(伴随  $F_o$  上升)。以前认为光抑制是 PSII 伤害的同义词,然而现在已证明光抑制也是一种光保护过程<sup>[5]</sup>,经常用  $F_v/F_m$  来检测光抑制。当植物受到光抑制时,常伴随  $F_v/F_m$  的降低和非辐射能量耗散(热耗散  $qN$ ) 的增加。热耗散在防御光破坏过程中起重要作用,与热耗散密切

相关的调节机制是植物体内叶黄素循环。叶黄素循环存在于所有高等植物、蕨类、苔藓和一些藻类的类囊体膜上。其过程是在抗坏血酸和  $\text{NADPH}_2$  的参与下,紫黄质(V)在几分钟内通过环氧玉米黄质(A)转化为玉米黄质(Z),提高了玉米黄质水平。而玉米黄质的含量与热耗散有密切的关系。自然条件下,随着光强的增加,玉米黄质的含量提高;当光强下降时,玉米黄质向紫黄质转变。如果通过叶黄素循环的非辐射能量耗散仍不能完全消耗过量的过剩的光能时,剩余的这部分能量有可能形成单线态氧,从而对光合机构造成危害。目前,对抑制异议较大是,光抑制是否伴随着 D1 蛋白的净降解。一种观点认为光抑制的原初位置是光系统 II 的反应中心,此处 D1 蛋白迅速被损伤发生降解;另一种观点认为光抑制是 PSII 本身而不是 D1 蛋白<sup>[6]</sup>。

## 2.2 低、高温胁迫

温度是决定各种植物在地球上不同地区分布的一个重要因子,高、低温胁迫是经常造成作物减产和限制作物产量提高的一个主要因素。因此,在作物育种中选择具有较强的抗寒或抗高温的亲本,并选育出具有较强的相应抗逆性的新品种,一直是人们追求的目标。

低温胁迫对植物光合作用的影响是多方面的,不仅直接引发光合机构的损伤,同时也影响光合电子传递和光合磷酸化以及暗反应的有关酶系。在低温胁迫下,即使中低光强也会使植物发生光抑制,因此,低温胁迫下  $q_N$  降低并且过剩光能主要依赖于叶黄素循环进行调节<sup>[5]</sup>,同时,在低温胁迫下,叶绿素的光还原活性降低,固定荧光  $F_0$  上升, $F_v/F_0$  和  $F_v/F_m$  的比值明显降低。 $F_0$  上升,表明 PSII 反应中心失活,结合  $F_v/F_0$  和  $F_v/F_m$  降低,则反映出 PSII 的潜在活性和原初光能转换效率的减弱。

高温胁迫常引起 PSII 反应中心的失活和捕光叶绿素 a/b 蛋白复合物的降解,其原因是由于 PSII 捕光叶绿素 a/b 蛋白复合物磷酸化所调节的状态 1 至状态 2 转化,这被认为是防御 PSII 过量激发或结构损伤的机制。状态 1 向状态 2 的转化会使 PSII 获得激发能减少引起荧光淬灭。

## 2.3 水分胁迫

水分是植物生长发育的必要条件之一,由于干旱胁迫引起的林木、农作物减产的量相当于其他因素引起减产总量的一半<sup>[7]</sup>。干旱胁迫可导致植物叶片中叶绿素含量的降低,叶片失水影响叶绿素的生物合成,且促进已形成的叶绿素加速分解,造成叶片变黄。而在一定范围内叶绿素含量的高低则直接影响叶片的光合能力,较合理的叶绿素 a/b 值可防止叶内光能过剩诱导的自由基产生和色素分子的光氧化。植物受中度以上干旱胁迫后,光合作用受到

明显抑制,此时气孔限制不是光合作用降低的主要原因,光合作用的下降主要与叶绿体的功能障碍有关,干旱阻断了放氧复合物到光系统 II(PSII)的第二个电子供体(即质子醌和 P700)之间的电子传递,从而导致整个电子传递活性降低。PSII 的破坏常伴随  $\text{Mn}^{2+}$  的丧失,脂肪酸的增加及 ATP 和蛋白质的降解<sup>[8]</sup>。在水胁迫期间如维持正常光照会提高玉米黄质的保护作用,即提高天线叶绿体中热耗散的速率,从而降低 PSII 光化学效率( $F_v/F_m$ )。水分胁迫能引起  $F_0$  上升和  $F_v$  下降,他们的变化程度可以用来鉴别植物的不同抵抗或忍耐干旱能力<sup>[9]</sup>。

## 2.4 盐胁迫

盐碱胁迫对植物产生的胁迫作用与干旱胁迫有相似的生理效果如:引起植物失水和体内渗透压的增加,除此之外,盐离子代谢失调也会影响光合作用的正常进行。受到盐胁迫的植物,都会有  $F_v/F_0$ 、 $F_v/F_m$ 、 $q_P$  的下降和  $q_N$  的上升,而且非光化学淬灭系数比光化学淬灭系数对 NaCl 反应较敏感,这主要是与 NaCl 胁迫使叶片中的离子平衡及细胞结构遭到破坏,毒性物质产生,叶绿素活性和光合酶活性下降有关。另外,有报道指出,在叶中同时积累钠和氯会加速荧光的淬灭,若仅积累氯排出钠则不会加速这种淬灭,加速荧光淬灭可能是由于加速  $Q_A$  再氧化的结果<sup>[10]</sup>。

## 参考文献:

- [1] Kautsky H, Bruijn H. Die Aufklärung der Photolumineszenztilgung fluoreszierender Systeme durch Sauerstoff: Die Bildung aktiver, diffusionsfähiger Sauerstoffmoleküle durch Sensibilisierung[J]. Die Naturwissenschaften, 1931, 48: 964.
- [2] 林世青,许春辉,张其德,等.叶绿素荧光动力学在植物抗性生理学、生态学和农业现代化中的应用[J].植物学通报,1992,9(1):1~16.
- [3] Schreiber U, Bilger W, Neubauer G. In: Ecophysiology of Photosynthesis[M]. Springer-Verlag, Berlin, 1994.
- [4] 张守仁.叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论[J].植物学通报,1999,16(4):444~448.
- [5] Demmig Adams B. Photoprotection and other responses of plants to high light stress[J]. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1992, 43: 599~626.
- [6] 冯建灿,胡秀丽,毛训甲.叶绿素荧光动力学在研究植物逆境生理中的应用[J].经济林研究,2002,20(4):14~20.
- [7] 梁新华,许兴,徐兆桢,等.干旱对春小麦旗叶叶绿素 a 荧光动力学特征及产量间关系的影响[J].干旱地区农业研究,2001,19(3):72~77.
- [8] 张永强,毛学森,孙宏勇.干旱胁迫对冬小麦叶绿素荧光的影响[J].中国生态农业学报,2002,10(4):13~15.
- [9] 陈贻竹,李晓萍,夏丽,等.叶绿素荧光技术在植物环境胁迫研究中的应用[J].热带亚热带植物学报,1995,3(4):79~86.
- [10] Belkhdja R et al. Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley(*Hordeum vulgare* L.) [J]. Plant Physiol., 1993, 104: 667~673.