

非调制式荧光仪测定叶绿素荧光参数的研究

赵 弢¹, 高志奎¹, 徐广辉¹, 王 梅¹, 高荣孚²

(1. 河北农业大学, 河北保定 071001; 2. 北京林业大学, 北京 100083)

摘要: 为了利用非调制式荧光仪获得调制式荧光仪测定的叶绿素荧光动力学参数, 采用植物效率 (PEA) 仪进行了叶绿素荧光参数测定程式的 4 要素 (光化光强度及其照射时间、饱和激发光强度及其照射时间) 以及节约测定时间和仪器内存的测定技术研究。结果表明, 暗适应 10 min 后, 在设定 $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光化光照射 360 s 时间内, 以连续 2 次 $1950 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 饱和激发光照射 3 s 的测定程式, 在 7 种植物的叶绿素荧光参数的测定中获得了较为满意的测定结果, 而且与 Strasser 等测定程式相比, 1 次测定需时从 600 s 缩短为 360 s、耗用仪器内存从 76.9% 减少为 2.56%。

关键词: 非调制式荧光仪; 调制式荧光仪; 叶绿素荧光动力学

中图分类号: Q6-33

0 引 言

植物叶绿素 a 荧光动力学分析技术能够快速灵敏、无损伤地反映光系统 II (photosynthetic system II, PS II) 对光能的吸收、传递、耗散、分配等方面的状况^[1], 对探究光合机构效能及其与环境胁迫的关系具有重要意义^[2-12]。

目前多采用调制式荧光仪直接进行初始荧光 (minimal fluorescence, F_0)、最大荧光产量 (maximal fluorescence, F_m)、稳态荧光 (steady fluorescence, F_s)、稳态的最大荧光 (steady maximal fluorescence, F_m') 等叶绿素 a 荧光动力学参数测定, 并据此计算 PS II 最大光化学量子产量 (optimal/ maximal photochemical efficiency of PS II in the dark, F_v/F_m)、PS II 实际光化学量子产量 (actual photochemical efficiency of PS II in the light, $\Delta F/F_m'$)、非光化学猝灭系数 (non-photochemical quenching coefficient, q_N)、光化学猝灭系数 (photochemical quenching coefficient, q_P) 等参数^[13-15]。而非调制式荧光仪多用于叶绿素 a 荧光动力学信号的快速响应测定, 只获得 F_0 、 F_m 和 F_v/F_m 参数。

Strasser 等^[16]在分析调制式荧光仪测定叶绿素 a 荧光动力学参数过程的基础上, 采用非调制式荧光仪, 对暗适应豌豆叶片用 3% 的光化光照射 10 s 后, 再用 100% 的饱和激发光进行照射, 如此连续进行 60 次光适应下的快速测定程式, 获得了 F_0 、 F_m 、 F_s 、 F_m' 等参数, 并计算了 q_N 、 q_P 等参数。但本课题组在效仿后发现 2 个问题: 一是光化

光强度及照射时间与饱和激发光强度及照射时间影响着直读参数 (F_0 、 F_m 、 F_s 、 F_m') 和计算参数 (q_N 、 q_P); 二是连续 60 次 (600 s) 的快速测定数据会占用植物效率仪 (Plant Efficiency Analyser, PEA, 即非调制式荧光仪) 近 76.9% 的存贮空间, 给田间测定带来不便。为此, 本研究采用 PEA 进行了测定条件筛选和简化研究, 得到了与调制式荧光仪相近似的结果^[7,11]。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料有茄子、草莓、矮生菜豆、菜用枸杞、柳蒿、李、桃, 均按常规栽培管理方式栽培于露地。测定时每种植物选择其完全展开的功能叶片进行测定, 重复测定 3 次。

1.2 试验方法

叶绿素荧光动力学参数由英国 Hansatech 公司生产的植物效率仪进行测定。其测定程式为: 茄子叶片暗适应 10 min 后, 在未加光化光的条件下, 以一定强度的饱和激发光对其照射一定时间, 测得 F_0 (记为 dF_0) 和 F_m (记为 dF_m); 之后进行连续重复测定, 利用一定强度的光化光持续照射一定时

收稿日期: 2005-10-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571267),

国家科技攻关计划项目 (2004BA525B14)

通讯作者: 高志奎, 电话: (0312)7528312,

E-mail: gaozhikui2005@163.com

间后，再用强度相同的饱和激发光照射相同的时间，测得 F_s (记为 F_s) 和 F_m' (记为 F_m)。其光化光和饱和激发光的强度和照射时间设定按照试验 I、II、III、IV、V 进行。

试验 I：将 PEA 光化光强度设定为 0、30、60、90、180、270、360、450 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，分别照射 600 s。并用 1 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的饱和激发光照射 1 s，仪器自动记录数据 2 次。

试验 II：据试验 I 选择出最佳光化光强度，设定在此强度下的照射时间分别为 120、240、360、480、600 s。并设定用 1800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的饱和激发光照射 1 s，仪器自动记录数据 2 次。

试验 III：据试验 I 和 II 选择最佳光化光强度和照射时间后，分别用 900、1 200、1 600、1 800、1 960、2 100、2 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的饱和激发光照射 1 s。仪器自动记录数据 2 次。

试验 IV：据试验 I 和 II 选择最佳光化光强度和照射时间后，依试验 III 选择最佳饱和激发光强度，分别照射 1、2、3、4、5 s。仪器自动记录数据 2 次。

试验 V：据试验 I 和 II 选择最佳光化光强度和照射时间后，再依据试验 III 和 IV 选择最佳饱和激发光强度及照射时间，对 7 种植物试材进行叶绿素荧光参数的测定。

叶绿素荧光参数的计算参考张守仁和 Strasser 的方法计算^{[1],[6]}。PS II 最大光化学量子产量 $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m = ({}^dF_m - {}^dF_o)/{}^dF_m$ 。PS II 实际光化学量子产量 $\Delta F/F_m = (F_m' - F)/F_m = ({}^lF_m - {}^lF_s)/F_m$ 。非光化学猝灭系数 $q_N = 1 - \frac{F_m - F_o'}{F_m - F_o} = 1 - \frac{{}^lF_m - {}^lF_o'}{{}^dF_m - {}^dF_o}$ 。光化学猝灭系数 $q_P = \frac{F_m - F_s}{F_m' - F_o'} = \frac{{}^lF_m - {}^lF_s}{{}^lF_m' - {}^lF_o'}$ 。其中，远红光

下的初始荧光 F_o' 的计算参照 Oxborough 和 Baker^[7] 提出的在不加远红光情况下的推算公式，即 $F_o' = F_o / \left(\frac{F_v}{F_m} + \frac{F_o}{F_m'} \right) = F_o / \left(\frac{F_m - F_o}{F_m} + \frac{F_o}{F_m'} \right) = {}^dF_o / \left(\frac{{}^dF_m - {}^dF_o}{{}^dF_m} + \frac{{}^dF_o}{{}^lF_m} \right)$ 。

2 结果与分析

2.1 光化光照射强度对叶绿素荧光参数的影响

对茄子叶片按照试验 I 测定，结果 (图 1) 表明，光化光强度为 90~450 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 之间时， F_m 稳定在 3 000 左右，符合仪器测定的最佳量程

范围，而且 F_v/F_m 一直稳定在 0.8 左右。随着光化光照射强度的增加， $\Delta F/F_m'$ 、 q_P 呈下降趋势，且在光化光强度为 90~270 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时变化较为平缓；而 q_N 则呈上升趋势。 q_P 与 q_N 交汇点位于 180 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

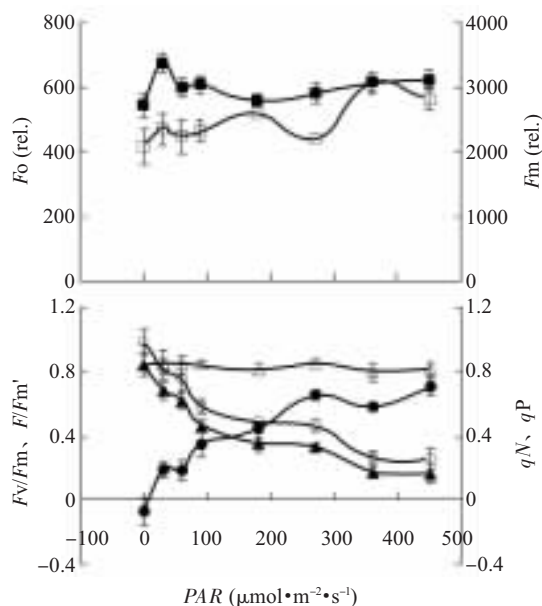


Fig.1 Effects of actinic light intensity on the chlorophyll fluorescence parameters of eggplant. —□—: F_o ; —△—: F_v/F_m ; —○—: q_N ; —■—: F_m ; —▲—: $\Delta F/F_m'$; —●—: q_P

2.2 光化光处理时间对叶绿素荧光参数的影响

在试验 I 基础上选定光化光强度为 180 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，依试验 II 对茄子叶片测定结果 (图 2) 表明，随着光化光处理时间延长， F_o 、

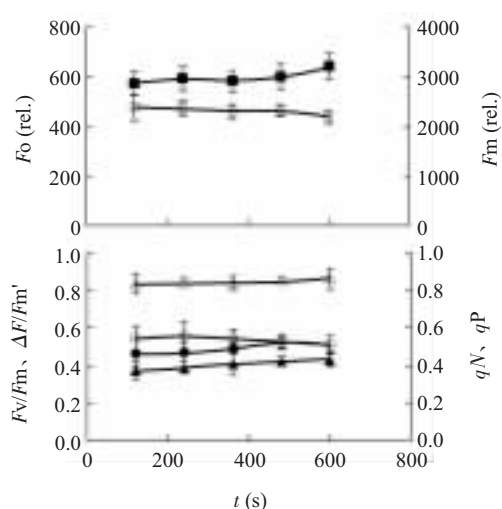


Fig.2 Effects of duration of actinic light on the chlorophyll fluorescence parameters of eggplant. —□—: F_o ; —△—: F_v/F_m ; —○—: q_N ; —■—: F_m ; —▲—: $\Delta F/F_m'$; —●—: q_P

F_v/F_m 、 qP 的变化不大，且 F_v/F_m 在 0.8 左右； F_m 、 $\Delta F/F_m'$ 略呈上升趋势，且 F_m 符合仪器测定的最佳量程范围；而 qN 则呈下降趋势。综合来看，光化光处理时间在 360~480 s 范围内各参数变化趋势较稳定。

效仿 Strasser 测定程式，茄子叶片暗适应 10 min 后，在 $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光化光下照射 10 s，用 $1800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的饱和激发光照射 1 s，连续进行 60 次光适应下的快速测定，获得了叶绿素荧光动力学曲线（图 3），发现 300~600 s 范围内的 F_m' 和 F_s 基本相近。

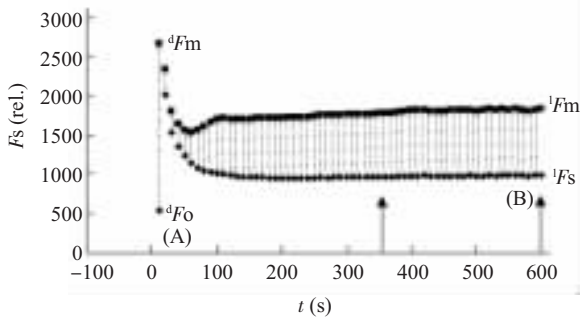


Fig.3 The process of fluorescence signals of eggplant in Strasser's patterns

2.3 饱和激发光照射强度对叶绿素荧光参数的影响

在试验 I 和 II 基础上选定光化光强度为 $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、照射时间为 360 s，按照试验 III 对茄子叶片的测定结果（图 4）显示， F_o 、 F_m 随

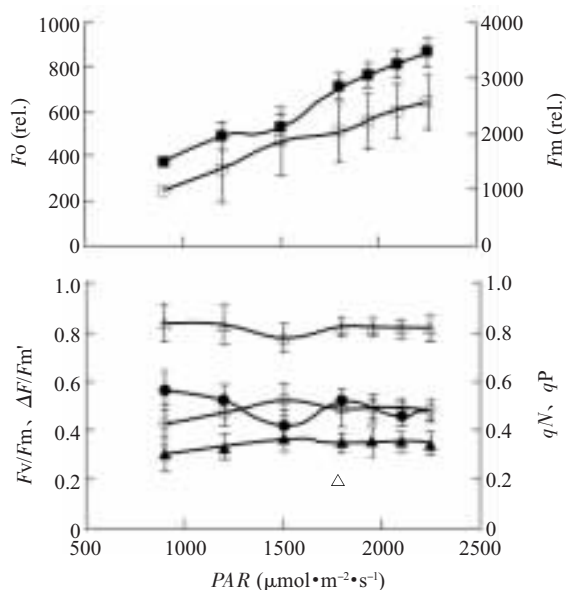


Fig.4 Effects of saturated light intensity on the chlorophyll fluorescence parameters of eggplant. —□—: F_o ; —△—: F_v/F_m ; —○—: qN ; —■—: F_m ; —▲—: $\Delta F/F_m'$; —●—: qP

饱和激发光强度的增加而增大，但是饱和激发光强度在 $1800\sim 2250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 范围内时 F_m 在 $3000\sim 3500$ 之间，符合仪器测定的最佳量程范围。在此饱和激发光强度范围内，其余的参数值变化趋势较为平稳。

2.4 饱和激发光照射时间对叶绿素荧光参数的影响

在试验 I、II 和 III 基础上选定光化光强度为 $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、照射时间为 360 s、饱和激发光强度为 $1950 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，按照试验 IV 对茄子叶片进行测定发现（图 5）， F_m 、 F_v/F_m 、 $\Delta F/F_m'$ 的变化趋势相同， F_o 、 qN 、 qP 的变化趋势也相同。在 2~4 s 范围内各测定参数变化较稳定。

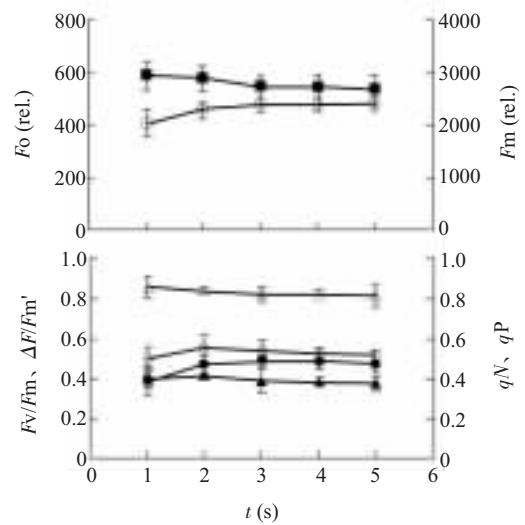


Fig.5 Effects of duration of saturated light on the chlorophyll fluorescence parameters of eggplant. —□—: F_o ; —△—: F_v/F_m ; —○—: qN ; —■—: F_m ; —▲—: $\Delta F/F_m'$; —●—: qP

2.5 不同植物的叶绿素荧光参数测定比较

在试验 I~IV 基础上选定 $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光化光照射 360 s、 $1950 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 饱和激发光照射 3 s 的条件下，进行 7 种植物叶绿素荧光参数的测定。结果表明（图 6），不同种植物的 F_o 基本相同。 F_m 在各种植物之间有所不同，但差异不十分显著，其中最大的为菜用枸杞，最小的为草莓。 F_v/F_m 各种植物之间差异显著，最大值与最小值的出现与最大荧光产量相同。 $\Delta F/F_m'$ 的最大值仍为菜用枸杞，但最小值为李。

从图 7 可知，7 种植物中 qN 最大的为桃，最小的为茄子。草莓和菜用枸杞的 qP 基本相同且较大，李的最小。在相同的测定条件下，茄子、草莓

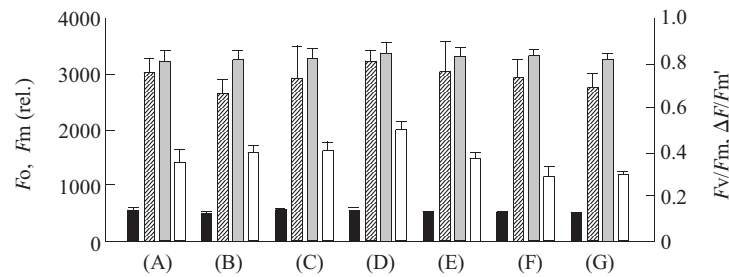


Fig.6 Comparison of F_m 、 F_o 、 F_v/F_m and $\Delta F/F_m'$ on seven kinds of plants. (A) Eggplant; (B) Strawberry; (C) Bean; (D) *Lycium chinense* Miller; (E) *Artemisia integrifolia* L.; (F) Plum; (G) Peach

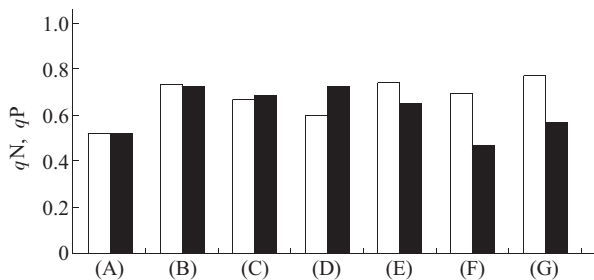


Fig.7 Comparison of q_N and q_P on seven kinds of plants. □: q_N ; ■: q_P

和矮生菜豆的 q_N 和 q_P 基本相同；柳蒿、李和桃的 q_N 高于 q_P 。

3 讨 论

3.1 节约测定时间和仪器内存对室内和田间尤为重要

通常，调制式荧光仪在叶片暗适应后的光适应测定程式需要 360~480 s。而 Strasser 采用非调制式荧光仪 PEA 测得类似于调制式荧光仪的叶绿素荧光参数，但是 1 次测定耗时较长，需要在 600 s 光化光照射期间以 10 s 间隔连续 60 次饱和激发光照射，并且 1 次测定耗用仪器内存 76.9%。这会影响到仅能存贮 78 组数据的 PEA 的工作效率，即使对存贮 1 000 组数据的 HandyPEA 也只能进行 16 次测定（相当于 1.6 h 的工作时间）。

本研究效仿 Strasser 测定程式对茄子叶片进行叶绿素荧光动力学曲线测定结果（图 3）发现 300~600 s 范围内的 F_s 基本相近。表明缩短测定时间至 300 s 也会获得类似结果。但是 1 次测定仍会耗用 38.5% 的内存。为此，本研究改用在 360 s 光化光照射期间连续 2 次饱和激发光照射的测定程式，也获得了较为满意的测定结果（图 6~7），而且 1 次测定仅耗用 2.56% 的内存，可以进行 36 次

测定（相当于 3.6 h 的工作时间）。

3.2 测定程式 4 要素的确定

本研究表明，测定程式 4 要素（光化光强度及其照射时间、饱和激发光强度及其照射时间）影响着直读参数（ F_o 、 F_m 、 F_m' 、 F_s ）和计算参数（ F_v/F_m 、 $\Delta F/F_m'$ 、 q_N 、 q_P 等）。一方面，饱和激发光强度影响着 F_m 。既要保证 F_m 不溢出，又要使 F_m 在 3 000~3 500 之间以保证计算参数处于常值范围内（图 4）。另一方面，光化光强度对计算参数 q_N 、 q_P 及其比例影响较大。从图 7 可见，7 种植物中有 3 种的 q_N 高于 q_P 。因此，测定程式 4 要素应依植物种类做相应的调整。

参考文献：

- [1] Zhang SR. A discussion on chlorophyll runescence kinetics parameters and their significance. *Chinese Bulletin of Botany*, 1999,16(4):444-448
- [2] Genty B, Briantais JM, Baker NR. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*, 1989:90089~90092
- [3] Schreiber U, Bilger W, Neubauer G. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: Schulze ED, Caldwell MM (ed). *Ecophysiology of Photosynthesis*. Berlin: Springer Verlag, 1994
- [4] Srivastava A, Strasser A. Stress and stress management of land plants during a regular day. *Plant Physiol*, 1996,148: 445~455
- [5] Havaux M, Strasser RJ, Greppin G. A theoretical and experimental analysis of the q_P and q_N coefficients of chlorophyll fluorescence quenching and their relation to photochemical and nonphotochemical events. *Photosynth Res*, 1991,27: 41~55
- [6] Stirbet A, Strasser RJ. Numerical simulation of the *in vivo* fluorescence in plants. *Math Compu.Simul*, 1996,42:245~253
- [7] Liu JY, Qiu BS, Liu ZL, Yang WN. Diurnal Photosynthesis and Photoinhibition of Rice Leaves with Chlorophyll

- Fluorescence. *Acta Botanica Sinica*, 2004,46(5):552~559
- [8] Strasser BJ, Strasser RJ. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test Mathis P Photosynthesis: From Light to Biosphere. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. 977~980
- [9] Yu FY, Robert D. Variable chlorophyll fluorescence in response to water plus heat stress treatments in three coniferous tree seedlings. *Guy Journal of Forestry Research*, 2004, 15(1):24~28
- [10] Strand M, Lundmark T. Effects of low night temperature and light on chlorophyll fluorescence of field-grown seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree Physiol*, 1987,3:211~224
- [11] Schreiber U, Berry JA. Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of the photosynthetic apparatus. *Planta*, 1977,136:233~238
- [12] Epron D, Dreyer E. Photosynthesis of oak leaves under water stress: maintenance of high photochemical efficiency of photosystem II and occurrence of non-uniform CO₂ assimilation. *Tree Physiol*, 1993,13:107~117
- [13] Quick WP, Horton P. Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in barley protoplasts. I. Factors affecting the observation of oscillations in the yield of chlorophyll fluorescence and the rate of oxygen evolution. *Proc Royal Soci of Lond B*, 1984,220:361~370
- [14] Schreiber U. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated fluorometer. *Photosynth Res*, 1986,9:261~272
- [15] Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res*, 1986,10:51~62
- [16] Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. The fluorescence transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. Yunus M, Pathre U, Mohanty E Probing Photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation. London: Taylor & Francis. 2000:445~483
- [17] Oxborough K, Baker NR. Revsolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components—calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo' . *Photosynth Res*, 1997, 54:135~142

STUDY ON GETTING PARAMETERS OF CHLOROPHYLL FLUORESCENCE DYNAMICS BY NON-MODULATED FLUOROMETER PLANT EFFICIENCY ANALYSER

ZHAO Tao¹, GAO Zhi-kui¹, XU Guang-hui¹ WANG Mei¹, GAO Rong-fu²

(1. Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to getting parameters (Fm' , Fs , $\Delta F/Fm'$, qN , qP , etc.) of chlorophyll fluorescence dynamics by non-modulated fluorometer plant efficiency analyser (PEA), the four elements (actinic light intensity and time, saturating light intensity and time) in the measurement patterns of fluorescence signals, saving on time and instrument expend memory by PEA were studied. After that, the authers got satisfying results on seven kinds of plant with the measurement patterns that the dark adaptation time was 10 min and the actinic light intensity was set at $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a light pulse of 3 s duration with an intensity of $1950 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ was given continuously for two times at intervals of 360 s, as compared with Strasser's patterns, the measurement time was shortened from 600 to 300 s and the expend instrument memory was reduced from 76.9% to 2.56%.

Key Words: Non-modulate fluorometer; Modulate fluorometer; Chlorophyll fluorescence dynamics

This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30571267) and National Scientific and Technological Project (2004BA525B14)

Received: Oct 18, 2005

Corresponding author: GAO Zhi-kui, Tel: +86(312)7528312, E-mail: gaozhikui2005@163.com