

叶绿素荧光技术在筛选光合突变体中的应用

郭玉朋¹, 郑霞², 王新宇¹, 曹孜义^{1,3*}

(1. 兰州大学生命科学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 中国农业科学院麻类研究所, 湖南 长沙 410205;
3. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 叶绿素荧光技术作为光合作用研究的手段, 在光合突变体筛选中起到了重要作用。使用该技术, 大量光合突变体得以分离, 并且随着分子生物学的进展, 突变基因也被陆续克隆, 同时利用这一技术的筛选方法也随着人们对光合作用机制认识的深入, 不断得到了改进, 本研究就这方面进展做以综述。

关键词: 叶绿素荧光技术; 光合突变体; 筛选

中图分类号: Q945.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5759(2009)06-0226-09

* 早在 1931 年, Kautsky 首先用肉眼观察到叶绿素荧光, 红色而且漂亮^[1]。自从叶绿素荧光现象发现后, 人们了解到叶绿素荧光的变化实际上反映了研究对象的光合功能状态, 之后基于光合研究的需要, 叶绿素荧光理论和技术很快发展起来。在应用上, 由于利用叶绿素荧光探测光合功能不但快速灵敏, 而且无损伤^[2], 因此给研究带来很大方便。随着研究的深入, 叶绿素荧光所包含的丰富信息逐渐得到了正确理解和应用^[3,4], 现在叶绿素荧光技术不但在光合作用基础研究中发挥了重要作用, 而且在作物抗逆、产量预测、遗传育种、病虫害监测等应用学科领域也得到了广泛应用^[5~10], 并且近年来正在发展利用卫星平台, 通过探测叶绿素荧光而预测一个地区植物生长状况的技术^[11~13]。

在生物学研究中, 突变体分析是剖析复杂生物学过程的强有力工具, 并且现在已经成为研究基因功能的重要手段^[14]。尤其在模式生物, 例如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)全基因组序列测序工作完成后, 利用突变体研究基因功能及表达调控的工作得到了极大地促进^[15,16]。在光合作用功能基因研究中, 利用叶绿素荧光作为筛选光合突变体的手段, 在光合突变体分离中发挥了重要作用。

1 叶绿素荧光理论基础

1.1 叶绿素荧光的产生

叶绿素作为重要的光敏色素, 在光合作用中捕获、传递光能, 并通过光化学作用, 将光能转变为化学能。在能量转化过程中, 由叶绿素所吸收的光能除主要部分被转变为化学能外, 有少部分能量以荧光的形式释放, 这就是叶绿素荧光。叶绿素荧光主要由叶绿素 a 产生, 在光系统中, 大约有一半以上的叶绿素 a 分布于光系统 I(photo-system I, PSI), 其余的存在于光系统 II(photosystem II, PSII)。

在光合能量的转化过程中, 光子首先被叶绿素 a 以及其他光合色素分子吸收, 叶绿素 a 分子以外其他光合色素分子吸收的光能以激子的形式快速(皮秒 ps, 10^{-12} s)传递给叶绿素 a。这些光合色素分子由于吸收光子, 而从基态(ground state)跃迁至激发态(excited state), 分子势能改变, 不同波长光子引起色素分子势能改变不同, 其中, 色素分子吸收一个红光光子, 分子势能大约增加 1.8 eV, 而蓝光光子则引起大约 3.1 eV 的改变。处于激发态的叶绿素是不稳定的, 经过去激发途径释放能量而回到基态, 在此过程中, 激发态主要通过放热、发射荧光或磷光、以及分子间能量传递回到基态^[17]。

在 PSII, 反应中心叶绿素分子 a(P680)接受激子后, 发生电荷分离形成 $P680^+$, 接着电子传递给初级醌电子受体 Q_A , Q_A 形成质半醌 Q_A^- ; 在 PSI, 反应中心叶绿素分子 a(P700)则将电荷传递至电子受体叶绿醌 A_1 , 这样

* 收稿日期: 2008-11-03; 改回日期: 2009-03-16

作者简介: 郭玉朋(1975-), 男, 甘肃敦煌人, 博士。E-mail: mlplml@sina.com

* 通讯作者。E-mail: caozy@gsau.edu.cn

在 2 个反应中心分别形成 2 个自由基对 $P680^+ Q_A^-$ 和 $P700^+ A_1^-$ 。电子在被传递至下一级电子受体前, 2 个反应中心都处于关闭状态, 不能再发生电荷分离, 直至 2 个自由基对重新回到电中性状态, 之前能够发生光化学反应的电中性状态称为开放态。在 PSII, 初级电子供体向 $P680^+$ 传递电子的速度很快(大约要 50 ns), 而 Q_A^- 向外传导电子的速度很慢($>100 \mu s$), 自由基对长时间以 $P680 Q_A^-$ 状态存在, 而 PSI 刚好相反, 自由基对长时间以 $P700^+ A_1^-$ 存在。 $P680^+$ 和 $P700^+$ 都是非常有效的激子淬灭剂, 将吸收的激子能量以热的形式耗散(non-radiative decay)而不是用于光化学反应和发射荧光, 因此当 2 个光系统都处于关闭状态时, PSII 将吸收的激子能量主要以荧光形式耗散, 而 PSI 所吸收的激子能量则主要通过 $P700^+$ 以热的形式耗散, 因此整个光系统叶绿素荧光产量变化主要由 PSII 荧光变化引起^[4,17]。

1.2 叶绿素荧光诱导现象

在光下, 光合作用的光反应由 2 个光系统相互协调完成, 但经过暗适应的叶片 2 个光系统间协调消失, 这时的光系统处于非功能化状态, 在照光后需要重新建立协调。同样, 参与暗反应的酶系统, 黑暗条件下也处于非活性状态, 照光后同样需要一个活化过程^[17,18]。因此, 经过暗适应的叶片, 在照光后叶绿素荧光会有一个迅速的变化过程, 并逐渐过渡到稳态水平, 这被称为叶绿素荧光诱导现象。在这一过程中, 首先是 PSII 电子传递初级受体 Q_A 被来自 PSII 反应中心的电子还原, PSII 反应中心由开放状态变为关闭状态, 当所有初级受体 Q_A 及次级受体 Q_B 都被还原时, 荧光由最低值 F_0 上升至最大值 F_m , 这一阶段为叶绿素荧光诱导的快相(O-P), 主要反映了 PSII 的原初光化学反应状态; 之后随着 PSI 开始工作, 电子由 PSII 排出, 经其他传递体最终传递至 $NADP^+$ 形成 NADPH, 暗反应也被激活, 荧光逐渐从 F_m 降低至 F_t , 该阶段为叶绿素荧光诱导的慢相(P-T), 主要反映了光合碳代谢的变化^[19,20]。叶绿素荧光诱导具体过程见图 1。

1.3 叶绿素荧光淬灭

叶绿素荧光诱导过程中, 荧光由最高值降至稳态, 在此过程中荧光产量的下降称为叶绿素荧光淬灭。由光化学过程引起的淬灭称为光化学淬灭(photochemical quenching, qP), 而热耗散造成的荧光产量降低称为非光化学淬灭(non-photochemical quenching, qN 或 NPQ)。光化学淬灭由光合作用引起, 而非光化学淬灭根据形成条件的不同, 以及照光后黑暗状态下叶绿素荧光恢复动态的变化, 主要被区分为 3 个组分: qE 能态淬灭、qT 状态转化和 qI 光抑制淬灭, 大量研究表明, 叶黄素循环与非光化学淬灭形成密切相关^[22]。在非光化学淬灭中, qE 由类囊体内外质子浓度差引起, 是非光化学淬灭最重要的部分, 也是反应最快的组分, 它是一种迅速可逆的光能调节方式, 有助于植物适应短时间光强剧烈变化^[23~26]; qT 是由状态转化形成的非光化学淬灭; qI 是与光合作用的光抑制联系在一起, 在这三者之中, qT、qI 与 qE 相比要小的多, 并不是主要的荧光淬灭途径^[24]。通常, 对非光化学淬灭的 3 个组分可以根据暗弛豫时间长短加以区分, 具体见图 2。

光系统吸收的能量通过光化学和热及荧光三者之一得以耗散, 这三者之间存在此消彼长的关系, 叶绿素荧光因受其他两方面的影响而变化, 因此可以通过测量叶绿素荧光的变化, 来了解其他 2 个方面的状况。

1.4 叶绿素荧光动力学参数

叶绿素荧光动力学参数是使用叶绿素荧光技术, 定量描述研究对象光合功能的工具, 这些参数是根据具体研

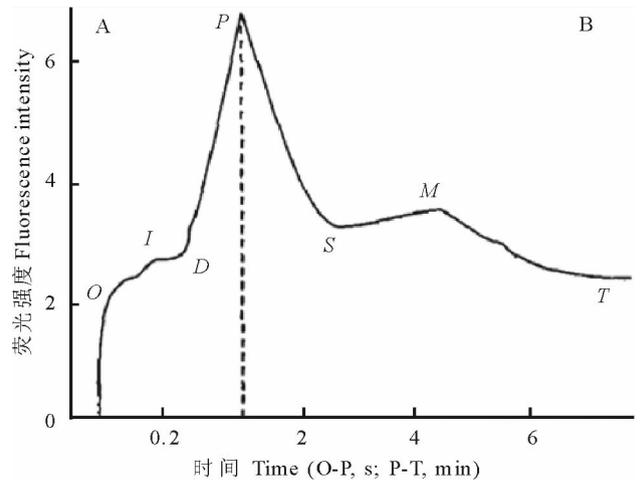


图 1 叶绿素荧光诱导过程^[21]

Fig. 1 Kinetic induction curve of chlorophyll a fluorescence in light

A: O-P 荧光诱导快相 The fast phase of induction curve; B: P-T 荧光诱导慢相 The slow phase of chlorophyll a fluorescence

究目的,而采用相应测量方法获得的,但通常基本数据的测量方法和步骤是基本相同的。一般情况是,在测量前先将待测样品经过充分暗适应,测量时,先向样品照一微弱测量光,得到基础荧光 F_0 ,接着打开饱和光使 PSII 饱和,得到 F_m (暗适应条件下最大荧光),之后打开光化光,等叶绿素荧光产量稳定后,记录稳态荧光产量 F_t ,然后再照一次饱和光,获得 F_m' (光适应条件下的最大荧光),关闭光化光,打开远红光测量光适应状态下的基础荧光 F_0' 。在使用荧光仪测得基本数据后,其他参数可以通过相应公式计算得到^[20]。

叶绿素荧光动力学参数,在应用上可以分为用来描述光化学淬灭和非光化学淬灭的 2 类,在描述光化学淬灭时,PSII 实际光化学量子效率 Φ_{PSII} 、PSII 最大光化学量子效率 F_v/F_m 和光化学淬灭系数 qP 较为常用;而在定量非光化学淬灭时, NPQ 、 qN 被广泛应用。这些参数的计算公式如下^[2,8,20]:

$$\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_t) / F_m' \quad (1)$$

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m \quad (2)$$

$$J = \Phi_{\text{PSII}} \times PFDa \times 0.5 \quad (3)$$

$$qP = (F_m' - F) / (F_m' - F_0') \quad (4)$$

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m' \quad (5)$$

$$qN = 1 - (F_m' - F_0') / (F_m - F_0) \quad (6)$$

式中, Φ_{PSII} 表示在作用光下,部分 PSII 反应中心关闭时,PSII 的原初光能捕获效率,这一指标可以用来估计电子传递速率(公式 3, $PFDa$ 光合有效辐射强度),从而了解光合作用效率。一般情况下,电子传递速率与光合作用效率有很强的线性关系,但在胁迫条件下,由于围绕 PSI 环式电子传递速率的提高和光呼吸作用的增强,这种线性关系会被改变; F_v/F_m 是指经过暗适应后,所有反应中心都处于开放状态时,PSII 的最大光能转化效率,是表征 PSII 功能的重要指标,常用来衡量光抑制程度^[27,28]; qP 是用来表示 PSII 反应中心开放程度的指标,其大小由 Q_A 的氧化还原状态决定,有时也用 $1-qP$ 表示 PSII 关闭的反应中心比例或者称为激发压。 NPQ 和 qN 两个参数中, qN 称为非光化学淬灭系数,是过去常用的 1 个参数,现在多用 NPQ ^[20]。

2 利用叶绿素荧光筛选光合突变体

光合功能突变体可以有多种表型,在筛选中主要依据叶绿素变化和叶绿素荧光变化为标准。在应用中,根据叶绿素荧光特性筛选获得的突变体,往往叶绿素会有不同程度缺失,而根据叶绿素变化得到的突变体,叶绿素荧光特性也会发生变化,因而这 2 种方法在筛选光合突变体时可以相互补充。相对叶绿素表型变化,用叶绿素荧光特征来筛选突变体具有更精确的特点,并且突变体荧光变化特征能够为后续研究提供线索^[29~36]。利用叶绿素荧光筛选突变体的方法主要被区分为 2 类:高叶绿素荧光筛选法和叶绿素荧光参数筛选法。

2.1 高叶绿素荧光突变体筛选

正常情况下,光合作用过程中,叶绿素荧光产量只占吸收光能的 1%~2%^[20],而当涉及光合过程的关键基因产生突变时,叶绿素吸收的光能无法有效用于光合作用,将导致荧光产量上升,表现为高叶绿素荧光表型 HCF (high chlorophyll fluorescence)^[37]。造成高叶绿素荧光表型的突变,主要是由于光合电子传递组分或者光合中心组分突变导致的电子传递阻断而引起^[30]。

高叶绿素荧光表型突变体的筛选需要在暗室中,采用长波紫外灯照射的方法,通过观察或拍照筛选出发射亮

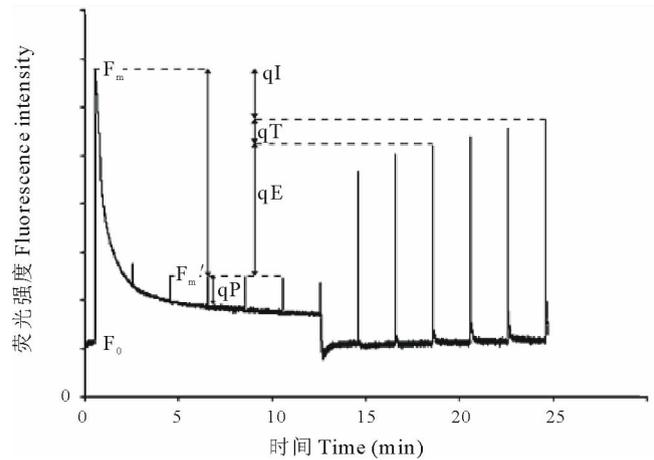


图 2 根据暗弛豫时间长短测定叶绿素荧光非光化学淬灭的 3 个组分 qE 、 qT 、 qI ^[26]

Fig. 2 Three composition of non-photochemical determined from relaxation time in dark

红色荧光的突变株,在最初是 Bennoun 和 Levine^[38]对经过 EMS 诱变的莱茵哈德衣藻 (*Chlamydomonas reinhardi*)进行了高叶绿素荧光突变体筛选。他们使用高压水银灯作光源,加长波截止滤光片将波长大于 640 nm 的光波滤去,当采用 4 000 lx 的光强时,肉眼即可分辨出高叶绿素荧光突变体。作为更灵敏的检测方法,拍照被用来记录筛选结果,使用对红色光敏感的胶卷,并加短波截止滤光片,将波长小于 640 nm 的短波光滤去,只允许长波光通过在胶片上成像,使用这种方法大约从每 200 个克隆就可以很容易筛选到一个高叶绿素荧光突变克隆(图 3)。经验证,得到的高叶绿素荧光突变克隆,只有在基本培养基添加乙酸酯后才能正常生长,这说明突变克隆的光合作用被破坏,不能光合自养,而只能在外界提供有机碳源的情况下才可以生长。经 CO₂ 固定试验检测,这些突变克隆的确无法正常固定 CO₂^[38]。

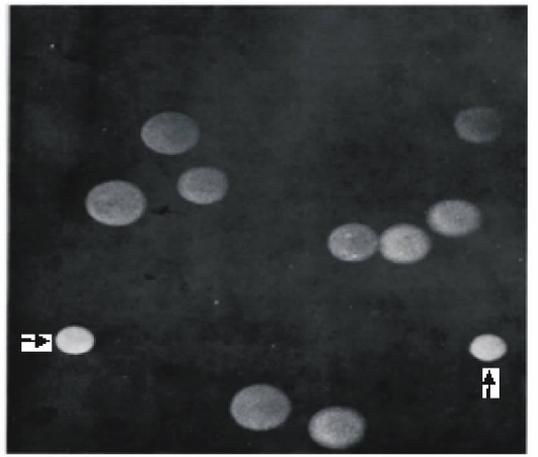


图 3 莱茵哈德衣藻高叶绿素荧光突变体筛选^[38]

Fig. 3 High chlorophyll fluorescence mutant screening of *C. reinhardi*

箭头所指为高叶绿素荧光突变克隆 Arrow indicate the mutant clone

高叶绿素荧光方法在其他植物光合突变体筛选上也得到了广泛应用,例如在玉米 (*Zea mays*)、拟南芥等植物中也筛选到大量此类突变体^[39]。Meurer 等^[37]及其同事就对拟南芥高叶绿素荧光突变体做了筛选,Meurer 使用波长 365 nm 的紫外灯作光源,通过对经由 EMS 诱变的 7 700 个 M₂ 代株系的筛选,共得到 238 个高叶绿素荧光突变株系,经过对自交 M₃ 代的复选,最终确认 34 个株系。其中,大多数突变体表现苗期致死,能够存活的突变株生长发育也受到极大影响而不能开花结实,这些突变株系只能通过杂合体保存。多数突变体同时表现为叶绿素不同程度缺失,在添加蔗糖培养基上,其叶绿素缺失表型可以恢复,除了高叶绿素表型外,与同条件下生长的野生植株没有明显区别^[37]。在获得突变体的基础上,Meurer 等^[37]还利用饱和和脉冲技术测定了突变体叶绿素荧光诱导过程各荧光参数的变化,并结合对 PSI 氧化还原状态光吸收变化的检测,对突变体突变位点做了初步预测和分类,最终突变体被区分为 6 类,前 4 类是由于电子传递链组分缺陷引起,第 5 类无法辨别突变位点,第 6 类是叶绿素 b 缺失突变体。为证明预测和分类的准确性,使用 Northern 和 Western 技术做了验证,结果表明通过荧光技术所做的预测是准确的。

然而,Meurer 等^[37]所使用的方法只能得到光化学淬灭过程突变体,所使用的光强并不足以引起非光化学淬灭大的变化。利用高叶绿素荧光表型筛选突变体,也可以基于叶绿素荧光淬灭不同组分产生的条件,变化筛选条件,得到关于不同淬灭组分的突变体,这其中包括对非光化学淬灭突变体的鉴定。Shikanai 等^[40]对高叶绿素荧光筛选方法做了改进,对经由 EMS 诱变的拟南芥突变体库做了筛选。在 Shikanai 等^[40]的方法中,材料先经过暗适应,照以 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光化光后,立刻记录叶绿素荧光成像,在照射时,光源装有长波光截止滤光片,将波长大于 590 nm 长波光滤除,以免干扰叶绿素荧光成像,之后再照以 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光化光,这一光强足以引起非光化学淬灭,2 min 后,记录荧光成像,比较 2 次成像结果即可得到非光化学淬灭突变体(图 4)。通过对 21 000 个 M₂ 代植株的筛选,共获得 37 个突变株,结合叶绿素荧光动力学测定和 PSI 氧化还原状态光吸收检测,对突变体做了详细研究,突变体被分为 3 类。其中,第 1 类由于 F_0 升高,而造成 F_v/F_m 大幅降低,高光强下荧光水平会降到 F_0 以下,此类突变一般由 PSII 缺陷造成;第 2 类则 F_v/F_m 与野生型相比变化不大, Φ_{PSII} 、 Φ_{PSI} (通过测量 PSI 氧化还原状态光吸收变化计算得到)也没有受到太大影响,而作用光增强时,荧光淬灭大幅降低,而第 3 类 Φ_{PSII} 或 Φ_{PSI} 受到严重影响,在低光强下即表现出荧光淬灭能力降低,第 2 和第 3 类的区别主要在于第 2 类只在高光强下荧光淬灭能力下降,而低光强下与野生型没有太大区别。Shikanai 等^[40]所得到的突变体与 Meurer 等^[37]的有所不同,他在筛选前剔除了苗期致死突变,而且在得到光化学淬灭突变体的同时,通过改变作用光强,也得到了非光化学淬灭突变体。

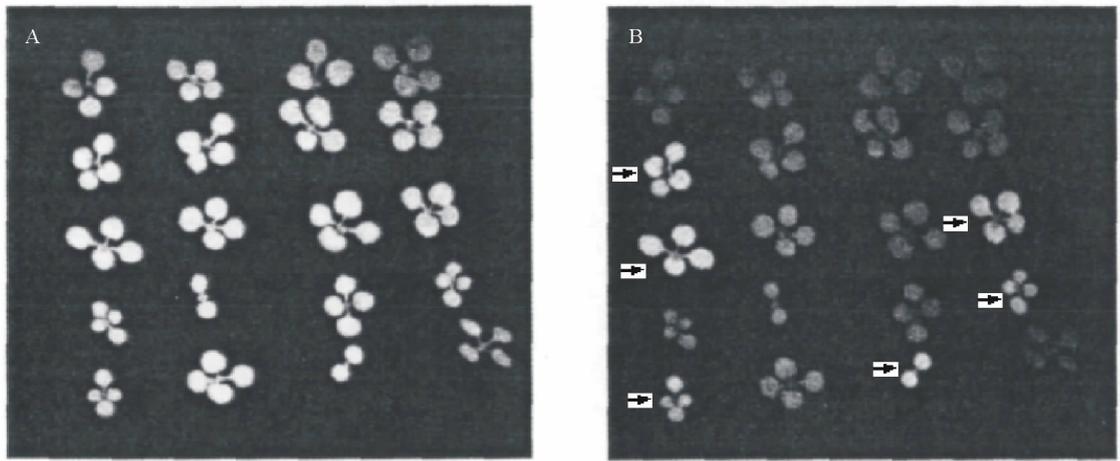


图 4 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光化光照射 (A) 和 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光化光照射 2 min (B)^[40]

Fig. 4 Photograph in 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ active light (A) and B photograph in 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ after 2 min (B)

箭头所指为非光化学淬灭突变体 Arrow indicate the mutant

从对已获得高叶绿素荧光突变体研究发现,突变几乎涉及光合作用的各个方面。例如,玉米 *HCF60* 突变体,由 *Ac* 转座子插入突变引起,被破坏基因编码叶绿体核糖体小亚基蛋白 17,突变体由于叶绿体核糖体缺陷,使叶绿体 DNA 编码基因翻译受阻,叶绿体发育障碍,正常情况下突变体不能光合自养,苗期致死。同样是玉米高叶绿素荧光突变体,而 *HCF106* 突变影响叶绿体膜系统发育,突变体呈浅绿色,不能光合自养,萌发后 3 周死亡^[41]。作为模式植物的拟南芥,在光合功能的研究中得到了更广泛的应用,通过系统筛选已获得了大量突变体,并且到目前为止,已经对约 15 个高叶绿素荧光突变体进行了刻画,鉴定的基因参与了叶绿体生物发生各个水平的调节^[14]。例如,突变体 *HCF107*,被破坏的基因参与叶绿体 RNA 加工过程,结果 *psbB*、*psbH* 基因表达受到影响,造成 PSII 发育缺陷^[42]。在 *HCF173* 中 PSII 核心蛋白 D1 相对野生型显著减少,核糖体对编码 D1 蛋白的 *psbA* mRNA 的起始翻译减少,突变基因编码蛋白是一个与叶绿体膜系统相关的高分子复合体组分,这一高分子复合体与 *psbA* mRNA 加工成熟有关^[43]。在拟南芥另外一个突变体 *HCF145* 中,由于 *psaA-psaB-rps14* 翻译受到影响,因此光系统 PSI 缺陷^[44]。在突变体 *HCF153* 中,细胞色素 b_6/f 复合体含量相比野生型减少,光合电子传递受阻造成高叶绿素荧光表型,该突变体由 T-DNA 插入引起,突变基因编码一个分子量为 15 kDa 的叶绿体蛋白,该蛋白可能参与细胞色素 b_6/f 复合体发生过程的翻译后修饰^[45]。

在国内, Peng 等^[46]对拟南芥 T-DNA 插入突变体库高叶绿素荧光突变体进行筛选,共获得大约 90 个性状不同的隐性突变体,其中有 3 个得到了详细研究并克隆了相应突变基因。其中 *lpa1* 编码蛋白与 D1 作用,定位于类囊体膜,以分子伴侣的形式参与 PSII 有效组装^[46]。*lpa2* 突变基因编码一个类囊体膜内在蛋白,与 PSII 核心蛋白 CP43 作用,协助 CP43 对 PSII 的组装^[47]。

2.2 根据叶绿素荧光参数筛选突变体

以高叶绿素荧光作为筛选标准,所得到的突变体大都光合过程受到严重影响,不能光合自养,而在光合突变中也有许多突变只是轻微改变光合过程的某些方面,正常环境下不至于引起明显的叶绿素荧光变化,突变只是造成某些荧光参数的轻微改变,对此类突变体,可以用特定荧光参数为标准加以筛选^[30]。在筛选中,用以描述非光化学淬灭的参数 *NPQ* 和光化学淬灭参数 Φ_{PSII} 较为常用。

2.2.1 以非光化学淬灭参数 *NPQ* 为筛选标准

Niyogi 等^[48]以 *NPQ* 为参数,做了莱茵哈德衣藻光合突变体筛选工作。在筛选前,材料的培养环境光强为 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,筛选光强采用 1 00 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,这一高光强几乎使光化学淬灭饱和,因此大部分叶绿素荧光淬灭,由非光化学淬灭引起。以一定的时间间隔拍照,由计算机处理形成 *NPQ* 参数的伪彩色图像,对比随光照进程变化的伪彩色图像,筛选出非光化学淬灭突变体。在获得非光化学淬灭突变体后,使用 PAM 荧光仪做具体的非光化学淬灭诱导分析,突变体被分辨成 4 类:非光化学淬灭诱

导第 1 段降低($npq4$)、第 2 段降低($npq1$)、2 个阶段同时降低($npq2$ 、 $npq11$)和与野生型相比非光化学淬灭升高 4 类,各种类型由不同突变造成^[24]。Niyogi 等^[48]用同样的方法,也以拟南芥为材料作了筛选工作,共鉴定出 13 个 NPQ 发生变化的突变体。

在非光化学淬灭的形成机制上,叶黄素循环被认为与光合机构对过剩光能的调节密切相关,莱茵哈德衣藻和拟南芥 NPQ 突变体的获得证实了这一理论。在莱茵哈德衣藻突变体 $npq1$ 中,紫黄质脱环氧化酶被破坏,紫黄质无法转变成单环氧玉米黄质和玉米黄质,而 $npq2$ 中,则缺乏玉米黄质环氧化酶,玉米黄质向紫黄质的转化被阻断,这 2 个突变都造成了叶黄素循环的破坏,最终影响到了非光化学淬灭 NPQ 的形成。拟南芥 $npq1$ 、 $npq2$ 突变体与莱茵哈德衣藻突变体成因一致,同样由缺失紫黄质脱环氧化酶和玉米黄质环氧化酶造成。

2.2.2 以 PSII 实际光化学量子效率 Φ_{PSII} 参数为筛选标准 除 NPQ 外,其他叶绿素荧光参数也被用来作为筛选标准。Varotto 等^[30]以 PS II 实际光化学量子效率 Φ_{PSII} 为参数,对拟南芥 T-DNA 和 En 插入突变体库做了筛选。他的检测没有采用叶绿素荧光成像技术,而是使用一个带有自动控制装置的系统,检测每株植物的叶绿素荧光。植株在经过 $200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光化光适应后,稳态荧光 F_s 被记录,然后照以饱和脉冲光,得到光适应状态下的最大荧光 F_m' ,计算出 Φ_{PSII} 。在对 En 插入突变体库 2 700 个株系中的筛选中,得到 13 个 Φ_{PSII} 减小的株系,在 47 000 个 T-DNA 插入株系中,筛到 35 个 Φ_{PSII} 减小的株系。在这些突变体中,有 3 个基因被鉴定为编码蛋白定位于叶绿体,其中,*chaos* 突变体的 CAO 基因是被 En 转座子插入破坏,在另外一个突变体中,编码 PSI 的 E 亚基蛋白 *PSAE1* 基因也是被 En 破坏,第 3 基因由 T-DNA 插入引起,该基因编码血红素氧化酶蛋白 HO1。

在植物的生境中,对高光强的适应能力,是影响光合功能的重要方面,过高的光强会引起光抑制,植物长时间处在高光强下甚至发生光氧化、光漂白,而且往往伴随其他生境因子(例如中午的高温)共同作用更加重了光抑制。完善的光能调节机制使植物能够及时改变光合机构状态,避免或减轻高光强所带来的伤害,然而相关基因突变会改变植物的光能调节利用途径,造成植物对高光强适应能力下降,最终导致光合效率降低,甚至光合机构被破坏。在有关这类突变体的筛选中,Walters^[49]以 Φ_{PSII} 为参数,以拟南芥 T-DNA 插入突变体库为材料,利用叶绿素荧光成像技术,做了光强适应能力发生变化突变体筛选的工作。在筛选过程中,植株先被培养在低光强($100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)下 14 d,移至高光强($400 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)下 3 d,培养前后,分别检测光适应($250 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, 15 min)状态下的 Φ_{PSII} ,比较高光强处理前后 Φ_{PSII} 的荧光成像,筛选出光适应能力变化的突变株,最终从 30 000 个植株中共得到 51 个突变体。通过分离插入位点侧翼序列发现,其中被命名为 *ape1* 的突变体,被破坏的基因编码一个未知功能蛋白,据预测这一蛋白与光合机构有关,另外一个突变体 *ape2*,TPT 基因被破坏,该基因编码位于叶绿体内膜的磷酸丙糖易位子蛋白。

2.3 根据具体光合过程改变筛选符合预期叶绿素荧光变化的突变体

用叶绿素荧光技术筛选光合突变体时,关键在于突变体和野生型叶绿素荧光的差异。突变体可以直接表现为高叶绿素表型,也可以通过构造的具体荧光参数来区分突变体和野生型。另外也可以根据具体光合过程特性,以及对叶绿素荧光产生的影响,筛选出叶绿素荧光变化符合预期的突变体。在这方面,Kruse 等^[50]所做的莱茵哈德衣藻 state2 向 state1 转变受阻突变体筛选就是范例^[50]。在光系统中,PSII、PSI 可以根据光质及光强变化调节光能在 2 个光系统的分配。在远红光照射下,PSI 叶绿素 a 对光能吸收占优势,PSI 将吸收的过剩光能向 PSII 分配,此时的状态称为状态 1(state1),与状态 1 相反,当光源以短波光为主的情况下,PSII 对光能吸收占优势,光能向 PSI 分配,称为状态 2(state2)。在 state2 下,光合电子传递链的质醌库被还原,PSII 吸收光能过剩,造成 PSII 集光复合体(LHCII)蛋白激酶激活,磷酸化 LHCII 复合体,LHCII 与 PSII 中心复合体解离,使 PSII 吸收的光能减少^[51],而且解离的 LHCII 进一步从分布集中的基粒类囊体向间质类囊体迁移,使 PSII 叶绿素 a 减少,最后造成 PSII 叶绿素荧光产量减少,而 state1 则刚好相反。因此根据状态转换中叶绿素荧光变化的特点,筛选叶绿素荧光增加的克隆即为 state2 向 state1 转变受阻突变体^[52]。Kruse 等^[50]通过对 2×10^4 个莱茵哈德衣藻克隆的筛选,确定了 5 个状态转换突变克隆,对其中一个命名为 *stm1* 的突变克隆研究发现,与野生型相比该克隆的集光复合体 LHCII 磷酸化水平显著降低,而 LHCII 磷酸化是保证 state2 向 state1 转化的重要反应。

3 结语

光合突变体筛选中,以前的方法多采用探测样品的 CO₂ 固定能力变化来确定突变体^[53],这对于象莱茵哈德衣藻这样的小个体生物,可以利用放射性标记,通过放射显影的办法,尽可能减少工作量,然而对于植物,工作量巨大,筛选的可操作性差。叶绿素荧光筛选技术的发明,使这一工作变得高效而且简便^[38],并且经过许多研究者的努力,筛选的理论和技术的日趋成熟,并且用于测定的荧光仪也不断得以改进,不断向小型化和智能化发展,使测定更加容易和便捷,尤其叶绿素荧光成像技术的发明,使得应用叶绿素荧光参数精确、大规模筛选突变体成为可能。然而,叶绿素荧光技术虽然获得了很好的发展,但在应用时,除高叶绿素荧光突变体的筛选相对简单外,通过叶绿素荧光参数筛选突变体则相对困难,因为叶绿素荧光成像仪造价昂贵,并不普及,而且对使用者有很高要求,否则,所测数据将很难得到合理解释。除此以外,现有的叶绿素荧光技术筛选方法是建立在当前对光合作用理解的程度上的,因此,所采用的荧光参数只反映当前进展,而影响光合作用的因素是复杂多样的,因此光合突变的获得并不可能由一种方法完成,需要其他方法补充,也可以通过鉴别叶绿素或生活力变化来辅助筛选。将来随着光合作用研究的不断进展,利用叶绿素荧光技术筛选突变体的理论和方法会得到不断的完善,并且在光合作用研究中发挥更重要的作用。

参考文献:

- [1] Govindjee. Sixty-three years since kautsky: Chlorophyll a fluorescence[J]. Australia Journal of Plant Physiology, 1995, 22: 131-160.
- [2] 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.
- [3] Crofts A R, Yerkes C T. A molecular mechanism for qE-quenching[J]. Federation of European Biochemical Societies, 1994, 352: 265-270.
- [4] Dau H. Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence[J]. Photochemistry and Photobiology, 1994, 60: 1-23.
- [5] Kooten O V, Jan F H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress[J]. Physiology Photosynthesis Research, 1990, 25: 147-150.
- [6] Maldonado R R, Pavlov S, Gonzalez A, *et al.* Can machines recognize stress in plants[J]. Environmental Chemistry Letters, 2003, 1: 201-205.
- [7] 陈建明, 俞晓平, 程家安. 叶绿素荧光动力学及其在植物抗逆生理研究中的应用[J]. 浙江农业学报, 2006, 18(1): 51-55.
- [8] 周蕴薇, 刘艳萍, 戴思兰. 用叶绿素荧光分析技术鉴定植物抗寒性的剖析[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(5): 945-950.
- [9] Pintoa F L, Oliveira J G, Cunha M D, *et al.* Chlorophyll a fluorescence and ultrastructural changes in chloroplast of water hyacinth as indicators of environmental stress[J]. Environmental and Experimental Botany, 2008, 64: 307-313.
- [10] Keranen M, Aro E M, Tyystjarvi E, *et al.* Automatic plant identification with chlorophyll fluorescence fingerprinting[J]. Precision Agriculture, 2003, 4: 53-67.
- [11] Moya I, Camenen L, Evain S, *et al.* A new instrument for passive remote sensing: 1. Measurements of sunlight-induced chlorophyll fluorescence[J]. Remote Sensing of Environment, 2004, 91: 186-197.
- [12] Meroni M, Colombo R. Leaf level detection of solar induced chlorophyll fluorescence by means of a subnanometer resolution spectroradiometer[J]. Remote Sensing of Environment, 2006, 103: 438-448.
- [13] Zarco P, Miller J, Mohammed G, *et al.* Chlorophyll fluorescence effects on vegetation apparent reflectance: I. Leaf-level measurements and model simulation[J]. Remote Sensing of Environment, 2000, 74: 582-595.
- [14] 马今芳. 拟南芥高叶绿素荧光突变体筛选及 PPT1 基因功能研究[D]. 兰州: 兰州大学博士学位论文, 2006. 4-9.
- [15] Pesaresia P, Varottoa C, Richlyb E, *et al.* Functional genomics of *Arabidopsis* photosynthesis[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2001, 39: 285-294.
- [16] 张峰, 王玉萍, 黄惠英. T-DNA 插入对拟南芥突变体色素和内囊体膜色素蛋白复合物的影响[J]. 草业学报, 2008, 17(5): 145-150.
- [17] Oxborough K. Imaging of chlorophyll a fluorescence: Theoretical and practical aspects of an emerging technique for the moni-

- toring of photosynthetic performance[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55: 1195-1205.
- [18] Lichtenthaler H K, Buschmann C, Knapp M. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RFd of leaves with the PAM fluorometer[J]. *Photosynthetica*, 2005, 43: 379-393.
- [19] 李鹏民, 高辉远, Strasser R J. 快速叶绿素荧光诱导动力学分析在光合作用研究中的应用[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31(6): 559-566.
- [20] Maxwell K, Johnson G N. Chlorophyll fluorescence- a practical guide[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51: 659-668.
- [21] 李晓, 冯伟, 曾晓春. 叶绿素荧光分析及应用进展[J]. *西北植物学报*, 2006, 26(10): 2186-2196.
- [22] 彭长连, 林桂珠. 拟南芥叶黄素缺失突变体叶绿素荧光猝灭的特性[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30(2): 251-256.
- [23] Horton P, Ruban A V, Walters R G. Regulation of light harvesting in green plants: Indication by non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence[J]. *Plant Physiology*, 1994, 106: 415-420.
- [24] Niyogi K K, Bjorkman O, Grossman A R. *Chlamydomonas* xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching[J]. *The Plant Cell*, 1997, 9: 1369-1380.
- [25] Ruban A V, Horton P. Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants[J]. *Australia Journal of Plant Physiology*, 1995, 22: 221-230.
- [26] Muller P, Li X P, Niyogi K K. Non-photochemical quenching: A response to excess light energy[J]. *Plant Physiology*, 2001, 125: 1558-1566.
- [27] 胡守林, 万素梅, 贾志宽. 黄土高原半湿润区不同生长年限苜蓿叶片光合性能研究[J]. *草业学报*, 2008, 17(5): 60-67.
- [28] 薛延丰, 刘兆普. 外源钙离子缓解海水胁迫下菊芋光合能力下降的研究[J]. *草业学报*, 2007, 16(6): 74-80.
- [29] Somerville C R. Analysis of photosynthesis with mutants of higher plants and algae[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1986, 37: 467-507.
- [30] Varotto C, Pesaresi P, Maiwald D, *et al.* Identification of photosynthetic mutants of *Arabidopsis* by automatic screening for altered effective quantum yield of photosystem 2[J]. *Photosynthetica*, 2000, 38(4): 497-504.
- [31] Gothandam K M, Kim E S, Cho H, *et al.* OsPPR1, a pentatricopeptide repeat protein of rice is essential for the chloroplast biogenesis[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 58: 421-433.
- [32] Austin II J, Webber A N. Photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants with reduced chloroplast number[J]. *Photosynthesis Research*, 2005, 85: 373-384.
- [33] Miyoshi K, Ito Y, Serizawa A, *et al.* OsHAP3 genes regulate chloroplast biogenesis in rice[J]. *The Plant Journal*, 2003, 36: 532-540.
- [34] Mandel M A, Feldmann K A, Herrera E L, *et al.* CLA 1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution[J]. *The Plant Journal*, 1996, 9(5): 649-658.
- [35] Walker M B, Roy L M, Coleman E, *et al.* The maize *tha4* functions in sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to *hcf106* *tatA*, and *tatB*[J]. *Journal of Cell Biology*, 1999, 147: 267-276.
- [36] Fisk D G, Walker M B. A molecular cloning of the maize gene *crpl* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression[J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18: 2621-2630.
- [37] Meurer J, Meierhoff K, Westhoff P. Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterization by spectroscopy, immunoblotting and Northern hybridization[J]. *Planta*, 1996, 198: 385-396.
- [38] Bennoun P, Levine R P. Detecting mutants that have impaired photosynthesis by their increased level of fluorescence[J]. *Plant Physiology*, 1967, 42: 1284-1287.
- [39] Heck D A, Miles D, Chitnis P R. Characterization of two photosynthetic mutants of maize[J]. *Plant Physiology*, 1999, 120: 1129-1136.
- [40] Shikanai T, Munekage Y, Shimizu K, *et al.* Identification and characterization of *Arabidopsis* mutants with reduced quenching of chlorophyll fluorescence[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1999, 40(11): 1134-1142.
- [41] Das L, Martienssen R. Site-selected transposon mutagenesis at the HCF106 locus in maize[J]. *The Plant Cell*, 1995, 7: 287-

294.

- [42] Felder S, Meierhoff K, Sane A P, *et al.* The nucleus-encoded HCF107 gene of arabidopsis provides a link between intercistronic RNA processing and the accumulation of translation-competent psbH Transcripts in Chloroplasts[J]. *The Plant Cell*, 2001, 13: 2127-2141.
- [43] Schult K, Meierhoff K, Paradies S, *et al.* The nuclear-encoded factor HCF173 is involved in the initiation of translation of the psbA mRNA in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19: 1329-1346.
- [44] Lezhneva L, meurer J. The nuclear factor HCF145 affects chloroplast psaA-psaB-rps14 transcript abundance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 2004, 38: 740-753.
- [45] Lennartz K, Bossmann S, Westhoff P, *et al.* HCF153, a novel nuclear-encoded factor necessary during a post-translational step in biogenesis of the cytochrome b₆f complex[J]. *The Plant Journal*, 2006, 45: 101-112.
- [46] Peng L W, Ma J F, Chi W, *et al.* Low PSII accumulation 1 is involved in efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18: 955-969.
- [47] Ma J F, Peng L W, Guo J K, *et al.* LPA2 is required for efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19: 1980-1993.
- [48] Niyogi K K, Grossman A R, Björkman O. *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion[J]. *The Plant Cell*, 1998, 10: 1121-1134.
- [49] Walters R G, Shephard F, Rogers J M, *et al.* Identification of mutants of arabidopsis defective in acclimation of photosynthesis to the light environment[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131: 472-481.
- [50] Kruse O, Nixon P J, Schmid G H, *et al.* Isolation of state transition mutants of chlamydomonas reinhardtii by fluorescence video imaging[J]. *Photosynthesis Research*, 1999, 61: 43-51.
- [51] Allen J F. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, 1098: 275-335.
- [52] 许大全. 光合作用效率[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002. 29-31.
- [53] Levine R P. A screening technique for photosynthetic mutants in unicellular algae[J]. *Nature*, 1960, 188: 339-340.

Application of a chlorophyll fluorescence technique for screening photosynthetic mutants

GUO Yu-peng¹, ZHENG Xia², WANG Xin-yu¹, CAO Zi-yi^{1,3}

(1. School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205, China; 3. School of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: As a basic technique in photosynthetic research, chlorophyll fluorescence is an important way to screen photosynthetic mutants. Many mutants have been isolated using this technique, and some genes have been identified in recent years. At the same time, screening method theories have also been developed with the accumulation of knowledge on photosynthesis. The development of screening technology is discussed in this article.

Key words: chlorophyll fluorescence technique; screening mutant; application