调制式荧光影像新技术：叶片内部最大光化学量子效率及其异质性的活体测定

樊大勇* 付增娟 谢宗强 李荣贵 张淑敏

中国科学院植物研究所植被与环境变化国家重点实验室, 北京 100093

摘要 研究叶片内部光合能力及其异质性, 是光合作用生化模型、光抑制机理、光保护机理等光合生理生态热点问题的重要前提, 但目前缺少可以进行活体测定的装置。该文作者对Vogelmann和Evans (2002)的装置进行了改进, 获得了叶片内部光系统II (PSII)最大光化学量子效率(F_v/F_m)及其异质性影像, 并采用基于Matlab软件自编的图像处理程序对其进行了分析, 研究了不同时间光抑制处理导致的叶内 F_v/F_m 及其异质性的变化。研究发现: 叶片内部不同层叶肉组织 F_v/F_m 存在异质性。强光照射导致叶片内部不同层叶肉组织 F_v/F_m 值下降, 但靠近上表皮的栅栏组织具有较强的抗光抑制能力。光抑制导致叶片内部 F_v/F_m 异质性的变化, 短期光抑制导致 F_v/F_m 异质性变大, 这可能与部分叶绿体避光运动相关, 长期光抑制导致 F_v/F_m 异质性变小, 说明叶绿体避光运动这种光保护机制已经失效。相比于其他类型叶绿素荧光仪, 此装置可以完整获得活体叶片内部 F_v/F_m 及其异质性影像数据, 这对于系统研究叶片内部光合能力及其异质性机制, 以及为进一步研究一些光合生理生态热点问题提供了有力工具, 具有进一步研发和应用的前景。

关键词 菠菜; 叶绿素荧光影像; 光抑制

引用格式: 樊大勇, 付增娟, 谢宗强, 李荣贵, 张淑敏 (2016). 调制式荧光影像新技术: 叶片内部最大光化学量子效率及其异质性的活体测定. 植物生态学报, 40, 942–951. doi: 10.17521/cjpe.2016.0001

A new technology of modulated Chl a fluorescence image: *In vivo* measurement of the PSII maximum photochemical efficiency and its heterogeneity within leaves

FAN Da-Yong*, FU Zeng-Juan, XIE Zong-Qiang, LI Rong-Gui, and ZHANG Shu-Min

State Key Laboratory of Vegetation and Environmental Change, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract

The spatial photosynthetic heterogeneity within leaves is an important prerequisite for the studies on the photosynthetic model, the mechanism(s) of photoinhibition and light protection, *etc.* However, currently the *in vivo* measurement of the spatial photosynthetic heterogeneity within leaves is difficult. The present study improved the device assembled by Vogelmann & Evans (2002), thereby acquired the photosystem II (PSII) maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) images within leaves. Finally, these images were processed and data of F_v/F_m and its spatial variations could be obtained, with the aid of MATLAB software. Based on the innovative technique, an investigation of the effects of strong light on the F_v/F_m and its spatial heterogeneity within leaves has been carried out. It was found that F_v/F_m within leaves was not homogenous. Strong light led to a general decrease of F_v/F_m (PSII photoinhibition) across leaf section, and the palisade tissue close to the epidermis layer had high tolerance to photoinhibition. Compared with control, short-term photoinhibition caused a larger spatial variation of F_v/F_m within leaves, which may be related to the chloroplast-avoidance response induced by high-fluence. On the contrary, long-term light inhibition led to a smaller spatial variation of F_v/F_m within leaves, indicating such mechanism is no longer effective. Compared to other types of chlorophyll fluorometer, the device in the present study can *in vivo* obtain the panoramic picture of F_v/F_m within leaves, providing a powerful tool for the studies on the mechanism(s) attributed to the spatial heterogeneity of photosynthetic capacity of leaf, which is critical for the understanding on several hot spots in the research field of photosynthesis.

Key words *Spinacia oleracea*; chlorophyll fluorescence image; photoinhibition

收稿日期Received: 2016-01-03 接受日期Accepted: 2016-07-19
* E-mail: fandayong@ibcas.ac.cn

Citation: Fan DY, Fu ZJ, Xie ZQ, Li RG, Zhang SM (2016). A new technology of modulated Chl a fluorescence image: *In vivo* measurement of the PSII maximum photochemical efficiency and its heterogeneity within leaves. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 40, 942–951. doi: 10.17521/cjpe.2016.0001

叶片水平的光合能力及其异质性一直是植物生理生态研究的热点。除叶面水平方向存在光合能力异质性外, 叶片内部不同层组织之间也存在光合能力异质性。不同层组织存在结构和生理功能上的分化, 以确保叶片整体光合能力的最优化。比如, 已有研究表明对典型异面叶而言, 栅栏组织趋向“阳生”特点而海绵组织趋向“阴生”特点(Terashima & Inoue, 1985), 这明显与叶片内部光梯度相耦合(Vogelmann & Bjorn, 1984), 说明在自然光照条件下不同叶肉组织处于相对适宜的光环境下。研究叶片内部光合能力及其异质性是光合作用生化模型、光抑制机理、光保护机理等重要光合生理生态热点问题的重要前提, 比如一些经典光合作用模型(如Farquhar *et al.*, 1980)通过气体交换测定结果, 结合一些简化假设, 获得一些重要的反映叶片生化活性的参数, 因此可以用来描述叶片的光合特征。然而, 所获得的这些参数均假设叶片内部各组织之间的生化活性是匀质的, 且光分布在叶片内部也是均匀的。考虑到叶片内部的光合能力异质性(Terashima & Inoue, 1985), 这种假设显然是不正确的。

强光会导致光系统II (PSII)的光失活(光抑制), 严重的光抑制会导致植物碳同化受抑制从而降低了其对环境的适应能力(Tyystjarvi, 2013)。植物发展了多种光保护机制以缓解光抑制导致的光合能力下调(比如光下失活的PSII会积极修复), 从而部分抵消了光抑制伤害(Tyystjarvi, 2013)。对光抑制和光保护机理的深入研究可以为增强植物抗逆能力提供重要的理论参考, 而这方面的研究也必须考虑叶片内部光合能力及其异质性。理论认为, 由于叶片内部不同层次组织接受的光强不同, 并且其光合能力不同, 因此强光下叶片内部不同组织PSII的光失活程度也会不同。但是由于技术限制的原因, 这种叶片内部光失活梯度很少有相关报道。有关PSII光失活程度的非损伤测定, 通常采用叶绿素荧光参数中的最大光化学量子效率(F_v/F_m)来表征(Baker, 2008), 其中 F_v 是最大可变叶绿素荧光产量, $F_v = F_m - F_o$ 。 F_o 是所有开放的PSII中心不发生光化学反应时的最小叶绿素荧光产量, F_m 是所有开放的PSII中心关闭时产生的最大叶绿素荧光产量。

普通调制式荧光仪(如PAM)以及连续式植物效能分析荧光仪(PEA)均不能探测光抑制导致的叶片内部 F_v/F_m 及其异质性的变化情况(表1)。PAM仅收集叶上表面(远轴面, adaxial side)或下表面(近轴面, abaxial side)的荧光, 这是因为其测量光光强很低($20\text{--}30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 无法达到叶片内部较深的组织。而PEA尽管测量光强非常高($3\ 000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 其反映的仅是叶片整体水平的 F_v/F_m 。Schreiber等(1996)和Oguchi等(2011)采用微光纤PAM荧光仪探测了在强光照射下叶片内部光失活梯度。微光纤PAM荧光仪的工作原理是采用调制锁相放大方式, 用一根微光纤(直径 $40 \mu\text{m}$ 左右)结合步进电机控制的显微操作手将光纤插入叶片不同位置, 测量光和饱和光通过微光纤获得不同层次的 F_v/F_m 。他们的研究均发现强光照射后栅栏组织PSII光失活程度大, 海绵组织PSII光失活程度小。并且, 这种光失活梯度与入射光的波长相关, 表明光抑制可能受过剩光能机制(Osmond, 1994)和锰簇受损机制(Hakala *et al.*, 2005)共同作用。

然而, 这两个研究报道仍有一定的局限性。首先, Oguchi等(2011)采用了lincomycin处理叶片消除了光下光失活PSII的修复机制, 因此其研究结果仅反映了没有修复机制存在的情况下叶内部光失活PSII梯度。自然情况下由于修复机制的存在, 叶内部“净”光失活PSII梯度可能不一样。且栅栏组织趋向“阳生”特点, 而研究表明阳生叶片的光修复能力强(Aro *et al.*, 1993)。事实上, 有研究表明阳生叶片与阴生叶片光失活速率相似, 而两者的光修复速率却有显著差异(Aro *et al.*, 1993)。此外, 光失活PSII的光下修复能力与光强明显相关, 一定光强范围内光强越强光修复能力越高(Hu *et al.*, 2013)。这些研究结果均说明在存在光修复的情况下, 叶内部“净”光失活PSII梯度可能与无修复情况不一样。Schreiber等(1996)采用 $5\ 000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的强光照照射浸入水中的叶片, 以测定叶片内部的光失活PSII梯度, 如此高的光强和缺少气体交换途径均会极大地抑制光失活PSII的修复过程(Hu *et al.*, 2013), 因此, 也存在以上提及的局限性。

其次, 微光纤PAM荧光仪属于点式荧光仪, 只

doi: 10.17521/cjpe.2016.0001

能测定某一点的叶绿素荧光参数, 由于无法获得叶片内部叶绿素荧光影像, 也就无法获得完整的叶片内部光合能力异质性(表1)。叶绿素荧光影像仪(如IMAGING PAM)可以获得叶面水平方向的光合能力异质性, 但由于分辨率的原因, 该类仪器无法获得叶片内部叶绿素荧光影像(表1)。事实上, 采用叶绿素荧光影像仪(IMAGING PAM)测定健康菠菜(*Spinacia oleracea*)叶片的 F_v/F_m 影像时, F_v/F_m 平均值为0.8的情况下, 会有最高值为0.94的影像区域, 说明沿水平方向存在 F_v/F_m 的异质性。Vogelmann和Evans (2002)发明了一种可以测定叶片内部的叶绿素荧光产量的装置, 但由于技术原因无法得到 F_v/F_m 异质性影像。

我们改进了Vogelmann和Evans (2002)的装置, 结合了PEA和IMAGING PAM的工作原理, 采用蓝色激光LED作为测量光和饱和光脉冲光源, 自制了

高速斩波器以获得调制测量光, 采用了荧光倒置显微镜的光路系统和电荷耦合成像(CCD)系统, 自行编写了基于Matlab软件的图像处理程序, 最终获得了叶片内部 F_v/F_m 异质性影像。我们用这套自制的仪器初步研究了强光导致的叶片内部 F_v/F_m 异质性的变化, 发现: 强光导致了叶片内部 F_v/F_m 梯度的整体下降; 存在修复的情况下, 靠近上表皮组织的栅栏组织具有更强的抵御光抑制的能力; 短时间强光导致 F_v/F_m 变异性的增大, 而长时间强光导致其减小。这些研究结果有助于进一步理解植物光合系统的光抑制和保护机制。

1 材料和方法

1.1 试验材料

采用温室种植的菠菜为试验材料。解剖学观察结果表明, 供试的菠菜叶平均厚度为570 μm (550–

表1 目前常见进行叶绿素荧光最大光化学量子效率(F_v/F_m)测定的荧光仪性能对比
Table 1 The comparison of current fluorometers which can measure maximum photochemical efficiency (F_v/F_m)

参数 Index	型号 Type			
	PAM101-102-103 ¹⁾	IMAGING-PAM	PEA	本仪器 This set-up
信号采集方式 Signal acquisition mode	调制-锁相放大 Lock-in amplifier	CCD连续采集 CCD continuous collection	光电连续采集 Photoelectric continuous collection	CCD连续采集 CCD continuous collection
荧光数据形式 Fluorescence data format	点式 Point	图像 Image	点式 Point	图像 Image
测量光光强 The measuring light intensity	20–30 ²⁾	10–1 000	3 000	1 000 ³⁾
测量光脉冲宽度 The measuring light pulse width	2 μs ⁴⁾	1.8 ms	2 s	160 μs
测量光周期 The measuring cycle duration	600 μs ⁵⁾	125–1 000 ms	NA	3.3 ms
测量光脉冲宽度在OJIP的位置 The position of the measuring light pulse in OJIP curve	O段 At O stage	接近J段 Close to J stage	NA	接近O段 Close to O stage
测量光占空比 The measuring light duty cycle	1/300	1.8/(125–1000)	NA	1/30
饱和光光强 Saturating light intensity ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	>3 000	800–1 200	3 000	1 000
测量光光强是否与饱和光光强一致 Is the measuring light intensity consistent with the saturating light intensity?	否 No	否 ⁶⁾ No ⁶⁾	是 Yes	是 Yes
可否得到叶水平面荧光异质性 Can the fluorescence image on the leaf surface be obtained?	否 No	可以 Yes	否 No	可以 ⁷⁾ Yes ⁷⁾
可否得到叶横截面荧光异质性 Can the fluorescence across leaf section be obtained?	否 No	否 ⁸⁾ No ⁸⁾	否 No	可以 ⁹⁾ Yes ⁹⁾
测量光和饱和光的均匀性 The uniformity of measuring and saturating light source	均匀 Uniform	一定范围内均匀 Uniform within a specific range	均匀 Uniform	均匀 ¹⁰⁾ Uniform ¹⁰⁾

1) PAM2100, Microscopic PAM, Dual PAM, Microfiber PAM均采用调制锁相放大模式; 2) 光强档位设在4–7之间; 3) 物镜放大倍数为4时; 4) 对于测量光脉冲宽度测定采用高灵敏度PIN光电二极管(LSSPD-2.5); 5) 调制频率为1.6 kHz; 6) 测量光光强可调, 最高档时与饱和光光强相同; 7) 当物镜放大倍数为4时, 可测定大约1 mm²的叶水平面荧光影像; 8) 空间分辨率低, 得不到厚度1 mm以下叶片的叶横截面荧光影像; 9) 当物镜放大倍数为4时, 可测定厚度约1 mm以下叶片的叶横截面荧光影像; 10) 测量光、饱和光、叶绿素荧光均从物镜通过, 保证了光的均匀性; 叶绿素荧光的诱导曲线OJIP的时间进程为: O 30 μs , J 2 ms, I 30 ms, P 1 s (Strasser *et al.*, 1995)。NA, 没有数据。

1) lock-in amplifier has been applied by PAM2100, Microscopic PAM, Dual PAM, as well as Microfiber PAM; 2) the range for light is set between 4–7; 3) the magnification of objective lens is 4 $\times$; 4) high sensitivity PIN photodiode (LSSPD-2.5) was used to measure the measuring light pulse width; 5) the modulation frequency is 1.6 kHz; 6) the measuring light intensity can be adjusted, the maximum is the same as the saturating light intensity; 7) when the magnification of the objective lens is 4, the leaf surface fluorescence image of about 1 mm² can be obtained; 8) the spatial resolution is too low to obtain fluorescence across leaf section with thickness less than 1 mm; 9) when the magnification of objective lens is 4 $\times$, the fluorescence image across leaf section with a thickness of less than 1 mm can be obtained; 10) because the measuring light, the saturating light and Chl a fluorescence all pass through the objective len, the uniformity of light thereby is guaranteed; The time course of the OJIP induction curve is O 30 s, J 2 ms, I 30 ms, P 1 s (Strasser *et al.*, 1995). NA, no data.

590 μm), 有明显异面叶特征, 栅栏组织平均厚度为320 μm (290–350 μm), 海绵组织平均厚度为240 μm (220–260 μm) (图3A)。采用PAM101-102-103系统(WALZ, Effeltrich Germany)和IMAGING PAM(WALZ, Effeltrich Germany)测定的 F_v/F_m 为0.79左右。

1.2 测量系统

我们参考并改制了Vogelmann和Evans (2002)的装置, 图1是测量装置原理示意图。测定叶片内部 F_v/F_m 装置由叶夹部分、光源部分、斩波器部分、电源部分、显微镜部分(Ti-E荧光倒置显微镜, Nikon, Tokyo, Japan)、计算机部分组成。待测叶片由叶夹固定, 放在显微镜载物台上, 叶片横截面朝向物镜; 入射调制测量光和饱和强光通过斩波器通光孔由光纤接入显微镜光路, 光路中的荧光激发块含二向分色镜, 激发端根据需要的入射光波长放置带通滤光片, 发射端放置长通滤光片(RG9, Schott, Jena, Germany)和滤热片以获取叶绿素荧光, 入射光通过物镜照射叶片横截面, 发射的荧光可通过目镜观察, 也可通过CCD采集; 光源由大功率恒流源提供稳定的电源, 斩波器由恒压源提供稳定的电源; 显微镜和CCD与计算机相连, 并由计算机控制荧光影像采集和处理。

采用1 W大功率蓝色激光二极管为调制测量光和饱和强光的光源(MTO-laserM-33A450-1000-G, Osram, Germany)。其波长为438 nm, 半峰宽小于3 nm, 具有极好的单色性(图2)。该激光器光强超过5 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 由于显微镜系统的分光板的分光效应和物镜的散光作用, 到达样品的光强为1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。我们采用了11 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的高速电机, 自制了高速斩波器, 获得了脉宽为160 μs , 周期为3.3 ms, 光强为1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的调制测量光。调制光的频率和脉冲宽度采用MD03024示波器(Tektronix, Johnston, USA)和LSSPD-2.5高灵敏度PIN光电二极管测定。采用调制方式获得测量光可以确保测量光(获得 F_0)与饱和光(获得 F_m)的光强一致, 这对于连续获得叶绿素荧光(如PEA和IMAGING PAM)以研究叶片内部光合能力及其异质性是非常重要的(Oxborough, 2004), 这是因为在非调制条件下, 如果测量光的光强低于饱和脉冲强光的光强, 两者探测的叶片深度不一样, 这会导致 $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ 中 F_0 和 F_m 反映了不同深度叶片的叶绿

素荧光, 所获得的 F_v/F_m 是不准确的。

由于脉宽已经超过了30 μs , 叶绿素荧光诱导曲线会出现上升现象(处于OJIP的O到J段)(Strasser *et al.*, 1995)。为研究自制的调制测量光是否导致 F_v/F_m 测定值偏低, 我们用PAM101-102-103测定了自制调制光照照射叶片1–10 min后的叶远轴方向 F_v/F_m 值变化情况。结果表明, F_v/F_m 平均下降了(2.33 $\pm$ 0.22)%, 在10 min内自制调制光对叶绿素荧光 F_v/F_m 的影响是平稳的, 不同时间下降程度没有显著区别($n = 12$, $F = 0.383$, $p = 0.768$)。对叶近轴方向进行同样的测定, 得到类似的结果。

1.3 获取沿叶横截面的荧光图像

参考Vogelmann和Evans (2002)的方法, 用锋利的双面刀片横切充分暗适应的待测叶片, 将切好的叶片固定在叶夹内, 并放置在显微镜载物台上, 叶片横截面朝向物镜, 对影像的放大倍数是40倍; 然后打开高速马达和激光光源, 产生调制光, 出现 F_0 。叶绿素荧光影像后, 进一步调焦使得叶绿素荧光影像清晰; 打开显微镜自带CCD进行影像记录, 记录时间为2 s, CCD曝光时间为400 ms, CCD敏感度为4倍, 获得 F_0 叶绿素荧光影像视频; 关闭高速马达, 使得入射强光从调制模式变为连续模式, 同时进行影像记录, 记录时间为2 s, CCD曝光时间为60 ms, CCD敏感度为4倍, 获得 F_m 叶绿素荧光影像视频。CCD的A/D转换位数为8位, 图像分辨率为800 $\times$ 560。每个样品的测定时间在2 min以内, 以尽量减少叶片因受切后生理活性变化产生的影响。固定叶片后的叶夹用湿纱布包裹以避免叶片失水。

1.4 获取沿叶横截面的 F_v/F_m 荧光图像

采用Matlab自编程序获得沿叶横截面的 F_v/F_m 荧光图像。具体步骤是: 首先对所获得的 F_0 和 F_m 影像视频进行逐帧图像的截获; 随后将RGB彩色图转换为灰度图; 第三, 对多个 F_0 和 F_m 图像进行每个像素点求平均(F_0 采用2 s视频图像的平均; F_m 采用第1.0–1.5 s的视频图像的平均(Strasser *et al.*, 1995); 第四, 采用矩阵运算方式对图像的每个像素点进行 F_v/F_m 求值(由于CCD暗电流的存在, 需要设置阈值以去除电子噪音干扰), 此处 F_0 图像要进行像素数值的重算, 这是因为 F_0 和 F_m 的曝光时间不同, 并且 F_0 是采用占空比为1/30的调制光获得; 第五, 进行假彩色运算, 获得沿叶横截面的 F_v/F_m 荧光假彩色图像(图4); 最后, 对图像每个像素的点灰度值

(F_v/F_m) 进行统计分析, 获得不同层叶肉组织的 F_v/F_m 异质性数据(图5-9)。为便于分析, 本研究将叶片分为10层, 每层厚度大约为57 μm 。

1.5 光抑制处理

采用蓝光LED阵列(波长为450 nm)进行光抑制

处理, 处理光强为1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 叶片以远轴方向面对光源距离大约为20 cm, 近轴方向浮在水上, 以避免处理过程中叶肉组织失水。由于LED为冷光源, 因此不会出现叶温过高现象。处理时间分别为1和3 h。处理后叶片立即放入湿纱布暗适应30 min后, 随后进行1.3和1.4节程序获得叶绿素荧光影像。

图1 仪器装置图。1 叶夹; 2 垫片; 3 叶片; 4 显微镜物镜; 5 入射调制测量光(用于测定 F_0)及饱和强光(用于测定 F_m); 6 蓝色激光LED; 7 斩波器(在测定 F_0 时打开, 产生调制测量光, 在测定 F_m 时关闭, 使得饱和强光通过); 8 恒流源; 9 显微镜二向分光镜; 10 叶绿素荧光; 11 短波截止滤光片(RG9); 12 显微镜自带CCD; 13 计算机。 F_0 , 暗适应状态下的最小荧光产量; F_m , 暗适应状态下的最大荧光产量。

Fig. 1 Block diagram of the experimental set-up of measurement of chlorophyll fluorescence yield within leaves. 1, leaf clip; 2, leaf pad; 3, leaf disk; 4, microscope objective; 5, incident modulated measuring light (for the determination of F_0) and saturate light (for the determination of F_m); 6, blue laser LED; 7, chopper (when turned on, modulated measuring light is created, for the determination of F_0 ; when turned off, continuous strong light is created, for the determination of F_m); 8, constant current source; 9, beam splitter; 10, chl a fluorescence; 11, short-wave cut-off filter (RG9); 12, charge coupled device (CCD); 13, computer. F_0 , minimum fluorescence yield in dark-adapted state; F_m , maximum fluorescence yield in dark-adapted state

图2 1 W大功率蓝色激光二极管的光谱。用AvaSpec-ULS2048×64光纤光谱仪(Avantes, Apeldoorn, the Netherlands)测定。

Fig. 2 Spectrum of 1 W high power blue laser diode. Measured by a fiber optic spectrometer AvaSpec-ULS2048×64 (Avantes, Apeldoorn, the Netherlands).

图3 本仪器设置的调制光对叶绿素荧光最大光化学量子效率(F_v/F_m)测定值的影响(平均值±标准偏差)。

Fig. 3 Effect of the current set-up of modulated measuring light on maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) values (mean $\pm$ SD).

图4 对照叶片和光抑制处理后沿叶横截面的最大光化学量子效率(F_v/F_m)异质性假彩色影像。A, 徒手切片。B, 0小时。C, 1小时。D, 3小时。

Fig. 4 The false color images of maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) across leaf section after photoinhibition. A, free-hand section showing the thickness of leaf. B, 0 h. C, 1 h. D, 3 h.

图5 对照叶片沿叶横截面的最大光化学量子效率(F_v/F_m)异质性。

Fig. 5 Maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) heterogeneity across leaf section of control leaf.

图6 光抑制1小时后叶片沿叶横截面的最大光化学量子效率(F_v/F_m)异质性。

Fig. 6 Maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) heterogeneity across leaf section of leaf with 1 hour photoinhibition.

2 结果和分析

图4是对照叶片的徒手切片显微照片和叶片内部的最大光化学量子效率(F_v/F_m)的假彩色影像。图4B–4D右下角的颜色条表明越趋近红色 F_v/F_m 值越高,越趋近蓝色 F_v/F_m 值越低,最大值设定为1,最

小值设定为0。从图4B可以看出对照叶片内部 F_v/F_m 均比较高,表明叶片内部各叶肉组织均处在正常的光合活性范围内。图4C是光抑制处理1 h后的 F_v/F_m 的假彩色影像,红色区域大幅减少,绿色区域大幅增加,说明叶片内部各叶肉组织出现了光合活性下降的趋势,也就是失活的PSII相对含量明显增加。

图7 光抑制3 h后沿叶横截面的最大光化学量子效率(F_v/F_m)异质性。

Fig. 7 Maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) heterogeneity across leaf section of leaf with 3 h photoinhibition.

有意思的是栅栏组织(叶片左边区域)有明显垂直叶水平方向的红色区域, 暗示栅栏组织部分叶绿体出现避光运动, 尽量靠近垂直叶水平方向区域以避免强光伤害。图4D是光抑制处理3 h后的 F_v/F_m 的假彩色影像, 基本已无红色区域, 而绿色区域占了大部分并且出现了蓝色区域, 表明叶片内部各叶肉组织出现了严重光抑制伤害, 并且栅栏组织不再出现明显垂直叶水平方向的红色区域, 暗示长期光抑制下叶绿体运动这种光保护机制已经失效。

我们对图4B–4D进行了进一步的数据提取和统计分析, 结果如图5–7。我们将叶片分为10层, 其中第一层为距远轴面57 μm 内的叶肉组织的 F_v/F_m 数据的汇总, 依此类推。对照叶片内部各层平均 F_v/F_m 值均在0.75以上(除第10层)(图5), 说明均处在正常光合活性范围内(本装置会低估 F_v/F_m 约2.33%)。但从数据频次分布来看, 各层组织均表现出略向右偏的正态分布, 说明存在相当的异质性。光抑制1 h (图6)和光抑制3 h (图7)后, 叶片内部各层平均 F_v/F_m 出现不同程度的下降, 说明出现了光抑制伤害。从数据频次分布来看, 各层组织也表现出略向右偏的正态分布, 说明光抑制处理下叶片内部各层 F_v/F_m 仍存在相当的异质性。

图8是对照与光抑制处理后叶片内部各层 F_v/F_m

图8 对照和光抑制处理后沿叶横截面的最大光化学量子效率(F_v/F_m)差异。

Fig. 8 Maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) curves across leaf section of the control and photoinhibited leaves.

平均值的对比。在1 h光抑制情况下沿叶片深度保持活性的PSII相对含量逐渐降低, 到海绵组织后(大约为第7–10层)又逐渐上升, 表现出U型曲线。靠近叶远轴方向(上表皮)的栅栏组织(第1层)具有相当强的抗光抑制能力, 表现在其 F_v/F_m 与对照无显著差异(ANOVA分析, $p > 0.1$)。在3 h光抑制情况下, 与对照相比所有层的叶肉组织均出现显著光抑制伤害(p 均小于0.001), 同样, F_v/F_m 梯度曲线表现出U型曲线。

图9 对照和光抑制处理后沿叶横截面的最大光化学量子效率(F_v/F_m)变异性(S.D.)。

Fig. 9 Maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) variability (S.D.) along the cross section of control and photoinhibited leaves.

3 h光抑制导致靠近叶近轴方向(下表皮)的海绵组织PSII“净”光失活程度最大。

我们进一步研究了对照与光抑制处理后叶片内部各层 F_v/F_m 方差(变异性)的变化。对照叶片 F_v/F_m 的变异性随叶片深度的增加而逐渐减小,到叶中部的某一层后逐渐增加,也呈U型曲线。总体而言,光抑制1 h导致叶片各层的叶肉组织 F_v/F_m 变异性显著增加(第9, 10层除外),而长时间光抑制则导致叶片各层的叶肉组织 F_v/F_m 变异性显著降低(第10层除外)。

3 讨论

3.1 靠近上表皮的栅栏组织具有较强的抗光抑制能力

Oguchi等(2011)和Schreiber等(1996)均发现光抑制处理下,没有修复机制的情况下,相对于海绵组织,栅栏组织受光抑制的伤害程度更大,叶片内部PSII光失活梯度表现出一种线性上升的趋势。然而,有研究表明栅栏组织趋向“阳生”,而海绵组织趋向“阴生”(Terashima & Inoue 1985)。而通常认为“阳生”叶片抵御强光伤害的能力要高于“阴生”叶片(Aro *et al.*, 1993)。进一步的研究表明“阳生”和“阴生”叶片其光失活的速率常数差异不大,但在光修复速率上存在很大差异(Fan *et al.*, 2015)。这些研究结果均暗示栅栏组织可能具有较强的抗光抑制能力。本研究结果表明存在修复的情况下(气体交换途径未被完全抑制,没有Lincomycin处理),越靠近远

轴端(上表皮)的叶肉组织其“净”光失活程度越低,证实了栅栏组织具有较强的抗光抑制能力。结合Oguchi等(2011)和Schreiber等(1996)的研究结果,这种抗光抑制能力可能与积极的受损PSII光修复能力相关。我们的研究结果还表明,越靠近近轴方向(下表皮)的海绵组织其净光失活程度也越低,这与Oguchi等(2011)和Schreiber等(1996)的研究结果类似,主要原因是叶片内部的光分布是一种指数下降的趋势。因此,越靠近近轴方向的叶肉组织所接受的光照也越弱(入射光从远轴方向照射叶片),从而导致其光抑制受损程度不如远轴方向的叶肉组织。此外,本研究采用蓝光作为光抑制的光源,有研究表明相对于红光和绿光,蓝光更容易被叶内浅层组织强烈吸收(Terashima *et al.*, 2009),导致这种指数下降的程度要高于红光和绿光,从而使得深层的叶肉组织接受的光强更弱,进而导致越靠近近轴方向(下表皮)的海绵组织其净光失活程度也越低。

3.2 强光抑制导致叶片内部 F_v/F_m 异质性的变化

本研究的另一个发现是对照叶片内部存在显著的 F_v/F_m 异质性,这与叶水平方向的叶绿素荧光异质性现象一致,但两者产生的原因可能不同。水平方向的叶绿素荧光异质性主要与气孔非均匀开闭相关(Baker, 2008),而叶片内部 F_v/F_m 异质性产生的原因则比较复杂。一种可能性是受切叶片的细胞质外泄导致的生理活性下降。但我们分析这种影响是有限的,这是因为受切叶片(未失水情况下)的平均 F_v/F_m 在数小时内并没有出现下降现象(未发表数据)。此外,如果存在这种影响,不同深度的叶肉组织的变异性应基本一致,而本研究结果却表明不同层组织的变异性存在较大差异(图9)。其他原因包括PSII反应中心的异质性,如非 Q_a 还原中心和非 Q_b 还原中心(Stresser *et al.*, 2004),活性和非活性反应中心(Cao & Govindjee, 1990),类囊体光合膜结构异质性(Melis, 1991; Danielsson *et al.*, 2004),以及光合机构发育阶段不同(Croxdale & Omasa, 1990)等原因。比如,研究发现70%–80%的PSII在类囊体垛叠区,剩余的PSII在垛叠区外周面向基质的区域内,与PSI的距离较短。因此相对于在垛叠区的PSII,这部分PSII受激发产生的电子流比较容易传递给PSI,相应降低了PSII还原侧积累过剩光能的可能性,也因此具有较高的最大光化学量子效率。

我们发现,短期光抑制导致 F_v/F_m 异质性变大,

尤其让人感兴趣的是栅栏组织有明显垂直叶水平方向的红色区域, 暗示栅栏组织部分叶绿体出现避光运动, 尽量靠近垂直叶水平方向区域以避免接受过多强光导致的光抑制伤害(图4) (Kagawa & Wada, 1999)。因此, 短期光抑制导致 F_v/F_m 异质性变大可能与部分叶绿体避光运动相关。由于通过避光运动减少了截获入射光能的面积进而减少了所吸收的光量, 这部分叶绿体可以保持相对较高的最大光化学量子效率, 因此导致 F_v/F_m 异质性变大。长期光抑制导致 F_v/F_m 异质性变小, 栅栏组织有垂直叶水平方向的红色区域这种现象消失, 说明长期光抑制情况下叶绿体运动这种光保护机制已经失去作用, 其他光保护机制如与叶黄素循环相关的非辐射热耗散途径、非线性电子流传递途径、积极的受损PSII的修复途径等, 逐渐起到主要作用。

3.3 结论

Vogelmann和Evans (2002)的装置仅可以测定叶片内部的叶绿素荧光产量, 而我们对其装置进行了改进, 参考了IMAGING PAM和PEA的工作原理, 设置了光强一样的调制测量光(用于测定 F_0)和饱和强光(用于测定 F_m), 采用了荧光倒置显微镜的光路系统和电荷耦合成像(CCD)系统, 自行编写了基于Matlab软件的图像处理程序, 最终获得了叶片内部最大光化学量子效率异质性影像。相比于微光纤PAM荧光仪, 本装置完整获得了活体叶片内部 F_v/F_m 的异质性数据。我们用这套自制的仪器初步研究了强光导致叶片内部最大光化学量子效率异质性的变化, 发现: 强光导致了叶片内部 F_v/F_m 梯度的整体下降; 存在修复的情况下, 靠近上表皮组织的栅栏组织具有更强的抵御光抑制的能力; 短时间强光导致 F_v/F_m 变异性的增大, 而长时间强光导致其减小。本装置对于系统研究叶片内部光合能力异质性, 以及为进一步研究一些光合生理生态热点问题提供了有力工具, 因而具有进一步研发和应用的前景。从研发角度而言, 可以采用电子调制方式缩短脉宽时间、增强 F_m 测定光光强、外加控制器以实现整台仪器的自动化测定、采用更高灵敏度和响应速度的CCD以获得OJIP曲线、采用面向用户的编程语言进一步可视化系统软件等多种措施, 以进一步提高测定精度和完善仪器功能。

基金项目 国家自然科学基金面上项目(31370424)和中国科学院知识创新工程项目(KZCX2-XB3-09)。

致谢 感谢北京林业大学高荣孚教授, 中国科学院植物研究所张守仁研究员和姜闯道研究员, 澳大利亚国立大学Wah Soon Chow教授的指导。

参考文献

- Aro EM, McMaffery S, Anderson JM (1993). Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances. *Plant Physiology*, 103, 835–843.
- Baker NR (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis *in vivo*. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 89–113.
- Cao J, Govindjee (1990). Chlorophyll a fluorescence transient as an indicator of active and inactive photosystem II in thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1015, 180–188.
- Croxdale JG, Omasa K (1990). Chlorophyll-a fluorescence and carbon assimilation in developing leaves of light-grown cucumber. *Plant Physiology*, 93, 1078–1082.
- Danielsson R, Albertsson PA, Mamedov F, Styring S (2004). Quantification, of photosystem I and II in different parts of the thylakoid membrane from spinach. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1608, 53–61.
- Farquhar GD, Caemmerer SV, Berry JA (1980). A biochemical-model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta*, 149, 78–90.
- Fan DY, Ye ZP, Wang SC, Chow WS (2015). Multiple roles of oxygen in the photoinactivation and dynamic repair of photosystem II in spinach leaves. *Photosynthesis Research*. doi: 10.1007/s11120-015-0185-y.
- Hakala M, Tuominen I, Keranen M, Tyystjarvi T, Tyystjarvi E (2005). Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1706, 68–80.
- Hu YY, Fan DY, Losciale P, Chow W, Zhang WF (2013). Whole-tissue determination of the rate coefficients of photoinactivation and repair of photosystem II in cotton leaf discs based on flash-induced P700 redox kinetics. *Photosynthesis Research*, 117, 517–528.
- Kagawa T, Wada M (1999). Chloroplast-avoidance response induced by high-fluence blue light in prothallial cells of the fern *Adiantum capillus-veneris* as analyzed by microbeam irradiation. *Plant Physiology*, 119, 917–923.
- Melis A (1991). Dynamics of photosynthetic membrane-composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1058, 87–106.
- Oguchi R, Douwstra P, Fujita T, Chow WS, Terashima I (2011). Intra-leaf gradients of photoinhibition induced by different color lights: Implications for the dual mechanisms of photoinhibition and for the application of conventional chlorophyll fluorometers. *New Phytologist*, 191, 146–159.
- Osmond CB (1994). What is photoinhibition? Some insights

- from comparisons of shade and sun plants. In: Baker NR, Bowyer JR eds. *Photoinhibition of Photosynthesis from Molecular Mechanisms to the Field*. BIOS Scientific Publishing, Oxford, UK. 1–24.
- Oxborough K (2004). Using chlorophyll a fluorescence imaging to monitor photosynthetic performance, In: Papageorgiou GC, Govindjee eds. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer Press, Dordrecht, The Netherland. 409–428.
- Schreiber U, Kuhl M, Klimant I, Reising H (1996). Measurement of chlorophyll fluorescence within leaves using a modified PAM fluorometer with a fiber-optic microprobe. *Photosynthesis Research*, 47, 103–109.
- Strasser RJ, Srivastava A, Govindjee (1995). Polyphasic chlorophyll-alpha fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 61, 32–42.
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou GC, Govindjee eds. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer Press, Dordrecht, the Netherland. 321–362.
- Terashima I, Fujita T, Inoue T, Chow WS, Oguchi R (2009). Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light: Revisiting the enigmatic question of why leaves are green. *Plant and Cell Physiology*, 50, 684–697.
- Terashima I, Inoue Y (1985). Palisade tissue chloroplasts and spongy tissue chloroplasts in spinach: Biochemical and ultrastructural differences. *Plant and Cell Physiology*, 26, 63–75.
- Tyystjärvi E (2013). Photoinhibition of photosystem II. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 300, 243–303.
- Vogelmann TC, Bjorn LO (1984). Measurement of light gradients and spectral regime in plant-tissue with a fiber optic probe. *Physiologia Plantarum*, 60, 361–368.
- Vogelmann TC, Evans JR (2002). Profiles of light absorption and chlorophyll within spinach leaves from chlorophyll fluorescence. *Plant, Cell & Environment*, 25, 1313–1323.

责任编辑: 彭长连 责任编辑: 李 敏

植物生态学报官网

微信订阅号
期刊及学科
相关信息发布

微信服务号
稿件状态查询
全文检索浏览