

研究报告 Original Papers

利用快速荧光、延迟荧光和820 nm光反射同步测量技术探讨干旱对平邑甜茶叶片光合机构的伤害机制

张葍, 陈昌盛, 李鹏民*, 马锋旺

旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌712100

摘要: 本文以苹果砧木平邑甜茶为实验材料, 利用快速叶绿素荧光、延迟荧光及820 nm光反射同步测量技术, 研究了干旱胁迫对平邑甜茶叶片光合机构的光系统I (PSI)、光系统II (PSII)以及整个光合电子传递链的伤害机制。实验结果表明: 干旱胁迫下平邑甜茶叶片的整个光合电子传递链都受到不同程度的影响。干旱2 d, PSII反应中心捕获的光能用于还原 Q_A^- 的能力低于电子从 Q_A^- 向下游传递的能力, 电子从 Q_A^- 向下游传递给 Q_B 和PQ库等中间电子传递体的能力小于电子从 Q_B 和PQ库向PSI受体侧传递的能力, 但干旱5 d上述变化则相反, 且更加显著。由此可以得出, 严重干旱胁迫下, 沿着从PSII到PSI受体侧的光合电子传递链, 电子传递的能力越来越低。此外, 随着干旱胁迫, PSII和PSI反应中心色素的降解速率快于天线色素, 且PSII的捕光效率和PSI反应中心的含量逐渐降低。快速荧光、延迟荧光及820 nm光反射同步测量结果互相印证了上述结论。我们推测, 这可能是平邑甜茶叶片对干旱的一种适应机制。

关键词: 平邑甜茶; 快速荧光; 延迟荧光; 820 nm光反射; 干旱

Effects of Drought on the Photosynthetic Apparatus in *Malus hupehensis* Leaves Explored by Simultaneous Measurement of Prompt Fluorescence, Delayed Fluorescence and Modulated Light Reflection at 820 nm

ZHANG Di, CHEN Chang-Sheng, LI Peng-Min*, MA Feng-Wang

State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

Abstract: In this study, prompt fluorescence, delayed fluorescence and modulated light reflection at 820 nm were measured simultaneously to explore the effect of drought on PSI and PSII as well as the whole photosynthetic electron transport chain in *Malus hupehensis* leaves. The results showed that the whole electron transport chain including the two photosystems was differently affected by drought. At day 2 of drought stress, the capacity of Q_A^- reduction by the trapping light in PSII reaction centers was lower than that of electron transfer from Q_A^- to the downstream electron carriers, and the capacity of electron transfer from Q_A^- to the downstream intermediate carries such as Q_B and PQ was also lower than that from Q_B and PQ to PSI acceptor side. Nevertheless, at day 5 of drought stress, the above electron transfer capacities changed contrary with the changes being more significantly, compared with that at day 2. In general, along the photosynthetic electron transport chain from PSII to PSI acceptor side, the electron transport capacity decreased gradually under severe drought stress. The results also exhibited that during drought stress, the degradation of PSII and PSI reaction centers was faster than that of their antenna pigments. The trapping efficiency of PSII and the content of PSI reaction center also decreased. The simultaneously measuring results of prompt fluorescence, delayed fluorescence and modulated light reflection at 820 nm supported the above conclusions, and corroborated each other. We speculate that this might be an adaption mechanism of *Malus hupehensis* leaves to drought stress.

Key words: *Malus hupehensis* Rehd; prompt fluorescence; delayed fluorescence; modulated light reflection at 820 nm; drought

收稿 2013-03-25 修定 2013-05-03

资助 国家自然科学基金项目(31000890和31171915)和西北农林科技大学国际科技合作交流项目(A213021202)。

* 通讯作者(E-mail: Lipm@nwsuaf.edu.cn; Tel: 029-87082648)。

在我国西北地区,干旱是植物经常遭受的环境胁迫之一。干旱导致叶片光合速率下降,从而造成产量下降(Lawlor和Cornic 2002)。干旱条件下,植物光合速率的下降有多种因素,这包括气孔导度下降(Gilbert等2011)、色素降解(Beck 1942)、光合作用暗反应能力下降(Chaves等2009)及光反应能力下降(Albert等2011)等。

光合光反应是指两个光系统(光系统II, PSII; 光系统I, PSI)吸收光能后,经光合电子传递和光合磷酸化,产生NADPH、ATP (两者称为同化力)及氧气的过程,其强弱主要由两个光系统及两个光系统之间的光合电子传递链的状态决定。目前,光合光反应可以通过快速叶绿素荧光(简称快速荧光)、延迟荧光及820 nm光反射等技术来检测(Strasser等2010; Goltsev等2012)。

叶绿素吸收光能后,PSII的捕光色素将捕获的光量子传递给反应中心(P_{680}),使 P_{680} 从基态变为激发态的 P_{680}^* , P_{680}^* 很不稳定,诱导发生电荷分解,产生 $P_{680}^+Pheo^-$, $Pheo^-$ 将电子传递给下游的电子受体如初级醌受体(Q_A)、次级醌受体(Q_B)及质体醌(PQ)等,最后经质兰素(PC)传递给氧化态的PSI反应中心(P_{700}^+)。而产生的 P_{680}^+ 是一个电子陷阱,诱导水发生裂解,放出氧气,并传递电子将 P_{680}^+ 还原。与 P_{680} 一样, P_{700} 受光激发后,生成 P_{700}^* , P_{700}^* 将受激发产生的电子通过电子传递体 A_0 和 A_1 等传递给铁氧还蛋白(Fd),生成 P_{700}^+ ,并最终由Fd-NADP⁺还原酶把NADP⁺还原为NADPH,用于光合碳还原, P_{700}^+ 又可以接受从PSII传来的电子,形成可持续的电子传递。在发生光合电子传递的同时,有一部分吸收的光能会以热和荧光等形式被耗散掉;并且,它们之间互相竞争,任何一者的改变都会影响到其它二者。例如,当光合电子传递受阻后,热耗散和快速荧光就会上升(Krause和Weis 1991; Strasser和Strasser 1995)。因此,快速荧光的变化可以间接反映光合电子传递的变化。

两个光系统与光合电子传递链上发生的氧化还原反应都是可逆的。当光合电子发生逆向传递,最终导致 P_{680}^+ 和 $Pheo^-$ 发生电荷重组进而形成 P_{680}^* ,PSII的天线色素就会发生延迟荧光现象。由于光合电子的可逆传递时刻存在,所以叶绿素受光后,延迟荧光现象一直发生。虽然快速荧光和延迟荧

光都主要由PSII发出(Wang等2007; Zhang等2007; Goltsev等2009),但它们发生的机制完全不同,寿命也不同。而相同的是,二者都可以用来反映光合电子传递及光合机构的状态变化。

此外,研究还表明,当 P_{700} 被氧化成 P_{700}^+ 时,氧化态的 P_{700}^+ 可以特异吸收820 nm波长的光(Schansker等2003)。因此,可以通过测量820 nm的光反射来检测PSI的氧化还原反应。

快速荧光、延迟荧光和820 nm光反射动力学能够快速、灵敏、无损伤地反映两个光系统对光能的吸收、传递及耗散等生理状况(Krause和Weis 1991; Schansker等2003; Goltsev等2009, 2012; Strasser等2010),从而探测逆境对植物光合机构的影响。近年来,随着MPEA-2的出现,科研人员已经实现了利用上述三种技术对植物的同步监测,而多种技术的优势互补,可以使我们更深入、更准确地了解植物光合机构对逆境的响应。目前,利用这种同步测量技术研究干旱胁迫对苹果叶片光合机构的影响还未见报道。本研究以平邑甜茶为材料,利用快速荧光、延迟荧光和820 nm光反射同步测量技术分析干旱对植物光合机构的影响,以期进一步揭示干旱胁迫对植物的伤害机制。

材料与方法

1 材料及处理

试验于2012年4~9月在西北农林科技大学园艺试验场进行。试验材料为两年生平邑甜茶(*Malus hupehensis* Rehd)盆栽苗,盆口直径30 cm,高24 cm,每盆装腐熟园土:沙:腐熟有机肥7:2:1,7.0 kg。每株为1个重复,共5次重复,每次重复测定2个叶片。所有盆栽苗均于自然光强下生长,干旱处理前正常肥水管理。9月上旬,在灌溉饱和水后停止供水,开始干旱处理。每株固定选取新梢中部完全展开的2片功能叶,在停止供水后0、2和5 d进行测定。0、2和5 d的土壤相对含水量分别为100%、68%和38%,最大光照强度为(1 900±50) $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,最高温度为(28±1) °C。

2 快速荧光、延迟荧光和820 nm光反射同步测量

快速荧光、延迟荧光和820 nm光反射用多功能植物效率分析仪(MPEA-2, Hansatech Instruments, UK)同步测量。测量时间为晚上9点(叶片已经完

全暗适应2 h), 测定方法参照Strasser等(2010)的方法并稍作修改。先用5 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的红光同步测量快速荧光、延迟荧光和820 nm光反射, 然后关掉红光, 用1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的远红光单独测量820 nm光反射。红光波长为(627 \pm 10) nm, 远红光波长为(735 \pm 15) nm。同步测量快速荧光、延迟荧光和820 nm光反射时, 从曝光后的300 μs 开始进行光暗转换, 光下记录快速荧光和820 nm光反射信号, 暗处记录延迟荧光信号, 具体时间设定参考Strasser等(2010)方法。单位反应中心吸收的光能(ABS/RC)、反应中心捕获的量子产额(TRo/ABS或 ϕ_{P_0})、捕获能量中用于电子传递的量子产额(ETo/TRo或 ψ_{E_0})、电子传递中用来还原PSI受体侧的量子产额(REo/ETo或 δ_{R_0})等参数的计算参考Strasser等(2010)。ABS/RC=4 \times (F_K-F_0) \times F_M/(F_J-F_0)/(F_M-F_0), TRo/ABS=(F_M-F_0)/F_M, ETo/TRo=(F_M-F_J)/(F_M-F_0), REo/ETo=(F_M-F_I)/(F_M-F_J); 其中F_M=F_P, F₀、F_K、F_J、F_I和F_P分别为暗适应后20 μs 、300 μs 、3 ms和30 ms及最大快速荧光值。由软件MPEA data-analyzer V.4.4.3自动模拟和计算延迟荧光衰减曲线的快组分振幅(L₁)、次快组分振幅(L₂)和慢组分振幅(L₃)。820 nm光反射曲线(MR/MRo)的最大下降速率V_{PSI}和最大上升速率V_{PSI+PSII}用软件Excel 2003计算, 其中用MR/MRo的0.7~3 ms阶段的下降斜率计算V_{PSI}, 用7~300 ms范围内的最大上升斜率计算V_{PSI+PSII}, V_{PSII}=V_{PSI}+V_{PSI+PSII}。

实验结果

1 用MPEA-2测得的三种信号信息

图1为用MPEA-2测量充分暗适应的无胁迫处理叶片所获得的三种同步测量信号信息。

平邑甜茶叶片的快速荧光诱导动力学曲线在从O点上升到P点的过程中, 呈现出典型的O-J-I-P多相变化。植物绿色组织在完全暗适应后, Q_A被完全氧化(此时PSII反应中心处于完全开放状态), 荧光产量最低(O点), 随后P₆₈₀受光激发, 产生光合电子传递, Q_A逐渐被还原为Q_A⁻, 荧光产量上升, 到达J点。J点反映了Q_A⁻的第一次瞬时最大积累, 而这种积累是因为受到Q_B位点上还原态与氧化态PQ交换速率的限制, 从而造成电子从P₆₈₀到达Q_A的速率快于电子从Q_A⁻传递给Q_B的速率造成的(Schansker

等2005)。因此, O-J阶段反映了照光后Q_A⁻的逐渐积累过程。J-P阶段是由于次级电子受体Q_B、PQ库、PC等逐渐被还原, 进而使Q_A也最终被完全还原造成的。研究表明, I点的出现反映了PQ库的异质性, 与PQ库的再氧化速率相关, J-I阶段反映了整个PQ库的还原过程; P点的出现与P₇₀₀受体侧的Fd-NADP⁺还原酶在曝光瞬间未被及时激活相关, 因此, I-P阶段反映了P₇₀₀受体侧的还原, 快速荧光到达P点时, PSII反应中心处于完全关闭状态(Govindjee 1995; Schansker等2005; Tóth等2007)。

快速荧光的寿命非常短, 在照光后的每个时间点只能测得一个信号值。延迟荧光的寿命则很长, 且会发生衰减现象, 所以在照光后的每个时间点可以测得随时间不断发生变化的一组延迟荧光信号值。而将照光不同时间后获得的每一条延迟荧光曲线上某个固定衰退时间的信号(如延迟荧光衰退时间在20 μs 时)以照光时间为横坐标(JIP-time)作图, 得到的就是这个衰退时间点的延迟荧光随JIP-time变化的动力学曲线(Strasser等2010)。光合电子逆向传递造成延迟荧光发生, 电子逆向传递发生电荷重组的速率越快, 延迟荧光信号越

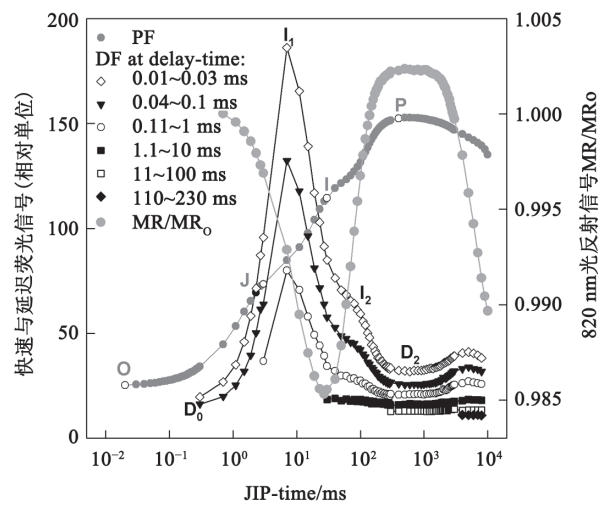


图1 平邑甜茶叶片中同步测定的快速荧光(PF)和延迟荧光(DF)(左纵坐标轴)及820 nm光反射(右纵坐标轴)的动力学曲线

Fig.1 Kinetics curves of prompt and delayed fluorescence (in different a.u.; left vertical axis) and modulated 820 nm reflection (right vertical axis) in *M. hupehensis* leaves 横坐标为对数坐标, 下图同此。

强。因此,理论上讲,当暗适应的叶片照光后,随着光合电子传递链被逐渐还原,快速荧光信号不断增强,而延迟荧光信号应该越来越低。然而,由图1可以看出,延迟荧光在其衰退时间10~30 μs 、40~100 μs 等的平均值随JIP-time的变化都呈现先上升,到达最高点 I_1 ,然后再下降到最低点 D_2 的趋势。研究表明,延迟荧光动力学曲线在JIP-time呈现先上升的过程主要和放氧复合体的状态转换有关(Strasser等2010)。放氧复合体根据带正电荷的多少,存在 S_0 、 S_1 、 S_2 、 S_3 和 S_4 等五个状态,当叶片完全暗适应时,放氧复合体主要以 S_0 和 S_1 状态存在,在每次闪光后积累1个正电荷,积累到4个正电荷时(S_4)能裂解2个 H_2O 释放1个 O_2 ,获取4个电子,并回到初始状态 S_0 。这个模型被称为水氧化钟,由Kok等(1970)发现。放氧复合体的不同氧化状态发出的延迟荧光信号强度不同,其中以 S_3 发生的延迟荧光信号最强(Buchta等2007)。因此, I_1 点的出现反映了暗适应的叶片在照光后其放氧复合体在 S_3 状态时的第一次瞬时最大积累。随着照光时间的延长,放氧复合体在不同状态的比率逐渐达到平衡,其状态转换不再引起延迟荧光信号的变化,此时,延迟荧光信号主要和光合电子传递链的氧化还原相关,即与快速荧光信号的变化相反。当快速荧光到达最高点P时,延迟荧光到达最低点 D_2 。从 I_1 到 D_2 的下降过程中出现的拐点标记为 I_2 (Zaharieva和Goltsev 2003; Goltsev等2009)。延迟荧光的 I_2 点同快速荧光的I点相同,也与PQ库的氧化还原过程相关。例如,弱光条件下,从 P_{680} 传递来电子还原PQ库的速率低于PQ库的再氧化速率,此时PSII反应中心的重新开放速率加快, I_2 点相对升高(Kalaji等2012)。

P_{700} 处于氧化态 P_{700}^+ 时可吸收820 nm波长的光,因此820 nm光吸收或反射的变化可以反映 P_{700} 的氧化还原状态(Munekage等2004; Zhang等2011)。然而,除了 P_{700}^+ 可以吸收820 nm光外,植物的其它组织也吸收820 nm波长的光,例如,叶片组织结构的变化也会影响820 nm光反射的测定(Strasser等2010)。因此,本研究中820 nm光反射动力学曲线用MR/MRo来表示(图1),MRo为开始照光时的初始反射值,旨在排除 P_{700} 外的其它因素对820 nm光吸收的影响。此时,MR/MRo比值的变化

反映了 P_{700} 的氧化还原状态的变化。用MPEA-2测得的每条820 nm光反射曲线从照光后的0.7 ms开始被准确测量。如图1所示,当完全暗适应的植物材料刚开始暴露在红光下时,两个光系统被单独激发,处于还原态的 P_{700} 受光激发变成 P_{700}^+ , P_{700}^+ 吸收820 nm波长的光,使其光反射量减少,导致MR/MRo快速下降。由于红光可以同时激发两个光系统,植物材料曝光一段时间后,当从PSII传来的电子到达PSI, P_{700}^+ 就会被重新还原,使其对820 nm波长的光吸收减少,当 P_{700}^+ 的还原比率大于氧化比率时,MR/MRo表现为上升趋势(图1)。MR/MRo快速下降阶段的终止一般出现在7 ms,此时PF正处于J-I的上升阶段,即PQ库的进一步还原阶段(Schancker等2003; Strasser等2004; Tsimilli-Michael和Strasser 2008)。

2 干旱胁迫对植物叶片快速荧光、延迟荧光及820 nm光反射的影响

2.1 干旱胁迫对植物叶片快速荧光信号的影响

苹果叶片的快速荧光动力学曲线在干旱胁迫0、2和5 d的变化趋势如图2-A所示。植物材料的快速荧光动力学曲线的形状随着干旱胁迫的加剧发生显著变化。峰值P点(F_p)在干旱2 d变化不明显,干旱5 d则显著下降(图2-A、表1);J点(F_j)、I点(F_i)及K点(F_k)在干旱胁迫2 d变化不明显,但5 d显著上升(图2-A、表1)。

图2-B为快速荧光动力学曲线以P点荧光值标准化后的诱导曲线,标准化后的曲线在0 d和2 d变化不明显,但5 d O-P之间的荧光信号明显上升。图2-C为快速荧光动力学曲线以I点荧光值标准化后的诱导曲线,由该图可以看出,标准化后的P点荧光在干旱5 d显著下降,而J点荧光显著升高。图2-D为快速荧光动力学曲线以J点荧光值标准化后的诱导曲线,由该图可以看出,J-P段荧光信号呈现随干旱呈现先轻微上升再明显下降的趋势,O-J段荧光信号在干旱2 d没有明显变化,在5 d则有所升高。

由快速叶绿素荧光诱导曲线导出的参数的变化如表1所示。TRo/ABS在干旱0 d和2 d没有明显差异,5 d显著下降。ETo/TRo在干旱2 d有所升高,5 d则显著下降。REo/ETo的变化趋势与ETo/TRo相似。ABS/RC随着干旱的加剧逐渐升高。

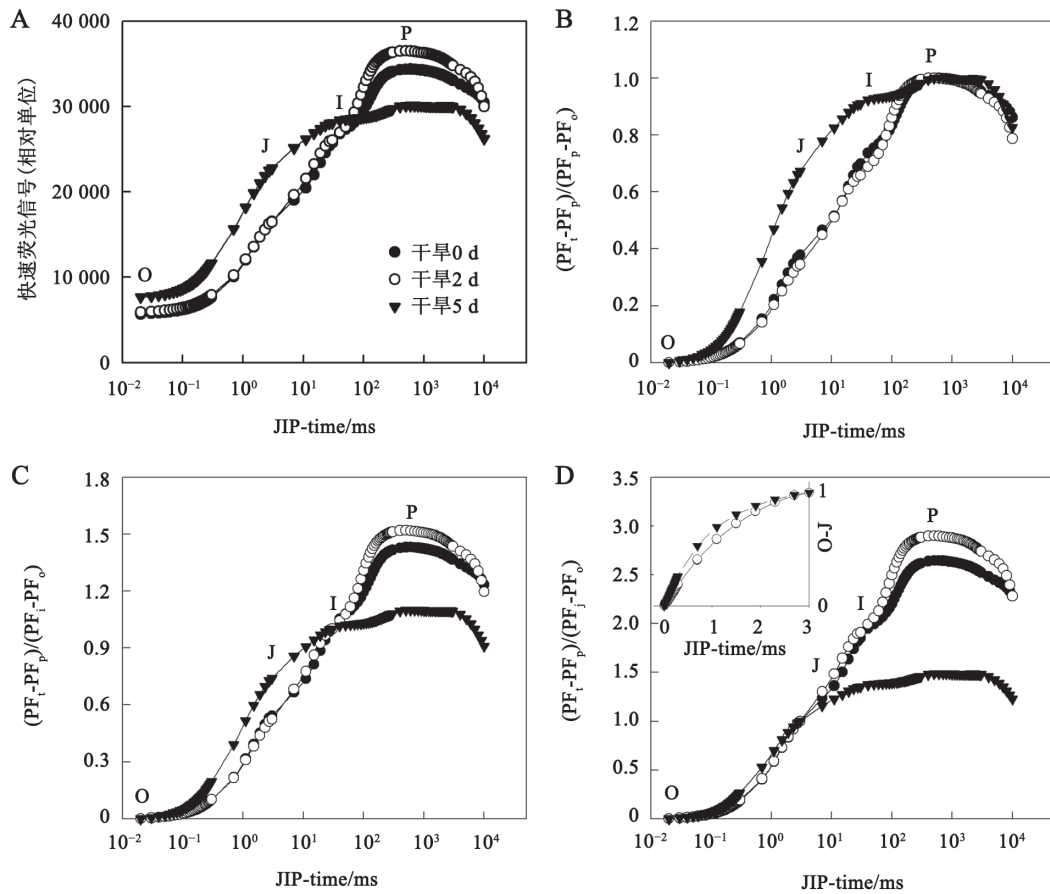


图2 干旱胁迫对平邑甜茶叶片快速荧光的影响

Fig.2 Effects of drought stress on kinetics curves of prompt fluorescence in *M. hupehensis* leaves

2.2 干旱胁迫对植物叶片延迟荧光信号的影响

延迟荧光信号20~30 μs 的平均值与40~50 μs 的平均值的差值主要反映延迟荧光微秒级组分随JIP-time的变化趋势。如图3-A所示,该延迟荧光信号在干旱2 d几乎没有变化,5 d则显著下降,尤其是 I_1 点的下降最明显。另一组延迟荧光(100~200 μs 的平均值与300~400 μs 的平均值的差值,图3-C)主要反映延迟荧光次毫秒级组分的变化。该组在 I_1 点和 I_2 点的信号,特别是 I_1 ,干旱前期变化不明显,5 d则显著下降。图3-B和D分别为图3-A和C以 I_1 点标准化后的延迟荧光动力学曲线。如图3-B所示,在干旱5 d,从 D_0 点到 I_1 点的延迟荧光信号上升加快,而 I_1 点之后的延迟荧光信号的下降则有所变慢。图3-D中, I_1 点后延迟荧光信号的下降随着干旱胁迫呈现逐渐加快的趋势。

图4为 I_1 和 I_2 点的延迟荧光随自身衰退时间

(delay-time)的变化趋势图。由图4-A可以看出,随着干旱胁迫的加剧,特别是干旱5 d, I_1 点延迟荧光信号在刚开始衰退时明显下降,且随后的衰退明显变缓。由图4-B可以看出, I_2 点刚开始衰退时的延迟荧光信号在干旱2 d有所上升,5 d则显著下降,由此, I_2 点的衰退呈现出先快后慢的变化。由软件MPEA data-analyzer V.4.4.3自动模拟和计算得来的 I_1 和 I_2 的快组分振幅 L_1 、次快组分振幅 L_2 及慢组分振幅 L_3 的变化趋势如表1所示。 I_1 的 L_1 和 L_2 在干旱5 d显著降低, L_3 在干旱2 d降低,5 d没有变化。 I_2 的 L_1 和 L_2 在干旱2 d有所升高,干旱5 d则明显下降, L_3 在干旱2 d没有明显变化,5 d显著升高。

2.3 干旱胁迫对820 nm光反射的影响

由图5-A可以看出,用红光同步测量的MR/MR₀曲线的快速下降阶段在干旱2 d已经有所变化,下降的最低点升高,且到达最低点的时间向前

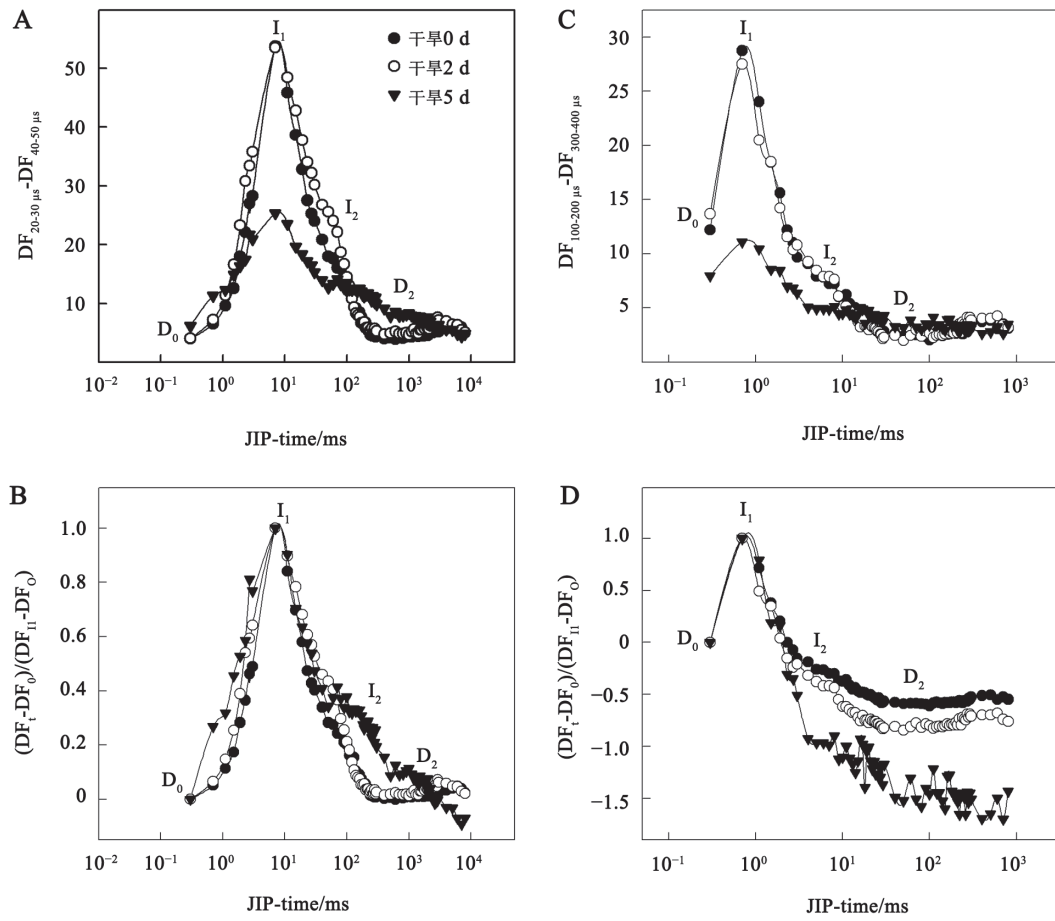


图3 干旱胁迫对平邑甜茶延迟荧光的影响

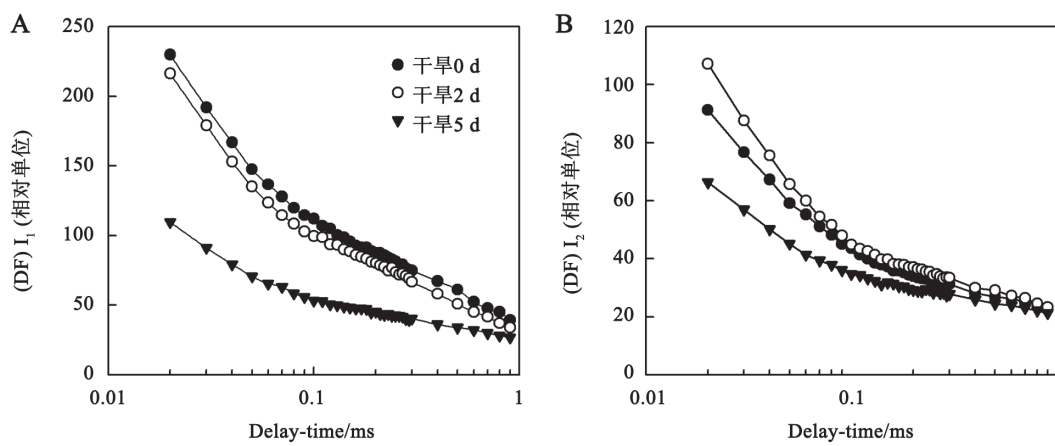
Fig.3 Effects of drought stress on kinetics curves of delayed fluorescence in *M. hupehensis* leaves

图4 干旱胁迫下延迟荧光衰减曲线的变化

Fig.4 Changes of delayed fluorescence decay curves in *M. hupehensis* leaves under drought stress

偏移, 但 MR/MR_0 的下降速率 V_{PSI} 没有变化。在干旱5 d, MR/MR_0 快速下降阶段的最低点明显向后

偏移, 并且 V_{PSI} 显著升高(表1)。对于 MR/MR_0 的缓慢上升阶段, 其在干旱2 d的上升速率 $V_{PSI+PSII}$ 显著

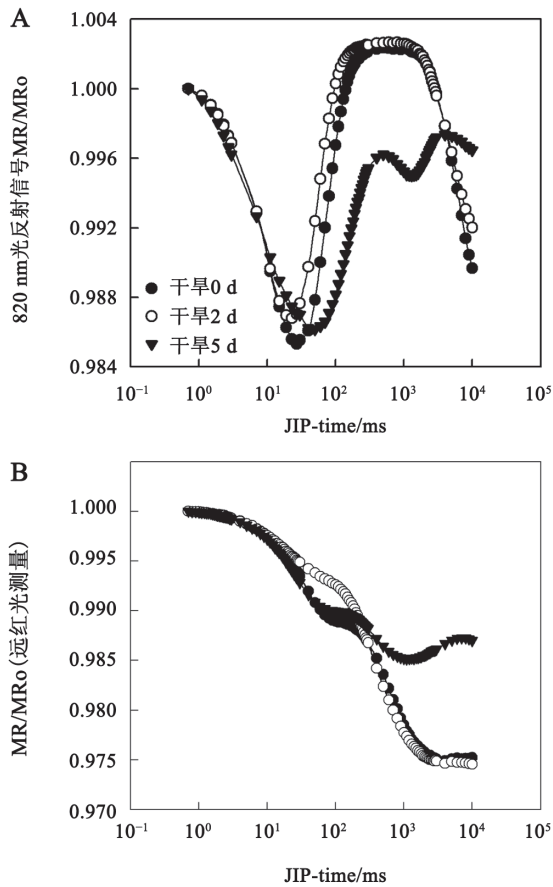


图5 干旱胁迫对平邑甜茶820 nm光反射的影响
Fig.5 Effects of drought stress on kinetics curves of modulated 820 nm reflection in *M. hupehensis* leaves

升高,但在干旱5 d的 $V_{PSI+PSII}$ 则显著下降,且干旱5 d的820 nm光反射动力学曲线振幅明显下降,上升的最高点也显著降低。 V_{PSII} 随干旱胁迫逐渐增加(表1)。

图5-B为干旱过程中用远红光测量的MR/MR₀变化趋势图。如图所示,MR/MR₀曲线在干旱2 d变化不大,但在5 d下降趋势明显减弱,且最低点升高。

讨 论

在本次实验中,为了探讨干旱条件下光合机构的调节机制,用MPEA-2同步测量并记录了快速荧光、延迟荧光和820 nm光反射信号,这样就使光合电子传递链的三个部分(PSII的电子供体侧、PSII和PSI两个光系统之间的电子传递链及PSI的

电子受体侧)的信息被同步收集并做相互印证和补充。

由图2可以看出,平邑甜茶叶片的快速荧光诱导动力学曲线对干旱胁迫十分敏感。通过JIP-test (Strasser等2010)分析,我们发现,平邑甜茶叶片的整个光合电子传递链在干旱胁迫下都明显受到影响,但在程度上略有不同。ABS/RC反映了PSII天线色素与反应中心色素的比值(Strasser等2010)。随着干旱胁迫,ABS/RC的变化(表1)表明平邑甜茶叶片PSII天线色素的降解速率慢于反应中心色素。TR₀/ABS的变化(表1)表明,随着干旱胁迫,平邑甜茶叶片PSII捕获光能用来还原 Q_A^- 的能力逐渐下降。由于电子从 Q_A^- 向下游继续传递的概率(ETo/TR_0)由两个因素决定,即供给 Q_A^- 电子的能力和电子从 Q_A^- 向下游传递的能力(Li等2009)。因此,快速荧光J点和参数 ETo/TR_0 的变化(图2-D、表1)表明,在干旱初期,平邑甜茶叶片供给 Q_A^- 电子的能力(即PSII捕获光能用来还原 Q_A^- 的能力)小于电子从 Q_A^- 向下游传递的能力,而随着干旱胁迫的加重,电子从 Q_A^- 向下游传递的能力则远远低于供给 Q_A^- 电子的能力。J-I反映了整个PQ库的还原过程(Tóth等2007),因此,由图2-C的J-I阶段可以得出,干旱5 d,从 P_{680} 传递电子还原PQ库的能力大于电子从PQ库向下游传递从而发生自身再氧化的能力。同理,快速荧光的I-P段和参数 RE_0/ETo 的变化则表明,在干旱初期,电子从 Q_A^- 向下游传递给 Q_B 和PQ库等中间电子传递体的能力小于电子从 Q_B 和PQ库向PSI受体侧传递的能力,而随着干旱胁迫的加重,电子从 Q_A^- 向下游传递给 Q_B 和PQ库等中间电子传递体的能力则大于电子从 Q_B 和PQ库向PSI受体侧传递的能力。由于快速荧光K点的升高主要是由 P_{680} 的供体侧(如放氧复合体)受伤害引起(Strasser和Strasser 1995),因此,在干旱胁迫5 d,快速荧光K点的略微上升表明,此时平邑甜茶叶片 P_{680} 的供体侧可能受到干旱胁迫的伤害。

由于延迟荧光的微秒级组分主要与围绕 P_{680} 发生的氧化还原反应相关(Goltsev等2009; Kalaji等2012),而 I_1 主要反映了基团 $S_3Z^+P_{680}^+Q_A^-$ 和 $S_3Z^+P_{680}Q_A^-$ 的积累(Kalaji等2012)。因此,如果干旱胁迫下 P_{680} 供体侧受到伤害,电子供应能力变低,抑制 P_{680} 的重新开放,就会进而抑制上述两个基团的

表1 干旱对平邑甜茶叶片荧光及820 nm光反射参数的影响

Table 1 Effects of drought stress on fluorescence and 820 nm reflection parameters in *M. hupehensis* leaves

荧光参数	处理时间/d		
	0	2	5
F_0	5 536±51.2 ^c	6 575±64.9 ^b	7 329±96.5 ^a
F_k	7 677±92.2 ^b	7 928±108 ^b	11 576±222 ^a
F_j	14 269±242 ^b	14 207±225 ^b	20 427±487 ^a
F_i	25 725±466 ^b	26 038±412 ^{ab}	27 563±773 ^a
F_p	34 356±602 ^a	36 480±527 ^a	29 687±768 ^b
TR _o /ABS	0.839±0.003 ^a	0.842±0.001 ^a	0.752±0.009 ^b
ET _o /TR _o	0.696±0.008 ^b	0.725±0.005 ^a	0.414±0.009 ^c
RE _o /ET _o	0.430±0.005 ^b	0.469±0.004 ^a	0.229±0.02 ^c
ABS/RC	0.998±0.012 ^b	1.038±0.007 ^b	1.488±0.023 ^a
$I_1(L_1)$	20 567±619 ^a	22 663±615 ^a	10 791±564 ^b
$I_1(L_2)$	7 470±204 ^a	7 206±159 ^a	2 980±261 ^b
$I_1(L_3)$	2 941±97 ^a	2 376±64 ^b	2 165±143 ^b
$I_2(L_1)$	8 687±162 ^b	12 008±291 ^a	5 981±287 ^c
$I_2(L_2)$	1 826±65 ^b	2 197±54 ^a	1 248±74 ^c
$I_2(L_3)$	1 537±31 ^b	1 622±37 ^{ab}	1 682±27 ^a
V_{PSI}	$(0.00138±3.33)×10^{-5a}$	$(0.00140±3.02)×10^{-5a}$	$(0.00168±2.36)×10^{-5b}$
V_{PSII}	$(0.00157±3.57)×10^{-5b}$	$(0.00163±3.36)×10^{-5ab}$	$(0.00173±2.64)×10^{-5a}$
$V_{PSI+PSII}$	$(0.000189±3.7)×10^{-6b}$	$(0.000234±4.2)×10^{-6a}$	$(0.000054±6.0)×10^{-6c}$

同行同一参数数据后标注的不同字母表示差异显著(LSD, $P<0.05$)。

积累,使得延迟荧光信号强度降低(图3-A),到达 I_1 点速率相对加快(图3-B)。这与快速荧光同步测量的结果(图2-D)相一致。而ABS/RC下降,使 P_{680} 数量相对减少,也会造成延迟荧光 I_1 点信号强度减弱和上升速率相对较快(图3-A、B),同样印证了快速荧光同步测定的结果(表1)。延迟荧光次毫秒级组分主要与 P_{680} 受体侧的电子传递体 Q_A 和 Q_B 等的氧化还原状态相关(Goltsev等2009)。由图3-C和D可以看出,标准化之后的延迟荧光在 I_1 点后的下降幅度随着干旱胁迫的加重而增加,表明干旱胁迫提高了 P_{680} 受体侧的还原程度,即电子在 P_{680} 受体侧往下游继续传递的概率下降,从而使电子的可逆传递概率也同时下降,这也与快速荧光同步测定的结果(图2-A~C、表1)相一致。由图3-B与图3-D可以看出,微秒级与次毫秒级延迟荧光组分的 I_2 随干旱胁迫变化趋势不同。这是因为,由于 I_2 与PQ库的氧化还原程度相关,当只有微秒级组分时,PQ库的还原主要取决于从 P_{680} 传递到PQ库的电子数量,由于干旱胁迫降低了PSII捕获光能用来还原 Q_A 的能力(TR_o/ABS),因此,随着干旱胁迫,电子从 P_{680} 传递到PQ库的能力降低, I_2 相对略微升高(图3-B)。而有次毫秒级组分存在时,PQ库的还原既与从 P_{680}

传递电子还原PQ库的能力相关,还与PQ库的再还原相关,即还与电子从PQ库沿光合电子传递链进一步往下传递的能力相关。因此,次微秒级组分 I_2 的变化表明,在干旱胁迫下,电子从 P_{680} 传递到PQ库的能力大于电子从PQ库向下传递给PC和 P_{700} 等电子传递体的能力(图3-D)。这也与快速荧光的结果相一致。

此外,对 I_1 和 I_2 延迟荧光自身的衰退曲线的分析也可以反映延迟荧光快组分、次快组分及慢组分的变化(Goltsev等2009)。其中快组分主要反映了围绕 P_{680} 发生的氧化还原反应,而延迟荧光组分越慢,表明电子是从 P_{680} 受体侧距离越远的电子传递体回传。由软件MPEA data-analyzer V.4.4.3自动模拟和计算得来的 L_1 主要反映快组分 $Z^+P_{680}Q_A^-Q_B^-$ 的相对含量变化, L_2 主要反映次快组分 $Z^+P_{680}Q_A^-Q_B^-$ 相对含量的变化,而 L_3 主要反映慢组分 $S_3Z^-P_{680}Q_A^-Q_B^-$ 相对含量的变化。随着干旱胁迫的加重, I_1 点的 L_1 、 L_2 和 L_3 下降(图4-A、表1),表明上述延迟荧光发光基团的积累受到干旱抑制,这也与干旱伤害了 P_{680} 的供体侧和提高了天线色素与反应中心色素的相对比值,导致 $Z^+P_{680}Q_A^-Q_B^-$ 和 $Z^+P_{680}Q_A^-Q_B^-$ 的积累受到抑制,和干旱降低了电子在 P_{680} 受体

侧的传递能力,从而导致 $S_3ZP_{680}Q_A^-Q_B^-$ 的积累受到抑制相一致。与 I_1 相比,延迟荧光在 I_2 点发生自身衰退过程中,上述三个延迟荧光基团的数量明显下降(表1)。然而,与 I_1 点相比,由于在测量过程中经历了更多的光暗转换过程, I_2 点延迟荧光衰退曲线的变化与更多的电子传递体如PC和 P_{700} 等的氧化还原状态相关,即 I_2 点延迟荧光衰退曲线中包含的基团 $Z^+P_{680}Q_A^-Q_B^-$ 和 $Z^+P_{680}Q_A^-Q_B^-$ 的积累除了与 P_{680} 供体侧和 P_{680} 天线色素与反应中心色素的相对比值相关外,还取决于电子从 Q_A 和 Q_B 等继续往下游传递的能力。因此,干旱胁迫下,平邑甜茶叶片 I_2 的 L_1 和 L_2 的变化与快速荧光参数 ETo/TRo 和 REo/ETo 的变化相一致(表1)。然而, I_2 的 L_3 的变化呈现出随着干旱逐渐上升的趋势,表明还有其他因素影响了 $S_3ZP_{680}Q_A^-Q_B^-$ 的积累。

用远红光测量的 MR/MRo 的变化(图2-B)表明,随着干旱胁迫,特别是在干旱5 d,能够发生氧化还原反应的 P_{700} 的含量显著下降。而由同步测定的 MR/MRo 的下降速率 V_{PSI} 的变化(图5-A、表1)可以得出,随着干旱胁迫的加重,在电子从PSII传递到PSI前, P_{700} 独立发生的氧化还原速率加快,这可能与干旱影响了PSI的天线色素与反应中心色素的比例有关,即与干旱对PSII的影响相同,干旱条件下,PSI天线色素的降解慢于反应中心 P_{700} 的降解。而由干旱过程中 MR/MRo 到达最低点的时间和 $V_{PSI+PSII}$ 的变化(图5-A、表1)可以看出,电子从PSII传到被红光激发而处于氧化态的 P_{700} 的速率在干旱初期稍微有所增加,但后期则显著下降。已有研究表明,干旱可以改变植物的类囊体膜的结构(Liu等2011),而光合电子传递的速率与类囊体膜的结构密切相关。因此,干旱情况下两个光系统之间光合电子传递速率的变化可能与类囊体膜结构的变化相关。然而,电子传递体之间传递电子的数量并不取决于电子传递的速率。由 MR/MRo (红光测定)在干旱5 d其缓慢上升阶段最高点的变化可以看出(图2-A),此时电子从PSII经光合电子传递链传递给处于氧化态的 P_{700} 的电子数量相对下降,从而使较少的 P_{700}^+ 被重新还原,与快速荧光和延迟荧光的同步测定结果一致。从PSII向PSI传递的光合电子数量相对下降可以避免光合电子传递链的过度还原,从而避免活性氧的产生,这可能是植物

自身的一种保护机制,这还有待进一步研究。

由以上分析可以看出,干旱胁迫会导致PSII和PSI天线色素的降解慢于其反应中心的降解,并降低PSII的捕光效率和PSI反应中心 P_{700} 的含量,影响电子在PSII受体侧(包括PSI)的传递能力,且这种影响随着干旱胁迫的变化而变化。严重干旱胁迫下,沿着从PSII到PSI受体侧的光合电子传递链,电子传递的能力越来越低。

参考文献

- Albert KR, Mikkelsen TN, Michelsen A, Ro-Poulsen H, van der Linden L (2011). Interactive effects of drought, elevated CO_2 and warming on photosynthetic capacity and photosystem performance in temperate heath plants. *J Plant Physiol*, 168: 1550~1561
- Beck WA (1942). Effect of drought on the production of plant pigments. *Plant Physiol*, 17: 487~491
- Buchta J, Grabolle M, Dau H (2007). Photosynthetic dioxygen formation studied by time-resolved delayed fluorescence measurements: method, rationale, and results on the activation energy of dioxygen formation. *Biochim Biophys Acta*, 1767: 565~574
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot*, 103: 551~560
- Gilbert ME, Zwieniecki MA, Holbrook NM (2011). Independent variation in photosynthetic capacity and stomatal conductance leads to differences in intrinsic water use efficiency in 11 soybean genotypes before and during mild drought. *J Exp Bot*, 62: 2875~2887
- Goltsev V, Zaharieva I, Chernev P, Kouzmanova M, Kalaji MH, Yordanov I, Krasteva V, Alexandrov V, Stefanov D, Allakh-verdiev SI et al (2012). Drought-induced modifications of photosynthetic electron transport in intact leaves: analysis and use of neural networks as a tool for a rapid non-invasive estimation. *Biochim Biophys Acta*, 1817: 1490~1498
- Goltsev V, Zaharieva I, Chernev P, Strasser RJ (2009). Delayed fluorescence in photosynthesis. *Photosynth Res*, 101: 217~232
- Govindjee (1995). Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Aust J Plant Physiol*, 22: 131~160
- Kalaji HM, Goltsev V, Bosa K, Allakhverdiev SI, Strasser RJ (2012). Experimental *in vivo* measurements of light emission in plants: a perspective dedicated to David Walker. *Photosynth Res*, 114: 69~96
- Kok B, Forbush B, McGloin M (1970). Cooperation of charges in photosynthetic O_2 evolution-I. A linear four step mechanism. *Photochem Photobiol*, 11: 457~475
- Krause GH, Weis E (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 42: 313~349
- Lawlor DW, Cornic G (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher

- plants. *Plant Cell Environ*, 25: 275~294
- Li PM, Cheng L, Jiang CD, Strasser RJ, Gao HY, Peng T (2009). Heterogeneous behavior of PSII in soybean (*Glycine max*) leaves with identical PSII photochemistry efficiency under different high temperature treatments. *J Plant Physiol*, 166: 1607~1615
- Liu CC, Liu YG, Guo K, Fan DY, Li GQ, Zheng YR, Yu LF, Yang R (2011). Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environ Exp Bot*, 71: 174~183
- Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa KI, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2004). Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature*, 429: 579~582
- Schansker G, Srivastava A, Govindjee, Strasser RJ (2003). Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll a fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. *Funct Plant Biol*, 30: 785~796
- Schansker G, Tóth SZ, Strasser RJ (2005). Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP. *Biochim Biophys Acta*, 1706: 250~261
- Strasser BJ, Strasser RJ (1995). Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test. In: Mathis P (ed). *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. Dordrecht: KAP Press, 5: 977~980
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Qiang S, Goltsev V (2010). Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochim Biophys Acta*, 1797: 1313~1326
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient, In: Papageorgiou GC, Govindjee (Eds). *Advances in Photosynthesis and Respiration Series* (Govindjee-Series Editor), Chlorophyll a Fluorescence: a Signature of Photosynthesis, vol. 19, Dordrecht: Springer, 321~362
- Tóth SZ, Schansker G, Strasser RJ (2007). A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient. *Photosynth Res*, 93: 193~203
- Tsimilli-Michael M, Strasser RJ (2008). *In vivo* assessment of plant's vitality: applications in detecting and evaluating the impact of mycorrhization on host plant's. In: Varma A (Ed). *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*, 3rd edition, Dordrecht: Springer, 679~703
- Wang J, Xing D, Zhang L, Jia L (2007). A new principle photosynthesis capacity biosensor based on quantitative measurement of delayed fluorescence *in vivo*. *Biosens Bioelectron*, 22: 2861~2868
- Zaharieva I, Goltsev V (2003). Advances on photosystem II investigation by measurement of delayed chlorophyll fluorescence by a phosphorescopic method. *Photochem Photobiol*, 77: 292~298
- Zaharieva I, Taneva St, Goltsev V (1999). Effect of PSII antennae size on the induction kinetics of prompt and delayed chlorophyll fluorescence. *Bulg J Plant Physiol*, 25: 17~30
- Zhang L, Xing D, Wang J (2007). A non-invasive and real-time monitoring of the regulation of photosynthetic metabolism biosensor based on measurement of delayed fluorescence *in vivo*. *Sensors*, 7: 52~66
- Zhang ZS, Jia YJ, Gao HY, Zhang LT, Li HD, Meng QW (2011). Characterization of PSI recovery after chilling-induced photoinhibition in cucumber (*Cucumis sativus* L.) leaves. *Planta*, 234: 883~888