

特约综述 Invited Review

叶绿素延迟荧光的发生及其在光合作用研究中的应用

杨程¹, 李鹏民², 张子山¹, Vasilij Goltsev³, 高辉远^{1,*}

¹山东农业大学, 作物生物学国家重点实验室, 山东省作物生物学重点实验室, 山东泰安271018; ²西北农林科技大学, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌712100; ³Department of Biophysics and Radiobiology, Faculty of Biology, St. Kliment Ohridski University of Sofia, 8, Dragan Tzankov Boulevard, 1164 Sofia, Bulgaria

摘要: 叶绿素延迟荧光主要由绿色植物中光系统II的天线色素产生, 光系统II反应中心色素 P_{680} 接受天线色素吸收的光能后转变为激发态的 P_{680}^* , P_{680}^* 回到基态时释放出一个电子传给原初电子受体, 随后电子沿光合电子传递链向PSI传递。当进入电子传递链的电子发生电荷重组时会使 P_{680} 再次激发形成 P_{680}^* , P_{680}^* 将激发能传递给天线色素后, 激发能以荧光的形式释放出来, 即为延迟荧光。延迟荧光的检测和分析技术为无损测定植物光合机构的结构与功能变化提供了新的方法。利用该方法可以获得丰富的光合机构信息, 如光系统II受体侧及供体侧的伤害程度、跨类囊体膜质子梯度的大小等。本文介绍了延迟荧光的产生原理和测定方法, 并且举例说明了延迟荧光测定技术在光合作用研究中的应用。

关键词: 延迟荧光; 瞬时荧光; 光合机构; PSII; 电荷重组

Arising of Chlorophyll Delayed Fluorescence and Its Application in Photosynthesis Research

YANG Cheng¹, LI Peng-Min², ZHANG Zi-Shan¹, Vasilij Goltsev³, GAO Hui-Yuan^{1,*}

¹Shandong Key Laboratory of Crop Biology, State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Agricultural university, Tai'an, Shandong 271018, China; ²State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; ³Department of Biophysics and Radiobiology, Faculty of Biology, St. Kliment Ohridski University of Sofia, 8, Dragan Tzankov Boulevard, 1164 Sofia, Bulgaria

Abstract: Chlorophyll delayed fluorescence is predominantly emitted from antenna chlorophyll of photosystem II (PSII) in green plants. It is emitted from repopulated excited chlorophylls as a result of recombination of the charge pairs in electron transport chain. Detection and analysis of delayed fluorescence provides a new approach to measure the change of structure and function of photosynthetic apparatus. Abundant information can be got from delayed fluorescence, such as the damage extent of either donor or acceptor side of PSII and the change of the proton gradient across thylakoid membrane. In this paper, the emission mechanism and detecting method of delayed fluorescence were introduced, and illustrations of its use in photosynthesis research were also given.

Key words: delayed fluorescence; prompt fluorescence; photosynthetic apparatus; PSII; charge recombination.

光合作用是存在于植物与光合细菌中最重要生理生化过程。通过光合作用, 植物将吸收的光能转化为稳定的化学能, 为植物生命活动提供能量。植物叶绿素吸收的光能除了用于光化学反应和热耗散外, 还有一小部分以荧光的形式释放。叶绿素荧光主要由光系统II (PSII)的天线激发产生。在叶绿素的激发能用于原初光化学反应之前产生的荧光, 寿命很短, 在停止照光后只能持续1 ns, 称为瞬时荧光(Goltsev等2009)。尽管光合作用电子传递效率非常高, 在光合机构中进行的光化学反应过程仍然是可逆的。当光化学反应分离

的电荷在PSII反应中心发生重组时, 会使 P_{680} 再次激发形成 P_{680}^* , P_{680}^* 将激发能传递给天线色素后, 激发能以荧光的形式释放出来, 产生的荧光在停止照光后依然能够延续相当长一段时间, 弛豫时间从几纳秒到几十秒甚至更长时间, 这种荧光称为

收稿 2013-07-15 修定 2013-09-18

资助 高校博士点专项基金(20113702110008)、作物生物学国家重点实验室开放基金(2011KF03)和西北农林科技大学国际合作交流项目(A213021202)。

* 通讯作者(E-mail: gaohy@sdau.edu.cn; Tel: 0538-8245985)。

延迟荧光(Goltsev等2009)。

Strehler和Arnold (1951)最早发现了延迟荧光现象。他们在用荧光法测定小球藻中光诱导的ATP的积累时观察到,即使在不添加荧光素酶和荧光素的情况下,停止照光后藻类细胞也有长寿命的荧光发出。随后,这种现象也分别在叶片(Strehler和Arnold 1951)、叶绿体和光合细菌(Arnold和Thompson 1956)等不同材料中被发现。由于受延迟荧光检测技术的限制,以及对延迟荧光解读困难,延迟荧光在光合作用研究中的应用远不如瞬时荧光普及。但是,延迟荧光蕴含着大量的关于光合作用过程的信息,且对环境胁迫的响应比瞬时荧光更敏感(Bjorn和Forsberg 1979),因此,半个世纪以来,延迟荧光的检测和分析始终吸引着很多学者的关注。

目前,对于延迟荧光的原理及其应用的研究多集中在生物物理学研究领域,而在植物生理学研究领域中的应用还非常有限。虽有一些学者对延迟荧光和光合作用的关系进行了探讨,但是它们之间的相互关系仍未被完全揭示(Lavorel 1975; Amesz和Van Gorkom 1978; Malkin 1979; Tyystjarvi和Vass 2004)。本文将结合国内外学者近些年来的研究成果和我们研究室的应用经验,从延迟荧光的产生原理、测定方法及延迟荧光在光合作用研究中的应用等方面进行简要介绍,为延迟荧光在植物科学研究中的应用提供参考。

1 延迟荧光产生的原理

延迟荧光的产生主要由PSII电子传递过程中的氧化还原反应决定。如图1所示,当PSII将天线吸收的光能和转化的电能从1→5传递时,PSII反应中心(P_{680})激发后产生的电子能够进入原初电子受体和次级电子受体并最终形成稳定的化学能(ATP和NADPH),这是光合电子传递的主要方向。然

而,任何氧化还原反应都是可逆的。在电子进行正向传递的同时,还会有一小部分电子进行逆向传递。当电子逆向传递到 P_{680}^+ 时,会使 P_{680} 再次被激发成 P_{680}^* ,部分 P_{680}^* 将激发能传给天线色素后,天线色素将激发能以荧光的形式释放,从而产生延迟荧光。

研究表明,与延迟荧光产生相关的电子传递体主要有以下几种:(1)位于 P_{680} 供体侧的放氧复合体和 Y_z (Z),放氧复合体包括 $S_0\sim S_4$ 5种不同的氧化状态,Z是 D_1 蛋白第161位酪氨酸残基,是 P_{680} 的原初电子供体;(2) P_{680} , P_{680} 接受天线色素吸收的能量后被激发,形成 P_{680}^* , P_{680}^* 极不稳定,回到基态后释放出一个电子传给原初电子受体,从而将光能转变为化学能;(3)位于 P_{680} 受体侧的去镁叶绿素(Pheo)、 Q_A 、 Q_B 、PQ、 P_{700} 等,Pheo作为 P_{680} 的原初电子受体,直接接受 P_{680}^* 给出的电子,电子依次经过 Q_A 、 Q_B 和PQ等向PSI传递。在电子传递的不同阶段,上述电子传递体会形成不同的基团,例如 $Z^+P_{680}^-PheoQ_A^-Q_B^-$ 和 $Z^+P_{680}^-PheoQ_A^-Q_B^{2-}$ 。延迟荧光就是由一些特定状态的基团发生电荷重组产生的。发生电荷重组的基团不同,产生的延迟荧光的寿命以及强度也不同。大多数情况下,延迟荧光的信号是由多种不同特征的延迟荧光组构成,而不同组分延迟荧光的寿命则由相应基团的存在时间决定。

在光合电子传递过程中,电子传递的越远,逆向返回到 P_{680} 的概率就越低,产生的延迟荧光的强度也越低。在停止照光后,随着时间的延续,能够重组的电荷逐渐减少,延迟荧光强度也会逐渐降低。因此,照光后在黑暗中能够观察到延迟荧光的衰减。延迟荧光的衰减过程主要由三个生理过程决定:(1)产生延迟荧光的基团如 $P_{680}^+Pheo^-$ 失去正电荷或者负电荷导致的该基团的减少,而 Q_A 对

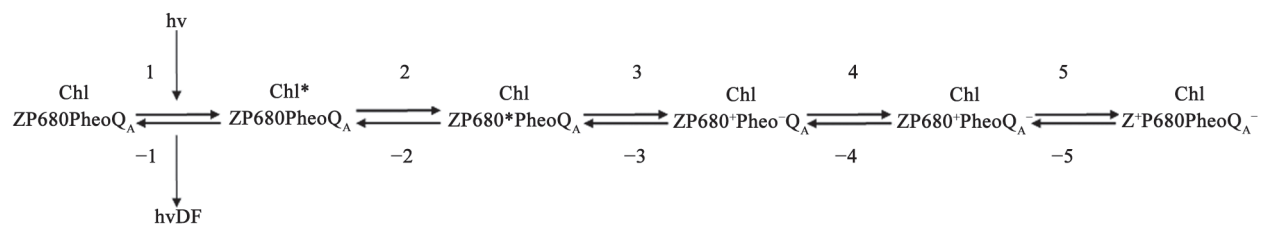


图1 光系统II延迟荧光产生的示意图

Fig.1 Scheme of reactions in PSII leading to delayed fluorescence (DF) emission

Pheo⁻的再氧化或电子供体Z对P₆₈₀⁺的再还原都会导致这种结果的发生。这种延迟荧光的衰减方式称为“电荷渗漏(leakage)”, 微秒级(1~100 μs)和亚毫秒级(100~1 000 μs)延迟荧光的衰减都属于这个类型。(2)延迟荧光基团内发生的氧化还原反应, 如P₆₈₀⁺Pheo⁻基团中Pheo⁻对P₆₈₀⁺的还原, 该过程导致的延迟荧光的衰减被称为去激作用(deactivation) (Lavorel 1975)。而当PSII的正向电子传递不能进行(如PQ库被完全还原)时, 这种方式导致延迟荧光的衰减起主导作用。大部分慢组分延迟荧光(>1 s)的衰减都属于这个类型。(3)速率常数是化学动力学的一个重要的物理常量, 其数值直接反映反应速率的快慢, 当电荷重组的速率常数发生改变时也会导致延迟荧光衰减发生变化, 这通常与黑暗中类囊体跨膜电位的衰减有关(Goltsev等2009)。

2 延迟荧光的测定

延迟荧光与瞬时荧光具有相同的光谱特征 (Strehler和Arnold 1951; Hideg等1991), 而强度与瞬时荧光相比又非常弱, 因此无法通过波长来区分延迟荧光与瞬时荧光。但是瞬时荧光在关光后很快弛豫, 延迟荧光关光后弛豫较慢, 所以可以通过衰减时间的不同来区分二者。目前延迟荧光的测定主要有两种方式: (1)充分暗适应的叶片在照光一段时间后关光, 记录关光后较长一段时间内荧光的变化, 即延迟荧光的衰减过程。通过这种方式可以获得较多的延迟荧光组分信息; (2)对完全暗适应的叶片照光, 在照光过程中不断给予短暂的黑暗间隔, 记录黑暗间隔时期的荧光信号, 从而获得延迟荧光的诱导动力学曲线。这种方法的优点是可以分析光-暗转换过程中光合电子传递链上每个载体以及类囊体膜能级的变化, 同时还可以在照光过程中记录瞬时荧光, 从而实现两种荧光的结合应用。缺点是由于要测定延迟荧光的诱导过程, 所以黑暗周期往往较短, 只能得到较少的延迟荧光组分的信息。

Strehler 和Arnold 于1951年发明了第一台能够测定延迟荧光的仪器(Strehler和Arnold 1951)。之后随着延迟荧光研究的深入, 世界多个国家的研究机构及学者都组建了相应的延迟荧光测定装置, 并且不断改进沿用至今, 其功能和构造都有很

大的不同(Kalaji等2012)。而商品化的延迟荧光测定仪器目前主要有两种, 英国Hansatech公司生产的M-PEA系列多功能植物效率仪和俄罗斯TEST公司生产的Becquerel-type FL-2006 磷光计。

3 延迟荧光的衰减曲线

对植物叶片或者藻类进行一次闪光或者持续一段时间照光后, 关闭光源并同时开始记录延迟荧光的信号, 会得到一条由强逐渐减弱的曲线, 即为延迟荧光的衰减曲线(图2)。延迟荧光的衰减曲线是关光后所有延迟荧光组分衰减过程的叠加, 这些组分的寿命从几纳秒到几十秒不等。

P₆₈₀⁺Pheo⁻电荷重组产生的延迟荧光寿命最短, 仅有2~4 ns (Shuvalov和Klimov 1976; Jursinic 1986), 很难直接与瞬时荧光进行区分(Schatz等1988; Christen等2000), 只有通过适当的化学处理去除光系统中能与P₆₈₀⁺Pheo⁻进行能量交换的其他部分之后才能测定(Shuvalov和Klimov 1976)。纳秒时间范围内延迟荧光的衰减反映了Z对P₆₈₀⁺的还原(Christen等2000)。研究表明, 在离体类囊体膜中, 此部分延迟荧光的衰减过程由3个呈指数衰减的延迟荧光组分组成, 寿命分别为50 ns、300 ns和1.5 μs, 而后两种组分随着饱和脉冲光的激发次数以4为周期波动, 与光下放氧复合体从S₀到S₄状态的变化过程相对应, 表明它们与P₆₈₀的供体侧的状

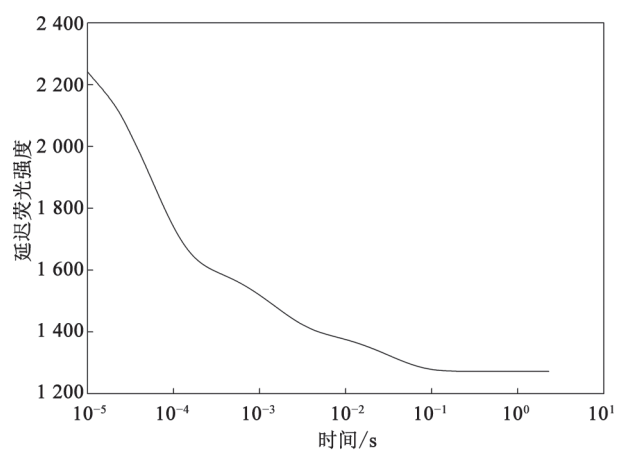


图2 烟草叶片在3 000 μmol·m⁻²·s⁻¹红光照射5 min后, 在黑暗中用M-PEA (Hansatech, 英国)记录的延迟荧光衰减曲线。

Fig.2 The decay curve of delayed fluorescence in tobacco leaves was registered in the dark by a M-PEA (Hansatech, UK) after illuminated 5 min with 3 000 μmol·m⁻²·s⁻¹.

态有关(Christen等2000)。

照光10 μs 后,约80%的PSII处于 $Z^+Q_A^-$ 状态(Jeans等2002),一直到毫秒时间范围内,大部分的延迟荧光都是 Z^+ 和 Q_A^- 重组产生的(Van Gorkom和Donze 1973; Jursinic 1986)。Grabolle和Dau (2005)发现,在暗适应的PSII颗粒中,延迟荧光的衰减对于饱和闪光的照射次数具有强烈的依赖性。Buchta等(2007)的研究证明,这种延迟荧光由四种组分构成,其中三种较快组分的寿命分别为14 μs 、65 μs 和203 μs ,反映了放氧复合体从 S_1 到 S_4 的转化过程,另一种较慢组分的寿命在毫秒范围,反映的是 S_4 到 S_0 的转化过程。因此,Buchta等(2007)认为延迟荧光在微秒时间范围内的衰减主要受 P_{680} 供体侧的影响。此外,还有研究表明,延迟荧光中的亚毫秒(120~200 μs)组分主要由基因 $Z^+P_{680}Q_A^-Q_B^-$ 产生,它的衰减是由电子的正向传递即 Q_B^- 对 Q_A^- 的氧化导致(Lazar 1999)。

在稳定的光照下(长时间的光—暗循环后),第一个毫秒级延迟荧光组分寿命约为1~3.5 ms (Zaharieva和Goltsev 2003; Goltsev等2005),主要由基因 $Z^+P_{680}Q_A^-Q_B^-$ 发生电荷重组产生。Goltsev等(1980)和Buchta等(2007)发现,在饱和脉冲光的照射下该基因对放氧复合体的状态具有强烈的依赖性。在多次光—暗循环后,放氧复合体处于 S_3 状态时的基因产生的延迟荧光强度比处于 S_2 状态时的延迟荧光高出一个数量级,比处于 S_1 状态时的延迟荧光高三个数量级(Buchta等2007)。因此,当处于不同 S 状态的放氧复合体与相关发光基因随机分布时,延迟荧光主要由 S_3 状态的基因产生。毫秒级延迟荧光的衰减也属于“电荷渗漏”型, P_{680} 供体侧 O_2 的产生和 S_3 状态的消失以及 P_{680} 受体侧氧化态的PQ对 Q_B^{2-} 的氧化都影响着延迟荧光的衰减。在离体类囊体膜中,毫秒级延迟荧光的强度随着跨膜电势的增加呈指数上升(Jursinic等1978; Venediktov等1980),这是由于当跨膜质子梯度存在时,跨膜电位促进电子从 Q_A^- 到 Pheo^+ 和 P_{680}^+ 的逆向传递,此时,毫秒级延迟荧光的强度与类囊体膜跨膜电势的大小密切相关(Fleishman 1971; Venediktov等1980)。当PSII受体侧电子传递受到抑制,例如用DCMU进行处理后,由于 Q_A^- 到 Q_B^- 的电子传递受到抑制,微秒级延迟荧光和毫秒级延迟荧光都会受

到严重的抑制(Wraight和Crofts 1971; Zankel 1971; Guo和Tan 2009)。

当PSII处于完全还原状态 $S_1ZP_{680}\text{Pheo}^-Q_A^-Q_B^{2-}$ 且PQ库被完全还原时,产生的延迟荧光寿命较长,约为1~22 s (Robinson和Crofts 1983),它的衰减与 Q_A^- 或者 Q_B^{2-} 与PSII供体侧放氧复合体(S_2 或者 S_3 状态)的电荷重组有关。

4 延迟荧光的诱导曲线

充分暗适应的叶片通过周期性的照光,并在连续的光—暗转变中的黑暗阶段记录延迟荧光的衰减信号,然后将每次关光后相同时间段测得的信号强度连接起来就得到了延迟荧光的诱导曲线。延迟荧光诱导曲线中所有凸出的峰点用I表示,凹陷的谷点用D表示。理论上每两个峰之间都存在一个谷点,因此这些位点按照出现的顺序依次命名为 I_1 、 D_1 、 I_2 、 D_2(Goltsev等2009)。

如图3所示,延迟荧光诱导曲线可以分为快相和慢相两个阶段,前者持续约200 ms,后者持续几分钟(Itoh等1971; Itoh和Murata 1973; Malkin和Barber 1978)。延迟荧光的快相从产生开始经过约7 ms到达 I_1 、100 ms到达 I_2 ,然后下降到一个较低强度 D_2 ,之后会有一个小幅度的上升,大约在1 s位置上升到 I_3 (Goltsev等2003)。延迟荧光慢相从 I_3 开始经过三次短暂的上升即 I_4 、 I_5 和 I_6 之后最终下降到一个稳定的水平S (Itoh和Murata 1973; Goltsev等2003)。

一般情况下,延迟荧光的快相包括 I_1 和 I_2 两个峰值。 I_1 的出现与两个过程相关,即相应的产生延迟荧光快组分的基因的积累和PSI氧化导致的类囊体膜跨膜电势的积累(Pospisil和Dau 2002; Goltsev等2009)。 I_2 出现在PQ完全还原之前,与 Q_B^- 向PQ传递电子导致的PSII反应中心的持续开放有关。在有铁氰化钾(人工电子受体,能够接受PSII传递的电子)和解偶联剂(能够消除跨类囊体膜的质子梯度从而加速电子传递的进行)共同存在时观察不到 I_2 - D_2 的荧光的下降,表明 I_1 - I_2 - D_2 与PQ的还原有关(Goltsev等2009)。 D_2 出现的时间可以反映PSII对PQ库的还原能力也就是PSII的活性,即 D_2 出现的越早,PSII的活性越强。 I_3 只在少数情况下会明显出现在延迟荧光快相的末尾,大约1s位置(Zaharieva和Goltsev 2003),但是对于它产生的原因至今

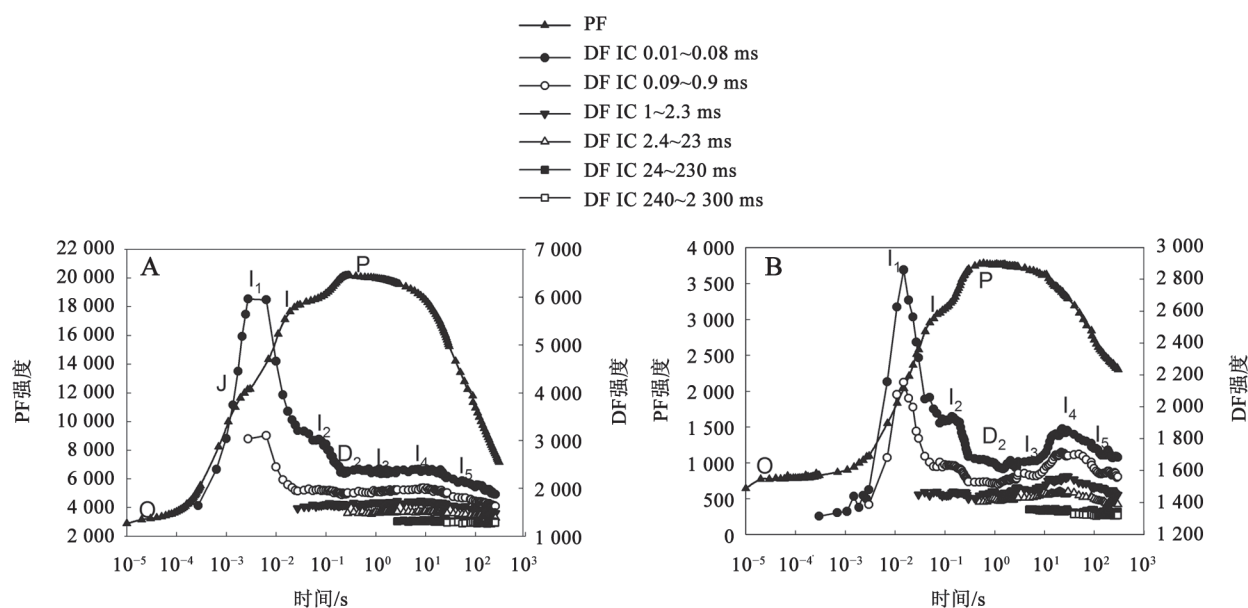


图3 烟草叶片暗适应30 min后,用M-PEA (Hansatech, 英国)同时测定叶片的快速荧光(PF)和延迟荧光(DF),获得快速荧光和延迟荧光的诱导动力学曲线

Fig.3 Prompt fluorescence (PF) and delayed fluorescence (DF) were measured simultaneously by an M-PEA (Hansatech, UK) in tobacco leaves after dark adaptation for 30 min.

A: 测定光强为3 000 $\mu\text{mol (photons)}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; B: 测定光强600 $\mu\text{mol (photons)}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

还未确定。D₂-I₄的上升伴随着照光后PSI的活化,上升的幅度与跨类囊体膜质子梯度的形成有关,上升程度越大表明跨类囊体膜质子梯度越大(Wraight和Crofts 1971; Evans和 Crofts 1973)。Zaharieva等(2001)认为I₅和I₆的出现可能与ATP和NADPH的积累以及卡尔文循环的启动有关。

然而,需要注意的是,测量光强不同,得到的诱导曲线也明显不同。例如600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 测量光条件下检测的延迟荧光与3 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光下检测的结果相比,随着时间的延长,延迟荧光有明显的改变,在3 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光下测定时, I₄并不明显,而在600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光下测定时, I₄较为明显,通常不能明显观察到I₃(图3-A、B)。此外,由于延迟荧光诱导过程中荧光强度的变化与很多生理过程紧密相关,如跨类囊体膜电势和质子梯度的大小(Wraight和Crofts 1971)、电子受体(Ruby 1976)、电子供体(Mar等1975)及放氧复合体的状态(Zankel 1971; Van Gorkom和Donze 1973)等,因此,测定条件及材料不同都会导致延迟荧光诱导曲线形状的差异。

5 延迟荧光在光合作用研究中的应用

植物本身的生理变化如衰老或逆境胁迫等都能够直接或间接地影响其光合机构的功能(Zhang等2012)。通过分析延迟荧光衰减曲线或诱导曲线能够获得大量的光合机构的信息,如植物的光合能力、跨类囊体膜电势及质子梯度的建立(Wraight和Crofts 1971)、PSII供体侧(Mar等1975)、受体侧(Ruby 1976)以及放氧复合体的状态(Zankel 1971; Van Gorkom和Donze 1973)等,从而使我们能够进一步了解逆境胁迫对光合作用过程以及光合电子传递链的影响。

延迟荧光和瞬时荧光都具有快速高效和无损伤测定等特点,而且都能够反映光合电子传递链的状态。但是,两者存在本质上的差异。瞬时荧光通过检测不同时间Q_A⁻的积累所导致的荧光变化来反映光合机构状态的改变,而延迟荧光则是直接检测不同状态的PSII基团发生电荷重组产生的荧光,由于不同特征延迟荧光代表不同的PSII复合体状态,因此它能更加直接的反映PSII的状态,获得的信息也更丰富。

5.1 分析光合电子传递链的状态

延迟荧光诱导曲线中 I_1 - I_2 - D_2 的变化伴随着PQ逐渐还原导致的反应中心的关闭。如果用电子经过PQ的速率来衡量PSII与PSI之间电子传递的活性,则该过程主要由两个因素即PSII捕获的电子传递到PQ的速率和 PQH_2 的电子传递到PSI的速率决定。PQ的氧化与还原速率的改变会导致延迟荧光诱导过程中 I_2 的相对变化。因此 I_2/I_1 常用来反映两个光系统间电子传递的活性。Goltsev等(2012)在研究大豆叶片的脱水过程时发现,在叶片相对含水量从100%下降到60%的过程中, I_2/I_1 随着大豆叶片的相对含水量的降低而逐渐降低,反映了PSII向PSI电子传递的抑制程度逐渐增加。

5.2 分析类囊体膜跨膜质子梯度的变化

叶绿体中跨类囊体膜质子梯度的建立具有重要的生理功能,不仅为叶绿体内ATP合成提供动力,而且能够诱导依赖叶黄素循环的热耗散的形成(Livingston等2010;姜闯道等2000)。因此,跨类囊体膜质子梯度的测定对光合作用的研究具有重要意义。目前检测跨类囊体膜质子梯度的方法主要有两种,一种是荧光探针法;另一种为延迟荧光法。荧光探针法需要使用离体的类囊体,操作较为复杂,不适宜于批量测定,而延迟荧光法不仅快捷高效而且对植物材料没有破坏。

早在上世纪70年代,Wraight和Croft (1971)在研究叶绿体光合磷酸化与类囊体膜高能态的关系时发现,当只用尼日利亚菌素处理消除跨膜质子梯度但不破坏膜电位时,毫秒级延迟荧光慢相阶段被抑制而快相阶段不受影响;只用缬氨霉素破坏膜电位时,只有毫秒级延迟荧光的快相阶段受到抑制而慢相部分不受影响,从而证明毫秒级延迟荧光的快相阶段与膜电位有关,而慢相阶段和跨类囊体膜质子梯度有关。至此以后,人们长期使用毫秒级延迟荧光的强度作为膜电位以及跨膜质子梯度的衡量指标。Zhang等(2012)近期发现,当用水杨基氧肟酸(SHAM)抑制*Rumex K-1*叶片的交替氧化酶呼吸途径(AOX)后,叶片的毫秒级延迟荧光强度(2.8~4 ms)显著下降, NPQ快组分qE被抑制,证明了AOX通过促进跨膜质子梯度的建立从而上调qE。Wang等(2006)通过分析高温强光胁迫下烟草NAD(P)H脱氢酶突变体的延迟荧光诱导动

力学曲线,发现突变体植株的2.8~3.8 ms延迟荧光明显下降,同时qE受到严重抑制,证明了突变体跨膜质子梯度的下降抑制了NPQ快组分qE的形成。

此外,Wraight和Crofts (1971)发现延迟荧光诱导动力学中 I_4 的形成与跨膜质子梯度的形成具有密切关系,因为跨膜质子梯度的建立需要PSI的活化,而 I_4 出现的时间也与PSI活化的时间有关。因此, I_4 的相对变化也可以用来反映叶绿体跨类囊体膜质子梯度。Pooja等(2011)在研究小麦盐胁迫下的生理变化时,发现随着NaCl浓度的增加延迟荧光的 $(I_4-D_2)/D_2$ 逐渐下降,证明了盐胁迫显著抑制了小麦跨类囊体膜质子梯度的建立,并且随着盐浓度的升高,抑制程度逐渐增大。Zaharieva等(2001)发现拟南芥膜脂去氧化基因缺失株系与野生型的 I_4/D_2 都在15~20 °C达到最大,而且突变体与野生型相比没有显著差异,证明膜脂去氧化基因并不影响跨类囊体膜质子梯度的建立。

5.3 延迟荧光与瞬时荧光以及820 nm光反射的结合应用

植物材料对820 nm光反射的变化能够反映叶绿体PSI 反应中心色素 P_{700} 及质体蓝素(PC)的氧化还原状态(Strasser等2010)。延迟荧光不仅可以独立用于植物生理学的研究,而且可以与瞬时荧光以及820 nm光反射同步测定(图4),三者互相补充,互相印证,从而更准确地反映植物光合机构的变化。 I_1 对应于瞬时荧光中J-I的上升阶段,820 nm光反射的下降阶段。在这个过程中PSII向受体侧的电子传递导致 $Q_A^-Q_B^-$ 和 $Q_A^-Q_B^{2-}$ 逐渐积累,PQ库也开始还原,而 P_{700} 和PC由于还未接受PSII传来的电子因此处于快速氧化阶段。 I_2 对应于瞬时荧光的I-P段,820 nm光反射的上升阶段,此时, P_{700} 和PC由于接受PQ侧传来的电子而逐渐还原,PQ受体侧的还原进一步促进PQ的还原,从而加速了PSII反应中心的关闭。在瞬时荧光的P点,反应中心完全关闭,电子传递链完全还原,延迟荧光降到最低点 D_2 , P_{700} 和PC也处于最大还原状态。

Strasser等(2010)的研究发现,当巴尔干苜蓿的相对含水量从100%下降到40%的过程中,瞬时荧光强度及 F_v/F_m 都逐渐下降,延迟荧光的 I_1 和 I_2 逐渐降低,820 nm光反射的氧化阶段不受影响而还原阶段受到抑制,表明脱水过程中巴尔干苜蓿PSII

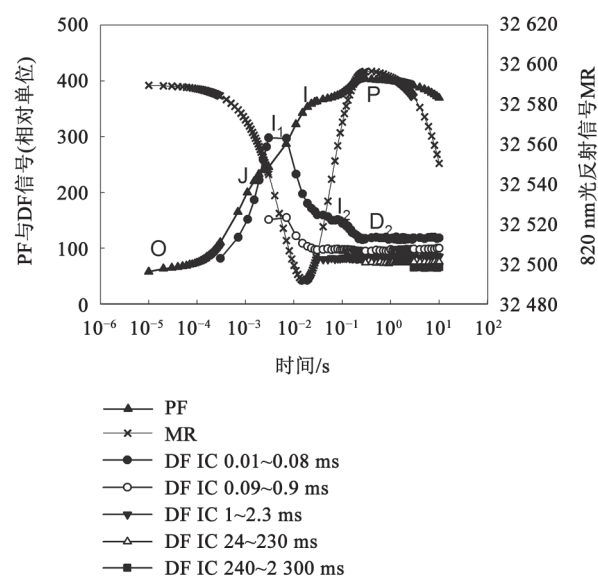


图4 烟草叶片暗适应30 min后,用M-PEA (Hansatech, 英国)同时测定叶片的瞬时荧光(PF)、延迟荧光(DF)和820 nm光反射(MR)

Fig.4 Prompt fluorescence (PF), delayed fluorescence (DF) and modulated 820 nm reflection (MR) were measured simultaneously by a M-PEA (Hansatech, UK) in tobacco leaves after dark adaptation for 30 min
测定光强为3 000 $\mu\text{mol}(\text{photons})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

逐渐失活且PSII和PSI的解耦联程度增加。张菡等(2013)利用瞬时荧光、延迟荧光和820 nm光反射同步测量技术,研究了干旱对平邑甜茶叶片光合机构的伤害,发现在严重干旱胁迫下,微秒级(20~40 μs)和亚毫秒级(100~300 μs)延迟荧光的 I_1 都降低,而将延迟荧光曲线标准化后发现,微秒级延迟荧光的 I_2 相对升高而亚毫秒级延迟荧光的 I_2 却相对降低,这表明,严重干旱胁迫下,平邑甜茶叶片光合机构从PSII到PSI的光合电子传递能力逐渐下降。同步测量的瞬时荧光和820 nm光反射的结果也都证明了上述结论。

5.4 延迟荧光在其它方面的应用

Wang等(2005)在研究模拟酸雨以及 SO_2 处理对紫荆花和栽培大豆延迟荧光的影响时发现,延迟荧光的强度与叶绿体的完整程度呈线性关系,提出延迟荧光可以用来反映叶绿体的完整程度并能够作为评估环境污染对生态系统影响的指标。Maja等(2008)在研究不同营养状态下的单细胞海洋藻类时发现,通过计算两种光照(<600 nm和>650

nm)诱导下的延迟荧光衰减曲线的比值可以得到一条新的曲线,这条曲线的峰值的变化可以用来区分不同营养状态下的藻类。王俊生等(2007)对不同衰减时间内的延迟荧光进行积分后和光合速率进行相关性分析发现,玉米和紫薇的光合速率与延迟荧光的强度呈显著相关,因此,他们提出可以用延迟荧光的强度来反映植物的光合速率。

6 延迟荧光的研究展望

延迟荧光理论的发展以及测定技术的逐渐完善为其在植物生理研究中的广泛应用奠定了基础,并且丰富了无损监测植物光合机构功能的手段。然而,关于延迟荧光诱导曲线中蕴含的丰富信息还尚未被充分开发和利用。这主要是因为光合作用是由多个化学反应共同完成,是一个复杂的生理过程,延迟荧光的产生不是由单一反应决定的,而是受多个反应共同影响的结果;其次,延迟荧光在波长上和瞬时荧光相重叠,而在强度上是瞬时荧光的百分之一甚至更低,因此检测比较困难(Goltsev等2009);再次,以前对于延迟荧光的测定多是不同研究室利用自制或组装的仪器完成,而不同研究室间测定仪器的差异阻碍了不同研究者之间研究信息的交流。目前,随着延迟荧光检测技术的不断完善和测定仪器的商品化,上述问题将会逐渐被解决,延迟荧光在植物科学研究中将扮演更加重要的角色。

未来应该强化延迟荧光在以下几个方面的研究和应用:(1)更多地发掘延迟荧光信息与植物体内生理生化过程的关系,从而扩大延迟荧光在植物科学研究中的应用范围;(2)研究逆境胁迫对植物延迟荧光信号影响,筛选出能够准确、快捷判断环境对植物伤害的延迟荧光指标;(3)加强延迟荧光与作物光合功能之间联系的研究,促进延迟荧光在作物品种的选育以及农业生产中的应用。

参考文献

- 姜闯道,高辉远,邹琦(2000). 类囊体膜 pH梯度在光抑制中的保护机理. 植物生理学通讯, 36 (4): 97~102
王俊生,邢达,许文海,陈维山(2007). 植物延迟荧光与光合能力相关性的理论与实验研究. 光电子·激光, 18 (7): 874~877
张菡,陈昌盛,李鹏民,马锋旺(2013). 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. 植物生理学报, 49 (6): 1~10
Amesz J, Van Gorkom HJ (1978). Delayed fluorescence in photosynthesis. Annu Rev Plant Physiol, 29: 47~66

- Arnold W, Thompson J (1956). Delayed light production by blue-green algae, red algae, and purple bacteria. *J Gen Physiol*, 39: 311~318
- Bjorn, CD, Forsberg AS (1979). Imaging by delayed light emission (phytoluminography) as a method for detecting damage of the photosynthetic system. *Physiol Plant*, 47: 215~222
- 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
- Christen G, Steffen R, Renger G (2000). Delayed fluorescence emitted from light harvesting complex II and Photosystem II of higher plants in the 100 ns-5 μ s time domain. *FEBS Lett*, 475: 103~106
- Evans EH, Crofts AT (1973). The relationship between delayed fluorescence and the H⁺ gradient in chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 292: 130~139
- Fleishman DE (1971). Luminescence in photosynthetic bacteria. *Photochem Photobiol*, 14: 277~286
- Goltsev V, Chernev P, Zaharieva I, Lambrev P, Strasser R (2005). Kinetics of delayed chlorophyll a fluorescence registered in milliseconds time range. *Photosynth Res*, 84: 209~215
- Goltsev V, Ortoidze TV, Sokolov ZN, Matorin DN, Venediktov PS (1980). Delayed luminescence yield kinetics in flash illuminated green plants. *Plant Sci Lett*, 19: 339~346
- Goltsev V, Zaharieva I, Chernev P, Kouzmanova M, Kalaji HM, Yordanov I, Krasteva V, Alexandrov V, Stefanov D, Allakhverdiev 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
- Goltsev V, Zaharieva I, Lambrev P, Yordanov I, Strasser R (2003). Simultaneous analysis of prompt and delayed chlorophyll a fluorescence in leaves during the induction period of dark to light adaptation. *J Theor Biol*, 225: 171~183
- Grabolle M, Dau H (2005). Energetics of primary and secondary electron transfer in Photosystem II membrane particles of spinach revisited on basis of recombination-fluorescence measurements. *Biochim Biophys Acta*, 1708: 209~218
- Guo Y, Tan J (2009). A kinetic model structure for delayed fluorescence from plants. *Biosystems*, 95: 98~103
- Hideg E, Scott RQ, Inaba H (1991). Spectral resolution of long term delayed fluorescence from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys*, 285: 371~372
- Itoh S, Murata N (1973). Correlation between delayed light emission and fluorescence of chlorophyll a in system II particles derived from spinach chloroplasts. *Photochem Photobiol*, 18: 209~218
- Itoh S, Murata N, Takamiya A (1971). Studies on the delayed light emission in spinach chloroplasts. I. Nature of two phases in development of the millisecond delayed light emission during intermittent illumination. *Biochim Biophys Acta*, 245: 109~120
- Jeans C, Schilistra MJ, Klug DR (2002). The temperature dependence of P₆₈₀⁺ reduction in oxygen-evolving Photosystem II. *Biochemistry*, 41: 5015~5023
- Jursinic P (1986). Delayed fluorescence: current concepts and status. In: Govindjee, Ames J, Fork DJ (eds). *Light Emission by Plants and Bacteria*. Orlando: Academic Press, 291~328
- Jursinic P, Govindjee, Wraight CA (1978). Membrane potential and microsecond to millisecond delayed light emission after a single excitation flash in isolated chloroplasts. *Photochem Photobiol*, 27: 61~71
- Kalaji H, Goltsev V, Bosa K, Allakhverdiev S, Strasser R, Govindjee (2012). Experimental *in vivo* measurements of light emission in plants: a perspective dedicated to David Walker. *Photosynth Res*, 114: 69~96
- Lavorel J (1975). Luminescence. In: Govindjee (ed). *Bioenergetics of Photosynthesis*. New York: Academic Press, 223~317
- Lazar D (1999). Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochim Biophys Acta*, 1412: 1~28
- Livingston AK, Cruz JA, Kohzuma K, Dhingra A, Kramer DM (2010). An *Arabidopsis* mutant with high cyclic electron flow around photosystem I (*hcef*) involving the NADPH dehydrogenase complex. *Plant Cell*, 22: 221~233
- Maja BZ, Luka D, Ilaria Molinari, Alexis Z, Serena FU, Marina M (2008). Delayed fluorescence as a measure of nutrient limitation in *Dunaliella tertiolect*. *J Photochem Photobiol B: Biology*, 92: 13~18
- Malkin S (1979). Delayed luminescence. In: Trebst A, Avron M (eds) *Photosynthesis I. Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation*. New York: Acad Press, 473~491
- Malkin S, Barber J (1978). Induction patterns of delayed luminescence from isolated chloroplasts. I. Response of delayed luminescence to changes in the prompt fluorescence yield. *Biochim Biophys Acta*, 502: 524~541
- Mar T, Brebner J, Roy G (1975). Induction kinetics of delayed light emission in spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 376: 345~353
- Pooja M, Vladimir K, Sudhakar B, Suleyman I, Allakhverdiev, Anjana J (2011). Analysis of salt stress induced changes in Photosystem II heterogeneity by prompt fluorescence and delayed fluorescence in wheat (*Triticum aestivum*) leaves. *J Photochem Photobiol B: Biology*, 104: 308~313
- Pospisil P, Dau H (2002). Valinomycin sensitivity proves that light-induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transients. *Biochim Biophys Acta*, 1554: 94~100
- Robinson HH, Crofts AR (1983). Kinetics of the oxidation-reduction reactions of the photosystem II quinone acceptor complex, and the pathway for deactivation. *FEBS Lett*, 153:221~226
- Ruby RH (1976). Delayed fluorescence from *Chlorella*. II. Effects of electron transport inhibitors DCMU and NH₂OH. *Photochem Photobiol*, 26: 293~298
- Schatz GH, Brock H, Holzwarth AR (1988). Kinetic and energetic model for the primary processes in Photosystem II. *Biophys J*, 54:397~405
- Shuvalov VA, Klimov VV (1976). The primary photoreactions in the complex cytochrome-P-890 P-760 (bacteriopheophytin 760)

- of *Chromatium minutissimum* at low redox potentials. *Biochim Biophys Acta*, 440: 587~599
- 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
- Strehler BL, Arnold W (1951). Light production by green plants. *J Gen Physiol*, 34: 809~820
- Tyystjarvi E, Vass I (2004). Light emission as a probe of charge separation and recombination in the photosynthetic apparatus: relation of prompt fluorescence to delayed light emission and thermoluminescence. In: Papageorgiou G, Govindjee (eds). *Chlorophyll a Fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. Dordrecht: Springer, 363~388
- Venediktov PS, Goltsev VN, Shinkarev VP (1980). The influence of electric diffusion potential on delayed fluorescence light curves of chloroplasts treated with DCMU. *Biochim Biophys Acta*, 593: 125~132
- Van Gorkom HJ, Donze M (1973). Charge accumulation in the reaction center of Photosystem 2. *Photochem Photobiol*, 17: 333~342
- Wang CL, Xing D, Zeng LZ, Ding CF, Chen Q (2005). Effect of artificial acid rain and SO₂ on characteristics of delayed light emission. *Luminescence*, 20: 51~56
- Wang P, Duan W, Takabayashi A, Endo T, Shikanai T, Ye JY, Mi HL (2006). Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco leaves functions in alleviation of oxidative damage caused by temperature stress. *Plant Physiol*, 141: 465~474
- Wraight CA, Crofts AT (1971). Delayed fluorescence and the high-energy state of chloroplasts. *Eur J Biochem*, 19: 386~397
- 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 S, Goltsev V (2001) Effect of temperature on the luminescent characteristics in leaves of *Arabidopsis* mutants with decreased unsaturation of the membrane lipids. *Bulg J Plant Physiol*, 27: 3~18
- Zankel KL (1971). Rapid delayed luminescence from chloroplasts: kinetic analysis of components; the relationship to the O₂ evolving system. *Biochim Biophys Acta*, 245: 373~385
- Zhang LT, Zhang ZS, Gao HY, Meng XL, Yang C, Liu JG, Meng QW (2012). The mitochondrial alternative oxidase pathway protects the photosynthetic apparatus against photodamage in *Rumex K-1* leaves. *BMC Plant Biol*, 12: 40
- Zhang ZS, Li G, Gao HY, Zhang LT, Yang C, Liu P, Meng QW (2012). Characterization of photosynthetic performance during senescence in stay-green and quick-leaf-senescence *Zea mays* L. inbred lines. *Plos One*, 7: e42936