

## 不同光强对霜冻后葡萄叶片PSII光化学活性恢复的影响

孙鲁龙, 耿庆伟, 宋伟, 邢浩, 杜远鹏, 翟衡\*

山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018

**摘要:** 为研究不同光强对霜冻后葡萄叶片PSII光化学活性恢复的影响, 从而为通过控制恢复期间光强减轻霜冻伤害提供理论依据, 以‘美乐’葡萄幼苗为试材, 进行模拟霜冻处理, 霜冻后对幼苗进行弱光( $150\sim 160\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )、中等光强( $500\sim 600\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )和强光( $1\ 390\sim 1\ 400\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )恢复, 分析霜冻前后葡萄叶片的叶绿素荧光参数变化。结果表明, 霜冻造成 $F_v/F_m$ 和 $\Phi_{\text{PSII}}$ 的降低, 较强光照会进一步造成光抑制。弱光有利于 $F_v/F_m$ 和 $\Phi_{\text{PSII}}$ 的恢复, 不会造成光抑制。本研究表明, 弱光( $150\sim 160\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )对葡萄叶片霜冻后PSII光化学活性的恢复具有促进作用, 而强光不利于其恢复。

**关键词:** 霜冻; 光强; 恢复; 叶绿素荧光; 葡萄

霜冻, 特别是晚霜冻, 是葡萄春季生长过程中经常遇到的低温灾害。随着全球气候变暖, 霜冻频率呈明显的上升趋势, 对农业生产的威胁也越来越大。霜冻害的严重程度与降温幅度和降温时的微域环境条件有关, 也与葡萄的生长发育状态有关。通常而言, 发芽早的品种、幼嫩的器官在降温程度较大、低温维持时间较长的霜冻天气下容易遭受较严重的伤害(孙福在和赵廷昌2003)。霜冻降温一般发生在夜间, 在翌日白天光照逐渐加强、气温逐渐上升这样的环境因素可能也会影响植株的霜冻伤害。低温胁迫后植物对原本可以适应的环境会变得敏感, 某些环境因子如光照可能会对植物造成胁迫。有研究表明, 夜间低温胁迫会对PSII反应中心造成损伤(Heber等2001), 随后的照光会造成葡萄叶片不同程度的光抑制(Bertamini等2006)。目前对霜冻过程中的气象因子对作物的影响研究比较多, 但对霜冻后环境因子, 特别是光照对恢复过程的影响研究比较缺乏。

‘美乐’是一种酿造干红葡萄酒的优良品种, 常与‘赤霞珠’配套栽培, 但其发芽相对于‘赤霞珠’早一周以上, 在山东地区一般4月上旬即开始发芽, 而这时是山东地区晚霜发生的高频时期, 使该品种容易遭受春季霜冻的伤害。在生产上除了可以通过霜前的气象预警、熏烟、喷布化学药剂等措施减轻霜冻以外, 加强霜后的补救工作也是重要的策略。本文通过探索霜后遮荫及光照在叶片恢复过程中的作用, 期望为通过控制光强减轻霜冻提供一定的理论基础。

### 材料与方法

#### 1 材料及培养

试材为欧亚种酿酒葡萄品种‘美乐’(*Vitis vinifera*

L. cv. ‘Merlot’)。选择枝条粗细度一致(直径大约0.8 cm)的一年生扦插苗, 定植在上口径15 cm, 下口径12 cm, 高15 cm的盆中。幼苗培养环境:  $25^\circ\text{C}/23^\circ\text{C}$  (昼/夜), 光强 $800\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 空气相对湿度75%。长出6~7片展开叶的健康植株用于霜冻试验。

#### 2 试验处理

为避免根系受冻, 首先用泡沫塑料板将盆包裹, 经检测 $-2^\circ\text{C}$ 下维持4 h, 土壤最低温度不低于 $2^\circ\text{C}$ 。

霜冻处理: 将幼苗放入人工霜箱内, 根据2015年监测到的大田霜冻天气温度数据, 模拟霜冻, 设定霜冻程序为: 黑暗条件下, 气温从室温条件下(大约 $16^\circ\text{C}$ )以 $2^\circ\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$ 的速度降到 $-2^\circ\text{C}$ , 在 $-2^\circ\text{C}$ 维持2 h, 之后以 $2^\circ\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$ 的速度回升到 $0^\circ\text{C}$ 。对照组不进行低温处理, 放置在 $23^\circ\text{C}$ 黑暗环境中培养12 h。

恢复处理: 将经过霜冻的幼苗放入 $25^\circ\text{C}$ 不同的光照环境中恢复12 h, 光照条件设置如下。

弱光恢复: 霜冻结束后立即用遮阳网遮盖幼苗, 之后将遮盖的幼苗转移到光照培养箱内, 调整光照强度、待测叶片与光源的距离和角度使网内待测叶片处光强为 $150\sim 160\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

中等光强恢复: 霜冻结束后将幼苗放置在光照培养箱内, 调整光照强度、待测叶片与光源的距离和角度, 使待测叶片处的光强为 $500\sim 600\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

强光恢复: 霜冻结束后将幼苗放置在光照培养箱内, 调整光照强度、待测叶片与光源的距离和角度, 使待测定叶片处的光强为 $1\ 390\sim 1\ 400\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

收稿 2016-04-15 修定 2016-07-18

资助 国家现代葡萄产业技术体系建设专项(CARS-30)和长江学者和创新团队发展计划项目(IRT15R42)。

\* 通讯作者(E-mail: zhaih@sdau.edu.cn)。

对照培养条件: 不进行低温处理, 23°C黑暗培养12 h, 之后置于25°C, 500~600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照环境下培养12 h。

### 3 叶绿素荧光测定

参照Feng等(2002)、胡文海等(2014)的测定程序, 用FMS-2型脉冲调制荧光仪(英国, Hansatech公司)测定植株顶部第3片展开叶的叶绿素荧光。为尽量减少叶片测定部位对测定结果的影响, 每个待测叶片都选择上裂片和下裂片交汇处, 避开叶脉进行测定。每个处理测定3片叶(分别属于3棵幼苗), 每片叶测定一次, 进行5次独立试验。先测定光下参数 $F_o'$ 、 $F_m'$ 和 $F_s$ , 其他参数从仪器上读取, 之后对待测叶片暗适应30 min, 测定暗适应后的参数 $F_o$ 和 $F_m$ , 其他参数从仪器上读取。数据结果以15个数据的平均值 $\pm$ 标准差表示。

霜冻胁迫前测定各个处理的荧光参数。霜冻处理刚结束时以及对照组进行12 h暗处培养后, 立即测定其暗适应后的各个参数。不进行光下参数的测定。光下恢复开始后, 每小时测定一次荧光参数。

各参数的计算及意义为,  $F_s$ : 光下的稳态荧光强度;  $F_m'$ : 光下的最大荧光强度;  $F_o'$ : 光下最小荧光强度;  $F_o$ : 暗适应初始荧光强度;  $F_m$ : 暗适应最大荧光强度;  $F_v/F_m=(F_m-F_o)/F_m$ : 暗适应下PSII最大光化学效率;  $\Phi_{\text{PSII}}=(F_m'-F_s)/F_m'$ : PSII光合电子传递量子效率;  $q_p=(F_m'-F_s)/(F_m'-F_o')$ : 光化学淬灭系数;  $F_v'/F_m'=(F_m'-F_o')/F_m'$ : 天线色素转换效率;  $\text{NPQ}=1-F_m'/F_m$ : 非光化学淬灭系数。

## 实验结果

### 1 不同光强对霜冻后葡萄叶片恢复期光化学活性的影响

图1-A显示了霜冻及不同的光强恢复条件对‘美乐’葡萄叶片最大光化学效率( $F_v/F_m$ )的影响。结果表明, 与霜冻之前相比, 叶片经过黑暗霜冻处理后 $F_v/F_m$ 略有下降, 而不经霜冻处理、只进行黑暗培养的对照组,  $F_v/F_m$ 在培养之后有所提高, 且高于所有霜冻处理组。不同的光强恢复条件对霜冻后 $F_v/F_m$ 的影响不同。弱光恢复条件下的 $F_v/F_m$ 在恢复的1~2 h

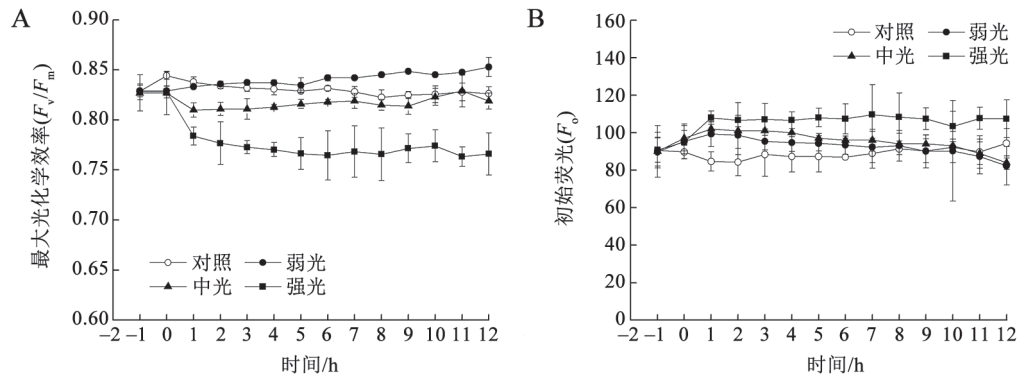


图1 不同光强对霜冻后恢复期葡萄叶片 $F_v/F_m$ 和 $F_o$ 的影响

Fig.1 Effects of different light intensities on  $F_v/F_m$  and  $F_o$  of grapevine leaves during recovery period after frost treatment

横坐标中-1时刻数据代表处理组霜冻之前或对照组黑暗培养之前的水平; 0时刻代表处理组霜冻12 h刚结束或者对照组刚完成12 h黑暗培养时的水平; 1~12分别代表处理组霜冻后恢复不同的时间, 或者对照组在25°C、500~600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 环境下培养不同的时间。数据结果以平均值 $\pm$ 标准差表示,  $n=15$ 。

就可达到霜冻之前的水平, 且在恢复的后期会高于同一时刻对照组的水平; 中度光强条件下,  $F_v/F_m$ 在恢复的11 h才能达到霜冻前水平, 并与对照值接近, 在此之前, 始终低于对照; 强光条件下, 随着恢复时间的延长,  $F_v/F_m$ 始终低于霜冻前的正常水平, 在所有恢复条件中一直处于最低水平, 并呈逐渐下降的趋势, 在恢复期结束时其 $F_v/F_m$ 也无法恢复到正常值。

霜冻后及恢复期葡萄叶片的 $F_o$ 有所变化(图1-B)。霜冻刚结束时(0时刻), 叶片的 $F_o$ 较对照略有上升, 而其 $F_v/F_m$ 较对照略有下降, 说明霜冻对叶片光系统II造成了一定程度的伤害。恢复期间(1~12 h), 所有的恢复处理都会造成 $F_o$ 的升高, 并且在同一时刻光照越强 $F_o$ 越大, 而其 $F_v/F_m$ 越低, 说明霜冻后照光造成叶片光抑制程度的加重。

## 2 不同光强对霜冻后葡萄叶片恢复期 $\Phi_{PSII}$ 的影响

由图2可知, 不同光强恢复条件对霜冻后 $\Phi_{PSII}$ 的影响不同。霜冻后进行弱光恢复, 叶片 $\Phi_{PSII}$ 先下降后上升, 在恢复的前2 h内低于对照水平, 但是从第3小时开始逐渐高于对照水平, 并获得了较大幅度的恢复。霜冻后进行中等光强和高光强恢复, 都会使 $\Phi_{PSII}$ 在恢复期内持续下降, 中等光强恢复的 $\Phi_{PSII}$ 要高于高光强处理, 但恢复的不同阶段具有不同的特征, 短时间内(恢复的前3 h)两种光下恢复的 $\Phi_{PSII}$ 要高于对照组和弱光恢复处理, 从4 h开始, 光下恢复的 $\Phi_{PSII}$ 下降到对照水平以下并持续到恢复期结束。

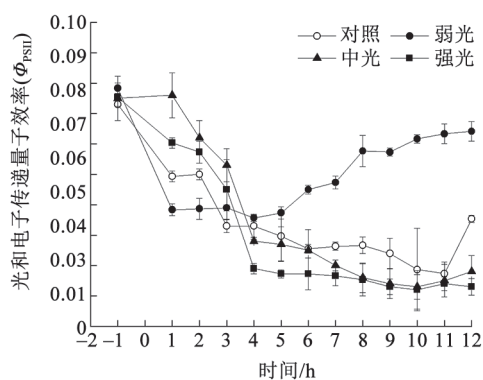
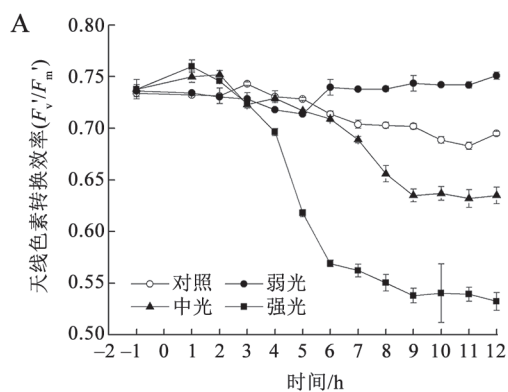


图2 不同光强对霜冻后葡萄叶片恢复期 $\Phi_{PSII}$ 的影响  
Fig.2 Effects of different light intensities on  $\Phi_{PSII}$  of grapevine leaves during recovery period after frost treatment

因 $\Phi_{PSII}$ 的测定需要在光下进行, 因此霜冻刚结束时以及对照组黑暗培养刚结束时无法进行 $\Phi_{PSII}$ 的测定。横坐标中-1时刻代表正常值, 1~12 h分别代表恢复不同的时间。数据结果以平均值 $\pm$ 标准差表示,  $n=15$ 。下图同。



## 3 不同光强对霜冻后葡萄叶片恢复期 $F_v'/F_m'$ 和 $q_p$ 的影响

图3-A表明, 弱光恢复导致 $F_v'/F_m'$ 先降低后升高, 并能恢复到正常水平且高于对照; 中等光强和高光强都会导致 $F_v'/F_m'$ 持续下降, 除了恢复的第1小时外, 中等光强恢复的 $F_v'/F_m'$ 都要高于高光强恢复的。在恢复的前2 h内, 光下恢复的 $F_v'/F_m'$ 要高于对照水平, 之后中、高光强的低于对照水平。

$q_p$ 在恢复过程中的变化趋势与 $\Phi_{PSII}$ 接近。与对照相比, 弱光导致 $q_p$ 先降低后升高, 并能恢复到正常水平且高于对照; 中等光强和高光强都会导致 $q_p$ 持续下降, 除了恢复的第1、2小时外, 中等光强恢复的 $q_p$ 都要高于高光强恢复的。在恢复的前3~4 h内, 光下恢复的 $q_p$ 要高于对照水平, 之后中、高光强的低于对照水平(图3-B)。

## 4 不同光强对霜冻后葡萄叶片恢复期热耗散的影响

图4显示了霜冻处理后不同光强对非光化学淬灭系数(NPQ)的影响。弱光条件下的NPQ最低, 且以比较平稳的趋势持续下降到极低水平。光强会对NPQ造成较大的影响。中等光强和高光强下NPQ均表现出升高和维持较高水平的趋势, 且光照越强NPQ增加越大。

## 讨 论

叶片是葡萄春季生长期最重要的生长器官。叶片只有完成形态建成并具备一定的光合能力才能为后面的新梢生长、开花结实提供良好的营养基础。春天的气候环境往往波动性比较大, 极端

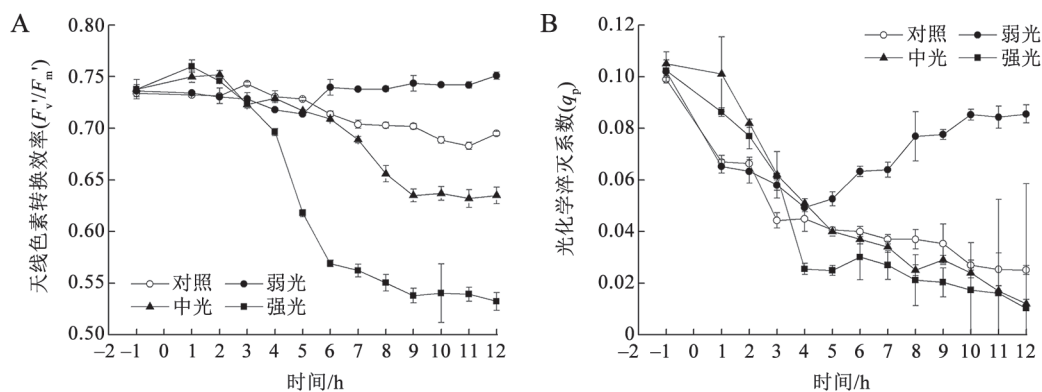


图3 不同光强对霜冻后恢复期葡萄叶片 $F_v'/F_m'$ 和 $q_p$ 的影响  
Fig.3 Effects of different light intensities on  $F_v'/F_m'$  and  $q_p$  of grapevine leaves during recovery period after frost treatment

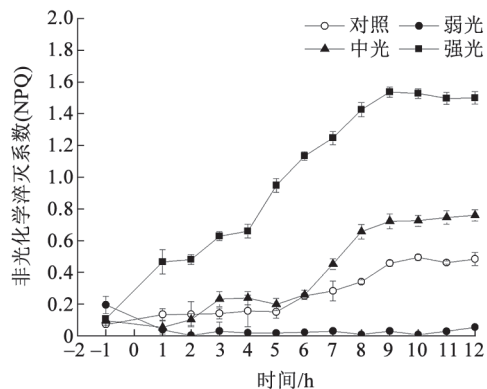


图4 不同光强对霜冻后恢复期葡萄叶片NPQ的影响  
Fig.4 Effects of different light intensities on NPQ of grapevine leaves during recovery period after frost treatment

的天气时有发生,春霜冻是最主要的灾害性天气。叶片在霜冻天气中能否维持正常的光化学活性具有重要的意义。在本试验条件下,霜冻处理后,‘美乐’葡萄叶片的最大光化学效率略有下降,同时其初始荧光也有所升高(图1),证明夜间霜冻对光系统的活性确实造成了一定的抑制(Nikiforou等2011);但是在通过恢复后,这种抑制基本可以解除,说明在实验室条件下的这种霜冻程度(-2°C)对‘美乐’葡萄而言基本可以忍受。

在自然环境下,霜冻过后往往会接着进入晴朗的天气,对植物而言,这很可能成为一种与低温胁迫在时间上连续的复合胁迫,经过低温胁迫的光系统能否处理霜冻次日相对过剩的光能,夜间霜冻后的光照条件对葡萄叶片光系统造成影响是值得探究的问题。

本研究发现,与霜冻刚结束相比,恢复期光照条件对各项指标的影响要远大于黑暗低温处理的影响,因此霜后光照条件对霜冻的严重程度起到很关键的作用。

不同的光照恢复条件所造成的恢复效果不一样。由于照光能提高叶片的温度,不同光强提高叶片温度的效果不同。在经受霜冻后,相对于中等光强和强光处理,弱光处理下的叶片温度在一段时间内处于相对较低的水平,很可能会形成低温弱光引起的PSI光抑制(Zhang等2011, 2013),进而导致PSII光抑制,致使过多的光能不能流入卡尔文循环,光照越强,过剩光能越多,光抑制也会越强,因此 $F_v/F_m$ 和 $\Phi_{PSII}$ 会有短时间的下降。由于试

验条件下的低温并不致死,因此在给予足够时间条件下,PSI、PSII的光抑制会逐渐解除(Feng等2002),同时由于非致死低温的刺激锻炼效果,PSII反应中心的活性又会得到恢复和提高,因此 $F_v/F_m$ 和 $\Phi_{PSII}$ 会显著高于对照水平。弱光恢复条件下,叶片吸收的光能比中等光强和强光恢复要少,因此叶片所积累的过剩光能也相对较少,所造成的光抑制和光伤害也较轻。叶片 $q_p$ 和 $F_v'/F_m'$ 都有较大幅度的升高,并且 $q_p$ 增加的趋势与 $F_v/F_m$ 和 $\Phi_{PSII}$ 增加的趋势一致,但 $q_p$ 在经过低温胁迫后大幅度升高,提高了光化学淬灭过程,并减轻了非光化学淬灭过程(NPQ),使叶片吸收的光能主要通过光化学反应途径得以消耗。 $\Phi_{PSII}$ 反映了照光条件下PSII反应中心部分关闭时的实际光合电子传递量子效率(Demmig-Adams等1996)。 $\Phi_{PSII}$ 对光照的响应要比 $F_v/F_m$ 对光照的响应剧烈得多(图2)。在恢复的前期,处理组和对照组的 $\Phi_{PSII}$ 都在持续下降,这一方面可能是由于经过较长时间的黑暗适应后,反应中心处于完全氧化状态,突然的照光造成反应中心瞬间饱和,而后续的电子传递链无法及时处理过剩的光能所致,另一方面可能是由于低温对反应中心造成了一定程度伤害,照光后过剩的光能又造成了光抑制。 $\Phi_{PSII}$ 的值由 $q_p$ 和 $F_v'/F_m'$ 共同决定。 $q_p$ 反映了PSII反应中心开放程度(Maxwell和Johnson 2000),而 $F_v'/F_m'$ 则可以衡量开放的PSII反应中心的激发能捕获效率(Demmig-Adams等1996)。本研究发现,虽然在霜冻及恢复期 $F_v'/F_m'$ 也发生了一些变化(图3-A),但起主要作用的应该是 $q_p$ ,因为 $q_p$ 的变化在时间和变化趋势上与 $\Phi_{PSII}$ 基本一致(图3-B)。可以推测,在经过一夜的暗适应后,叶片光合电子传递链处于完全氧化的状态,当光照时,其通过光化学淬灭光能的能力很强,因此 $q_p$ 在短时间内增高,但低温可能影响了光能的转化步骤,造成过剩光能的积累, $q_p$ 有所下降,弱光会使光系统逐渐修复,因此其光化学淬灭系数再次升高。

本研究通过模拟霜冻试验发现,霜冻的严重程度除了与霜冻期间的温度条件相关外,恢复期间的光照条件对其也有影响。其中,弱光在葡萄叶片霜冻后的恢复中具有促进作用,强光不利于光化学活性的恢复,150~160  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 是本试验中最佳的恢复光强。

## 参考文献

- Bertamini M, Muthuchelian K, Rubinigg M, Zorer R, Velasco R, Nedunchezian N (2006). Low night temperature increased the photoinhibition of photosynthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling) leaves. *Environ Exp Bot*, 57: 25–31
- Demmig-Adams B, Adams III WW, Barker DH, Logan BA, Bowling DR, Verhoeven AS (1996). Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol Plant*, 98: 253–264
- Feng YL, Cao KF, Feng ZL, Ma L (2002). Acclimation of lamina mass per unit area, photosynthetic characteristics and dark respiration to growth light regimes in four tropical rain forest species. *Acta Ecol Sin*, 22: 901–910 [冯玉龙, 曹坤芳, 冯志立, 马玲 (2002). 四种热带雨林树种幼苗比叶重, 光合特性和暗呼吸对生长光环境的适应. *生态学报*, 22: 901–910]
- Heber U, Bukhov NG, Shuvalov VA, Kobayashi Y, Lange OL (2001). Protection of the photosynthetic apparatus against damage by excessive illumination in homoiohydric leaves and poikilohydric mosses and lichens. *J Exp Bot*, 52: 1999–2006
- Hu WH, Zhang SS, Yan XH, Xiao YA (2014). Effects of natural sunlight on photoinhibition and photoprotection mechanisms in *Rhododendron molle* leaves from long term shading to sunny days. *J Jinggangshan Univ (Nat Sci)*, 35: 42–46 [胡文海, 张斯斯, 闫小红, 肖宜安 (2014). 长期遮荫后全光照对羊蹄躑叶片光抑制及光保护机制的影响. *井冈山大学学报(自然科学版)*, 35: 42–46]
- Maxwell K, Johnson GN (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot*, 51: 659–668
- Nikiforou C, Nikolopoulos D, Manetas Y (2011). The winter-red-leaf syndrome in *Pistacia lentiscus*: Evidence that the anthocyanic phenotype suffers from nitrogen deficiency, low carboxylation efficiency and high risk of photoinhibition. *J Plant Physiol*, 168: 2184–2187
- Sun FZ, Zhao TC (2003). Biological characteristics and frost- inciting mechanisms of ice nucleation active (INA) bacteria and the research in frost control. *Acta Ecol Sin*, 23: 336–345 [孙福在, 赵廷昌 (2003). 冰核细菌生物学特性及其诱发植物霜冻机理与防霜应用. *生态学报*, 23: 336–345]
- Zhang Z, Jia Y, Gao H, Zhang L, Li H, Meng Q (2011). Characterization of PSI recovery after chilling-induced photoinhibition in cucumber (*Cucumis sativus* L.) leaves. *Planta*, 234 (5): 883–889
- Zhang ZS, Yang C, Gao HY (2013). Chilling photoinhibition of photosystem I and its recovery after photoinhibition. *Plant Physiol J*, 49 (4): 301–308 [张子山, 杨程, 高辉远 (2013). 植物光系统I的低温光抑制及恢复. *植物生理学报*, 49 (4): 301–308]

## The role of different light intensities in the recovery of PSII photochemical activity in grape leaves after frost

SUN Lu-Long, GENG Qing-Wei, SONG Wei, XING Hao, DU Yuan-Peng, ZHAI Heng\*

State Key Laboratory of Crop Biology, College of Horticultural Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

**Abstract:** In order to study the role of light intensity in the recovery of photochemical activity in grape leaves after frost and provide the basis for the use of controlling light intensity in reducing frost damages, ‘Merlot’ grape seedlings were frozen and then recovered under low ( $150\text{--}160\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), moderate ( $500\text{--}600\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) and high ( $1\ 390\text{--}1\ 400\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) light intensity conditions. Chlorophyll fluorescence parameters were measured and analyzed before and after artificial simulated frost treatment.  $F_v/F_m$  and  $\Phi_{\text{PSII}}$  were reduced after frost treatment. Low light intensity was useful for their recovery, with no photo-inhibition. It was indicated that, low light intensity ( $150\text{--}160\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) had a promoting effect on the recovery of PSII photochemical activity in grape leaves after frost. Too high intensity of light was harmful.

**Key words:** frost; light intensity; recovery; chlorophyll fluorescence; grape

Received 2016-04-15 Accepted 2016-07-18

This work was supported by China’s Agriculture Research System (Grant No. CARS-30) and the Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University Project (Grant No. IRT15R42).

\*Corresponding author (E-mail: zhaih@sdau.edu.cn).