



植物胁迫的荧光测量指南（二）

——胁迫测量的注意事项

1 叶片的选取

通常选取最新生长的、完全展开的成熟叶片，用于植物胁迫的测量 (Reuter and Robinson 1997)

2 暗适应测量时间的确定

暗适应是在某些荧光测量中使用的技术，用于对处于已知的、特定状态下的样品进行比较 (Baker 2004)。暗适应对多种测量提供了一个参比点 (Maxwell and Johnson 2000)，对参比点位置的确定，取决于研究者对影响测量的植物机理的理解，以及要测量的对象。与淬灭测量和快速光曲线相比， F_v/F_m 和 OJIP 的暗适应测量时间差异性更大。

20min、30min、40min 和 60min 是陆地植物常用的暗适应时间，而某些学者只用黎明前的值，作为对 F_v/F_m 和 OJIP 的可靠测量。

当使用调制式荧光仪时，若要得到可靠的 F_v/F_m 和 OJIP 测量，需要对控制条件和测量进行限定。下面介绍的植物机理会降低 F_m ，可能增加 F_o ，还可同胁迫那样降低 OJIP 和 F_v/F_m 的测量值。操作者必须据此判断要关注的特定类型胁迫，以及暗适应时间。

F_v/F_m 同时受光化学和非光化学因子的影响。如果对叶片进行暗适应后再测量，然后再将叶片暴露于高光照水平下，之后再次暗适应后测量，首次测量的结果则较高。 F_v/F_m 的降低可能是由反应中心光反应的降低，或不可逆转的非光化学淬灭引起的 (Baker N.R., Oxborough K. 2004)。

Papageorgiou 的研究表明，随暗适应时间的差异，测量结果可能出现显著的变异。几分钟的暗适应可重新氧化光化学质体醌库和 $CaMn_4OxCl_y$ cluster。若进行长时间的暗适应，则会耗尽呼吸基质。长时间的暗适应也会消耗 ATP 库和跨膜离子浓度梯度。暗适应也会导致高等植物和藻类向着状态 1 移动，蓝细菌向状态 2 移动 (Papageorgiou G.C. Tismilli-Michael M. Stamatakis K. 2007)。

快速光保护中的非光化学机制是由植物暴露于光强变化的环境中造成的 (包含在 q_E 和 $Y(NPQ)$)，是叶黄素循环和类囊体腔的 ΔpH 引起的。他们在暗适应几分钟后完成弛豫 (Muller, Niyogi 2001; Kramer D. M., Johnson G., Kiirats O., Edwards G., 2004)，根据 Lichtenthaler (1999) 的研究，时间在 2 min 到 4 min，然而野外条件下，需要的时间则可能更长 (Baker 2008)。

对于陆生植物，非光化学淬灭——状态 1 到状态 2 转换的淬灭 (q_T)，在低光照下最显著，约占低光照下淬灭的 60%。在高光强下，则仅占总淬灭的 5%。陆生植物状态转换淬灭弛豫时间小于 20 分钟 (Lichtenthaler H. Burkart S 1999)，基于这个原因，20min 或更长的暗适应时间对于多数 F_v/F_m 和 OJIP 测量足够。

研究表明，由于暴露于强光下，非光化学淬灭的急性光抑制造成的影响，可通过 20 到 30 分钟的暗适应逆转 (Theile, Krause & Winter 1998)。暴露于强光下数小时造成的慢



性光抑制，则在暗适应 40 min 才开始进行弛豫，可能需要 40 h 到 60 h 才能完全弛豫 (Lichtenthaler H. & Babani F., 2004; Theile, Krause & Winter 1998)。

当进行长时间的、与光抑制和光损害相关的非光化学淬灭和淬灭弛豫测量时，应该注意，可能需要大于 1 天的时间，用于完全弛豫或修复非光化学淬灭，以使样品达到胁迫前的状态。这种类型的胁迫或损害，常见于长期的高光强胁迫、高温胁迫、冻害胁迫和越冬胁迫。多数的非光化学淬灭参数使用 F_v/F_m 中的 F_m 作为测量的尺度。基于上面的原因，测量者应比较具有相同 F_v/F_m 值的植物 NPQ (Baker 2004, 2008)。为得到可靠的非光化学淬灭值，通常暗适应一整夜或者 24h (Maxwell and Johnson 2000)。在野外长期光抑制的条件下，通常部分 NPQ 残留会累积到 F_m 值中 (Lichtenthaler H 2004)。

对于藻类和维管植物，在暗反应中，Rubisco 需要 3 min 到 4 min 活化。而对于藻类，Rubisco 在暗适应中钝化时间为 9 min 到 18 min，维管植物则可能需要 24 min 到 28 min (MacIntyre, Sharkey, Geider 1997)。

对水生植物来讲，Gorbunov (2001) 的研究是很好的参考资料，而 (Consalvey 2004) 的研究可作为藻类研究的参考。

Rascher (2000) 和 Ralph (2005) 的研究使用了不同的暗适应方法，可作为暗适应和光曲线有用的参考资料。快速光曲线或 RLC 是植物在饱和光下的特性。在某些研究中，测量与近期和长期光照历史条件相关的、植物在饱和光下的特性 (Ralph 2005; Rascher 2000)。Ralph (2005) 建议使用 5-10 s 的瞬时暗适应。这样即使不完全氧化 QA，也可以将其快速氧化，而不造成显著的非光化学淬灭弛豫。同时他建议 5-10 s 的暗适应，以防止 Rubisco 的失活诱导效应。Rascher (2000) 对 RLC 进行了深入的研究，发现 RLC 不仅因每天测定时间的不同而剧烈变化，而且不同的暗适应时间， α 和 I_k 也不同。使用 30s 的暗适应，斜率要比 30 min 暗适应更陡峭。ETR_{max} 则不随暗适应的不同而变化。因为光历史会改变 RLCs 的结果，Rascher 建议在每天不同的时间进行测试，然后用软件对光曲线结果进行拟合。

某些型号的荧光仪可以使用远红外光对样品进行预照射，通过激活 PSI 来快速再氧化 PSII，这种方法对野外测量十分有用 (Maxwell and Johnson 2000)。但使用时必须明白，红外光不会影响非光化学淬灭弛豫的机理(Consalvey, 2004)。

综上所述，测量时需要考虑几件事情。物种、光历史、植物生活史、需要测量的荧光参数、以及需要测量的胁迫类型的差异，都会导致暗适应时间的不同。当测量新物种或光历史未知的物种时，最好是在不同的暗适应下，测量其最大和稳定时的 F_v/F_m ，以获得最佳的测量结果。当测试最佳的暗适应时间时，要把测试的样品暴露在与实验中相同的最大光照条件下，理由如上所述。

3 Y(II)

Y(II) 测量仅需要几秒钟。然而，可靠的 Y(II) 测量必须在光合作用稳定状态下进行。当植物顶端的叶片暴露于晴天的阳光下时，可以认为其处于光合稳定状态，云层变化，遮荫或者风等会对光合作用进行扰动。稳定状态可以在外界光照几分钟后达到。如果光照水平发生变化，那么植物大约需要 30 min 重新达到新的稳定状态。Maxwell 与 Johnson (2000) 测量了 22 个不同的大不列颠物种，发现他们大约需要 15 到 20 min 达到光合稳定状态。在变化光照条件下进行的测量，结果可能不可靠 (Rascher 2000)。基于上面的叙述，



在使用 PAR 或 Y(II) 时，不要改变叶片相对光化光的角度。测量不需要暗适应。

Y(II) 测量结果受辐射水平和温度影响显著。如果没有控制这两个因子或测量，结果可能受到影响。例如，在测量盐分胁迫时，因为光强的差异，光强较高地点的 Y(II) 可能较高，这样测量者可能认为是胁迫造成的 Y(II) 差异，而实际上仅仅是光强变化的影响。

对于野外测量，辐射和温度处于变化中，建议测量时使用 PAR 叶夹，在测量 Y(II) 的同时，测量辐射水平和叶片温度。相对电子传递速率 (ETR) 的测量同样要使用 PAR 叶夹。更多关于 Y(II) 测量的资料请从我们的网站获取。

当研究冠层下方的样品时，可能需要对叶片进行遮挡，这样可以使使用内置的人工光源，对不同光照水平下的样品进行 Y(II) 测量。测量前确保达到稳定状态。

4 ETR

ETR 是由 Y(II) 和叶片表面的光辐射计算而来。每吸收单个 CO₂ 分子，必须传递 4 个电子 (Schreiber 2004)。

$$ETR = (Y(II)) \times (PAR : \text{mols}) \times (0.84) \times (0.5)$$

上面公式使用的是平均值。0.84 对于许多物种来讲是一个很好的平均值 (Bjorkman and Demming, 1987)。研究表明，随物种、叶绿素含量和含水量的变化，叶片吸收系数可在 0.7~0.9 间变异 (Eichelman H. 2004)。研究还发现，不同物种 PSII 的吸收比例的变异在 0.40 到 0.60 (Laisk and Loreto, 1996)。即使使用默认的平均值，ETR 结果也可很好的用于不同样品或不同条件下同一样品间的比较研究。

要获得更精确的 ETR 值，您可参考前人的研究成果 (Eichelman H. 2004; Laisk and Loreto, 1996; Edwards & Baker 2002)。PSII 反应中心到 PSI 反应中心的比例随物种和生活型而变化。C4 植物反应中心数量具有较 C3 植物高的趋势 (Laisk and Loreto, 1996)。

Baker (2008) 的研究表明，当测量 ETR 时，使用一个整合的系统测量叶片的吸收十分重要。物种、叶绿素含量、水分含量的差异可能导致吸收比例的显著变异。对于多数的比较研究，ETR 可能不需要校正。但对于更精确的研究或研究过程中含水量发生了变化，可能需要更准确的参数计算。因此，很多研究者更倾向使用 Y(II) 测量替代 ETR，用于植物胁迫的研究，公式中的参数可不考虑。

根据 Rascher (2000) 的研究，PAR 的位置可引起测量误差。当使用人工光源时，Rascher 发现 PAR 传感器相对叶片表面的位置可引起多达 10% 的误差。如果使用太阳光，这个误差并不显著，因为到光源的距离非常远。Rascher 使用一个单独的 PAR 传感器，测量到达叶片的辐射强度。之后他比较 PAR 叶夹的值同叶片的值间的差异，对 PAR 叶夹的位置进行校正。这对于多数相对比较 ETR 的研究是不需要的，但对要求精度高的研究却十分有帮助。

5 光曲线

通过对 ETR vs. PAR 作图，潜在 ETR 速率、光合能力和 ETR 速率的限制可以被确定 (U. Schreiber 2004)。植物在一定光照水平下，达到光合稳定状态时才可对其进行测量。



根据 Maxwell 和 Johnson (2000) 的研究结果，在一定的光照水平下，稳定时间大约需要 15 到 20 min，植物才能达到光合稳定状态。注意：在测量前，样品必须到达光合稳定水平，也就是说，光化光源必须照射至少 20 min，更多的资料可登陆我们的网站获得。

6 快速光曲线

在光照变化的条件下，例如林下植物和水体植物，快速光曲线是植物胁迫测量很好的解决方案。快速光曲线测量的光饱和速率与 Rubisco 的浓度和最大活性高度相关 (Macintyre 1997; Macintyre 1996)。在光照变化的环境中，测量的光合速率过高的估计了实际值 (Macintyre 1997)，RLC 的结果受光历史的影响，在每天当中不同时间的测量，结果存在差异。不同学者的暗适应时间从瞬时的 5-10s (Ralph 2005)，到更长的时间 (Rascher 2000)。更多的信息请登录我们的网站获得。

7 理解测量的精度、重复性和可靠性

测量的精度是关键。

在许多类型的测量中，精度取决于对 NIST 的标准物进行校正的精度。这种类型的测量，都会存在公差。

重复性是指在一定的公差水平上连续、重复获得相同的测量。

一个可靠的测量是具有精度和重复性的测量。

对于叶绿素荧光仪，精度的定义采用与上面不同的方式。

归一化的比例 - F_v/F_m , $Y(II)$ 或 $\Delta F/F_m'$

F_v/F_m 和 $Y(II)$ 是通过归一化的比值计算，并不遵循一个可追寻的标准，他们的精度是由正确的使用设备测量和对植物生理的了解决定的。对于多数的未受胁迫的物种，合适的 F_v/F_m 读数在 0.79 到 0.84 之间 (Maxwell and Johnson 2004)。

$Y(II)$ 是依赖于光照水平的归一化比例，其值总是低于 0.84。光照水平越高， $Y(II)$ 值越低。测量 $Y(II)$ 时，同时测量光照水平和叶片温度十分重要，或者可以对光照水平和叶片温度进行控制。 $Y(II)$ 还受温度的影响。

更多的植物胁迫或植物荧光资料请点击[这里](#)获取。