

叶绿素荧光显微成像技术在光合作用研究中的应用

尹燕, 唐为江, 赵长征*

(中国科学院植物研究所公共技术中心, 北京 100093)

摘要: 叶绿素荧光的变化反映了光化学效率和热耗散能力的变化, 可以用于反映植物光合作用机理和光合生理状况。叶绿素荧光成像能够无损、高通量分析样品不同区域的荧光动力学分布变化, 叶绿素荧光显微成像又将研究尺度进一步拓展到细胞、亚细胞水平。目前, 叶绿素荧光显微成像技术的应用, 已使得样品的微观结构光合功能空间差异方面的研究取得了进展, 例如猕猴桃叶片横截面栅栏组织与海绵组织、玉米花环结构中维管束鞘细胞与叶肉细胞的光合功能与光保护差异等。

关键词 叶绿素荧光; 显微成像; 光合作用

中图分类号: Q336 **文献标识码:**

Application of chlorophyll fluorescence kinetic microscope in photosynthesis research

YIN Yan, TANG WeiJiang, ZHAO Changzheng

(Plant Science Facility of the Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100093)

Abstract: The changes in chlorophyll fluorescence reflect the changes in photochemical efficiency and heat dissipation capacity, hence can be used to reveal the mechanism of photosynthesis and display the physiology of photosynthesis in plants. Chlorophyll fluorescence imaging can be used in non-destructive high-throughput analysis of the changes in the fluorescence kinetic distribution of different sample regions, and chlorophyll fluorescence kinetic microscope imaging further expands the research scale to the cellular and subcellular levels. Recently, chlorophyll fluorescence microscopy has enabled the progress of the study of the spatial differences in photosynthetic function of the microstructure of samples, such as the differences in photosynthetic function and photoprotection between cross-section palisade tissue and sponge tissue of kiwifruit leaves, and between bundle sheath cells and mesophyll cells in the corn Kranz anatomy.

Keywords: chlorophyll fluorescence, microscope, photosynthesis

光合作用是地球上最重要的化学反应，植物、藻类及光合细菌等吸收光能、将 CO₂ 和水转化为有机物并释放 O₂。获得光能的叶绿素分子从基态跃迁到激发态，激发态的叶绿素分子可通过三种途径释放能量回到基态：推动光化学反应、以热的形式耗散、释放光子产生荧光。这三种途径的总和是一定的，因此叶绿素荧光的变化反映了光化学效率和热耗散能力的变化。叶绿素荧光成像是广泛应用的光合生理研究的重要探针，叶绿素荧光显微成像又将研究尺度进一步拓展到细胞、亚细胞水平。叶绿素荧光技术发展出了很多不同的测量程序，以慢诱导荧光动力学曲线为例，通过测量光（measuring light, ML）、作用光（actinic light, AL）、饱和脉冲光（saturating pulse light, SP）激发样品，记录动力学曲线并计算叶绿素荧光参数，可以用于反映植物光合作用机理和光合生理状况（朱新广等，2021）。

叶绿素荧光成像技术能记录整个叶片、植株等样品不同区域的荧光动力学分布变化，实现从宏观到微观的光合机理研究。叶绿素荧光成像由于其无损、高通量的技术特征，在光合作用相关突变体筛选领域成为了广泛应用的重要技术，为光合作用机理及抗逆研究提供了强大的技术支持。叶绿素荧光显微成像技术最早出现于 2000 年，Küpper 等人将叶绿素荧光脉冲调制式激发光源与显微镜结合，首次获得了显微尺度的叶绿素荧光图像（Küpper *et al.*, 2000）。叶绿素荧光显微成像技术在国外已经展开多方面研究应用，目前国内的叶绿素荧光显微研究尚处于起步阶段，多个课题组都正在探索这项技术在不同研究领域中的应用，也取得了多项研究进展。

叶绿素荧光显微成像技术适用于研究样品微观结构上光合功能的空间差异，例如叶片横截面栅栏组织与海绵组织的差异，C₄ 植物花环结构中维管束鞘细胞与叶肉细胞的差异，藻类中有差异的单个细胞、异形胞等。我们多年来与吉林师范大学、四川省农业科学研究院等单位合作，目前已合作发表的 3 篇相关论文是国内该领域开创性的应用成果，以叶绿素荧光显微成像的特色优势技术为光合作用的微观探究提供有力支撑。

Yu 等发现狗枣猕猴桃（*Actinidia kolomikta*）的白化叶片通过调整叶片结构及基因表达调控，仍然保持了相对较高的光合能力。应用叶绿素荧光显微成像技术比较了白化和绿色叶片栅栏组织、海绵组织的叶绿素荧光参数，揭示了白化叶片海绵组织光合能力增强的机理。绿叶中栅栏组织 F_v/F_m （最大光化学效率）更高，而白叶中海绵组织显著增厚， F_v/F_m 更高，光合能力增强，补偿了白化的影响，成为叶片光合作用主力组织（Yu *et al.*, 2022）。接下来 Chen 等又比较了两种猕猴桃白化叶片的光保护策略差异，狗枣猕猴桃的白叶主要通过反射实现光保护，强光下花青素积累，叶片转变为粉色，更有效地保护叶片；而葛枣猕猴桃（*Actinidia polygama*）强光下仍为白色，具有更强的叶绿素荧光参数，说明它具有更高的强

光适应能力 (Chen *et al.*, 2023)。Liu 等比较了干旱处理下的玉米 (*Zea mays* L.) 叶肉细胞和维管束鞘细胞, 发现这两种细胞具有不同的不同光保护策略。对玉米完整叶片的分析显示, 随着干旱处理程度增强, F_v/F_m 、 Φ_{PSII} (实际光化学效率) 降低, NPQ (non-photochemical quenching, 非光化学猝灭系数) 显著升高。进一步应用叶绿素荧光显微成像的分析结果与完整叶片相符合, 并且发现与叶肉细胞相比, 维管束鞘细胞 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 更低, 干旱胁迫后 NPQ 升高更显著, 不同细胞的变化趋势差异表明它们具有不同的光保护策略, 维管束鞘细胞中可能具有更强的热耗散能力 (Liu *et al.*, 2022)。

叶绿素荧光显微成像技术在光合作用的微观研究领域具有独特的技术优势, 在光合作用机理研究、环境及毒理胁迫与抗性筛选、优良品系选育等领域具有广阔的应用前景。目前多家单位的科研人员都在探索该技术的新应用, 我们也正在将该技术拓展到多个新的领域, 例如对原生质体以及种子、茎秆等非叶片器官的研究。

参考文献:

- [1] 许大全, 第 9 章: 用叶绿素荧光分析探索光合作用[M]. 朱新广, 许大全主编. 光合作用研究技术. 第一版. 上海: 上海科学技术出版社, 2021: 97-105.
- [2] Küpper H, Šetlík I, Trtílek M, *et al.* A microscope for two-dimensional measurements of *in vivo* chlorophyll fluorescence kinetics using pulsed measuring radiation, continuous actinic radiation, and saturating flashes. *Photosynthetica*, 2000, 38(4): 553-570.
- [3] Yu M, Chen L, Liu D H, *et al.* Enhancement of photosynthetic capacity in spongy mesophyll cells in white leaves of *Actinidia kolomikta*. *Front. Plant Sci.*, 2022, 13: 856732.
- [4] Chen L, Wen D Q, Shi G L, *et al.* Different photoprotective strategies for white leaves between two co-occurring *Actinidia* species. *Physiol. Plant.*, 2023, 175: e13880.
- [5] Liu W J, Liu H, Chen Y E, *et al.* Chloroplastic photoprotective strategies differ between bundle sheath and mesophyll cells in maize (*Zea mays* L.) under drought. *Front. Plant Sci.*, 2022, 13: 885781.