

叶绿素荧光及碳氧同位素信号在光合作用研究中的应用

肖怡^{1,2}, 朱新广^{1,*}

¹中国科学院-马普学会计算生物学伙伴研究所, 上海200031; ²中国科学院大学, 北京100049

摘要: 叶绿素 a 荧光和碳氧稳定同位素信号常用于研究光合作用的光能及水分利用效率。本文综述了叶片光合作用过程中的叶绿素荧光和碳氧稳定同位素信号的机理和研究进展, 并阐述了叶片内部光环境和二氧化碳浓度的不均一性对这两种信号的影响, 最后我们在展望中建议建立基于叶片三维结构及光合机理的模型, 以支持对叶绿素荧光及稳定同位素信号的物理解释, 促进其在光合作用研究中的应用。

关键词: 光合作用; 叶绿素荧光; 稳定同位素; 光能利用效率; 水分利用效率; 二氧化碳利用效率; 叶片结构; 三维叶片模型

光合作用是自然界最重要的生物物理及生物化学反应之一。它吸收并利用光能, 分解水释放氧气的同时, 固定大气中的二氧化碳, 产生碳水化合物, 为地球上的生命活动提供物质及能量基础。近年来, 提高光合作用效率也被认为是进一步提高粮食产量的重要途径(Zhu等2010; Long等2015; Ort等2015)。为了量化衡量植物叶片的光合作用, 人们发展了各种各样的手段和指标来测量和表征叶片的光能及水分利用效率(water use efficiency, WUE), 本文将介绍其中最主要的两种技术方法的原理和相关研究, 即基于叶绿素 a 的荧光信号及碳氧稳定同位素信号。

1 叶绿素荧光理论、测量及叶片光能效率

Kautsky和Hirsch (1931)首次发现, 如果将暗适应的植物叶片或绿色组织突然暴露在可见光下, 叶片及组织会发出暗红色的荧光, 且荧光强度会经历一个先上升后下降的过程。这个现象和在萃取出叶绿素在溶液中的表现不同, 因为叶绿素溶液在恒定光强下发出的荧光强度是一直恒定的。叶片的这种荧光强度变化的过程后来被称为Kautsky效应。

后来研究发现, Kautsky效应与光合作用的光反应过程紧密相关。光子被叶绿体中的捕光天线复合体吸收后被传递到光系统的反应中心。光系统II (photosystem II, PSII)的反应中心P680在接收了一个光子的能量后, 被激发到了第一激发单线态P680^{*}, P680^{*}不稳定, 迅速将电子传递给脱镁叶绿素(pheophytin, Pheo), 并发生电荷分离从而形成P680⁺Pheo⁻; P680⁺之后从PSII电子供体(Y₂)处获取电子, 完成水的光解和氧气释放。而Pheo⁻则进一步将电子传递给初级电子受体Q_A、次级电子受体

Q_B和质体醌(plastoquinone, PQ), 接着经由质体蓝素(plastocyanin, PC)传递到光系统I (photosystem I, PSI)的反应中心P700。被激发的叶绿素 a (P680^{*})除了将能量进行电子传递过程, 还有另外4条途径将电子释放并回到基态: (1)色素分子间的能量传递, 即将相邻的基态P680变为激发态, 而自己回到基态, 这条途径本质上仍可视作电子传递的一部分; (2)激发态的能量以热能的形式耗散; (3)以荧光的形式耗散; (4)从单线态的P680^{*}转变为更稳定的三线态P680^{*}。考虑到短时间及恒定光强下, 热耗散部分是恒定的。如果忽略掉第四种途径, 则Kautsky效应中观察到的荧光强度的变化其实直接反映了电子转移速率的变化。在光下, 随着Calvin-Benson循环的逐步诱导, 电子转移速率逐渐增加, 从而荧光强度减小, 这是Kautsky现象的本质; 这种由于光化学反应导致的叶绿素荧光降低通常被称为光化学淬灭。

叶绿素荧光的瞬变现象常用两种荧光仪来测量。一种使用了调制激发技术[PAM (pulse amplitude modulation)系列仪器, Walz公司(德国Effe-trich)制造]。调制激发就是对于本底激发光采用特定的调制频率, 而检测器只检测记录与同频的荧光, 这样就使得在叠加有其他光源的时候, 仍旧可以把对应激发的荧光信号从背景信号中区分出

收稿 2016-06-22 修定 2016-08-29

资助 比尔及梅琳达·盖茨基金会项目(OPP51586和OPP1060461)、欧盟第七框架计划项目(EU289582)、国家自然科学基金(C020401)、国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2014AA101601)、国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2015CB150104)和中国科学院与澳大利亚联邦科学与工业研究组织合作研究项目(GJHZ1501)。

* 通讯作者(E-mail: zhuxinguang@picb.ac.cn)。

来。另一种荧光仪使用了非调制的连续光来激发并记录叶绿素荧光强度变化,例如PEA (Photosynthetic Efficiency Analyser, Hansatech, 英国)。连续激发式荧光仪相较于调制激发式荧光仪具有分辨率高的优点(每秒可达10万次),不过劣势是测量的时候不能叠加多个光源。

1.1 快速叶绿素荧光诱导动力学曲线

暗适应的叶片放到可见光下,叶绿素 a 荧光强度随时间表现出特征性的变化,我们称之为荧光诱导,有时也叫做荧光瞬变,或者就叫Kautsky效应。叶绿素荧光诱导动力学曲线根据其变化趋势和发生时间分为快相和慢相两个阶段,并通常分别以曲线上的一些变化特征点来命名。前者从暗适应转到可见光下开始起,在大约几百微秒的时间里,荧光强度持续上升,又被称为OJIP曲线。这里O是原点,代表了照光瞬间的荧光强度初始值,J和I都是曲线中间变化的拐点,P代表荧光峰值。荧光诱导曲线的慢相阶段也被称为PSMT曲线,荧光强度从最高峰值P开始下降,S表征了下降过程中的一个半稳态点,M代表了随后出现的次峰值,最后荧光强度将趋于稳定的T,整个过程一般需要几分钟。

对于OJIP曲线的内在机理(图1),考虑充分暗适

应后的叶片,它其中的 Q_A 、 Q_B 和PQ等都处于几乎完全氧化的状态,然后样品受光照射后激发PSII的反应中心,激发的 $P680^*$ 将电子传递给Pheo需要3 ps, Pheo $^-$ 将电子传递给 Q_A 需要250~300 ps, 而电子由 Q_A^- 传递到 Q_B 需要100~200 μ s (Krause和Weis 1991)。这里不均一的电子传递速率造成 Q_B 不能及时把 Q_A^- 氧化,从而导致 Q_A^- 的积累,进而导致部分PSII反应中心被激发后无法回到基态而关闭,整体光合电子转移速率下降,荧光产量上升,因此对应产生了OJIP曲线中的O~J段(Zhu等2005; Xin等2013)。而随后的J~I~P段的荧光强度的变化则和 Q_A^- 氧化和再度还原过程的阶段性变化直接相关(Stirbet等2014; Zhu等2005; Xin等2013)。随着PSII反应中心的不断关闭,从 Q_A^- 和 Q_B^- 传递到PQ库的还原能力不断减弱,当PQ库在来自PSII的持续还原过程和来自PSI渐强的氧化过程中达到短暂的平衡的时候,就出现了荧光诱导曲线中的继拐点J之后的第二个拐点I (Joly和Carpentier 2007)。在I附近的平稳时期里,大部分的PQ和PC将被还原,进而I~P阶段的变化主要表征着来自PSI电子受体方面的影响(Tsimilli-Michael和Strasser 2008; Hamdani等2015)。

对于慢相PSMT曲线,其相关研究和OJIP的相

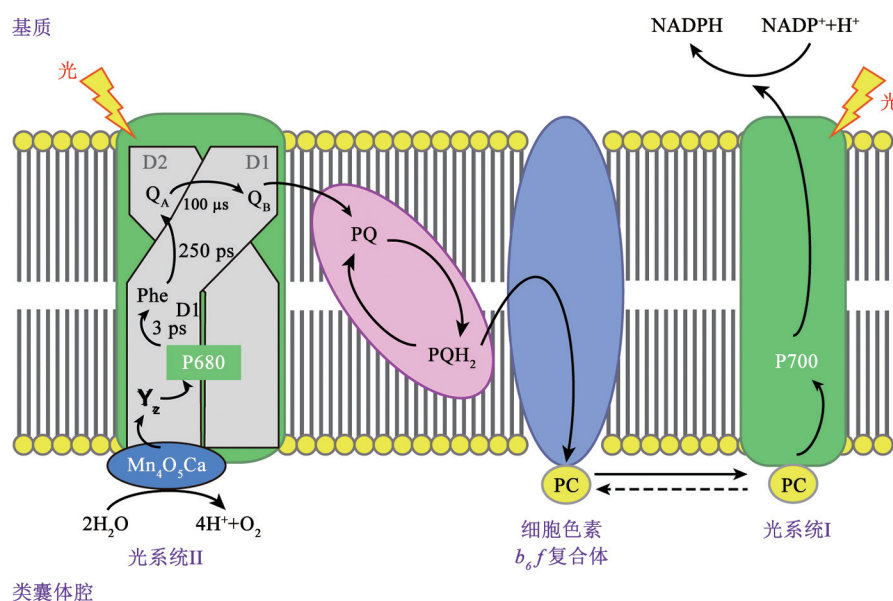


图1 快相叶绿素荧光OJIP曲线的内在机理

Fig.1 Inherent view of the fast OJIP phase in the chlorophyll fluorescence induction curve

Mn_4O_5Ca : 放氧复合物锰簇合物; Y_z : 酪氨酸残基; P680: PSII反应中心; Phe: 脱镁叶绿素; Q_A : 初级受体醌; Q_B : 次级受体醌; PQ: 质体醌; PQH_2 : 还原态质体醌; PC: 质体蓝素; P700: PSI反应中心; NADPH: 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸; $NADP^+$: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸。

比相对较少, 这一方面是由于在实验中发现PSMT曲线部分的可重复性没有OJIP部分高, 所以其机理也有很多至今未明了的地方。并且由于这个阶段的荧光变化是从秒级开始并一直持续几分钟才会稳定, 在考虑荧光变化的内在机理因素时, 除了和OJIP阶段一样需要考虑 Q_A 还原态的变化(Bradbury和Baker 1984), 还必须考虑非光化学淬灭的影响(Niyogi和Truong 2013)。现在一般认为, 其中的P~S阶段主要会受叶黄素类循环的影响, 以热量形式耗散的能量会增加, 从而引起了荧光产量的下降(Holub等2007); S~M~T阶段则既会受Calvin-Benson循环动力学状态的影响(Laisk等2006; Zhu等 2013), 也受光合机构的状态转换(q_T)的影响, 其中S~M阶段对应PSII上的捕光天线复合体(light-harvesting complex II, LHCII)向PSI移动的过程, M~T阶段对应LHCII回到PSII的过程。另外关于连续激发测量叶绿素荧光诱导曲线, 还有一点需要注意的是, 对没有受到胁迫的叶片, 快相阶段明显的J和I点的出现, 一般要求较强的光照, 快速使得 Q_A 、 Q_B 和PQ依次还原; 而对于慢相的PSMT而言, 则需要一个相对低光照射条件, 从而才能得到特征的S和M点, 过高的光强会导致S和M点的消失。所以虽然完整的荧光诱导动力学曲线有时被统称为OJIPSM曲线, 其快相和慢相一般需要分开测量得到。

1.2 饱和脉冲法

定量测量叶绿素荧光的光化学淬灭(q_P)和非光化学淬灭(NPQ)必须依靠饱和脉冲法测量得到的荧光诱导曲线。其常规测量过程是: 首先打开测量光(measuring light, 常用弱红光, 光强只能激发荧光却不足以驱动光合电子传递), 测量叶片的初始荧光(F_0 , 也叫基底荧光、不变荧光或最小荧光); 然后打开饱和脉冲光(saturating flash light), 瞬间将暗适应下原本完全打开的PSII反应中心全部关闭, 从而测量得到暗适应叶片的最大荧光(F_m); 然后开启作用光(actinic light)让叶片进行正常的光合作用, 这个阶段叶片内部的电子传递链上的氧化还原状态的变化就如上面1.1部分中所述, 大约几分钟后荧光强度趋于稳定值(F_s , 或标记为 F_t 或者 F_a); 这个时候PSII反应中心部分关闭, 此时再打开饱和脉冲光, 测得光下最大荧光(F_m'), 得到光适应下PSII反应中心全部关闭时的荧光强度; 然后再关

掉作用光, 打开远红光(far-red light), 由于远红光会偏好性的被PSI反应中心所吸收, 从而PSII上的PQ库会很快被来自PSI的电子受体氧化, 并且PSII的反应中心将全部打开, 此时得到的荧光强度称为光下最小荧光(F_0')。

饱和脉冲法中测量得到的基本参数如上所述, 包括了 F_0 、 F_m 、 F_s 、 F_m' 和 F_0' , 为了消除基本参数中背景噪音以及生化过程等因素的影响, 在实际应用中通常以这些参数为基础, 计算更好描述叶片的生长生理状态的荧光参数。其中重要的参数包括:

F_v : $F_v = F_m - F_0$, 即黑暗中最大可变荧光, F_v 的大小与 Q_A 的还原状态相关。

F_v/F_m : 充分暗适应的叶片PSII的最大或潜在量子产额。对于未经胁迫的植物, F_v/F_m 一般在0.80~0.85之间。

F_v' : $F_v' = F_m' - F_0'$, 即光适应下的最大可变荧光。

F_v'/F_m' : 表示光适应下的PSII的最大量子产额。

Φ_{PSII} : $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$, 表示光适应下的PSII的实际光化学效率。

q_P : $q_P = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$, 代表光适应下的PSII反应中心开放的比例。

q_N : $q_N = 1 - (F_m' - F_0')/(F_m - F_0)$, 反映光适应下的非光化学淬灭。

NPQ: $NPQ = F_m/F_m' - 1$, 表征非光化学淬灭的另一种量化形式, q_N 的取值范围在0到1之间, 而NPQ的取值范围则可能大于1。

ETR: $ETR = \Phi_{PSII} \times PFD \times \alpha \times \beta$, 代表了线性电子传递速率, 其中PFD光通量密度, α 表示叶片对于光的吸收率, 常见值在0.85左右, β 代表了吸收的光子中被PSII吸收的比例, 常默认设为0.5。

2 碳氧稳定同位素理论、测量及叶片二氧化碳、水分利用效率

稳定同位素丰度是进行光合作用研究中常用的另外一个重要信号。稳定同位素是具有相同的原子序数(即质子数), 但中子数目不同且不具有放射性的元素形式的统称。自然界中, 对于常见的生物元素(碳、氢、氧、氮、磷、硫等), 除磷以外, 均存在两种或两种以上的稳定同位素形式。比如碳的同位素形式 ^{12}C 、 ^{13}C , 氧的同位素形式 ^{16}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 。对于特定同位素在某种物质中的组成而言, 重同位素含量一般比轻同位素含量低很多,

直接用两者的摩尔含量比值(同位素比值, isotope ratio)来表示同位素组成不便于记数和记忆, 所以通常使用相对量(delta notation, δ)来表示物质的同位素组成。比如对于碳同位素, 定义为 $\delta^{13}\text{C} = R_p/R_s - 1$, 其中 R_p 是样品中的碳同位素比值, R_s 是国际通用标准物[常见标准物有Pee Dee Belemnite (PDB), 是一种出自美国南卡罗莱纳州的碳酸盐矿石]的碳同位素比值。该数值常以‰作为单位, 也有一些文献会将这个数值乘以1 000来使用。

稳定同位素形成的化合物的化学性质没有明显差异, 但由于分子量不同, 在物理化学性质上(扩散速率、分子键能、生化生成和分解速率等)有着微小的差异, 从而会导致物质反应或跨膜运输前后在同位素组成上出现差异。这种差异现象被称为同位素效应(isotope effect)。同位素效应的大小通常用同位素分馏因子(fractionation factor)来描述, 记做 α ($\alpha = R_r/R_p$, 其中 R_r 和 R_p 分别是该过程反应物和生成物同位素比值)。由于很多过程的同位素分馏因子和1很接近, 于是也常用同位素判别值(isotope discrimination, Δ)来表示, 定义为 $\Delta = \alpha - 1$ 。若测得反应物和生成物的同位素组成分别为 δ_r 和 δ_p , 则该过程的同位素判别值 $\Delta = (\delta_r - \delta_p)/(1 + \delta_p)$ 。例如, 已知大气的 $\delta^{13}\text{C}$ 约等于-8‰, C_3 植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值大约在-27.6‰, 从而光合作用这个过程对应的碳同位素判别值 Δ 就等于20.1‰。

Farquhar等(1982)发现, C_3 植物叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与叶片的胞间二氧化碳浓度(c_i)成正比, 从而得到光合作用的同位素判别值公式(1)。

$$\Delta = a \frac{c_a - c_i}{c_a} + b \frac{c_i}{c_a} \quad (1)$$

在公式(1)中, a 和 b 分别被认为是二氧化碳扩散和羧化过程的碳同位素分馏判别值, c_a 是大气的二氧化碳浓度。通过公式(1)可以看到, 如果采样测量了叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 就能计算叶片的光合作用 Δ 值, 从而计算得到 c_i 的值, 进一步就可以计算得到WUE。而且由于叶片的 $\delta^{13}\text{C}$ 的值是一个长时间积累的结果, 这样计算得到的WUE其实表征了植物在水分利用方面很长时间内表现, 该值比通过光合仪的瞬时测量得到的WUE更有生态研究上的意义。

Evans等(1986)发展了一套在不损伤叶片的情况下测量叶片的同位素组成和光合作用 Δ 值的方法。该方法同步测量叶片气体交换和进出气的碳

同位素组成(图2-A), 并进一步发展了Farquhar等(1982)的光合作用碳同位素理论公式(1), 得到了公式(2)。

$$\Delta = a_b \frac{c_a - c_s}{c_a} + a_s \frac{c_s - c_i}{c_a} + a_m \frac{c_i - c_c}{c_a} + b \frac{c_c}{c_a} - \frac{\alpha_b e}{\alpha_e} \frac{R_d}{A + R_d} \frac{c_c - \Gamma^*}{c_a} - \frac{\alpha_b f}{\alpha_f} \frac{\Gamma^*}{c_a} \quad (2)$$

其中 c_s 和 c_c 分别是叶表面和叶绿体内部的二氧化碳浓度; a_b 、 a_s 和 a_m 分别表示二氧化碳从大气扩散到叶表面、从叶表面通过气孔进入气孔下腔和从气孔下腔进入到叶绿体内过程中的同位素分馏因子; e 和 f 分别表示呼吸和光呼吸过程的同位素分馏因子; α_b 、 α_e 和 α_f 分别等于 $1+b$ 、 $1+e$ 、 $1+f$; R_d 和 A 分别代表叶片的呼吸速率和净光合速率; Γ^* 是 A 等于 R_d 时的 c_c 值。

从公式(2)可以看到, 在已知各个过程的蒸腾因子的情况下, 结合气体交换技术, 可以从中由 Δ 值计算得到叶绿体二氧化碳浓度 c_c , 进而计算出叶片对于二氧化碳的叶肉导度(g_m)。叶肉导度和气孔导度(g_s)两个参数一起刻画叶片二氧化碳利用效率。气孔导度描述的是二氧化碳在通过气孔的过程中, 浓度由大气二氧化碳浓度 c_a 降到胞间浓度 c_i 的阻力, 其定义为 $g_s = A/(c_a - c_i)$ 。叶肉导度描述的是二氧化碳在从胞间扩散到叶绿体内最终被羧化的过程所受到的阻力, 其定义为 $g_m = A/(c_i - c_c)$ 。

Jarman (1974)和Cowan (1978)讨论了气孔中蒸腾气流的流出和二氧化碳气流的流入会互相影响, 这被称为三元效应(ternary effect), 并且这种影响很早就在气体交换测量中得到了考虑(von Caemmerer和Farquhar 1981)。但在碳同位素测量中, 直到Farquhar和Cernusak (2012)才在公式的基础上考虑进了这种气孔中水蒸气分子、二氧化碳分子和大气分子的相互碰撞对于同位素分馏的影响。得到了如下公式(3)。

$$\Delta = \frac{1}{1-t} \left[a_b \frac{c_a - c_s}{c_a} + a_s \frac{c_s - c_i}{c_a} \right] + \frac{1+t}{1-t} \left[a_m \frac{c_i - c_c}{c_a} + b \frac{c_c}{c_a} - \frac{\alpha_b e}{\alpha_e} \frac{R_d}{A + R_d} \frac{c_c - \Gamma^*}{c_a} - \frac{\alpha_b f}{\alpha_f} \frac{\Gamma^*}{c_a} \right] \quad (3)$$

其中 t 代表了三元效应的大小。同时他们在实际应用中发现, 通过公式(2)计算得到叶肉导度要显著高于公式(3)计算得到的值, 说明了三元效应对稳定碳同位素信号的阐释至关重要。

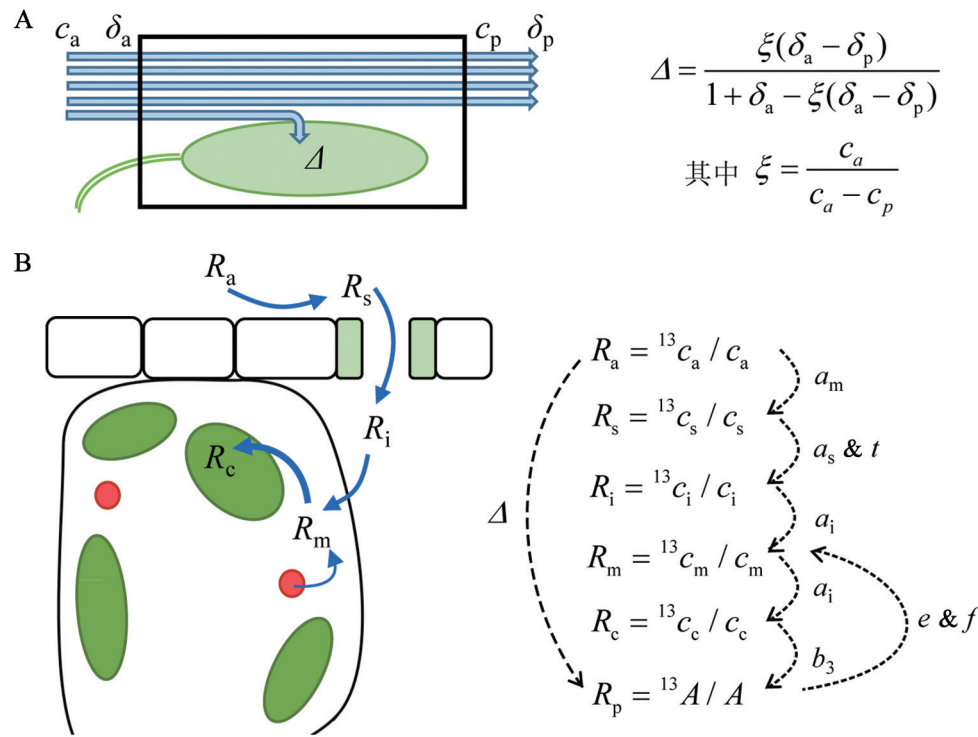


图2 结合气体交换和稳定同位素技术测量叶肉导度的方法和原理示意图

Fig.2 Techniques and principles of measuring the mesophyll conductance from combined gas exchange and stable carbon isotope discrimination

A: 结合气体交换和稳定同位素技术可以在不破坏叶片的情况下测量光合作用的同位素判别值。 c_a 和 c_p 分别是叶室进气和出气的二氧化碳浓度, δ_a 和 δ_p 分别是进气和出气的同位素组成(Evans等1986), Δ 表示光合作用的同位素判别值; B: 碳同位素在叶片内部的具体分馏过程, R_x 表示碳同位素的比值, $^{13}c_x$ 表示 $^{13}\text{CO}_2$ 的含量, c_x 表示二氧化碳的含量, 下标的a表示空气, s表示叶片表面, i表示气孔下腔, m表示细胞质, c表示叶绿体基质。 R_p 表示光合产物中的碳同位素比值, ^{13}A 表示 $^{13}\text{CO}_2$ 的光合速率, A 表示二氧化碳的光合速率。 a_m 表示二氧化碳在从大气扩散到叶片表面过程中的同位素蒸馏因子, a_s 表示从叶片表面进入气孔下腔过程的蒸馏因子, t 代表气孔的三元效应, a_i 表示二氧化碳溶解和在水中扩散过程的蒸馏因子, b_3 表示Rubisco羧化过程的蒸馏因子, e 和 f 分别表示呼吸和光呼吸过程的蒸馏因子。整个光合过程的同位素判别值 Δ 的最终公式(4)可以由此示意图推导得到(具体推导过程详见Evans和von Caemmerer 2013; Gu和Sun 2014)。

稳定氧同位素信号相较于稳定碳同位素而言更加复杂, ^{18}O 元素既会以 $^{18}\text{OC}^{16}\text{O}$ 的形式存在于大气的二氧化碳中, 也会以 H_2^{18}O 的形式存在于根系从土壤中吸收的水分里, 而且由于碳酸酐酶的存在, 这两者的氧同位素组成会在二氧化碳水合过程中进行交换。Gillon和Yakir (2000)测量了 C_3 植物叶片中水和二氧化碳的稳定氧同位素并以此发展了计算 C_3 植物叶肉导度的方法。对于 C_4 植物, 由于维管束鞘细胞中二氧化碳浓缩机制的存在, 如上依靠稳定碳同位素的方法无法测得其叶肉导度。这一问题最近由Barbour等(2016)解决, 她们同时测量 C_4 叶片气体交换以及二氧化碳和水中的稳定氧同位素信号, 推导了计算 C_4 植物的叶肉导度的新模型。

3 叶绿素荧光信号和碳氧稳定同位素信号在叶片中的异质性

在如上考察叶绿素荧光信号和碳氧稳定同位素信号的过程中, 其实都是把叶片假想成为了一个大的细胞, 也即假设了叶片内部的光环境、二氧化碳环境和水环境等都是均一的, 然而其实这些假设距离真实情况都有一定偏差, 进而影响针对叶绿素荧光及同位素信号的物理阐释。

对于均一的叶绿素溶液其内部的光吸收分布符合Beer-Lambert定律, 也即光的吸收随着深度的增加而指数型递减。然而, 叶片内部结构存在极大的异质性: (1)存在多种细胞, 包括表皮细胞、栅栏组织、海绵组织、维管束、维管束鞘伸展区及泡状细胞等多种细胞类型, 而且这些细胞的分布

方式在不同叶片中也不一致; (2)在单个细胞内部, 还存在细胞壁、细胞膜、细胞质、叶绿体膜、液泡膜等不同介质, 其对光的反射、透射和吸收特性存在差异; (3)在一些物种中, 其叶绿体在细胞内的分布会随着光强变化而做出适应性的局部移动 (Davis等2011; Davis和Hangerter 2012)。所以Beer-Lambert定律不能准确描述叶片内部的光环境, 实验上的测量结果也证实了这一点。从上世纪八十年代开始, 人们就尝试用各种方法测量叶片内部光环境, 比如用很细小的光纤插入到叶片内部的不同深度以测量内部光强 (Cui等1991; Oguchi等2011), 也有通过观察表面照光下叶片横截面的荧光图像来测得叶片内部光环境的 (Takahashi等1994; Vogelmann和Han 2000; Vogelmann和Evans 2002)。所有这些研究都表明不同的光质 (入射光的方向是直射或散射, 光的不同颜色), 不同的叶片内部结构对于光能吸收在叶片内部的分布有着不同程度的影响 (Vogelmann和Evans 2002; Brodersen和Vogelmann 2010)。

这种不均一的光环境会影响对从叶片测得的荧光信号的生理意义的阐释。一方面荧光本质上是由于光被吸收才产生, 叶片吸收的光越多, 激发出的荧光强度也就越高。因此, 叶片内部不均一的光吸收首先会导致叶片内部不均一的荧光激发; 其次, 叶片表面透射出来的荧光信号其实是来自叶片内部不同细胞的荧光信号的叠加。虽然仪器一般选用>715 nm的波段作为检测波长, 不过仍旧存在着荧光重吸收现象; 这导致荧光参数更多地是表征着相对更靠近叶片表面的叶肉细胞的光合性质。在这一点上, 叶绿素荧光技术和气体交换技术不同: 气体交换测量得到的光合参数都是相对被夹在密闭气室里的整个叶片而言的。Evans (2009)利用一个叶片多层模型估计了光的异质性对于电子转移速率测量的影响, 发现即使不考虑叶片内部不同层之间的荧光信号被重吸收, 荧光测量得到的电子转移速率会高估叶片真正的电子转移速率; 尤其是在蓝光作为作用光或者叶片反面朝上来测量荧光时, 这种高估更加明显。

除了光环境以外, 叶片内部的二氧化碳环境也存在很强的异质性。考虑到二氧化碳分子从气孔下腔到叶绿体的扩散过程依赖于其浓度梯度,

从而不同细胞不同叶绿体到气孔下腔的距离远近会导致其局部的二氧化碳浓度的不同 (Parkhurst 1994)。此外, 不均一的局部光吸收也会导致叶绿体之间不均一的光限制程度, 从而导致不均一的叶绿体光合速率, 进一步影响二氧化碳在叶片内部分布的异质性。在此情况下考虑稳定碳同位素在叶片内部的分馏过程就变得非常复杂, 首先不同的叶绿体光合效率会导致不同程度的同位素分馏, 而且即使经过某叶肉细胞的一次分馏后的二氧化碳气体仍可能被另一个叶肉细胞二次分馏, 就又增加了叶片内部碳同位素信号的异质性。Farquhar (1989)采用了一种极其简略的方式来处理这个问题, 其中所有叶肉细胞的分馏过程被假设成互相独立的, 然后叶片层面检测到的碳同位素分馏信号等于所有叶肉细胞产生信号的加权, 权重就等于每个叶肉细胞各自的净光合速率。

除了这种在不同细胞间的二氧化碳浓度的异质性, 即使在单个叶肉细胞内部, 也存在着二氧化碳浓度的异质性, 而且这种异质性也影响碳同位素信号的阐释, 从而影响着在此基础上的二氧化碳利用效率和WUE的计算。在正常环境下, 在细胞内部, 由于羧化反应的消耗, 叶绿体内二氧化碳浓度而最低, 细胞质中的浓度略高于叶绿体二氧化碳浓度, 线粒体由于有光呼吸和呼吸的二氧化碳的释放, 其局部浓度最高。Evans和von Caemmerer (2013)将这种二氧化碳的空间异质性也考虑进了碳同位素的公式中, 得到公式(4)。

$$\Delta = \frac{1}{1-f} \left[a_b \frac{c_a - c_s}{c_a} + a_s \frac{c_s - c_i}{c_a} \right] + \frac{1+f}{1-f} \left[a_i \frac{c_i - c_c}{c_a} + b \frac{c_c}{c_a} - \frac{\alpha_b}{\alpha_e} e \frac{R_d}{A+R_d} \frac{c_c - \Gamma^*}{c_a} - \frac{\alpha_b}{\alpha_f} f \frac{\Gamma^*}{c_a} \right] - \frac{1+f}{1-f} \left[\frac{\alpha_i}{\alpha_e} e \frac{R_d}{c_a} + \frac{\alpha_i}{\alpha_f} f \frac{A+R_d}{c_c - \Gamma^*} \frac{\Gamma^*}{c_a} \right] \times r_c \quad (4)$$

其中 r_c 表示细胞内部叶绿体膜对二氧化碳扩散的阻力 (图2-B)。

4 展望

叶绿素荧光信号及同位素信号在过去光合作用研究中起到重要作用。鉴于叶绿素荧光和碳同位素信号在叶片内部的这种异质性, 即使采用如Evans (2009)的那样的多层模型, 也未能完全刻画荧光信号激发和传播过程中的距离、吸收和重

吸收问题; 或采用Evans和von Caemmerer (2013)推荐的模型来阐释碳同位素信号, 也没能考虑细胞内部二氧化碳的重固定及叶片内部二氧化碳不均一分布。这主要是由于这些机理模型在结构维度和复杂度上仍旧做了大量不可避免的简化。而今随着人们对机理研究的深入、原理解析的完善和高性能仿真计算技术的发展, 基于叶片三维结构的光环境和二氧化碳环境模拟已经得以实现(Govaerts等1996; Tholen和Zhu 2011; Ho等2016), 同时光合作用代谢过程模型也被建立(Zhu等2013; Wang等2014a, b)。可以预见, 在这些模型的基础上, 目前已经有可能构建基于叶片三维结构、光合机理、二氧化碳扩散过程及光线传输过程的高度机理性的叶片模型。利用此类模型, 将实现对叶绿素荧光信号及稳定同位素信号的更加精确的模拟, 这将为推动叶绿素荧光和碳氧同位素信号的物理解释及其应用提供理论工具。

参考文献

- Barbour MM, Evans JR, Simonin KA, Caemmerer S (2016). Online CO₂ and H₂O oxygen isotope fractionation allows estimation of mesophyll conductance in C₄ plants, and reveals that mesophyll conductance decreases as leaves age in both C₄ and C₃ plants. *New Phytol*, 210 (3): 875–889
- Bradbury M, Baker NR (1984). A quantitative-determination of photochemical and non-photochemical quenching during the slow phase of the chlorophyll fluorescence induction curve of bean-leaves. *BBA-Bioenergetics*, 765 (3): 275–281
- Brodersen CR, Vogelmann TC (2010). Do changes in light direction affect absorption profiles in leaves? *Funct Plant Biol*, 37 (5): 403–412
- Cowan IR (1978). Stomatal behaviour and environment. In: Preston RD, Woolhouse HW (eds). *Advances in Botanical Research*. the Netherlands: Elsevier, 4: 117–228
- Cui M, Vogelmann T, Smith W (1991). Chlorophyll and light gradients in sun and shade leaves of *Spinacia oleracea*. *Plant Cell Environ*, 14 (5): 493–500
- Davis PA, Caylor S, Whippo CW, Hangarter RP (2011). Changes in leaf optical properties associated with light-dependent chloroplast movements. *Plant Cell Environ*, 34 (12): 2047–2059
- Davis PA, Hangarter RP (2012). Chloroplast movement provides photoprotection to plants by redistributing PSII damage within leaves. *Photosynth Res*, 112 (3): 153–161
- Evans J, Sharkey T, Berry J, Farquhar G (1986). Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO₂ diffusion in leaves of higher plants. *Funct Plant Biol*, 13 (2): 281–292
- Evans JR (2009). Potential errors in electron transport rates calculated from chlorophyll fluorescence as revealed by a multilayer leaf model. *Plant Cell Physiol*, 50 (4): 698–706
- Evans JR, von Caemmerer S (2013). Temperature response of carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in tobacco. *Plant Cell Environ*, 36 (4): 745–756
- Farquhar G (1989). Models of integrated photosynthesis of cells and leaves. *Philos Trans R Soc Biol Sci*, 323 (1216): 357–367
- Farquhar G, O'Leary M, Berry J (1982). On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Funct Plant Biol*, 9 (2): 121–137
- Farquhar GD, Cernusak LA (2012). Ternary effects on the gas exchange of isotopologues of carbon dioxide. *Plant Cell Environ*, 35 (7): 1221–1231
- Gillon JS, Yakir D (2000). Internal conductance to CO₂ diffusion and C¹⁸OO discrimination in C₃ leaves. *Plant Physiol*, 123 (1): 201–214
- Govaerts YM, Jacquemoud S, Verstraete MM, Ustin SL (1996). Three-dimensional radiation transfer modeling in a dicotyledon leaf. *Appl Opt*, 35 (33): 6585–6598
- Gu L, Sun Y (2014). Artefactual responses of mesophyll conductance to CO₂ and irradiance estimated with the variable J and online isotope discrimination methods. *Plant Cell Environ*, 37 (5): 1231–1249
- Hamdani S, Qu M, Xin C, Li M, Chu C, Zhu X (2015). Variations between the photosynthetic properties of elite and landrace Chinese rice cultivars revealed by simultaneous measurements of 820 nm transmission signal and chlorophyll *a* fluorescence induction. *J Plant Physiol*, 177: 128–138
- Ho QT, Berghuijs HN, Watté R, Verboven P, Herremans E, Yin X, Retta MA, Aernouts B, Saeys W, Helfen L (2016). Three-dimensional microscale modelling of CO₂ transport and light propagation in tomato leaves enlightens photosynthesis. *Plant Cell Environ*, 39 (1): 50–61
- Holub O, Seufferheld M, Gohlke C, Heiss G, Clegg R (2007). Fluorescence lifetime imaging microscopy of *Chlamydomonas reinhardtii*: non-photochemical quenching mutants and the effect of photosynthetic inhibitors on the slow chlorophyll fluorescence transient. *J Microsc*, 226 (2): 90–120
- Jarman P (1974). The diffusion of carbon dioxide and water vapour through stomata. *J Exp Bot*, 25 (5): 927–936
- Joly D, Carpentier R (2007). The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the I-peak in the O-J-I-P chlorophyll fluorescence rise: effects of various electron acceptors. *J Photochem Photobiol B*, 88 (1): 43–50
- Kautsky H, Hirsch A (1931). Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Natuwissenschaften*, 19: 964
- Krause GH, Weis E (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 42 (1): 313–349
- Laisk A, Eichelmann H, Oja V (2006). C₃ photosynthesis in silico. *Photosynth Res*, 90 (1): 45–66
- Long SP, Marshall-Colon A, Zhu X (2015). Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential. *Cell*, 161 (1): 56–66
- Niyogi KK, Truong TB (2013). Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxy-

- genic photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*, 16 (3): 307–314
- Oguchi R, Douwstra P, Fujita T, Chow WS, Terashima I (2011). Intra-leaf gradients of photoinhibition induced by different color lights: implications for the dual mechanisms of photoinhibition and for the application of conventional chlorophyll fluorometers. *New Phytol*, 191 (1): 146–159
- Ort DR, Merchant SS, Alric J, Barkan A, Blankenship RE, Bock R, Croce R, Hanson MR, Hibberd JM, Long SP, et al (2015). Redesigning photosynthesis to sustainably meet global food and bioenergy demand. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112 (28): 8529–8536
- Parkhurst DF (1994). Diffusion of CO₂ and other gases inside leaves. *New Phytol*, 126 (3): 449–479
- Stirbet A, Riznichenko GY, Rubin AB, Govindjee (2014). Modeling chlorophyll *a* fluorescence transient: Relation to photosynthesis. *Biochemistry (Moscow)*, 79 (4): 291–323
- Takahashi K, Mineuchi K, Nakamura T, Koizumi M, Kano H (1994). A system for imaging transverse distribution of scattered light and chlorophyll fluorescence in intact rice leaves. *Plant Cell Environ*, 17 (1): 105–110
- Tholen D, Zhu X (2011). The mechanistic basis of internal conductance: a theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO₂ diffusion. *Plant Physiol*, 156 (1): 90–105
- Tsimilli-Michael M, Strasser RJ (2008). *In vivo* assessment of stress impact on plant's vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants. In: Varma A (ed). *Mycorrhiza*. Berlin: Springer-Verlag, 679–703
- Vogelmann T, Han T (2000). Measurement of gradients of absorbed light in spinach leaves from chlorophyll fluorescence profiles. *Plant Cell Environ*, 23 (12): 1303–1311
- Vogelmann TC, Evans J (2002). Profiles of light absorption and chlorophyll within spinach leaves from chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Environ*, 25 (10): 1313–1323
- von Caemmerer S, Farquhar G (1981). Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153 (4): 376–387
- Wang Y, Bräutigam A, Weber APM, Zhu X (2014a). Three distinct biochemical subtypes of C₄ photosynthesis? A modelling analysis. *J Exp Bot*, 65 (13): 3567–3578
- Wang Y, Long SP, Zhu X (2014b). Elements required for an efficient NADP-Malic enzyme type C₄ photosynthesis. *Plant Physiol*, 164 (4): 2231–2246
- Xin C, Yang J, Zhu X (2013). A model of chlorophyll *a* fluorescence induction kinetics with explicit description of structural constraints of individual photosystem II units. *Photosyn Res*, 117 (1): 339–354
- Zhu X, Govindjee, Baker NR, deSturler E, Ort DR, Long SP (2005). Chlorophyll *a* fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete set of excitation energy and electron transfer associated with photosystem II. *Planta*, 223 (1): 114–133
- Zhu X, Long SP, Ort DR (2010). Improving photosynthetic efficiency for greater yield. *Annu Rev Plant Biol*, 61 (1): 235–261
- Zhu X, Wang Y, Ort DR, Long SP (2013). *e*-photosynthesis: a comprehensive dynamic mechanistic model of C₃ photosynthesis: from light capture to sucrose synthesis. *Plant Cell Environ*, 36 (9): 1711–1727

Chlorophyll fluorescence and stable isotope signals in photosynthesis research

XIAO Yi^{1,2}, ZHU Xin-Guang^{1,*}

¹CAS-MPG Partner Institute for Computational Biology, Shanghai 200031, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Chlorophyll fluorescence and stable isotope signals are two major categories of signals used extensively in the study of light and water use efficiencies of photosynthesis. This review summarizes current progress and major theories for these signals. We further discussed the heterogeneity of light and CO₂ inside a leaf and how these heterogeneities influence these signals. To cope with this challenge of accurate interpretation of these signals from a leaf, we propose to establish a 3-D highly mechanistic model of leaf reaction diffusion models to help interpreting these signals and further promoting their application in photosynthesis research.

Key words: photosynthesis; chlorophyll fluorescence; stable isotope; light use efficiency; water use efficiency; CO₂ use efficiency; leaf structure; 3-D leaf model

Received 2016-06-22 Accepted 2016-08-29

This work was supported by Bill & Melinda Gates Foundation (Grant Nos. OPP51586 and OPP1060461), European Union's 7th Framework Programme (FP7) (Grant No. EU289582), National Natural Science Foundation of China (Grant No. C020401), National High Technology Research and Development Program of China ("863" Program) (Grant No. 2014AA101601), National Key Basic Research Program of China ("973" Program) (Grant No. 2015CB150104), and CAS–CSIRO Collaborative Research Programme (Grant No. GJHZ1501).

*Corresponding author (E-mail: zhuxinguang@picb.ac.cn).