

# 基于快相荧光的高等植物光合速率测量仪设计

覃志松<sup>1,2,3</sup>, 赵南京<sup>1,4</sup>, 殷高方<sup>1,4</sup>, 石朝毅<sup>1</sup>, 甘婷婷<sup>1,4</sup>, 肖雪<sup>1,4</sup>, 段静波<sup>1,4</sup>, 张小玲<sup>1,2,4</sup>,  
陈双<sup>1,2,4</sup>, 刘建国<sup>1,4</sup>, 刘文清<sup>1,4</sup>

(1. 中国科学院环境光学与技术重点实验室/中国科学院安徽光学精密机械研究所 安徽合肥 230031; 2. 中国科学技术大学 安徽合肥 230026;  
3. 桂林电子科技大学计算机与信息安全学院 广西桂林 541004; 4. 安徽省环境光学监测技术重点实验室 安徽合肥 230031)

**摘要:**通过对植物叶绿素荧光的测量,可以实时获得植物生理状态信息。为了得到植物光合作用速率,通过对光合作用的电子传递进行分析,设计基于快相荧光技术高等植物速率测量仪。利用高速脉宽可调技术产生激发光信号,并利用高速采样技术获得微秒量级的快相荧光曲线,最后利用滑动窗口和最小二乘算法在数字信号处理器(DSP)平台上计算获得光合作用参数最小荧光产率( $F_0$ )、最大光荧光产率( $F_m$ )等信息,并基于光合作用吸收模型计算植物的光合速率( $J_{V_{PSII}}$ )。通过对高温胁迫条件的高等植物光合参数进行测量,结果表明,可以获得光化学效率产率( $F_v/F_m$ )、光合速率( $J_{V_{PSII}}$ )连续变化趋势, $F_v/F_m$ 与国外的PAM技术测量结果线性相关性达到0.982,该测量仪为研究植物光合作用提供了一种新的测量手段。

**关键词:**光合速率测量;快相荧光;非负最小二乘算法;叶绿素荧光动力学

**中图分类号:** X835 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)17-0230-04

光合作用测量的方法包括直接测量法、间接测量法。直接测量法依据光合作用过程  $CO_2 + 2H_2O \rightarrow CH_2O + O_2 + H_2O$ , 通过测量光合作用过程中反应物消耗速率或产物生成速率反映其生理状态<sup>[1-2]</sup>。常用测量方法是测量有机物的积累速率、 $CO_2$  气体交换或光合放氧来反演光合作用速率<sup>[3]</sup>。20 世纪 30 年代, Kautsky 发现叶绿素荧光诱导现象<sup>[4]</sup>, 以后国内外学者对该现象进行了深入研究, 发展并形成了光合作用荧光诱导理论, 成为研究植物光合作用快速而有效的探针<sup>[5]</sup>。目前广泛使用 Water-PAM 作为测量系统<sup>[6-8]</sup>, 其原理根据 Schreiber 等提出的脉冲振幅调制技术 (pulse amplitude modulation, 简称 PAM), 该技术使用饱和脉冲光还原全部 PQ 和 PS II 初级电子受体来测量植物光合作用可变荧光产率  $F_v/F_m$  参数<sup>[9]</sup>。1992 年 Kolber 等提出高速重复脉冲技术 (fast repetition rate, 简称 FRR), 使用快速光脉冲光激发诱导荧光产率曲线来反演出光合作用细节参数: 功能吸收截面  $\sigma_{PSII}$  和 QB 氧化还原时间  $\tau_{QA}$  进行反演<sup>[10]</sup>; 2014 年石朝毅等提出了可变光脉冲诱导荧光的检测方法<sup>[11]</sup>, 对激发条件进行了详细的分析。

由于快相荧光技术可在微秒量级的时间分辨率下获得荧光快速变化曲线, 瞬时的激发条件可获得更高的信噪比<sup>[11]</sup>;

同时由于测量时间足够快, 使得测量光合系统 II 时, 避免了光合系统 I 的电子传递影响, 使得测量的光合作用参数更加准确。因此本研究采用快相荧光技术研制植物光合速率测量系统, 其主要思路是通过应用高速采样技术获得荧光动力学曲线, 利用非线性回归分析算法反演获得  $F_0$ 、 $F_m$ 、 $F_v/F_m$ , 再根据吸收模型获得植物光合速率参数。

## 1 基本原理

光合作用的实质是电子传递过程, 图 1 详细阐述了电子传递和荧光激发原理<sup>[5]</sup>。光照后, PS II 反应中心发生原初电荷分离产生强氧化剂  $P680^+$ , 电子传递至 QA, 形成 1 个相对稳定的还原剂  $QA^-$ ; 在 PS II 电荷分离产生 1 个非常稳定的还原剂铁硫蛋白 ( $FeSx^-$ ) 和 1 个弱氧化剂 ( $P700^+$ )。具强氧化势的  $P680^+$  可以使水放出 1 个电子, 而  $QA^-$  具有的还原势驱动电子“下山”传递, 最终传给  $P700^+$  1 个电子。电子传递过程中在光合膜两侧建立的质子梯度驱动 ATP 的合成。PS II 电子传递过程中存在 2 个重要的时间节点: QA 到 PQ 需要 100~200  $\mu s$ , PQ 达到 PS I 几百微秒到几十毫秒。

单周强闪光激发后, PS II 大量吸收电子导致在 QA 处阻塞, 反应中心关闭, 无法再接收后续的能量用于光化学反应, 其光能仅能以热量、荧光的形式耗散, 引起荧光产率从静态最小荧光  $F_0$  上升并达到最大荧光产率  $F_m$ , 叶绿素荧光产率与激发光能量、PS II 的功能吸收截面  $\sigma_{PSII}$  及 QA 的氧化还原状态密切相关。根据 FRR 原理, 光系统在强光激发下, 时刻  $t$  与荧光产率函数可由式 (1) 表示<sup>[12]</sup>:

$$f(t) = F_0 + (F_m - F_0) [1 - \exp(-\sigma_{PSII} t)] \quad (1)$$

式中:  $F_m$  为反应中心完全关闭后的最大荧光产率;  $F_0$  为最小荧光产率;  $F_v = F_m - F_0$  是最大可变荧光产率;  $C(x) = \exp(1 - \sigma_{PSII} x)$  为关闭的 PS II 反应中心比例;  $\sigma_{PSII}$  为 PS II 功能吸收截面。通过式 (1) 可获得光化学效率产率  $F_v/F_m$ 、功能

收稿日期: 2017-03-23

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31400317); 国家“863”计划(编号: 2014AA06A509); 国家重点研发计划(编号: 2016YFC1400602、2016YFC1400604); 安徽省科技重大专项(编号: 15CZZ04125); 安徽省自然科学基金青年项目(编号: 1708085QD87); 中国科学院 STS 计划(编号: KFJ-SW-ST5-170)。

作者简介: 覃志松(1977—), 男, 广西容县人, 博士, 讲师, 主要从事荧光检测技术研究。E-mail: zsqin@aiofm.ac.cn。

通信作者: 赵南京, 博士, 研究员, 主要从事环境污染光学与光谱学监测新技术与方法研究。E-mail: njzhao@aiofm.ac.cn。

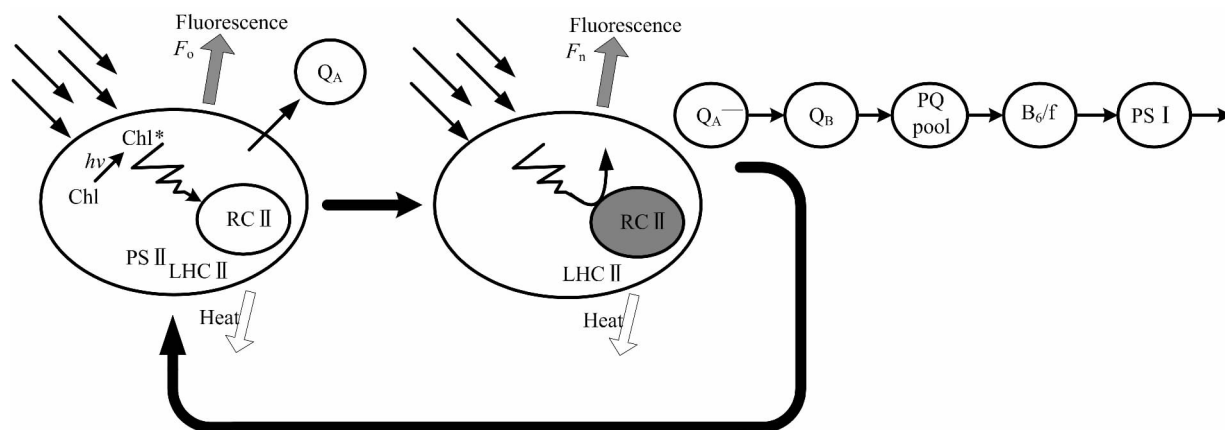


图1 荧光产生原理

吸收截面  $\sigma_{PSII}$  等光合作用参数。

根据光合作用模型,获得了上述的光合参数后,即可根据光量子吸收模型<sup>[13]</sup>对光合速率进行计算,由式(2)表示:

$$JV_{PSII} = \frac{F_m \cdot F_o}{F_m - F_o} \cdot \frac{F_v'}{F_m'} \cdot \frac{K_R}{E_{LED}} \cdot E_o \quad (2)$$

式中:  $F_o$ 、 $F_m$  为在暗适应下由式(1)计算得到;  $F_m'$ 、 $F_v'$  ( $F_m' - F_o'$ ) 为在光适应条件下计算获得;  $E_{LED}$ 、 $K_R$  分别表示 LED 的光照度 [以单位时间、单位面积内的通过的光量子数计,单

位:  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,下同]和光谱纠正系数,这两个参数可以采用光谱仪进行测定;  $E$  表示环境光照度,可以使用光传感器来获得该参数,因而光合速率即可根据式(2)计算获得。

## 2 系统设计

光合速率测量仪构架如图2所示,主要包括光学结构、激发单元、发射单元和程序算法控制等内容。

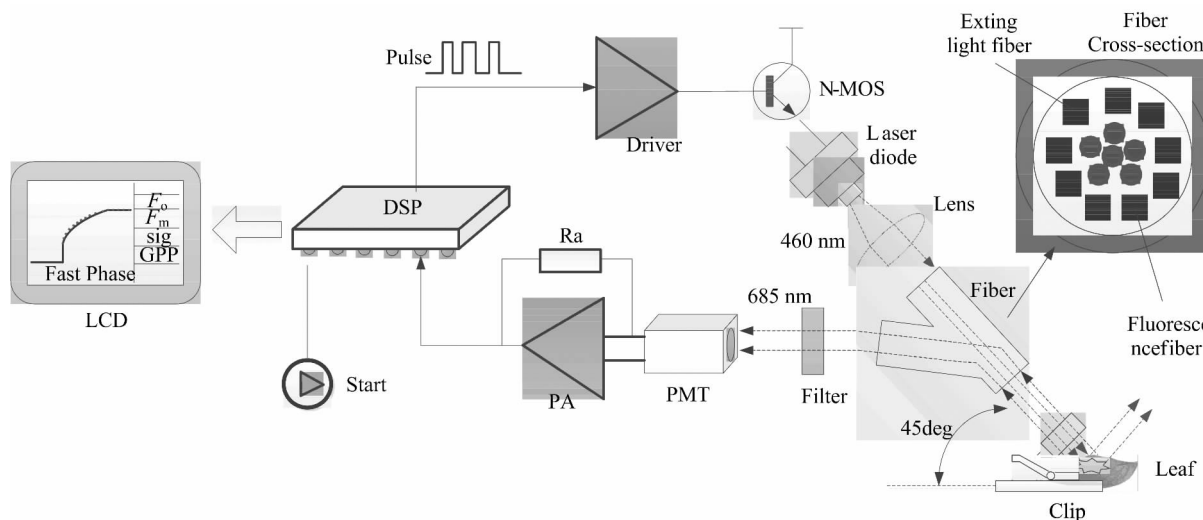


图2 光合速率仪构架原理

光源采用单个激发波长为 560 nm 的激光二极管,最大瞬时光照度为  $30\,000 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。由于激发光具有发散角度,为更好地汇聚到光纤内,采用透镜组将其调成平行光后入射到光纤。光纤有 15 根细光纤组成,分别由 6 根激发光纤、9 根荧光光纤组成,并设计为“Y”形结构,在 1/4 处将 15 根光纤汇成整体结构。光纤的剖面结构如图 3 所示,由于激发光强较为集中,而荧光的发射是向各个方向分散发射,为更好地收集荧光,激发光纤置于内部,而荧光光纤则均匀放置在外围。为了减少激发光的反射,设计专用的叶片夹,除了能将外界光照屏蔽以便更好地进行暗适应外,还可以将叶片平整地放置后,将光纤固定并与叶片呈  $45^\circ$ 。激发光经玻璃滤光片 BG39(截止波长 650 nm)对样品激发产生荧光,叶绿素荧光信号在 685 nm 效率较高,因此使用带宽为 10 nm 的带通滤波

片 HB680 对荧光滤波再进行荧光检测。

激发单元由数字信号处理器(DSP)产生高速可调脉宽信号,并由驱动器(TC4421A, MICROCHIP)驱动激光二极管产生激发光信号。TC4421A 是强电流缓冲器/驱动器,能够用 9.0 A 的峰值电流驱动容性负载,可以驱动大功率 N-MOSFET(IRF640, Vishay),可以满足光脉冲的调制需要。由于瞬时电流可高达十几安培,为提供足够强的激发光强,电路采用 3 个  $300 \mu\text{F}$  并联作为储能元件。有激发单元产生的快相激发光强范围从  $2\,400 \sim 30\,000 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,最小分辨率为  $1\,200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

荧光采用电信增管模块(H6779-1, 滨松公司)进行信号探测,它包括 1 个金属封装的光电倍增管(PMT)和 1 个高压模块,在 685 nm 处约为  $25 \text{ mA/W}$ 。控制电压为 0.80 V 时,探

测器电容为 10 pF,暗电流为 0.4 nA,电流增益约为 60 dB,上升时间为 0.78 ns,响应特性完全满足测量要求。

获得荧光电流信号以后,采用 500 MHz 宽带高速放大器 OPA637 完成 I/V 转换,并由 DSP 内置的高速 12 位 ADC 完成转换并保存在 SRAM 器件中,作为算法程序的荧光信息。控制和计算过程采用高性能 DSP 芯片 (MK60FX150, Freescale),该 DSP 芯片采用单指令周期,最高处理速度达 210 MIPS,满足本测量系统的时间要求。该单片机采用 Cortex-M4 内核,集成有 16 通道的高精度 12 位 A/D 模数转换器,采样速率可达 1.0 MSPS,可满足本研究的高速采样和数据计算的要求。

光照参数采用光学材料窗口集成的光传感 (NHZD210, 武汉中科),量程范围为 0~2 000 lx,DSP 使用 RS485 通信接口与传感器连接。通过读指令将光照参数读入并保存在 DSP 的内存中,作为计算光合速率的其中 1 个参数。

### 2.2 计算流程

参数的计算基于嵌入式 DSP 系统,由于复杂的非线性拟合算法不适用在本系统上运行,本研究对快速下降法进行优化,根据荧光产率曲线采用线性拟合极值法对  $F_0$ 、 $F_m$  进行估计,代入式 (1) 拟合获得  $F_0$ 、 $F_m$  和  $\sigma_{PSII}$ 。结合环境光照实时曲线计算测量区间的瞬时光照度  $E_t$ ,结合 LED 激发光谱曲线计算获得  $E_k$  (即  $E_{LED}$ ) 和  $K_R$  参数,应用式 (2) 即可获得该时刻的光合速率  $JV_{PSII}$ ,详细计算流程如图 3 所示。

### 3 结果与分析

基于快相荧光动力学原理研制的高等植物光合作用参数

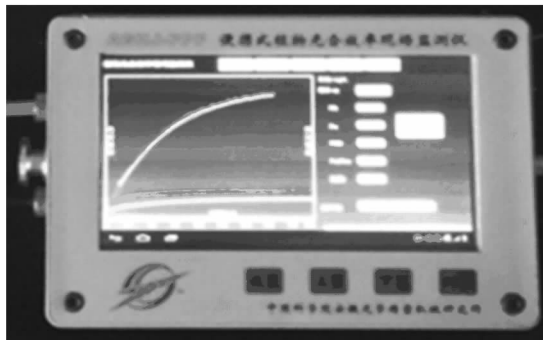


图4 光合效率参数测量仪实物

高温胁迫对高等植物光合叶片系统产生及其重要的影响,长时间的胁迫会导致光合系统 II 和光合系统 I 的电子传递收到严重破坏,主要表现为光合作用速率持续下降<sup>[14-15]</sup>,  $F_v/F_m$  和  $Y(II)$  和  $Y(I)$  迅速下降<sup>[19]</sup>。高温胁迫试验选用笔者所在实验室培育的绿萝 (*Epipremnum aureum*),其平均光照度约 25.0  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。绿萝属常绿藤本且气根发达,生长在温度较为恒定的环境中,平均生长温度在 20  $^{\circ}\text{C}$  左右。高等植物光合参数测量,由于温度条件相比其他胁迫如水分、营养盐、重金属和毒性试验条件较为容易建立,因此本研究采用温度胁迫条件,对高等植物光合参数变化趋势进行测量和分析。将仪器和绿萝植株都置于恒温箱中,设定温度从 20  $^{\circ}\text{C}$  至 60  $^{\circ}\text{C}$ ,通过人工调控 20 个档位,每档依次升高 2.0  $^{\circ}\text{C}$ 。测量周期为 30 min/次,测量前进行 20 min 的暗适应时间。通过

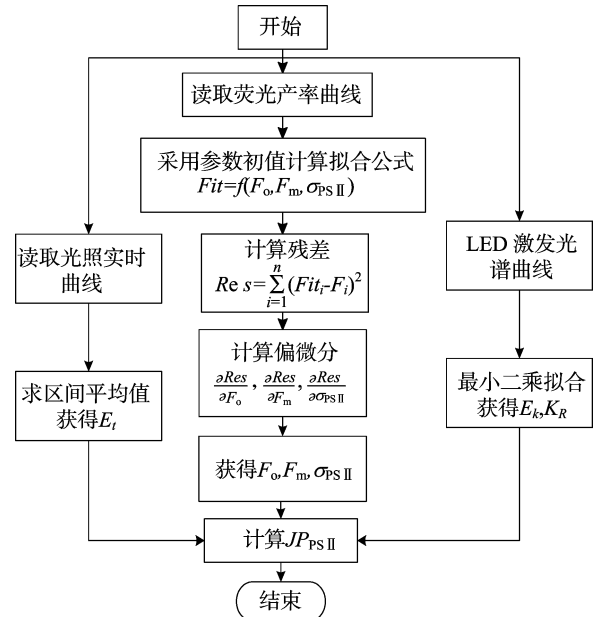
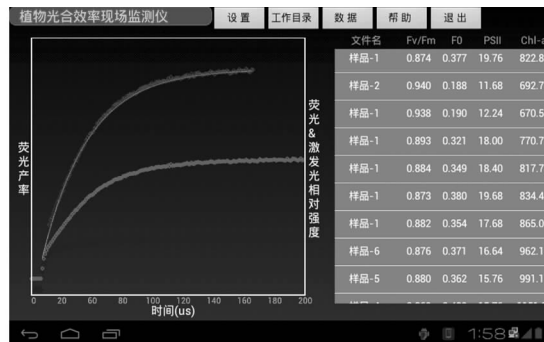


图3 光合速率计算流程  
 $Fit_i$ —拟合荧光值;  $F_i$ —测得的荧光值

测量系统实物如图 4 所示,主要部分由主机、“Y”形导入光纤、样品夹组成,质量约为 3.0 kg,适合进行野外进行植物光合作用测量操作。可以对植物快相荧光动力学曲线进行测量和分析,获得光合作用细节参数  $F_0$ 、 $F_m$ 、 $F_v/F_m$  参数,其中  $F_v/F_m$  与采用 PAM 技术的国外商业化仪器 Mini-PAM 作对比分析验证。

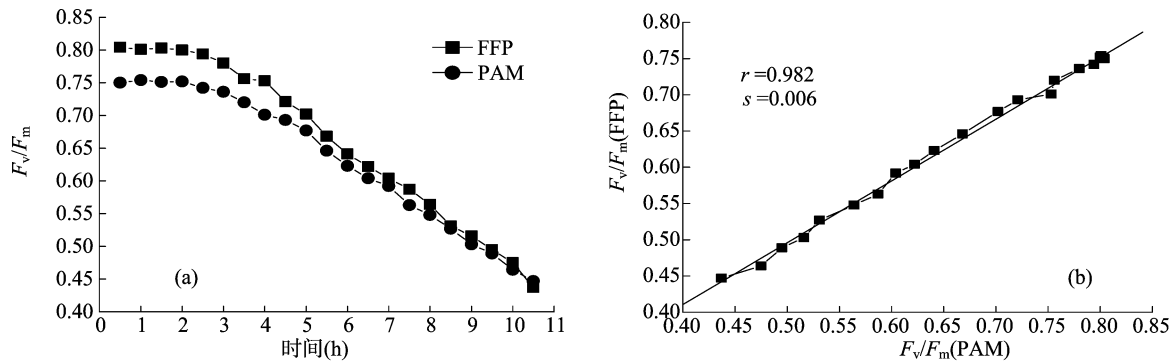


连续监测获得的光合作用参数变化趋势如图 5 所示。

从图 5-a 可知,在常温 25  $^{\circ}\text{C}$  下,  $F_v/F_m$  比较平稳,随着温度的上升,  $F_v/F_m$  呈现下降趋势。最终温度在 50  $^{\circ}\text{C}$  的时候已经减弱到 0.437,表明植物的光合系统已经受损严重。其测量结果与 Mini-PAM 结果一致,线性相关系数为 0.982 (图 5-b)。通过对比主要的参数  $F_0$ 、 $F_m$  和  $F_v/F_m$  等,证明本研究的光合速率测量仪的有效性。

### 4 结论

本研究基于快相荧光动力学原理研制了植物光合作用速率测量系统,应用分支光纤方式对激发光与荧光进行收集,设计快相荧光硬件检测电路,应用快速下降法算法对荧光曲线反演获得光合作用参数信息,并结合环境光照信息计算获得

图5 高温胁迫条件下的 $F_v/F_m$ 变化曲线

植物的光合速率。将获得的光合参数与 PAM 技术进行了对比,结果表明具有较好的一致性,本研究成果为植物光合作用研究提供了一种新的测量手段。

致谢:衷心感谢国家环境保护环境光学监测技术重点实验室以及国家环境光学监测仪器工程技术研究中心为本研究工作开展所提供的技术与平台支持。

#### 参考文献:

- [1] 许大全. 光合作用效率[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 28-36.
- [2] Raines C A. Increasing photosynthetic carbon assimilation in  $C_3$  plants to improve crop yield: current and future strategies[J]. Plant Physiology 2011, 155(1): 36-42.
- [3] 吴庆余, 刘志礼. 测定浮游植物光合作用速率的  $^{14}C$  方法[J]. 植物生理学报, 1986(3): 63-65.
- [4] Kautsky H, Hirsch A. Neue versuche zur kohlenstoff-assimilation[J]. Die Naturwissenschaften, 1931, 19(48): 964.
- [5] 韩博平, 韩志国, 付翔. 藻类光合作用机理与模型[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 35-40.
- [6] Guan W, Gao K. Impacts of UV radiation on photosynthesis and growth of the coccolithophore *Emiliania huxleyi* (Haptophyceae) [J]. Environmental and Experimental Botany 2010, 67(3): 502-508.
- [7] Ji C F, Legrand J, Pruvost J, et al. Characterization of hydrogen production by *Platymonas subcordiformis* in torus photobioreactor[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(13): 7200-7205.
- [8] Helbling E W, Pérez D E, Medina C D, et al. Phytoplankton distribution and photosynthesis dynamics in the Chubut River estuary (Patagonia, Argentina) throughout tidal cycles [J]. Limnology and Oceanography 2010, 55(1): 55-65.
- [9] Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer [J]. Photosynthesis Research, 1986, 10(1/2): 51-62.
- [10] Kolber Z S, Prasil O, Falkowski P G. Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1367(1/2/3): 88-106.
- [11] Shi C Y, Zhang Y J, Yin G F, et al. Measurement of algae PS II photosynthetic parameters using high-frequency excitation flashes [J]. Chinese Optics Letters 2014, 12(8): 80101-80104.
- [12] Suggest D J, Prasil O, Borowitzka M A. Chlorophyll fluorescence in aquatic sciences: methods and applications [M] // Developments in applied phycology. Netherlands: Springer, 2010, 4: 19-30.
- [13] Oxborough K, Moore C M, Suggest D J, et al. Direct estimation of functional PS II reaction center concentration and PS II electron flux on a volume basis: a new approach to the analysis of Fast Repetition Rate fluorometry (FRRf) data [J]. Limnology & Oceanography Methods 2012, 10(3): 142-154.
- [14] 李治鑫, 李鑫, 范利超, 等. 高温胁迫对茶树叶片光合系统的影响[J]. 茶叶科学, 2015, 35(5): 415-422.
- [15] 杨再强, 李伶俐, 殷剑敏, 等. 灌浆初期不同时长高温胁迫对早稻叶片光合和荧光参数的影响[J]. 中国农业气象, 2014, 35(1): 80-84.