

利用光诱导延迟荧光的植物盐胁迫生理监测*

张玲瑞, 邢达**, 王俊生, 曾礼漳, 李强

(华南师范大学 激光生命科学研究所 暨激光生命科学教育部重点实验室, 广州 510631)

摘 要:利用自制的便携式延迟荧光(Delayed Fluorescence, DF)探测系统,以早熟 18 号大豆品种为实验材料,研究了盐胁迫对植物叶绿体 DF 特性的影响.结果发现在单纯的盐胁迫和盐胁迫伤害程度被调控缓解时,绿色植物叶片光诱导 DF 强度的变化都能很好地反应植物叶片光合性能的变化.因此,可以用 DF 强度的变化来表征盐胁迫对植物的伤害程度.

关键词:延迟荧光;光合速率;盐胁迫;缓解效应

中图分类号:Q632

文献标识码:A

文章编号:1004-4213(2007)12-2284-6

0 引言

土壤盐渍化限制作物产量是一个全球性问题.全世界盐渍化土地约 10^8 hm^2 , 约占可耕地面积的 10%^[1].盐胁迫对植物危害的原因包括渗透胁迫、离子毒害和细胞内离子平衡的破坏等.盐胁迫会使植物光合速率下降,生长发育受到抑制,并且衰老加速^[2].作为植物生长发育基础的光合作用,它的性能的好坏最终影响作物的生长、产量和质量.叶绿体是植物光合作用的场所,也是对盐胁迫最敏感的细胞器^[3].盐胁迫下,类囊体结构的改变、叶绿素含量的下降、光系统 II 光化学效率的下降都说明光合作用进程是植物盐胁迫最为敏感的生理过程之一^[4-6].

植物光诱导延迟发光就是植物光合器官在停止照光后的发光现象.因为与植物叶绿素荧光有相同的波形且比荧光要迟,所以也叫 DF^[7].因为光诱导 DF 是在光合电子传递链中产生,所以较叶绿素荧光更有利于研究植物光合作用^[8-9].通常,DF 对胁迫因子比叶绿素荧光更为敏感(至少在某些胁迫条件下)^[10-11].DF 是体外和体内研究各种化学和物理因子对光合器官功能活性效应的良好手段^[12-13].王成龙等利用高灵敏背向照明 CCD 和像增强器为核心的探测系统,对 DF 和光合效率的关系进行了深入的研究.研究表明:DF 强度和植物的净光合速率有着极好的正相关性^[14].因此,DF 是光合器官生理状态内在的高灵敏探针,是评价植物光合作用性能的良好指标^[14-15].

本文利用自行研制的便携式 DF 检测系统对不同盐胁迫下植物 DF 的变化进行了研究,同时与光合作用测定系统获得的净光合速率进行比较,发现

DF 可以作为一项准确诊断盐胁迫光合作用生理变化的有效指标,可以定量表征不同浓度盐胁迫对光合作用的抑制程度以及不同盐胁迫缓解因子的缓解效应.DF 技术有望成为大田在位、实时监测植物盐胁迫生理、快速评价植物抗盐性和筛选抗盐植物新品种的一项新的、可靠的光子学手段.

1 材料与方法

1.1 材料与处理

试验于 2005 年 3 月~4 月在华南师范大学激光生命科学研究所植物实验基地进行.实验设施为拱圆式聚乙烯塑料大棚,上覆遮光网,面积为 100 m^2 .选用早熟 18 号大豆(*Glycine max* Zaoshu No. 18)品种为试材(中国科学院遗传与发育研究所朱保葛教授提供).种子在 26°C 下催芽 24 h,播于装有石英砂的塑料盘中育苗,昼温 $22^\circ\text{C} \sim 28^\circ\text{C}$,夜温 $16^\circ\text{C} \sim 18^\circ\text{C}$,自然光照.子叶展开后浇 Hyponex 营养液(Hyponex 原液与蒸馏水 1 : 500 稀释;Hyponex, Oosaka, Japan).当幼苗第 1 片复叶展开后,选生长整齐一致的幼苗定植于装有 Hyponex 营养液的水培槽中.分成九组稳定预培养 3 天后,6 : 00 a. m. 在第一小组的营养液中添加 NaCl,并使营养液中 NaCl 的浓度分别达到 0(对照)、25、50、75、100、125、150、175 mM.在第二、三、四小组的营养液中添加 NaCl,并使营养液中 NaCl 的浓度达到 125 mM,同时在第二小组的营养液中添加 CaCl_2 ,并使营养液中 CaCl_2 的浓度达到 0(对照)、5、10、20、40、80、160、320 mM;第三小组叶面分别喷洒 0(对照)、0.1、0.2、0.4、0.8 mM 的 6-苄基腺嘌呤(6-BA);第四小组叶面分别喷洒 0(对照)、5、10、20、40 μM 的水杨酸(SA);以上小组处理后的第 18 h,分别测定植株第 1 片复叶的 DF 和光合速率.在第五、六、七、八、九小组的营养液中添加 NaCl,并使营养液中 NaCl

*国家自然科学基金(60378043;30470494)和广东省自然科学基金(015012;04010394;2004B10401011)资助

** Tel: 020-85210089 Email: xingda@scnu.edu.cn

收稿日期: 2006-07-12

的浓度分别达到0(对照组)、125、125、125、125 mM. 同时第六小组的营养液中添加 CaCl_2 , 并使营养液中 CaCl_2 的浓度达到 20 mM. 同时也在第七、八小组叶面分别喷洒 0.4 mM 的 6-BA、20 μM 的 SA. 以上小组在 108 h 内, 每隔 6 h 测量一次植株第 1 片复叶的 DF 和光合速率. 每个实验至少重复 5 次.

1.2 光合速率测量

选取第 1 片复叶, 采用 LI-6400 光合测定仪测量最大净光合速率(P_n). 光合测定仪的流速均设定

在 500 $\mu\text{mol s}^{-1}$; 使用内置红蓝光源, 设定 1 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 的饱和光照强度; 二氧化碳浓度控制在 400 ppm 左右; 叶室温度和湿度分别控制在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 和 80% 左右.

1.3 DF 测量装置与 DF 测量

用自制的便携式 DF 检测系统收集植物被激发后 0.26 到 5.26 s 范围内的 DF. 监测系统装置如图 1. 其技术细节见文献[16].

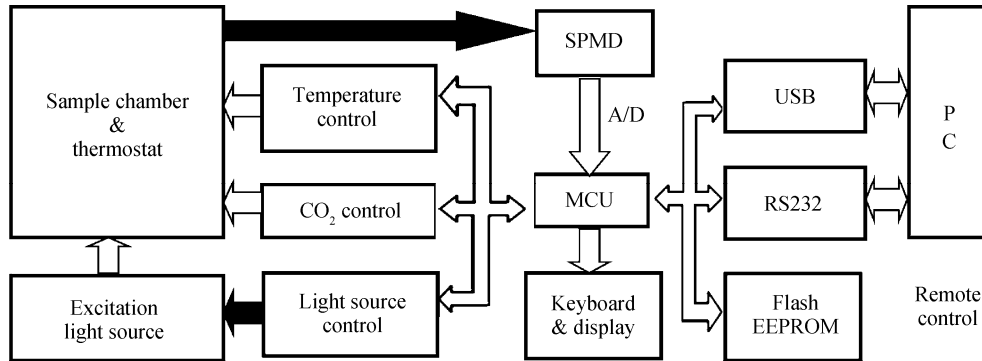


图 1 DF 监测装置

Fig. 1 Experimental setup for delayed fluorescence measurement

连体叶片置于样品暗室, 设定温度和 CO_2 浓度控制条件. 样品暗室适应 10 min, 打开光照组件(其光照组件有 6 只 LED 圆周均匀排列组成, 中心波长为 650 nm, 半波宽 20 nm, 单管输出光通量为 20 lm)均匀表面垂直激发叶片 10 ms. 光照强度和光照时间分别在 $0 \sim 3000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 和 $0 \sim 60 \text{ s}$ 范围内可调. 停止光激发 0.26 s, 来自叶片的 DF 信号, 用超灵敏单光子计数模块[SPCM (MP963, Perkin-Elmer, Wiesbaden, Germany)]通过光纤逆激发光垂直接收, 输出脉冲范围为 $0 \sim 10^6 \text{ cps}$, 可以探测的波长范围是 185~850 nm, 覆盖了 DF 的谱段. 数据采集和处理由[MCU (AT89c55)]单片机来完成. 采用恒流源及 ACC 恒电流反馈控制, 使 LED 注入电流准确度可以达到 10^{-4} 量级. 局部控制模式下, 0.26~5.26 s 范围内 DF 总强度可以在显示面板直接读出, 表达为每秒钟的光子数.

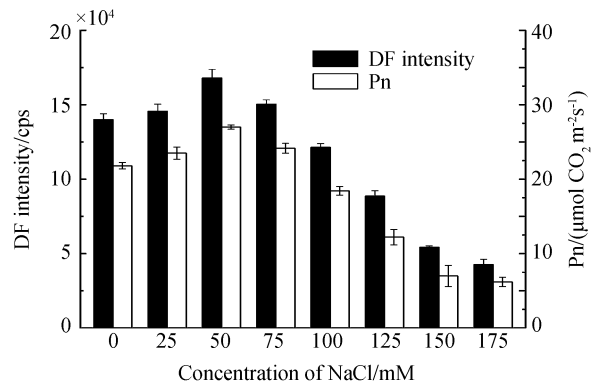
激发光强采用同光合速率测量一致的饱和激发光. 温度和 CO_2 浓度控制成和光合速率测量时的条件一样.

2 结果与分析

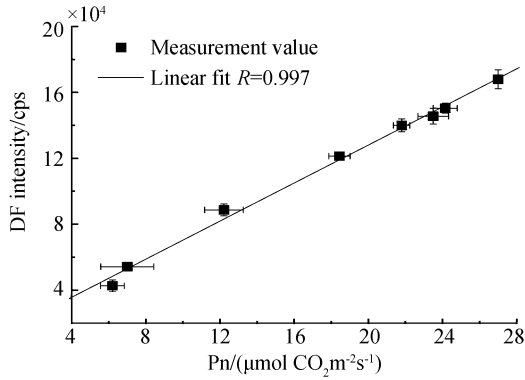
2.1 不同浓度 NaCl 处理大豆植株对其 DF 和光合速率的影响及其关系

对不同浓度 NaCl 处理下大豆叶片光合速率和

DF 的测定结果表明, 低浓度(25~75 mM) NaCl 对大豆叶片的光合作用起着促进作用, 其中以 50 mM NaCl 的促进效果最为显著($P < 0.01$), 促进程度是对照的 128.1%. NaCl 浓度为 75 mM 时, 促进作用开始下降, 但仍高于对照水平. 随着 NaCl 浓度的进一步升高, NaCl 表现出对光合作用的抑制作用, 125 mM NaCl 处理 18 h 导致光合作用下降到对照的 63.1%. 而且, NaCl 在 $0 \sim 175 \text{ mM}$ 的浓度范围变化内, DF 强度和光合速率呈现一致的变化趋势(图 2(a)). 相关性分析表明, 在不同浓度 NaCl 处理下, DF 和光合速率有着极好的正相关性($R = 0.997$)(图 2(b)). 这表明 DF 强度的变化能准确、真实的反应不同浓度 NaCl 对植物光合性能的作用效



(a) Changes in DF intensity and P_n of leaves of soybean exposed to various NaCl concentrations for 18 h



(b) Correlation between DF and Pn ($R=0.997, P<0.0001$)

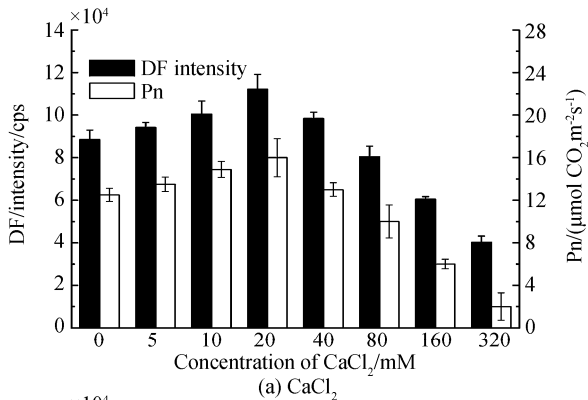
图 2 NaCl 胁迫对大豆植株 DF 和光合速率的影响以及它们之间的关系

Fig. 2 Effects of NaCl stress on the DF intensity and Pn of soybean (*Glycine max* Zaoshu No. 18) and the relationship between them

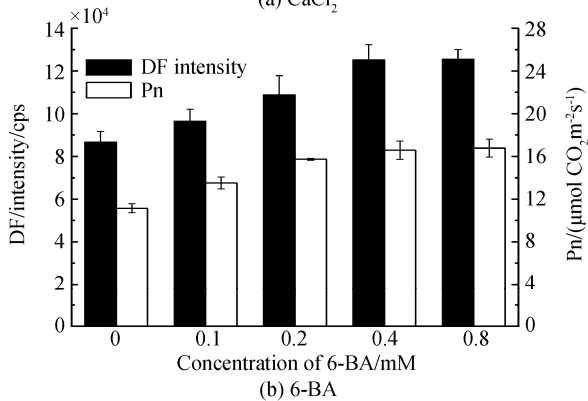
果。图 2~4 中每个值是 5 个独立叶片的平均值加标准误差。

2.2 不同浓度的 CaCl₂、6-BA 和 SA 盐胁迫缓解效应对 DF 和光合速率的影响

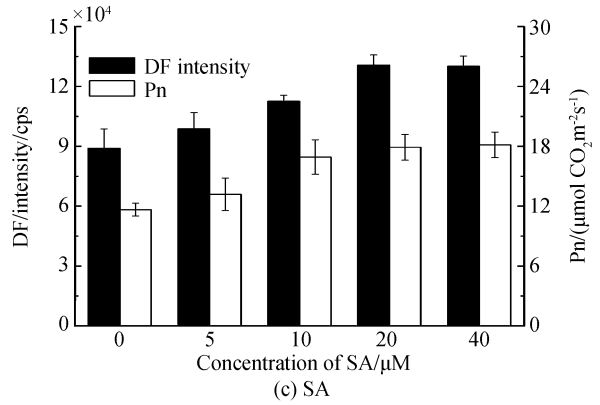
实验结果表明, CaCl₂、6-BA 和 SA 对 125 mM NaCl 胁迫效应都具有缓解效应(图 3)。CaCl₂ 在低浓度(5~40 mM)时有着很明显的缓解盐胁迫效应。以 20 mM 的缓解作用最为显著($P<0.01$)。随着 CaCl₂ 浓度的进一步上升(≥ 80 mM), 这种缓解作用不复存在, 反而表现出胁迫加剧程度(图 3(a))。6-BA 和 SA 分别在 0.1~0.8 mM 和 5~40 μ M 起着缓解盐胁迫、促进光合作用的效果(图 3(b)和图 3



(a) CaCl₂



(b) 6-BA



(c) SA

图 3 不同浓度的 CaCl₂、6-BA、SA 和 125 mM NaCl 一道处理大豆植株 18 h 后 DF 和光合速率的变化

Fig. 3 Changes in DF and Pn of leaves of soybean (*Glycine max* Zaoshu No. 18) exposed to 125 mM NaCl for 18 h along with various concentration CaCl₂, 6-BA and SA, respectively

(c)), 二者浓度的进一步上升对延缓作用没有进一步的促进作用。

同时 DF 测量结果表明, DF 强度在三者的盐胁迫缓解效应中, 都和光合速率保持着一致的变化趋势。这进一步表明 DF 强度的变化能准确、快速的反应植物盐胁迫下光合作用生理调控的效果和程度。

2.3 CaCl₂、6-BA 和 SA 盐胁迫缓解效应在 DF 时间动力学变化的表现

在 125 mM NaCl 胁迫下, 测量了 20 mM CaCl₂、0.4 mM 6-BA 和 20 μ M SA 盐胁迫缓解作用对 DF 108 h 内时间动力学变化特征的影响。结果如图 4。没有任一延缓因子(CaCl₂、6-BA 和 SA)存在时, DF 表现出剧烈的下降现象, 特别是在前 36 h 内。18 h 的胁迫 DF 已下降到对照的 59.8%。随后的胁迫, DF 并没有表现出更为剧烈的下降。在存在 CaCl₂、6-BA 和 SA 任一胁迫缓解因子时, 都能缓解

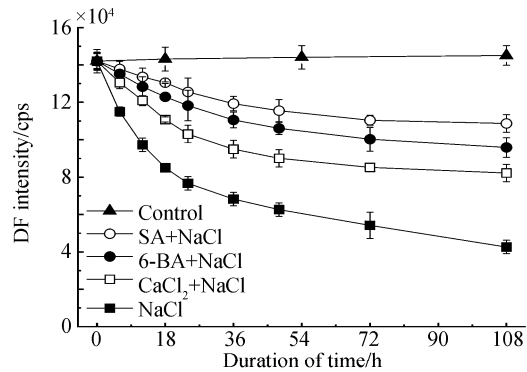


图 4 125 mM NaCl 分别与 20 mM CaCl₂、0.4 mM 6-BA 和 20 μ M SA 一道处理大豆植株对 DF 时间动力学变化特征的影响

Fig. 4 Effects of 125 mM NaCl respectively plus 20 mM CaCl₂, 0.4 mM 6-BA and 20 μ M SA treatment on DF intensity in soybean (*Glycine max* Zaoshu No. 18) measured as a function of hours

DF 的下降程度. 第 18 h 时, DF 强度分别下降到对照的 91.8%、86.5% 和 78%. 说明对于 125 mM NaCl 胁迫, 缓解效应依次是 SA>6-BA>CaCl₂. 结果说明, 盐胁迫下植物生理的实时变化能通过光诱导 DF 强度的变化快速、灵敏的反应出来.

3 讨论

DF 是光合器官生理状态内在的高灵敏探针, 是评价植物光合作用性能的良好指标^[14-15]. 作为 DF 的主要产生者的叶绿体, 是植物光合作用的细胞器, 大量实验表明叶绿体要进行正常的生理功能需要一定浓度的 Na⁺ 和 Cl⁻, 但是叶绿体内 Na⁺ 和 Cl⁻ 浓度过高, 势必影响植物光合器官正常的光合功能^[17-18]. 实验表明, 低浓度(25~75 mM) NaCl 对大豆叶片的光合作用起着促进作用, 当浓度上升到 100 mM 时对大豆光合作用表现出抑制作用(图 2(a)). 在不同浓度盐处理情况下, DF 和光合速率保持着高度一致的变化趋势, 并且存在着极高的正相关性(图 2(b)), 说明 DF 可以准确、真实的反应盐胁迫光合作用生理变化. DF 强度的变化可以定量表征不同浓度盐胁迫对光合作用的抑制程度.

植物受到盐胁迫的伤害时会通过生理调节来一定程度上适应高浓度的盐, 例如植物改变内源激素的水平来适应外界的盐胁迫. 体外大量实验已经证明, 外施 CaCl₂、6-BA 和 SA 能够缓解盐胁迫对植物的伤害程度, 尽管其机制仍待研究^[19-21]. 本文通过外施 CaCl₂、6-BA 和 SA, 研究他们对盐胁迫的缓解作用(图 3). 结果发现三种盐胁迫缓解因子对光合作用的促进作用都能通过 DF 的变化表现出来. 并且三种盐胁迫缓解因子对植物盐胁迫伤害的减轻作用在 DF 时间动力学变化上能清晰的反应出来(图 4). 进一步说明 DF 可以准确而真实的反应植物的盐胁迫生理变化, 可以定量表征不同浓度盐胁迫对光合作用的抑制程度以及不同盐胁迫延缓因子的延缓作用.

由于样品个体之间存在着差异以及随着测量时间的延长, 外界环境条件(如二氧化碳、温度、湿度等)会发生一定程度的变化, 致使实验结果存在着测量误差. 因此可以通过增大样品数量、提高实验重复次数以及控制好环境条件来减小测量误差, 进而使 DF 能准确、真实的反应植物的盐胁迫生理变化. 一定的时间内维持植物相对稳定的生长环境条件(如二氧化碳、温度、湿度等), 并给以植物所需要的饱和的激发光强和激发时间, DF 强度的变化可以反应植物盐胁迫生理的实时变化, DF 技术有望成为盐胁迫生理实时监测的一种新手段. 相同生长周期的

植物, 在相同的测量条件下, DF 强度的大小可以用来快速评价植物抗盐性的大小, 在筛选植物耐盐新品种等方面, DF 可作为一个可靠、有效的指标.

4 结论

以早熟 18 号大豆为试材, 分析了在不同盐胁迫处理下 DF 和光合速率变化及其相互关系. 结果表明: 盐胁迫处理下, DF 和光合速率有着一致的变化趋势和极好的相关性. 因此 DF 可以作为一项准确诊断盐胁迫光合作用生理变化的有效指标, 可以定量表征不同浓度盐胁迫对光合作用的抑制程度以及不同盐胁迫延缓因子的延缓作用. DF 技术有望成为大田在位、实时监测植物盐胁迫生理、快速评价植物抗盐性和筛选抗盐植物新品种的一项新的、可靠的高灵敏的光子学技术手段.

参考文献

- [1] LIU Xu, SHI Juan, ZHANG Xue-yong, *et al.* Screening salt tolerance germplasm and tagging the tolerance gene(s) using microsatellite (SSR) markers in wheat [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, **43**(9): 948-954.
刘旭, 史娟, 张学勇, 等. 小麦耐盐种质的筛选鉴定和耐盐基因的标记[J]. *植物学报*, 2001, **43**(9): 948-954.
- [2] LIU You-liang, MAO Cai-liang, WANG Liang-ju. Recent progress in studies on salinity tolerance in plants [J]. *Plant Physiology Communications*, 1987, **24**(4): 1-7.
刘友良, 毛才良, 汪良驹. 植物耐盐性研究进展[J]. *植物生理学通讯*, 1987, **24**(4): 1-7.
- [3] CHEESEMAN J M. Mechanism of salinity tolerance in plants [J]. *Plant Physiol*, 1988, **87**(3): 547-550.
- [4] WANG Li-yan, ZHAO Ke-fu. Effect of NaCl stress on ion compartmentation, photosynthesis and growth of *Salicornia bigelovii* Torr [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, **30**(1): 94-98.
王丽燕, 赵可夫. NaCl 胁迫对海蓬子离子区室化、光合作用和生长的效应[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2004, **30**(1): 94-98.
- [5] ALBERTE R S, THORNBUR J P, FISCUS E L. Water stress on the content and organization of chlorophyll in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize [J]. *Plant Physiol*, 1997, **59**(3): 351-353.
- [6] EVERARD J D, GUCCI R, KANN S C, *et al.* Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various level of root zone salinity [J]. *Plant Physiol*, 1994, **106**(1): 281-292.
- [7] STREHLER B, ARNOLD W. Light production by green plants [J]. *J Gen Physiol*, 1951, **34**(1): 809-820.
- [8] GUO Z Y, ZHU Y B, MA J F, *et al.* The spectra distribution properties of ultraweak photon emission from biological system and biophoton coherence [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2000, **29**(10): 890-893.
- [9] LI Shao-shan, ZHU Yan-bin, LIU Song-hao, *et al.* Ultraweak photon emission from germinating peanut seeds [J]. *Acta*

- Photonica Sinica*, 2000, **29**(11):966-969.
李韶山,朱延彬,刘颂豪,等. 萌发花生种子超弱发光的研究[J]. 光子学报, 2000, **29**(11):966-969.
- [10] IORN C D, FORSBERG A S. Imaging by delayed light emission (phytoluminography) as a method for detecting damage of the photosynthetic system [J]. *Physiol Plant*, 1979, **47**(4):215-222.
- [11] XI Gang, LI Ying, Cao Yong-jun, *et al.* System of photosynthetic pigment in leaf of spinach and tobacco under the action of low level microwave electromagnetic field [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2005, **34**(7):1023-1027.
习岗,李英,曹永军,等. 低强度微波电磁场作用下菠菜和烟草光合细胞叶绿素荧光动力学过程及光合色素系统的差异[J]. 光子学报, 2005, **34**(7):1023-1027.
- [12] HAVAUX M. Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures [J]. *Plant Cell Environ*, 1993, **16**(4):461-467.
- [13] WANG Cheng-long, Qian Long, Fan Duo-wang, *et al.* Spectra research on delayed fluorescence of Chloroplast at Different Concentration [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2005, **34**(7):1028-1031.
王成龙,钱隆,范多旺,等. 叶绿体不同浓度下光诱导延迟荧光光谱研究[J]. 光子学报, 2005, **34**(7):1028-1031.
- [14] WANG C L, XING D, CHEN Q. A novel method for photosynthesis measuring using chloroplasts delayed fluorescence [J]. *Biosens Bioelectron*, 2004, **20**(3):454-459.
- [15] WANG Cheng-long, FAN Duo-wang, XING Da, *et al.* Rapid and compact optical measurement system for photosynthesis ability using LED excitation [J]. *Journal of Optoelectronics • Laser*, 2006, **17**(3):337-342.
王成龙,范多旺,邢达,等. 植物光诱导延迟荧光介导的酸性环境污染监测[J]. 光电子·激光, 2006, **17**(3):337-342.
- [16] WANG Jun-sheng, XING Da, XU Wen-hai. Rapid and compact optical measurement system for photosynthesis ability using LED excitation [J]. *Journal of Optoelectronics • Laser*, 2006, **17**(3):377-380.
王俊生,邢达,许文海. 发光二极管辐照光合能力快速检测系统[J]. 光电子·激光, 2006, **17**(3):377-380.
- [17] WANG Li-yan. Effects of NaCl on photosynthesis [J]. *Journal of Dezhou University*, 2005, **21**(4):12-14.
王丽燕. NaCl胁迫对植物光合作用的影响[J]. 德州学院学报, 2005, **21**(4):12-14.
- [18] MENG Chao-ni, LIU Cheng, HE Jun-min, *et al.* The effects of increased UV-B radiation, NaCl stress and their combination treatment on the photosynthesis and flavone metabolism in wheat seedlings [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2005, **34**(12):1868-1871.
孟朝妮,刘成,贺军民,等. 增强UV-B辐射、NaCl胁迫及其复合处理对小麦幼苗光合作用及黄酮代谢的影响[J]. 光子学报, 2005, **34**(12):1868-1871.
- [19] YIN Zeng-fang, HE Zhen-xiang, CHEN Meng-yang, *et al.* Abating effects of exogenous Ca²⁺ on depressed seed germination and seedling growth of *Kosteletzkya virginica* resulting from NaCl stress [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, **26**(3):0462-0466.
尹增芳,何祯祥,陈梦阳,等. 外源钙对NaCl胁迫下海滨锦葵种子萌发和幼苗生长的缓解效应[J]. 西北植物学报, 2006, **26**(3):0462-0466.
- [20] XU Kai, JIN Fang. Effects of exogenous hormones on photosynthetic characteristics of strawberry under salt stress [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2006, **41**(2):31-34.
徐锴,金芳. 外源激素对盐胁迫下草莓光合性能的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2006, **41**(2):31-34.
- [21] LI Fang-min, LU Zhi-guo, WANG Xun-ling, *et al.* Protect effects of CO₂ laser pretreatment on wheat seedling lipid peroxidation by UV-B radiation [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2006, **35**(4):561-564.
李方民,陆治国,王勋陵,等. CO₂激光预处理对UV-B辐射引起的小麦幼苗脂质过氧化伤害的防护作用[J]. 光子学报, 2006, **35**(4):561-564.

Light-induced Delayed Fluorescence as an Indicator for the Effects of Salt Stress on Plant Physiology

ZHANG Ling-rui, XING Da, WANG Jun-sheng, ZENG Li-zhang, LI Qiang

(MOE Key Laboratory of Laser Life Science and Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Received date: 2006-07-12

Abstract: With the leaves of Zaoshu No. 18 soybean species (*Glycine max* Zaoshu No. 18) as testing models, the effects of salt stress on characteristics of DF (Delayed Fluorescence) are studied by using a home-made portable weak luminescence detection system. The results show that the changes in DF intensity of green plant can truly reflect the changes in photosynthetic performance. Therefore, the changes in DF intensity may provide a new approach for the evaluating the damage extent of plant physiology caused by the salt stress. DF technique can be potential useful for real-time monitoring the effects of salt stress on plants and screening the plant species with salt tolerance.

Key words: Delayed fluorescence; Net photosynthesis rate; Salt stress; Abating effect



ZHANG Ling-rui was born in 1980. He received the B. S. degree from College of Life Science, Henan University in 2004. Now he is pursuing his Ph. D. degree at MOE Key Laboratory of Laser Life Science and Institute of Laser Life Science, South China Normal University. His research interests are biophoton and its application in monitoring ecological environment and identifying crop resistance.