

植物叶片和冠层光化学反射指数与叶黄素循环的关系

彭 涛¹, 姚 广¹, 高辉远^{1,*}, 李鹏民¹, 王未未¹, 孙 山^{1,2}, 赵世杰¹

(1. 山东农业大学生命科学学院/作物生物学国家重点实验室, 2. 山东省果树研究所, 山东泰安 271018)

摘要:以一串红(*Salvia splendens* Ker-Gawl.)和白车轴草(*Trifolium repens* Linn.)为材料,使用光谱反射技术测定了这两种植物叶片水平和冠层水平的光化学反射指数(PRI)的日变化,同时使用高效液相色谱分析法测定了这两种植物叶黄素循环的日变化,分析了单叶、群体冠层的PRI与叶黄素循环和叶片实际光化学效率($\Phi PS II$)和非光化学淬灭(NPQ)之间的关系。结果表明,不论是叶片水平还是冠层水平,两种植物PRI的变化均与叶黄素的脱环氧化程度和NPQ之间呈显著的负相关、与 $\Phi PS II$ 呈显著的正相关。研究结果表明无论叶片水平还是冠层水平上的光谱反射指数均能非常好地反映植物光合机构对光能的利用效率。

关键词:光谱分析仪;光化学反射指数;叶黄素循环;非光化学淬灭

文章编号:1000-0933(2009)04-1987-07 中图分类号:Q948 文献标识码:A

Relationship between xanthophyll cycle and photochemical reflectance index measured at leaf or canopy level in two field-grown plant species

PENG Tao¹, YAO Guang¹, GAO Hui-Yuan^{1,*}, LI Peng-Min¹, WANG Wei-Wei¹, SUN Shan^{1,2}, ZHAO Shi-Jie¹

1 College of Life Sciences/State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Agricultural University, Shandong Taian 271018, China

2 Shandong Institute of Pomology, Shandong Taian 271000, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(4): 1987 ~ 1993.

Abstract: In order to evaluate the relationship between the photochemical reflectance index (PRI) and xanthophyll cycle, the diurnal variations of spectral reflectance at leaf or canopy level, actual photochemical efficiency of PS II ($\Phi PS II$), non-photochemical quenching (NPQ) in two field-grown species (*Salvia splendens* Ker-Gawl., *Trifolium repens* Linn.) were analysed, the leaves sampled for reflectance were subsequently harvested to assay xanthophyll cycle pigment content by high-performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the photochemical reflectance index (PRI) measured at leaf or canopy level was negatively correlated with de-epoxidation status of total xanthophyll pigment pool size ($(A + Z)/(A + Z + V)$) and non-photochemical quenching (NPQ). The actual photochemical efficiency of PS II ($\Phi PS II$) was positively correlated with the PRI. The results demonstrated that the PRI measured at leaf level or canopy level was a good indicator of light use efficiency in photosynthetic apparatus.

Key Words: field spectrometer; spectral reflectance index; xanthophyll cycle; non-photochemical quenching

光是植物进行光合作用的能量来源。然而,过多的光会引起植物叶片的光氧化破坏,导致色素漂白或植物死亡^[1]。生长在自然条件下的多数植物,晴天中午强光下吸收的光能会超过其自身光合作用的利用能力,导致激发能过剩。当植物遇到其它环境胁迫,如高温、低温、干旱、盐胁迫或营养缺乏等条件时,更容易引起过剩激发能的产生^[2~4]。如果过剩的激发能不能被及时耗散,就会对光合机构造成不可逆的伤害。在长期的进化过程中,植物为了适应多变的生长环境,形成了多种耗散过剩激发能避免光合机构遭受光破坏的保护机制,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671451, 30571125);高校博士点专项基金资助项目(No. 20050434007)

收稿日期:2008-03-08; 修订日期:2008-11-24

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: gaohy@sdau.edu.cn

其中依赖叶黄素循环的热耗散是重要的保护机制之一^[5-7]。叶黄素循环是指光能过剩时,紫黄质(violaxanthin)在紫黄质脱环氧化酶(VDE)的催化下,经过花药黄质(antheraxanthin)转化为玉米黄质(zeaxanthin);在暗处,则在环氧化酶(ZE)的作用下朝相反的方向进行,形成一个循环。脱环化形成的玉米黄质或花药黄质可通过直接和间接的作用耗散过剩光能^[5-7]。近些年来,人们对叶黄素循环在耗散过剩光能保护光合机构免受强光破坏方面的作用做了大量的研究^[8]。叶黄素循环色素的传统测定方法是先通过化学方法将色素提取出来,再利用高效液相色谱进行定量分析。该方法需要破坏植物叶片,因此不能监测同一叶片在不同条件或不同时间叶黄素循环的动态变化。另外,色素的提取和测定过程都比较费时耗力,不宜用于植株冠层和种群以及群落冠层的测定。因此,多年来,叶黄素循环都是基于植物叶片水平的研究。植物冠层水平的叶黄素循环与叶片水平的叶黄素循环之间的关系、植物冠层水平的叶黄素循环与能量耗散和光化学效率的关系以及植物冠层水平的叶黄素循环的研究方法均已成为植物生理生态研究关注的重要问题。

Camon 等^[9,10]证明叶黄素循环色素间的相互转换可以在完整叶片对 531nm 反射光谱的敏感变化中检测出来,并建立了光化学反射指数($PRI = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$)^[11]。光谱反射技术的发展不仅实现了植物叶片水平叶黄素循环的无损测定,而且成为生理生态研究者们进行植物冠层水平叶黄素循环研究的重要手段。这种无损的光谱反射测定技术可以简便、快速、准确的评价叶黄素循环的瞬时变化^[12-14]。

单叶水平和冠层水平上测定的光谱反射特征与叶黄素循环以及 PS II 光化学效率之间的关系有什么异同?冠层水平的反射光谱测定能否很好地反映植物冠层叶黄素循环的脱环化状态和光合机构对光能的利用效率?此外,对不同科属或植被高低不同的植物,其叶片和冠层的光谱反射与叶黄素循环和能量耗散之间是否不同?上述问题对从较大尺度进行不同植物种类光合生理生态研究有重要的理论和实际意义。

本研究选用植株个体比较高的唇形花科植物一串红(*Salvia splendens* Ker-Gawl.)和植株个体较小的豆科植物白车轴草(*Trifolium repens* Linn.)为研究材料,分别使用单通道光谱分析仪(Unispec SC)和双通道光谱分析仪(Unispec DC)并结合叶绿素荧光淬灭动力学分析和高效液相色谱等研究手段探讨了以上问题。

1 材料与方法

1.1 材料

以田间栽培的一串红(*Salvia splendens* Ker-Gawl.)和白车轴草(*Trifolium repens* Linn.)为实验材料。一串红为出花期,田间栽培密度约 30 株/m²左右,植株平均高度 1.3m 左右。白车轴草为营养生长期,田间栽培密度约 90 株/m²左右,植株平均高度 12cm 左右。在整个生长期,两种植物处在自然光照和温度变化的环境中,按照常规水、肥管理。

1.2 方法

在 9 月份选择天气晴朗的日子,分别在 8:00、10:00、12:00、14:00、16:00、18:00 测定一串红和白车轴草冠层顶部外围叶片水平和群体冠层水平的光化学反射指数(PRI),同时测定冠层外围叶片的实际光化学效率($\Phi PS II$),非光化学淬灭(NPQ)和光照强度(PAR),在测定完以上生理指标后,选取植株顶部外围受光一致的叶片 60~90 片,分成 3 份,迅速放入液氮中冷冻,用于叶黄素循环组分脱环化程度的测定。

1.2.1 叶片水平光化学反射指数(PRI)的测定

使用 Unispec-SC 单通道光谱分析仪(美国,PP SYSTEMS)测定植物叶片水平的光化学反射指数,测定波长范围为 310~1100nm。Unispec-SC 单通道光谱分析仪内置一个卤素灯,测定时,将一个分支光纤(直径为 2.3mm)的一端连接到卤素灯的输出端口,另一端连接到检测器的输入端口,光纤的探头端固定在一个标准叶夹中,与叶片呈 60°。在一天中不同的光照强度下测定时,使用仪器配备的白色标准板进行仪器的校正和参比扫描,每一个叶片每一次扫描的反射光谱为 6 次测定的平均值。每种植物、每个时间点测定 30 个以上的叶片。由叶片反射除以参比反射计算叶片的光谱反射率。叶片的光化学反射指数按 $PRI = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$ 计算^[12], R_{531} 为 531nm 的光谱反射, R_{570} 为 570nm 的光谱反射。

1.2.2 植物冠层水平光化学反射指数(PRI)的测定

使用 Unispec-DC 双通道光谱分析仪(美国,PP SYSTEMS)测定植物冠层水平的光化学反射指数,测定波

长范围为 310 ~ 1100nm。将两根直型光纤分别连接到光谱仪的 A 通道和 B 通道。连接到 A 通道的光纤探头与余玄接收器相连,垂直指向天空,随时测定入射光的光强;连接到 B 通道的光纤探头与视角调节管连接,调节光纤探头插入视角调制管的距离,可以改变俯视探头视野(field of view:FOV)的大小,置于植物冠层上方的某一高度,测定植物冠层的反射光谱。测定时,将与余玄接收器相连的探头作为仰视探头指向天空,与视角调节管连接的探头作为俯视探头对准仪器配备的白色标准板,进行参比扫描。随后进行植物冠层反射光谱的测定。本实验的冠层扫描面积为 0.87m²,每个品种测定 5 个冠层小区,每一个冠层反射光谱为 20 次测定的平均值。由目标反射除以参比反射(通道 B 反射/通道 A 反射)计算植物冠层的光谱反射率。植物冠层的光化学反射指数同样由 $PRI = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$ 计算^[11]。

1.2.3 叶绿素荧光参数的测定

使用 FMS-2 型脉冲调制式叶绿素荧光仪(英国,HANSATECH)的光、温叶夹探头测定在一串红和白车轴草冠层顶部外围叶片的实际光化学效率 $\Phi PS II$ 的日变化,按 $\Phi PS II = (F'_m - F_s) / F'_m$ 计算^[15]。于黎明前测定充分暗适应叶片的 F_m ,在每个测定时刻,测定实际光照条件下的最大叶绿素荧光 F'_m ,由 $NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m$ 计算这两种植物的非光化学淬灭参数 NPQ 的日变化^[16],其中 F_m 为黎明前测定的充分暗适应叶片的最大叶绿素荧光; F'_m 为每个测定时刻,光适应下的叶片最大叶绿素荧光。

1.2.4 光照强度(PAR)的测定

使用 FMS-2 叶绿素荧光仪的 PAR 探头,在测定叶绿素荧光参数的同时测得光合有效辐射(PAR)强度。

1.2.5 叶黄素循环色素含量的测定

参照赵世杰等^[17]的方法,使用 SPD-10A_{vp} 型高效液相色谱仪(日本,岛津)测定叶黄素循环组分:紫黄质(V)、花药黄质(A)和玉米黄质(Z)。叶黄素循环脱环氧化程度用 $(A + Z) / (V + A + Z)$ 表示。

2 结果与分析

2.1 单叶与冠层水平的光化学反射指数日变化与叶黄素循环及 PSII 光化学效率日变化的关系

无论是白车轴草还是一串红,它们单叶水平和冠层水平的光化学反射指数(PRI)的日变化均表现出相同趋势(图 1)。上午随着光照的增强,PRI 值逐渐下降,在 12:00 下降到最低值,而下午则随着光强的下降而逐渐增加。可以看出 PRI 的日变化趋势与叶片 PS II 的实际光化学效率($\Phi PS II$)的日变化趋势是一致的(图 1),两者之间呈现显著的正相关(图 2)。一天中叶黄素循环脱环氧化程度的变化与 PRI 的变化相反(图 1),两者之间呈现显著的负相关(图 2)。

从测定结果中还可看出,白车轴草和一系列红叶黄素循环脱环氧化程度的日变化与非光化学淬灭(NPQ)的日变化呈现一致的趋势(图 1),两者呈现显著的正相关(图 2)。

2.2 叶黄素脱环氧化程度与 PSII 光化学效率和 NPQ 的关系

由图 3 可以看出,无论是白车轴草还是一串红,随着叶黄素循环的脱环氧化程度的增加,NPQ 呈线性增加,而 $\Phi PS II$ 则呈线型下降,两种植物之间并没有显著性的差异。这说明对于这两种植物来说,叶黄素循环均是它们热耗散的一种重要机制,也是导致 PSII 光化学效率下降的原因之一。

2.3 单叶水平的 PRI 与冠层水平的 PRI 的关系

研究结果表明,白车轴草和一系列红在叶片水平光化学反射指数(PRI)的日变化和冠层水平的光化学反射指数(PRI)的日变化非常一致,呈现出极显著的线性相关(图 4),表明在冠层反射指数的测定中,可以将冠层作为一张大叶片来看待;而在测定冠层顶端叶片水平的光化学反射指数时,如果取样量适当,可以在一定程度上反映出冠层水平的光化学反射指数。

3 讨论

在研究植物叶片的光谱反射特征时,多数的研究者使用带有内置光源的单通道光谱仪,在测定过程不受自然光强变化的影响。在测定较大范围植物冠层光谱反射时,如果使用单通道光谱仪测定,则无法使用内置光源,必须利用自然光强,而自然条件下光强是不断变化的,这就需要对测定时刻的光强进行随时的监测,并

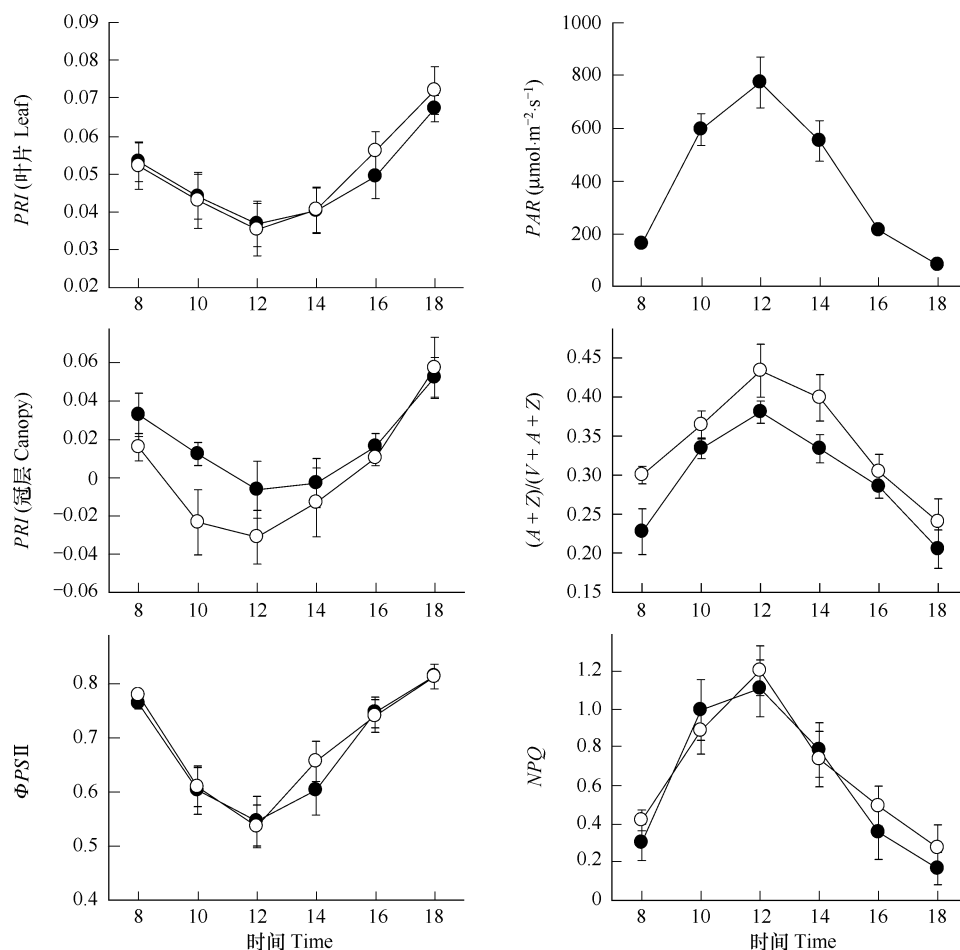


图1 白车轴草(●)和一串红(○)的光化学反射指数(PRI),叶黄素循环色素脱环氧化程度($A + Z/V + A + Z$)、光系统II的实际光化学效率($\Phi\text{PS II}$)以及非光化学淬灭(NPQ)的日变化

Fig. 1 The diurnal variation of photochemical reflectance index (PRI), de-epoxidation status of total xanthophylls pigment pool size $(A + Z)/(V + A + Z)$, actual photochemistry efficiency of PS II ($\Phi\text{PS II}$) and non-photochemical quench (NPQ) in field-grown *Trifolium repens* Linn. (●) and *Salvia splendens* Ker-Gawl. (○)

随时对仪器进行校正。在多云天,这样的测定很麻烦。因此,在分析植物冠层光谱反射特征时,使用双通道的光谱仪可以避免因光强变化带来的频繁校正。双通道光谱仪同时使用两根光纤,一根光纤的探头与余玄接收器相连,测定植被上方光强的变化;另一根光纤的探头与视角镜头相连,测定冠层的反射光谱,无论光强如何变化,光谱仪均能自动将任何时刻的植被反射光谱转换成当时实际光强的反射率,确保了测定数据的准确性。

在本研究中,上午随着光强的增加两种植物叶片的实际光化学效率($\Phi\text{PS II}$)不断下降,在中午光强最大时达到最低;而热耗散(NPQ)和叶黄素循环脱环氧化程度($A + Z)/(V + A + Z)$ 则随着光强的增加不断上升(图1),这个事实表明,随着光强的增加,叶片吸收的光能逐渐超出两种植物光合作用所能利用的范围,此时,白车轴草和一串红植株可以通过依赖叶黄素循环的热耗散机制耗散过剩激发能。其结果是导致NPQ上升和PS II实际光化学效率的下降,保护了光合机构免受强光的破坏。当下午光强逐渐减弱后,叶片的实际化学效率渐恢复到清晨时的水平,这个事实进一步证明了在该测定条件下,中午 $\Phi\text{PS II}$ 的下降是光合机构主动下调的过程,而不是光破坏的结果。

虽然一天中,冠层PRI与单叶PRI的绝对值的大小不同,但是两种植物叶片水平和冠层水平的PRI之间呈极显著的正相关,且都与叶片的实际光化学效率 $\Phi\text{PS II}$ 呈显著的正相关、与黄素循环脱环氧化的程度呈负相关。这个事实表明,无论在单叶水平还是在冠层水平上的PRI值均能很好地反映不同环境条件下植物叶片

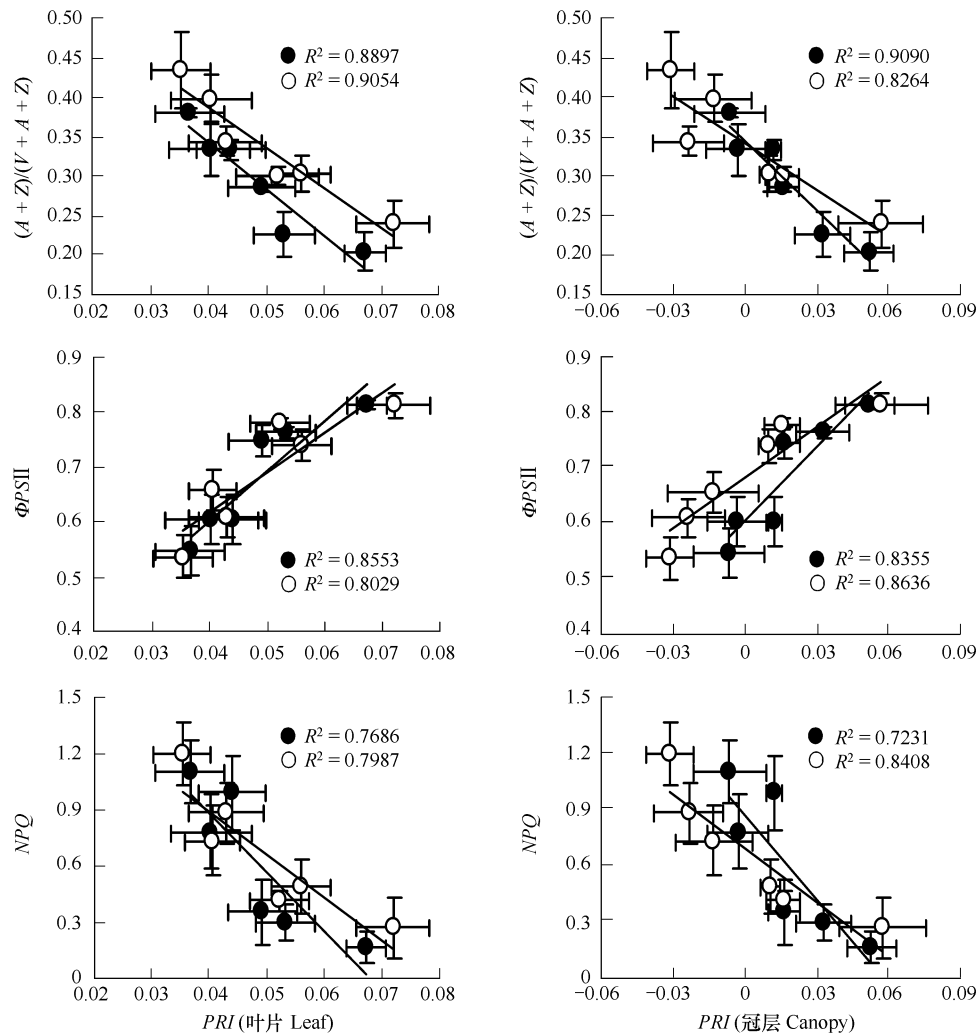


图2 白车轴草(●)和一串红(○)的 PRI 与 $(A+Z)/(V+A+Z)$ 、 $\Phi PS II$ 以及 NPQ 的相关性,测定时的光照条件见图1

Fig. 2 The correlation between PRI measured at leaf or canopy level and $(A+Z)/(V+A+Z)$, $\Phi PS II$, NPQ in field-grown *Trifolium repens* Linn. (●) and *Salvia splendens* Ker-Gawl. (○); The light intensity during the measurements is depicted in Fig. 1

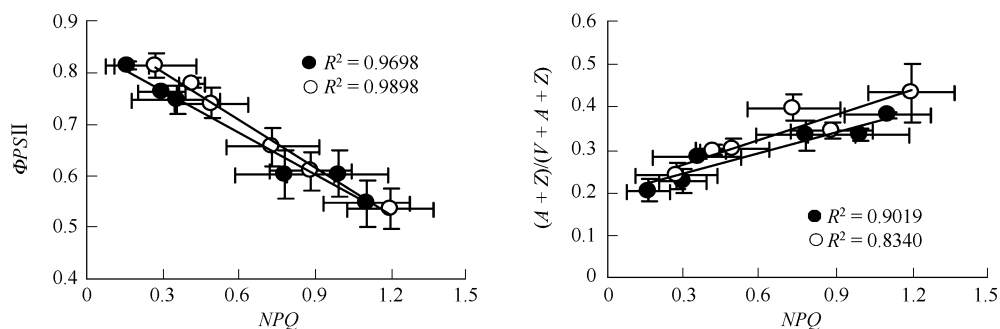


图3 白车轴草(●)和一串红(○)的 NPQ 与 $(A+Z)/(V+A+Z)$ 和 $\Phi PS II$ 之间的相关性

Fig. 3 The correlation between NPQ and $(A+Z)/(V+A+Z)$, $\Phi PS II$ in field-grown *Trifolium repens* Linn. (●) and *Salvia splendens* Ker-Gawl. (○)

的叶黄素循环脱环氧化的程度和 $PS II$ 的光化学效率。Stylinski 和 Gamon 等人在研究不同季节长绿灌木植物的光化学反射指标与光合特性的变化时,也观察到不同种类的灌木植物在不同季节, PRI 的大小与 $PS II$ 的光

化学效率一致^[18]; Nichol 等人在红树林冠层的研究也得出类似的结果^[13]。这些研究结果说明,群体的光谱反射特征能够与叶片的光化学效率和叶黄素循环很好地联系起来。迄今为止,尚未建立一种直接测定群体的光化学效率和叶黄素循环的方法,而通过群体光谱反射的特征来间接地研究群体的光化学效率和叶黄素循环无疑是一种行之有效的方法。

一天中,这两种植物冠层的 *PRI* 绝对值之间存在较大的差异,然而这种冠层水平上 *PRI* 的差异并不影响 *PRI* 与叶黄素循环脱环化程度和与光化学效率的相关性。我们推测两种植物冠层水平上的差异与两种植被的叶面积系数、叶片密度和叶片着生角度等有关^[14,19]。

综上所述,无论是在单叶水平还是冠层水平上测定的光谱反射特征,均与叶黄素循环以及 PS II 实际光化学效率之间存在极显著的线性相关;冠层水平的光谱反射特征能很好地反映植物群体的叶黄素循环的脱环化状态及其对光能的利用效率。光谱反射技术为生理生态工作者提供了一个无损伤研究植物完整叶片和群体冠层叶黄素循环的方法,同时也是研究植物群体冠层水平上能量耗散和光化学效率的有力工具。

当然,不同种植物对过剩光能的耗散机制并不完全相同,在不同情况下,相同植物的耗散机制也可能发生变化。植物除了依赖叶黄素循环的热耗散外,还有部分激发能可以通过光呼吸或 Mehler 反应等其它途径耗散^[20,21]。此外,对于角质或腊质层较厚的植物,或叶片有较多表皮毛的植物,它们对光谱的反射也可能不会不尽相同。对于这些植物光谱反射指标 *PRI* 与叶黄素循环的关系尚需做更多的研究来阐明。

References:

- [1] Donald R O. When there is too much light. *Plant Physiol*, 2001, 125: 29—32.
- [2] Lu C M, Zhang J H. Effects of water stress on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition in wheat plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1998, 25: 883—892.
- [3] Chen H X, Li W J, An S Z, *et al.* Characterization of PS II. photochemistry and thermostability in salt treated *Rumex* leaves. *J. Plant Physiol*, 2004, 161: 257—264.
- [4] Jiang C D, Gao H Y, Zou Q. Increase in excitation energy dissipation by iron deficiency in soybean. Leaves. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2002, 28(2): 127—132.
- [5] Demmig-Adams B. Carotenoids and photoprotection in plants. A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1020: 1—24.
- [6] Gilmore A M. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol Plant*, 1997, 99: 197—209.
- [7] Xu C C, Li L B, Kuang T Y. Photoprotection in chilling-sensitive and-resistant plants illuminated at a chilling temperature: role of the xanthophyll cycle in the protection against lumen acidification. *Aust J Plant Physiol*, 2000, 27: 669—675.
- [8] Wu C A, Meng Q W, Zou Q. The xanthophyll cycle and its regulation. *Plant Physiology Communications*, 2001, 35(1): 1—5.
- [9] Gamon J A, Field C B, Bilger W, *et al.* Remote sensing of the xanthophyll cycle and chlorophyll fluorescence in sunflower leaves and canopies. *Oecologia*, 1990, 85: 1—7.
- [10] Gamon J A, Filella I, Penuelas J. The dynamic 531-nanometer Δ reflectance signal: A survey of twenty angiosperm species. In: Yamamoto H Y and Smith C M, eds. *Photosynthetic Responses to the Environment*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, M d, 1993. 172—177.
- [11] Gamon J A, Penuelas J, Field C B. A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Rem Sens Environ*, 1992, 41: 35—44.
- [12] Gamon J A, Surfus J S. Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *New Phytol*, 1999, 143: 105—117.
- [13] Nichol C J, Rascher U, Matsubara S, *et al.* Assessing photosynthetic efficiency in an experimental mangrove canopy using remote sensing and chlorophyll fluorescence. *Trees*, 2006, 20: 9—15.

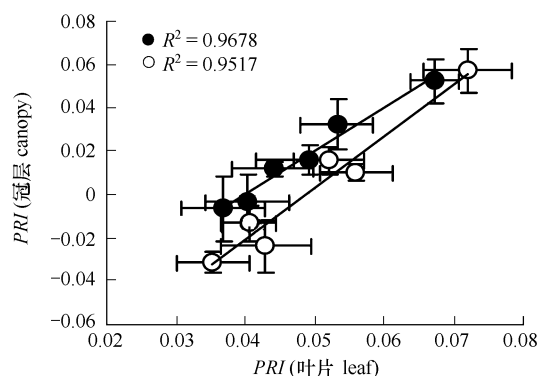


图4 白车轴草(●)和一串红(○)的单叶反射指数与冠层反射指数的相关性

Fig. 4 The correlation between *PRI* measured at leaf and *PRI* measured at canopy level in field-grown *Trifolium repens* Linn. (●) and *Salvia splendens* Ker-Gawl. (○)

- [14] Weng J H, Jhaung L H, Jiang J Y. Down-regulation of photosystem 2 efficiency and spectral reflectance in mango leaves under very low irradiance and varied chilling treatments. *Photosynthetica*, 2006, 44 (2): 248—254.
- [15] Genty B, Briantais J M, Baker N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1989, 990: 87—92.
- [16] Demmig-Adams B, Adams III W W, Barker D H, *et al.* Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol Plant*, 1996, 98: 253—264.
- [17] Zhao S J, Meng Q W, Xu C C, *et al.* Analysis of the xanthophylls cycle components in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Physiology Communications*, 1995, 31(6): 438—442.
- [18] Stylinski C D, Gamon J A, Oechel W C. Seasonal patterns of reflectance indices, carotenoid pigments and photosynthesis of evergreen chaparral species. *Oecologia*, 2002, 131: 366—374.
- [19] Gamon J A, Serrano L, Surfus J S. The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecologia*, 1997, 112: 492—501.
- [20] Chen H X, Gao H Y, An S Z, Li W J. Dissipation of excess energy in Mehler-peroxidase reaction in *Rumex* leaves during salt shock. *Photosynthetica*, 2004, 42: 117—122.
- [21] Li H D, Gao H Y. Effects of Different Nitrogen Application Rate on Allocation of Photosynthetic Electron Flux in *Rumex* K-1 Leaves. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2007, 33(5): 417—424.

参考文献:

- [4] 姜闯道,高辉远,邹琦. 缺铁使大豆叶片激发能的耗散增加. *植物生理与分子生物学学报*, 2002, 28(2): 127~132.
- [8] 吴长艾,孟庆伟,邹琦. 叶黄素循环及其调控. *植物生理学通讯*, 2001, 37(1): 1~5.
- [17] 赵世杰,孟庆伟,许长成. 植物组织中叶黄素循环组分的高效液相色谱分析法. *植物生理学通讯*, 1995, 31(6): 438~442.
- [21] 李海东,高辉远. 不同施氮量对杂交酸模叶片光合电子流分配的影响. *植物生理与分子生物学学报*, 2007, 33(5): 417~424.