

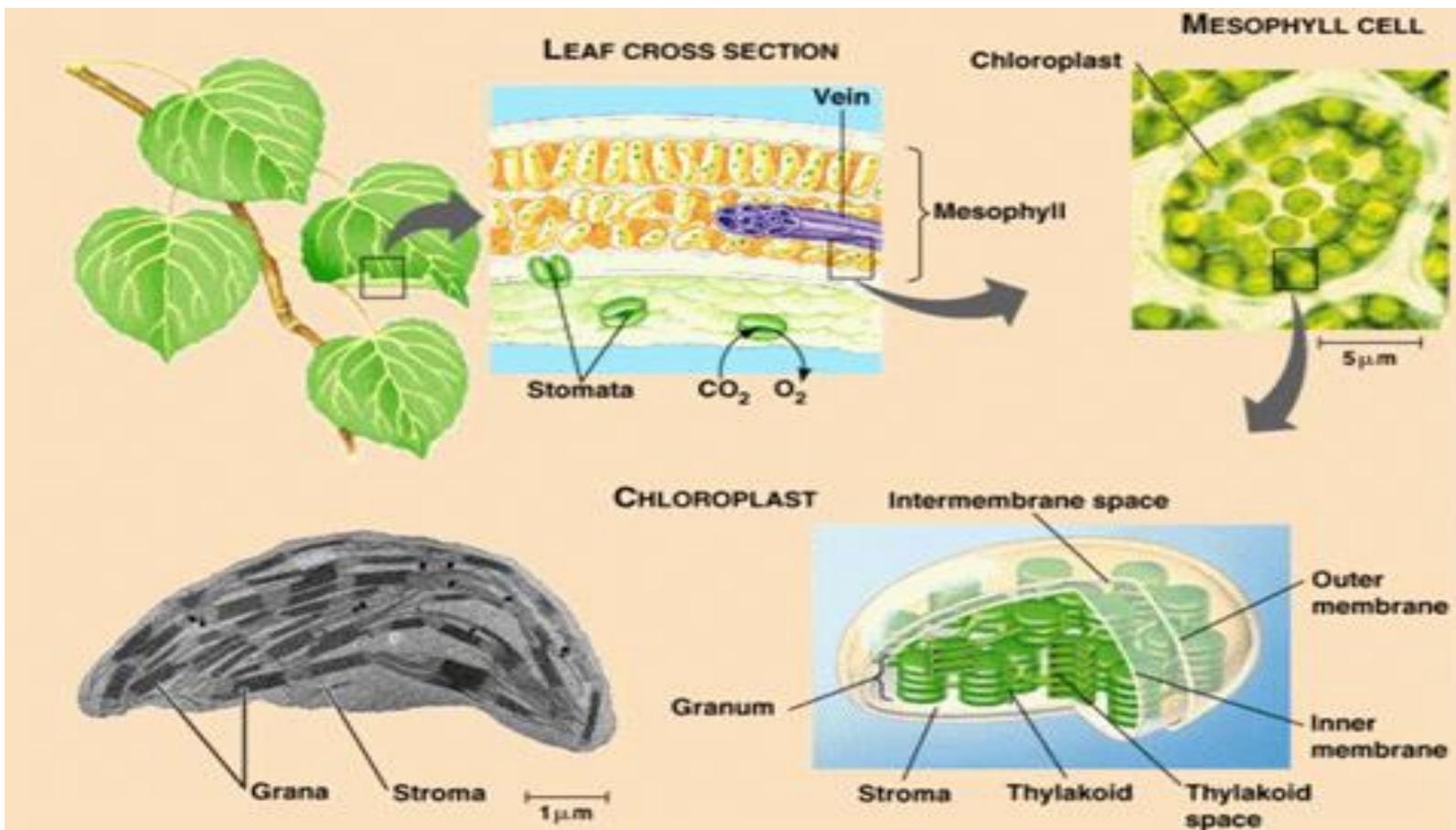
LI-6800叶绿素荧光测量原理

LI-COR®

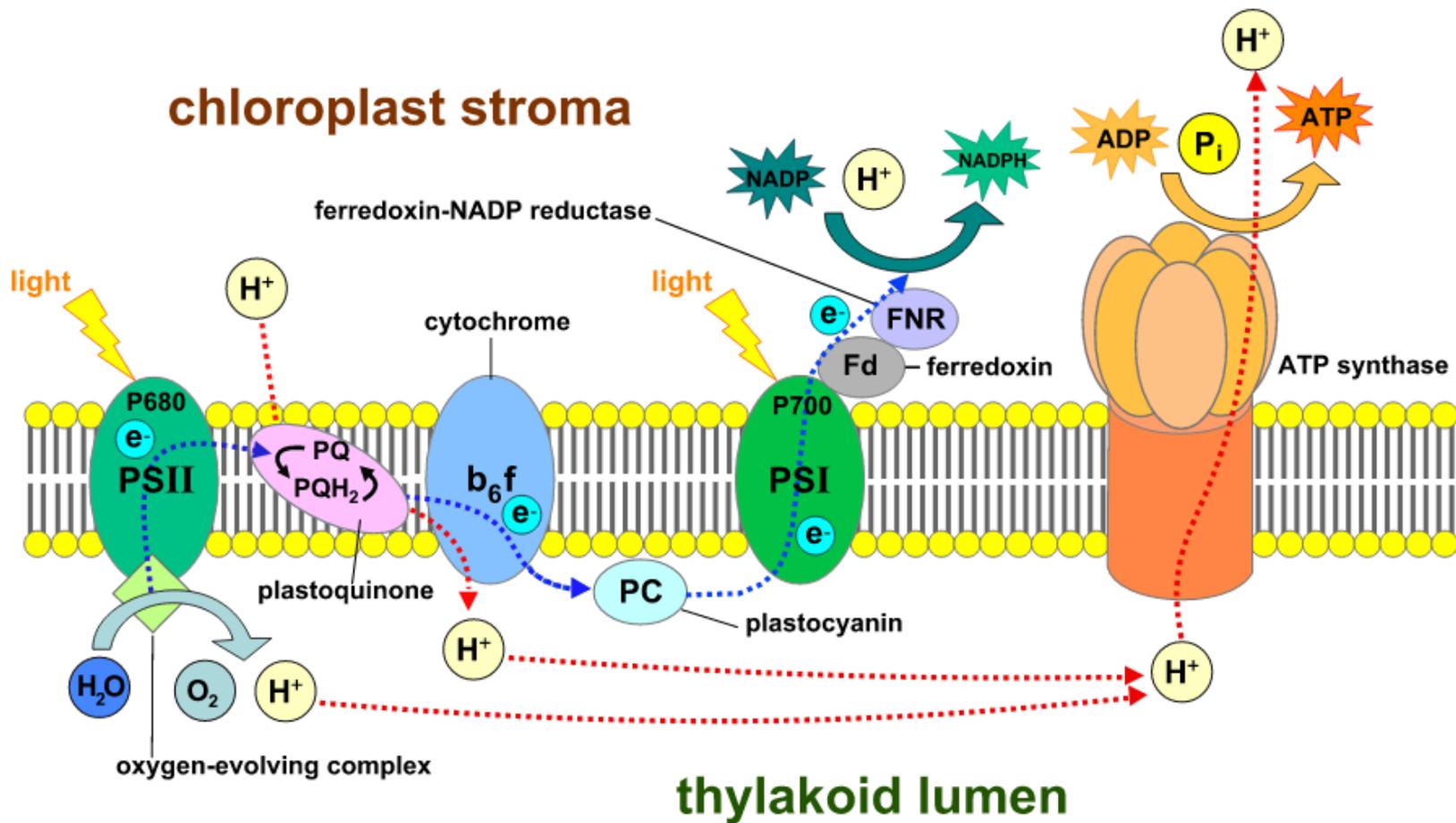
基因有限公司农业环境科学部
北京力高泰科技有限公司
技术支持部



光合作用基础理论 (叶片尺度)

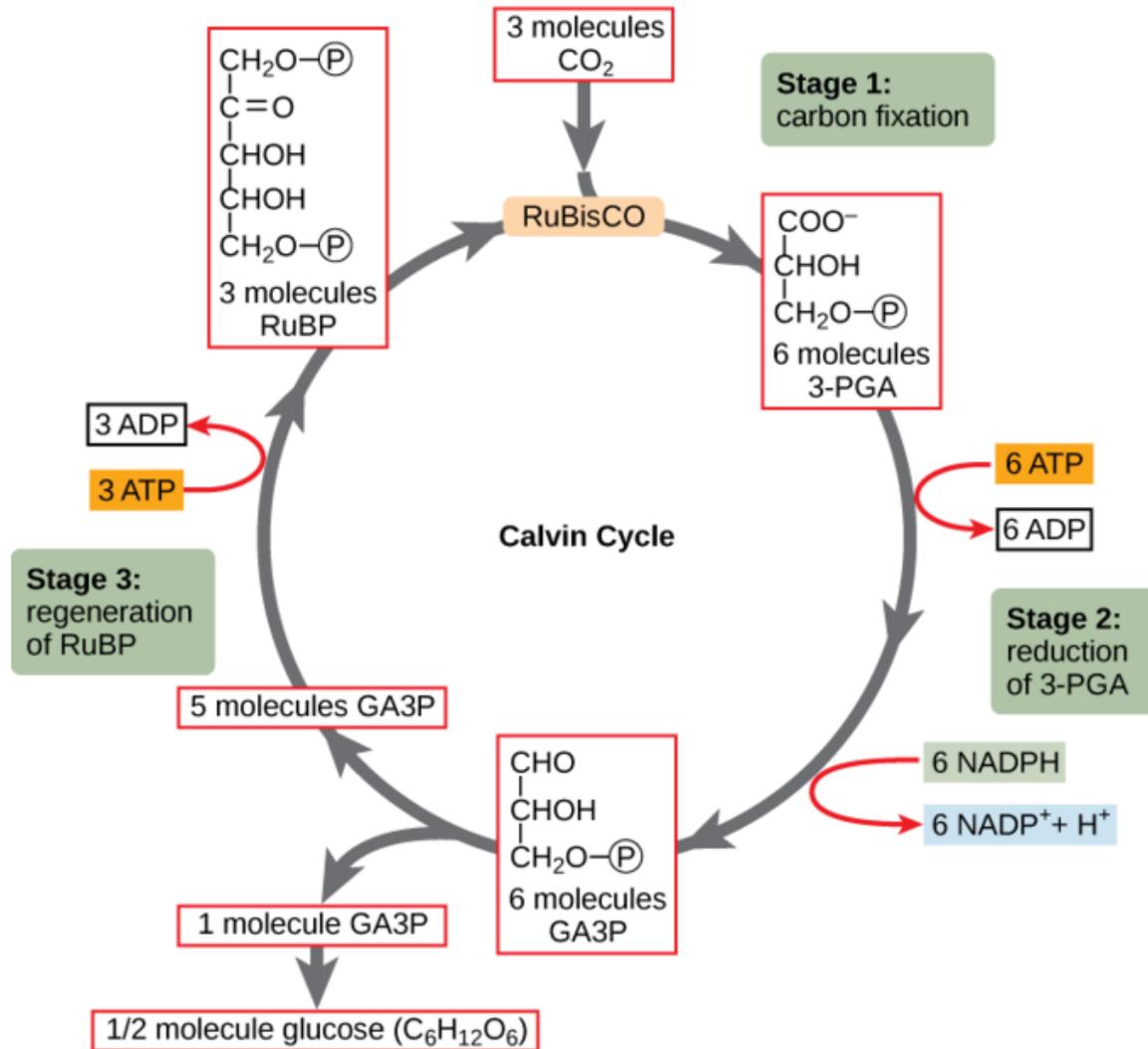


光合反应-光合电子传递链 (光反应)



光能 \longrightarrow 电能 \longrightarrow ATP+NADPH

光合作用-碳反应





光合作用基础理论

光合作用过程简单概括：

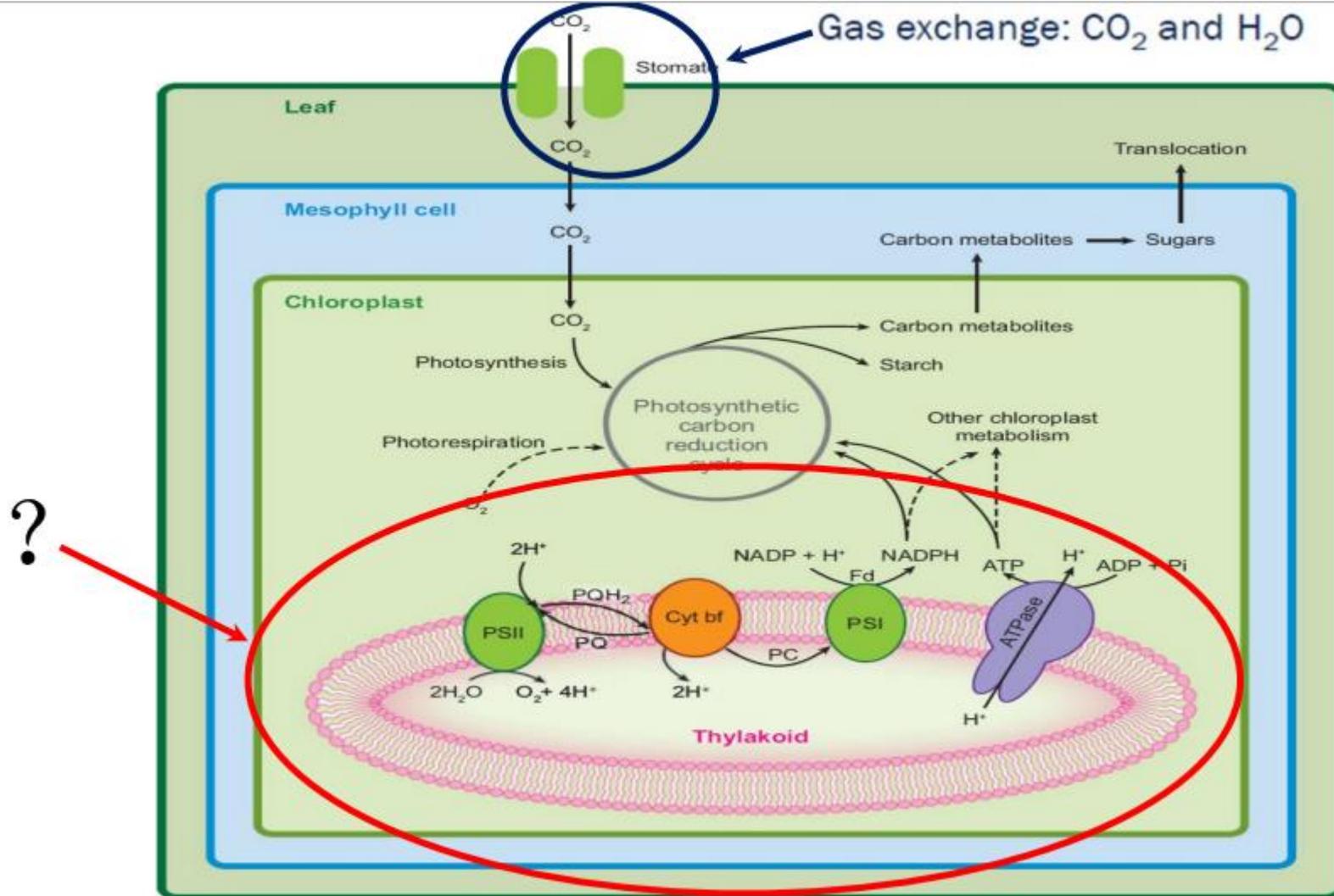
叶绿体光合电子传递链上四大复合体相互配合实现：

(LR) 光能——电能——ATP+NADPH (高能化合物)

然后，借助ATP+NADPH中所蕴含的能量的驱动实现：

(DR) CO_2 —— (CH_2O)

光合作用基础理论





光合作用—光反应

光反应各阶段能量转化如何量化？——叶绿素a荧光

- 叶绿素a荧光是如何产生的？
- 叶绿素a荧光信号大小与光合作用的光能分配有什么关系？
- 为什么叶绿素a荧光被称之为“光合活体探针”？

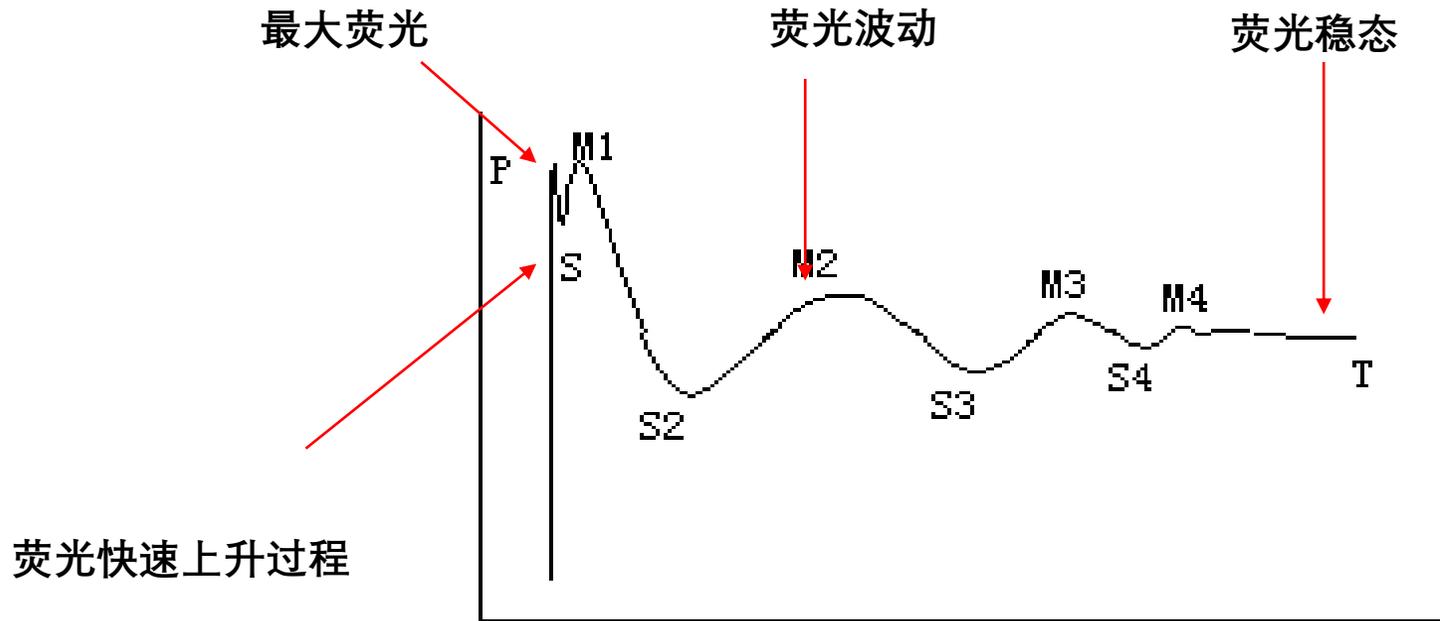
回答好这些问题将十分有利于大家借助叶绿素a荧光技术进行光合作用的研究

叶绿素荧光的发现——Kautsky效应



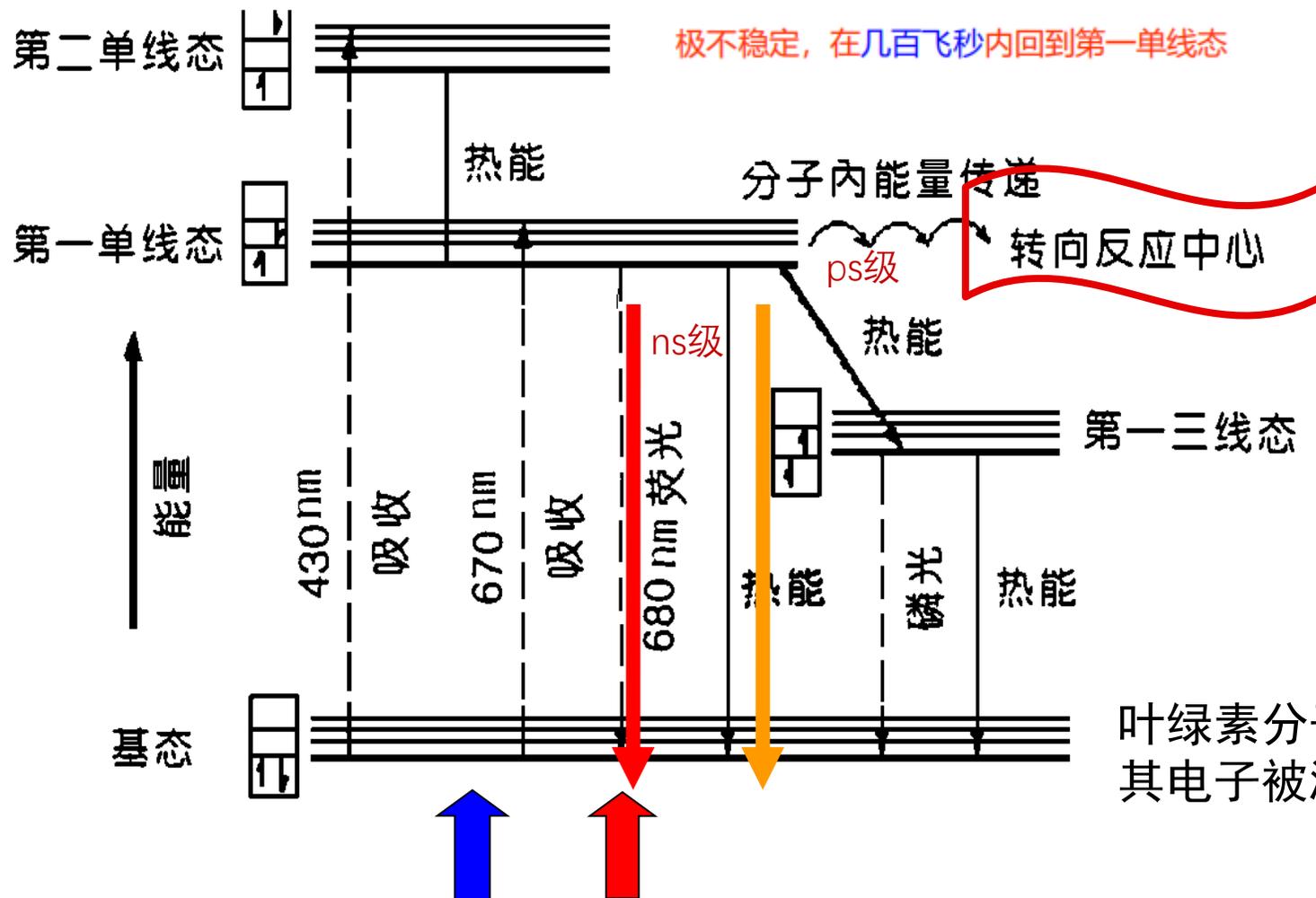
Kautsky 等（1931）发现，将暗适应的绿色植物突然暴露在可见光下后，植物绿色组织发出一种暗红色，强度不断变化的荧光，称为**Kautsky**效应。

Kautsky效应



当对暗适应叶片照光时，叶绿素荧光迅速上升，随后有一系列的慢的波动，逐渐下降到稳态，后期荧光下降的过程称为荧光淬灭。

叶绿素a荧光的产生



极不稳定, 在几百飞秒内回到第一单线态

分子内能量传递
 ps级
 转向反应中心

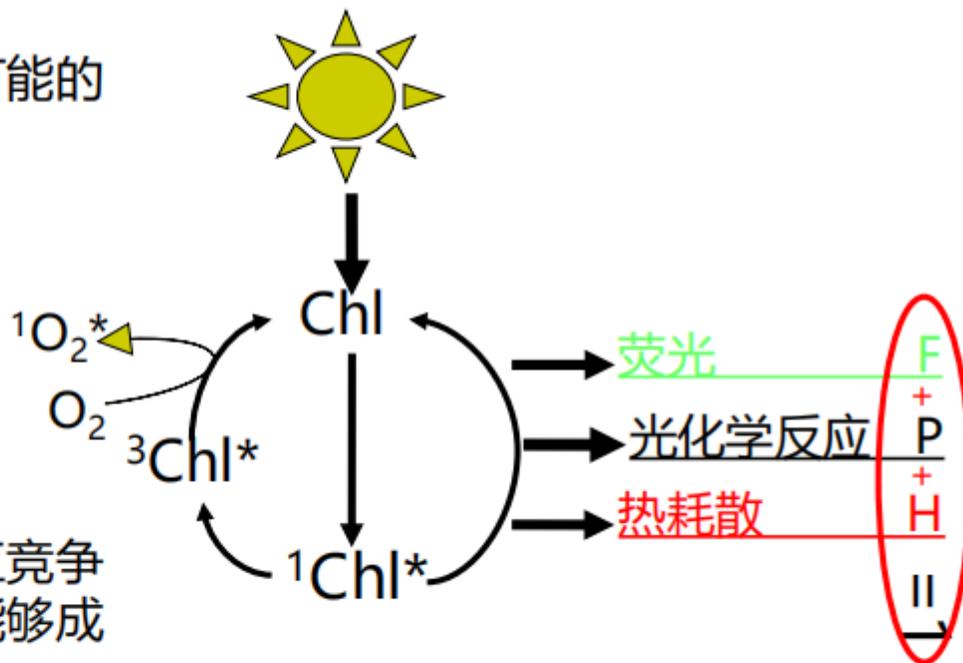
叶绿素分子吸收红光或蓝光后, 其电子被激发

光能的分配

光合机构吸收的光能有三种可能的去向：

- ①推动光化学反应；
- ②以热能形式耗散；
- ③以荧光形式散失；

三者之间存在此消彼长的相互竞争的关系，因此，叶绿素荧光能够成为研究光合作用的有效地探针。



荧光产量的变化反映了光化学效率和热耗散能力的变化。



叶绿素a荧光理论

$$F + H + P = 1 \quad (\text{eq. 1})$$

At saturating light intensity:

No increase in **P** with further increase in light intensity and **F** & **H** maximum

$$F = F_m, H = H_m, P = 0 \quad (\text{eq. 2})$$

$$F_m + H_m + 0 = 1 \quad (\text{eq. 3})$$

$$H_m = 1 - F_m \quad (\text{eq. 4})$$

If we assume the ratio of heat to fluorescence de-excitation does not change,

$$H/F = H_m/F_m \quad (\text{eq. 5})$$

$$H = F(1-F_m)/F_m \quad (\text{eq. 6})$$

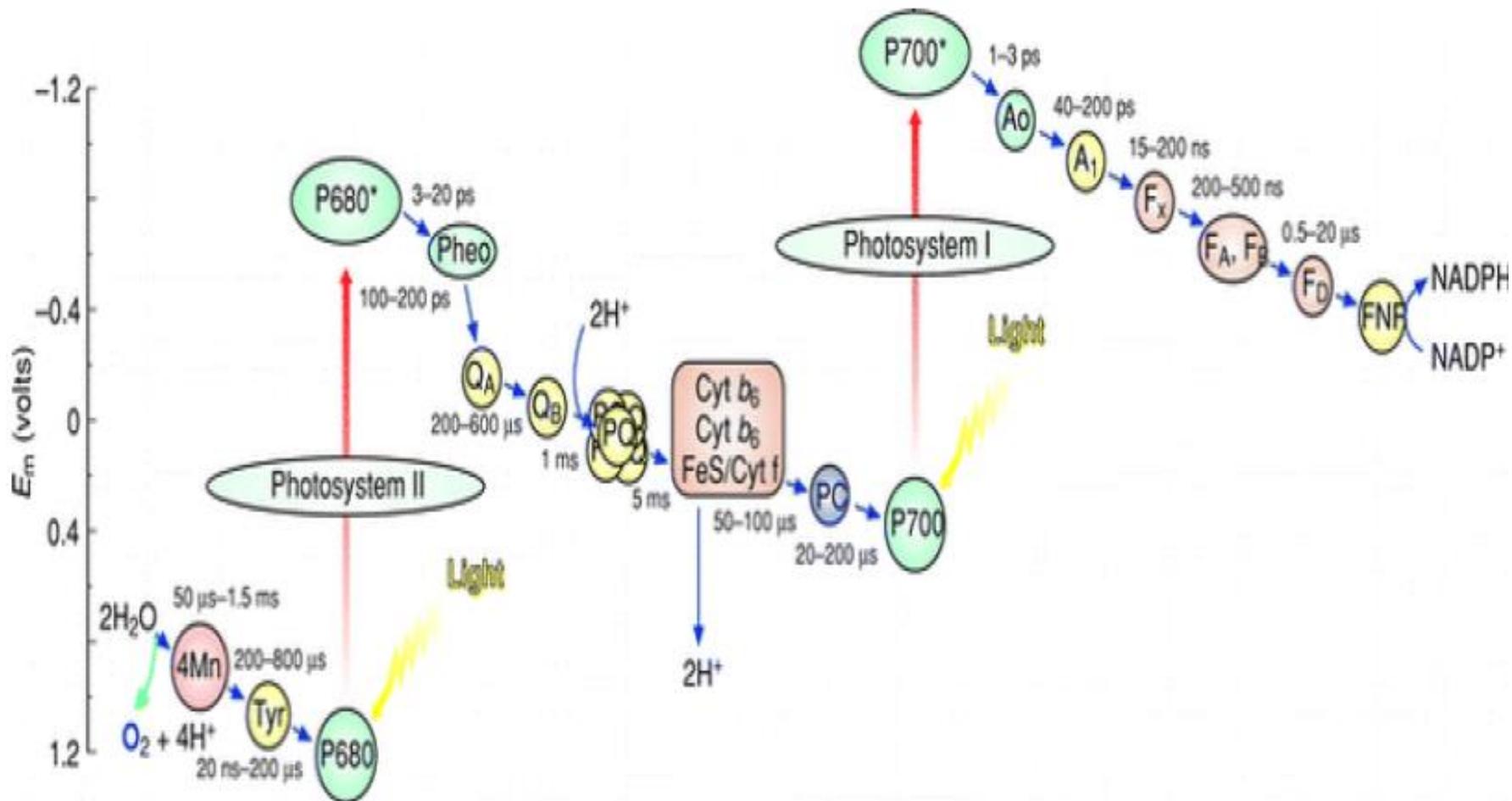
We can solve for **H** & **P** if we measure **F** in non-saturating light (**F**) and saturating light (**F_m**)

$$P = 1 - F - H \quad (\text{eq. 7})$$

$$P = 1 - F - [F(1-F_m)/F_m] \quad (\text{eq. 8})$$

$$P = F_m - F / F_m \quad (\text{eq. 9})$$

光合电子传递链



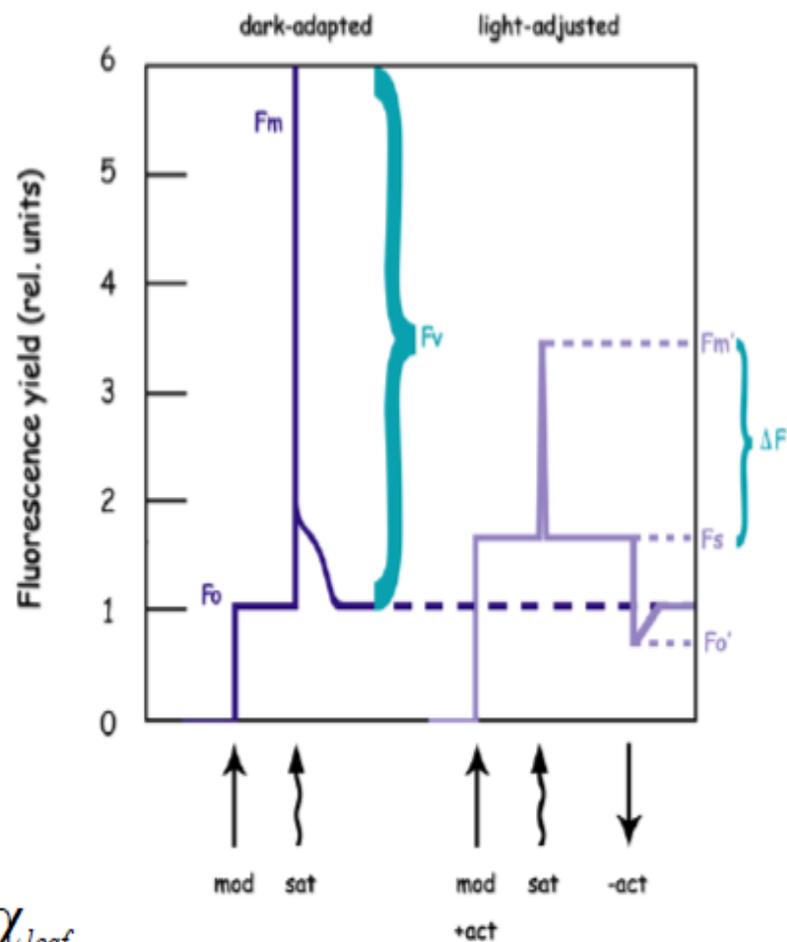
叶绿素a荧光理论

$$P = (F_m - F) / F_m$$

$$P_{dark} = \frac{F_m - F_o}{F_m} = \frac{F_v}{F_m}$$

$$P_{light} = \Phi_{PSII} = \frac{F_m' - F_s}{F_m'} = \frac{\Delta F}{F_m'}$$

$$ETR = \Phi_{PSII} fI \alpha_{leaf} = \frac{F_m' - F_s}{F_m'} fI \alpha_{leaf}$$



叶绿素a荧光理论

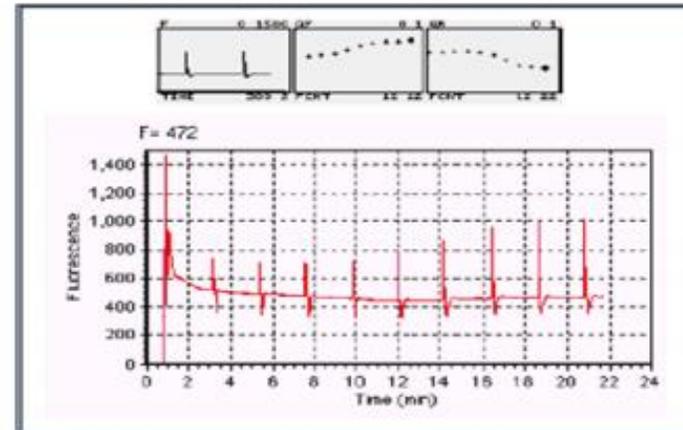
q_P and q_N

$$q_P = \frac{F_m' - F_s}{F_m' - F_o'}$$

$$q_N = \frac{F_m - F_m'}{F_m - F_o'}$$

$$NPQ = \frac{F_m - F_m'}{F_m'}$$

Dark-Adapted
Measurement





如何测量叶绿素a荧光?

- 连续激发式荧光测量技术;
- 脉冲调制式荧光测量技术;
- LI-COR多相闪光技术 “Multiphase Flash™ Fluorescence



如何测量叶绿素a荧光?

两种类型的荧光仪：连续激发式和脉冲调制式荧光仪

一.连续激发式荧光仪

将测定叶片充分暗适应，然后对叶片进行短暂的快速照光，通过高分辨率检测器检测荧光信号的变化。

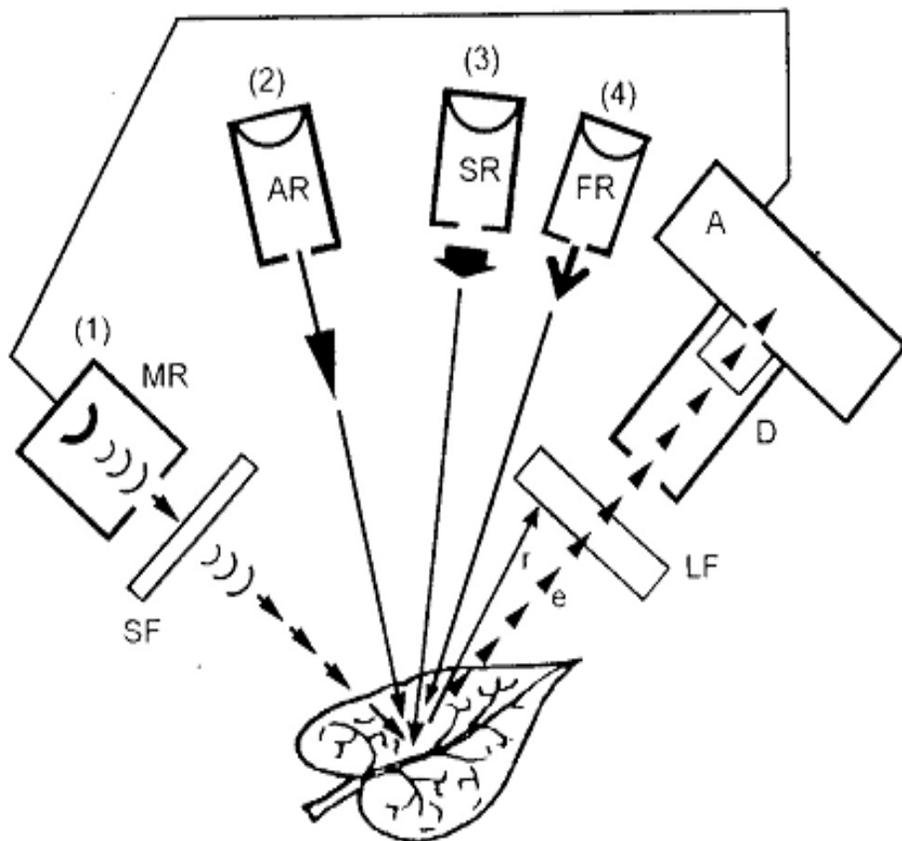
特点：具有较高分辨率，但只适应于暗处理的样品，无法区分环境背景光的影响。

二.脉冲调制式荧光仪

测定时仪器提供一种脉冲调制光，能诱导出相同脉冲频率的荧光。当有其他光线同时存在时，会产生以下两种光信号：

1. 活化光诱导的非脉冲荧光信号
2. 脉冲调制光诱导的脉冲荧光信号

脉冲调制式测量的原理



- 1: 调制测量光;
- 2: 作用光;
- 3: 饱和脉冲光;
- 4: 远红光;
- 5: 检测器及放大器;
- 6: 短波通过滤光片;
- 7: 长波通过滤光片;
- 8: 样品

脉冲调制式荧光仪能排除背景光诱导的荧光信号，只监测脉冲光诱导的荧光信号的变化。不但能反应荧光诱导动力学曲线上升过程中O-P阶段的变化还能反映光合作用的碳同化反应启动后的光能捕获、转化及利用效率。

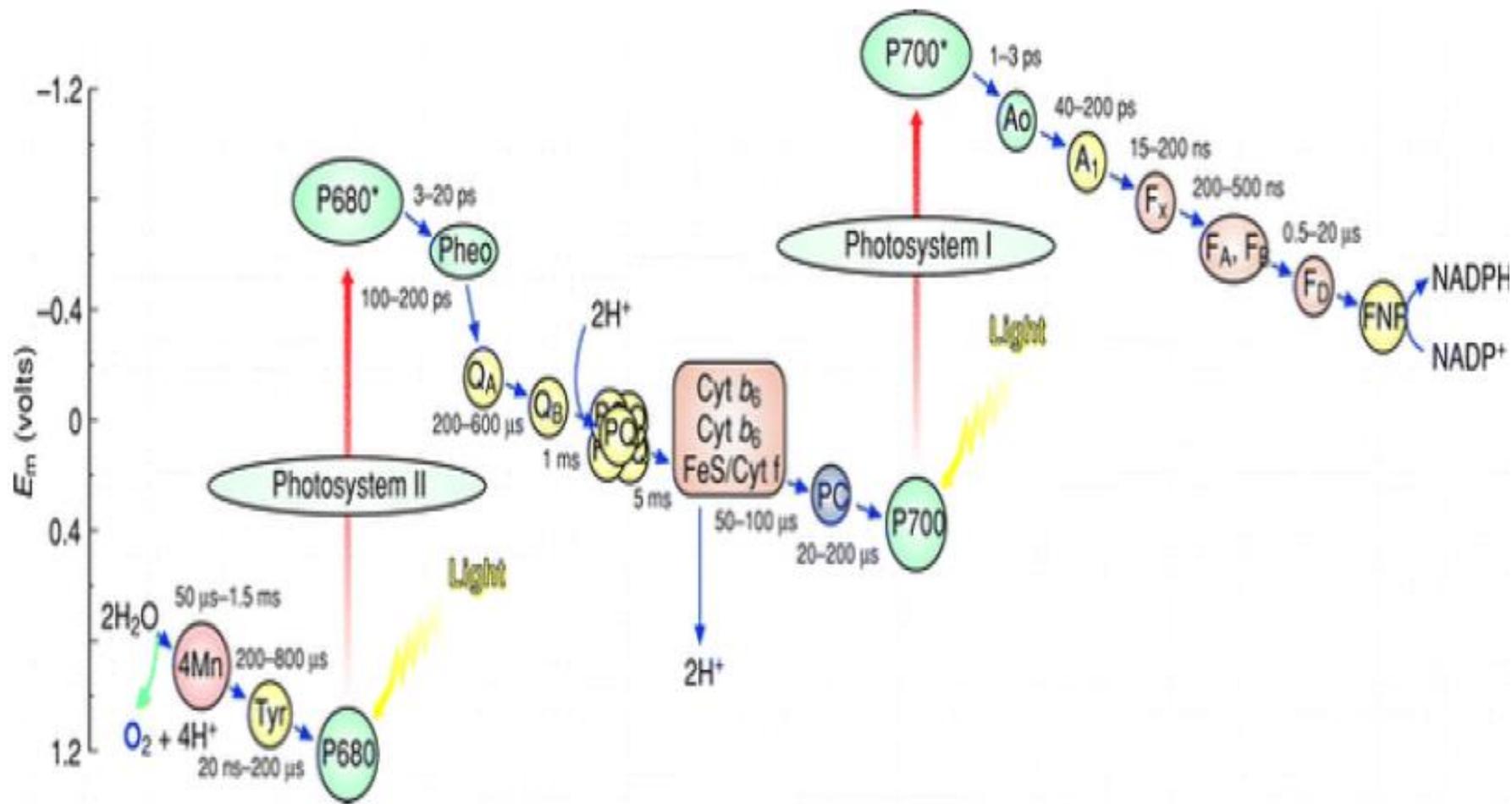


饱和脉冲技术

所谓饱和脉冲技术，就是打开一个持续时间很短（一般小于1 s）的**强光**关闭所有的**电子门**（光系统II的电子传递过程被暂时阻断），从而使叶绿素荧光达到最大。

饱和脉冲（Saturation Pulse, SP）可被看作是活化光的一个特例。**活化光越强，PS II释放的电子越多，QA处累积的电子越多，也就是说关闭态的电子门越多，F越高。**当活化光达到使所有的电子门都关闭（不能进行光合作用）的强度时，就称之为饱和脉冲。

光合电子传递链



慢相荧光

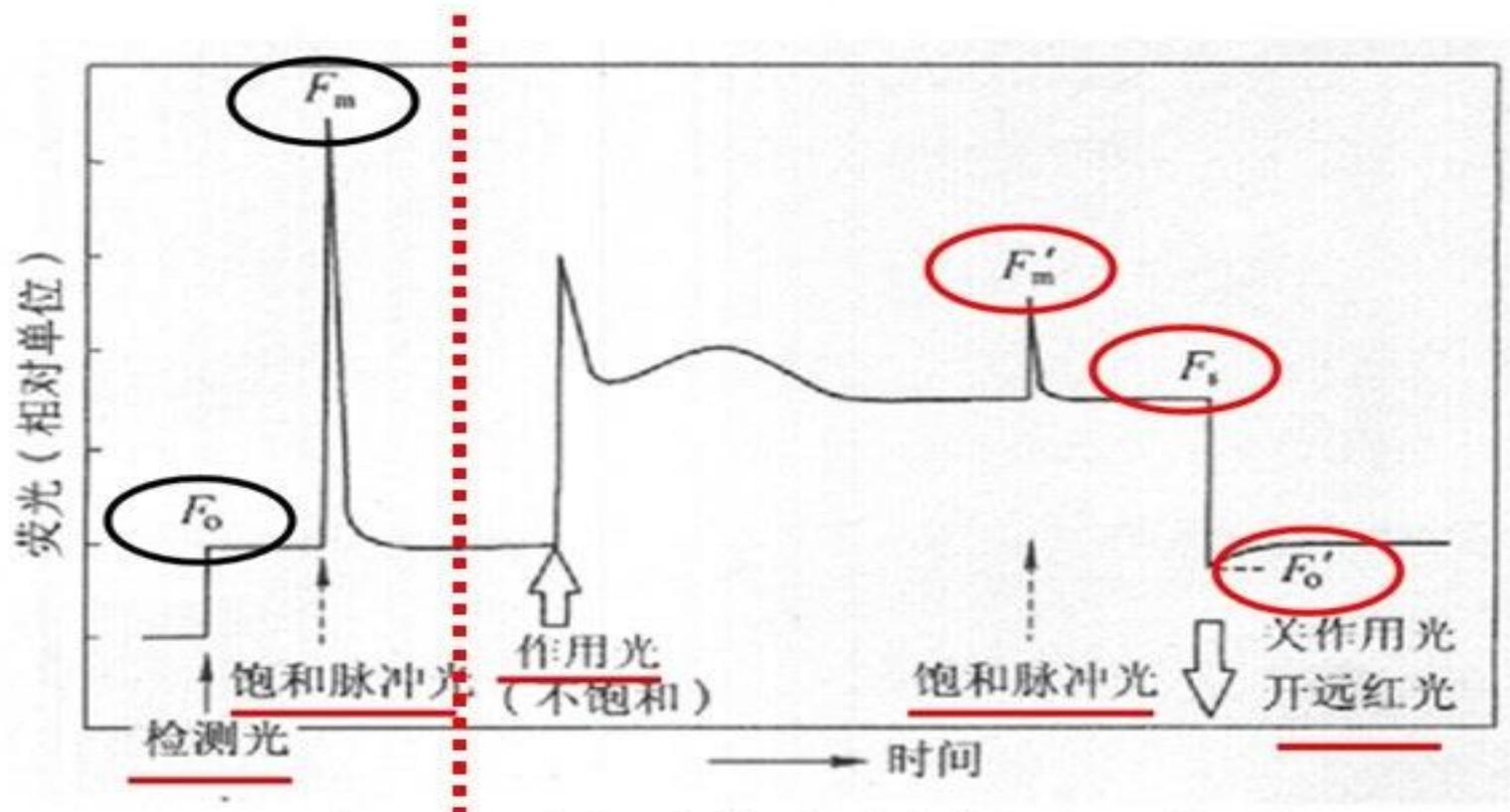


图4-4 叶绿素荧光分析方法示意图

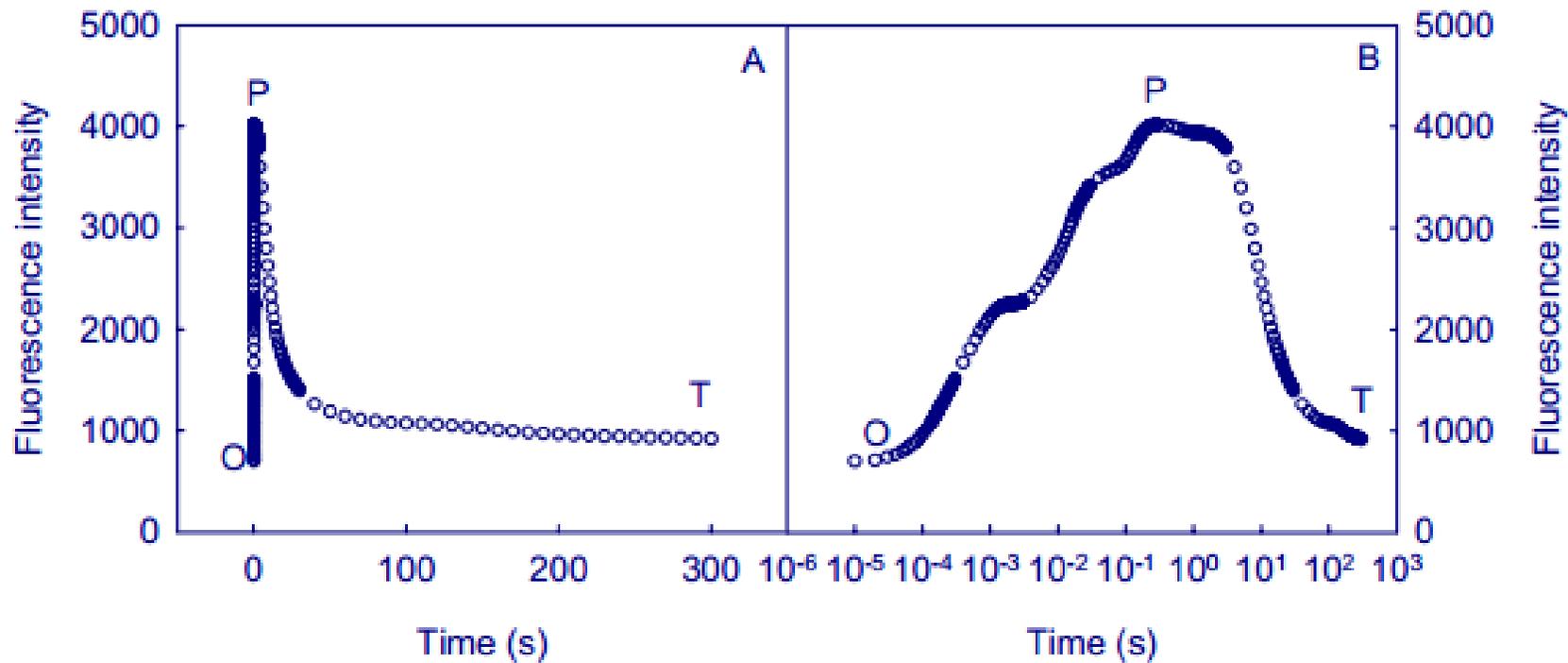


慢相荧光

	计 算 参 数	参 数 意 义
光化学效率参数	$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$	暗适应下 PSII 反应中心完全开放时的最大光化学效率, 它反映 PSII 反应中心最大光能转化效率
	$F_v'/F_m' = (F_m' - F_o')/F_m'$	光适应下 PSII 最大光化学效率, 它反映有热耗散存在时 PSII 反应中心完全开放时的最大光化学效率
荧光淬灭参数	$qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$	光化学淬灭系数, 反应 PSII 反应中心开放程度
	$1 - qP = (F_s - F_o')/(F_m' - F_o')$	反应 PSII 反应中心关闭程度
	$qN = (F_m - F_m')/(F_m - F_o')$	非光化学淬灭系数
	$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$	非光化学淬灭
	$\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$	PSII 实际光化学效率, 它反映在照光条件下 PSII 反应中心部分关闭的情况下的实际光化学效率
	$ETR = 0.5 * \alpha * \Phi_{PSII} * PPFD$	PSII 电子传递速率 ($\alpha \approx 0.84 \sim 0.87$)



快相荧光 (OJIP曲线)





主要荧光参数及其意义——暗适应

F_o: **初始荧光产量** (Original fluorescence yield) 也称基础荧光, 是PSII反应中心 (经过充分暗适应以后) 处于完全开放状态时的初始荧光产量。

F_m: **最大荧光产量** (Maximal fluorescence yield), 是PSII反应中心完全关闭时的荧光产量。通常叶片经暗适应20min后测得。

F_v/F_m: 暗适应下PSII反应中心完全开放时的最大光化学效率, 反映**PSII反应中心潜在最大光能转换效率**。
一般在0.75-0.85之间, 分析植物是否受胁迫



主要荧光参数及其意义——光适应

F_o' : 光适应下初始荧光。

F_m' : 光适应下最大荧光。

F_v'/F_m' : 光适应下PSII最大光化学效率，它反映有热耗散存在时PSII反应中心完全开放时的光化学效率。

F_t (或 F_s): 稳态荧光产量

$\phi_{PSII}=(F_m'-F_s)/F_m'$: PSII实际光化学效率，它反映在照光下PSII反应中心部分关闭的情况下的实际光化学效率。



荧光淬灭参数及其意义——暗适应、光适应

$qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$: 光化学淬灭系数, 它反映了PSII反应中心的开放程度。

1- qP : 用来表示PSII反应中心的关闭程度。

$qN = (F_m - F_m') / (F_m - F_o')$: 非光化学淬灭系数

$NPQ = (F_m - F'm) / F'm = F_m / F_m' - 1$: 非光化学淬灭

$ETR = \phi_{PSII} \times \text{absorbed PFD} \times 0.5$: PSII电子传递速率



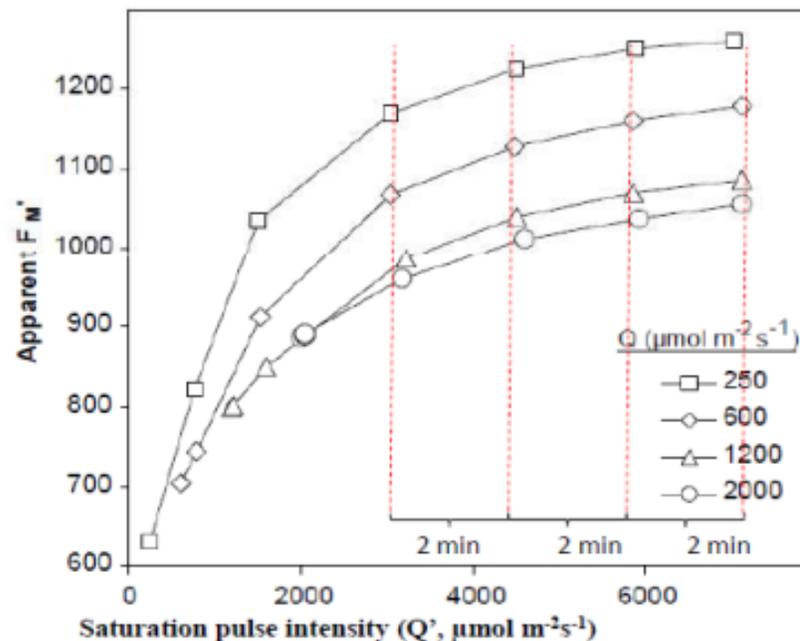
叶绿素a荧光的测定

饱和脉冲光真的能实现饱和吗？

准确测定 F_m' 的探索：

Apparent maximum
fluorescence yield ($^A F_m'$)

only approaches saturation

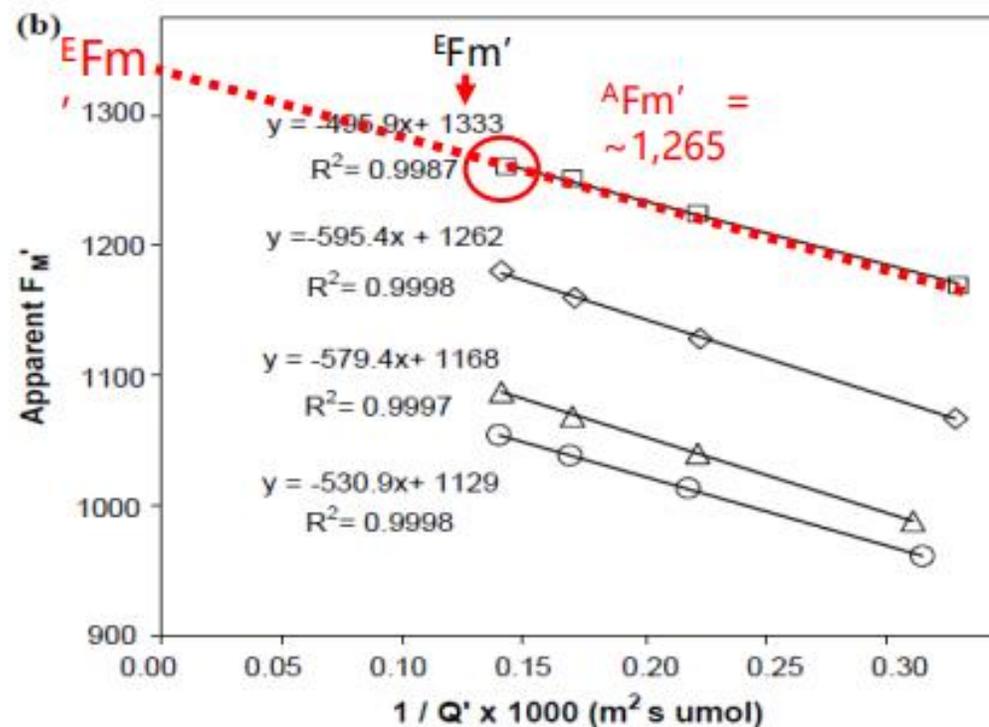


Earl, H. and Ennahli, S. Photosynthesis Research, 2004



叶绿素a荧光的测定

如何获取
最接近真实的Fm': $E_{Fm'}$



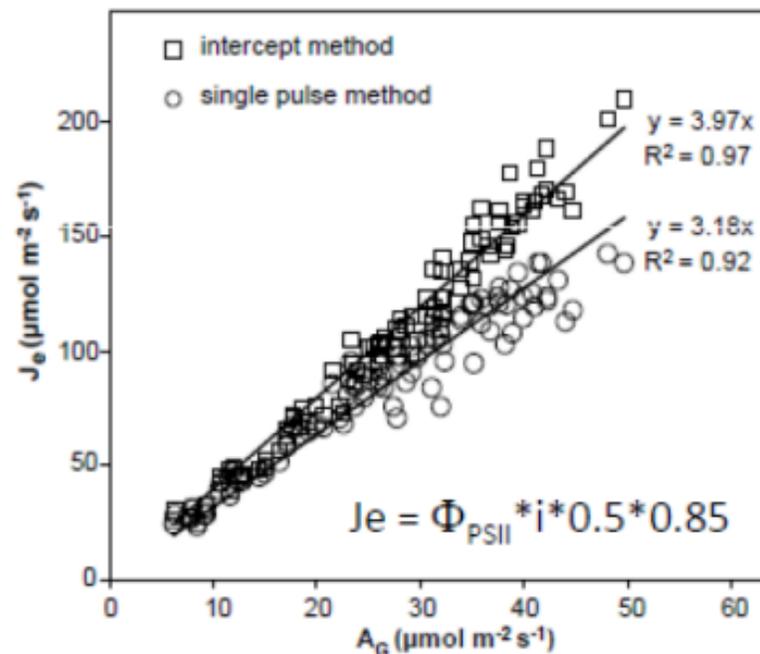
Earl, H. and Ennahli, S. Photosynthesis Research, 2004



叶绿素a荧光的测定

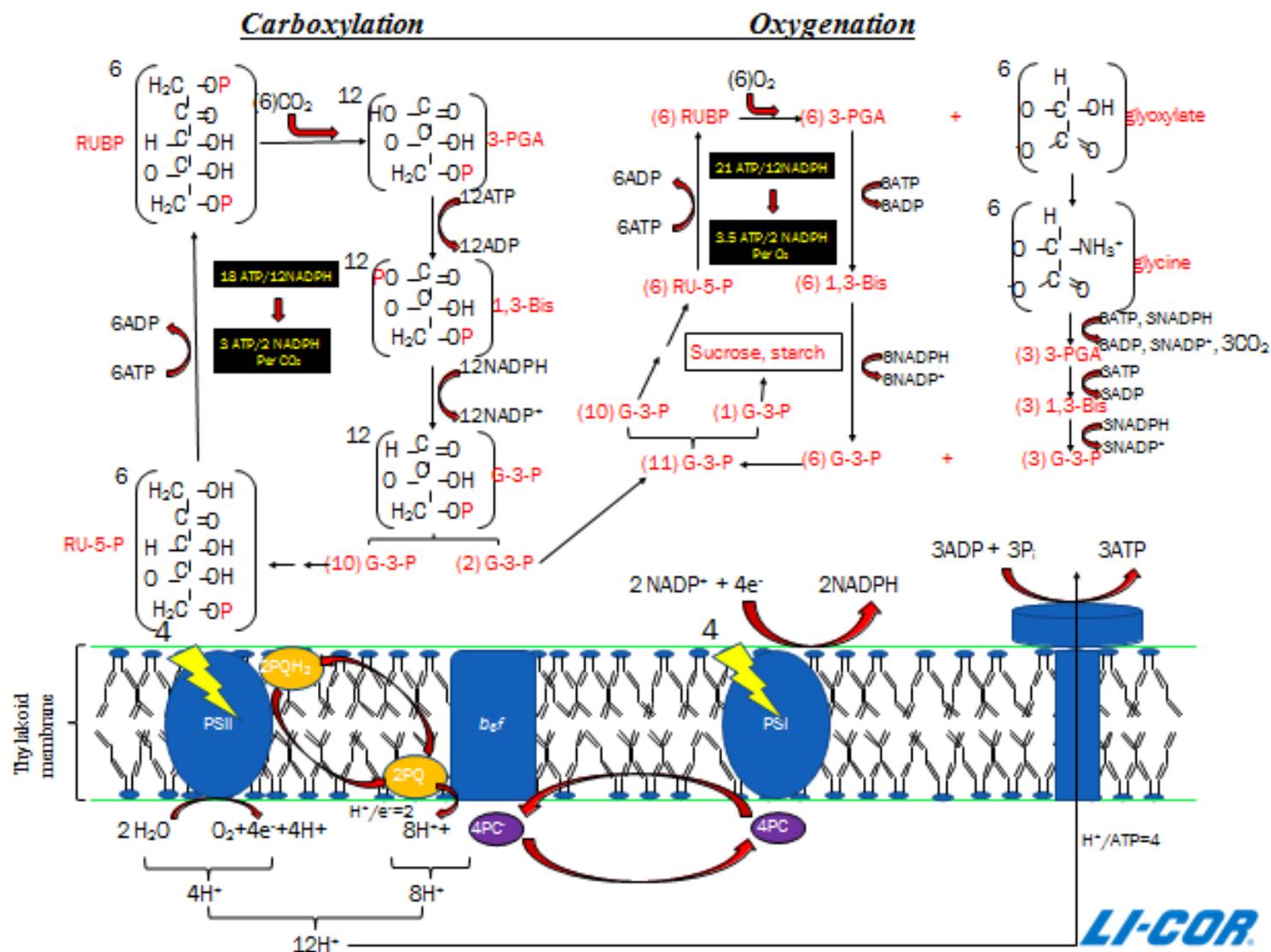
如何验证 $E_{Fm'}$ 优于 $A_{Fm'}$

基于光合基本原理



Earl, H. and Ennahli, S. Photosynthesis Research, 2004

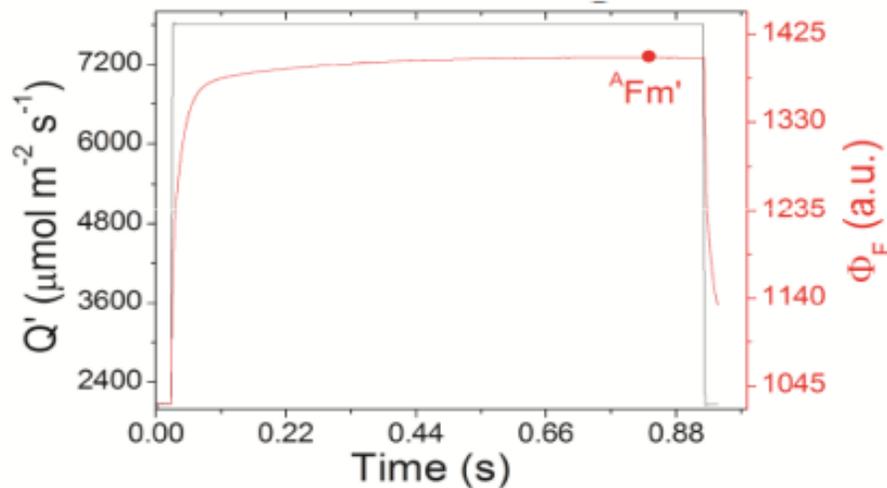
光合基本原理



叶绿素a荧光的测定

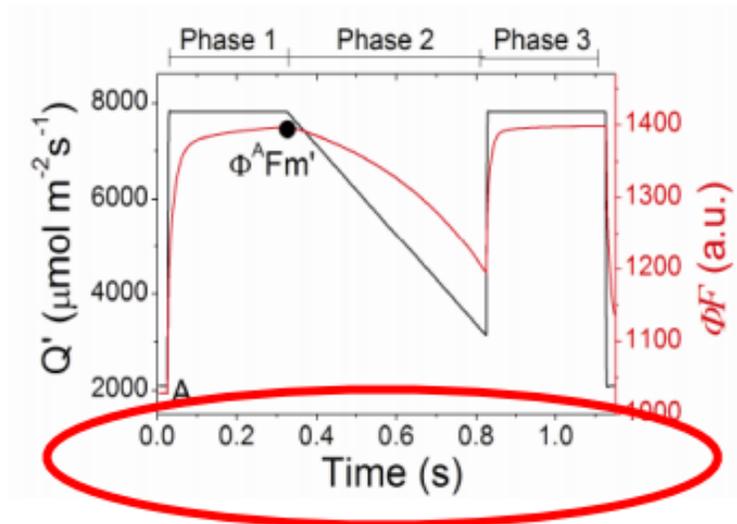
Multiphase Flash™ Fluorescence (MPF) ——LI-COR多相闪光技术

传统荧光设计



饱和闪光——矩形闪光(Rectangular Flash)

MPF

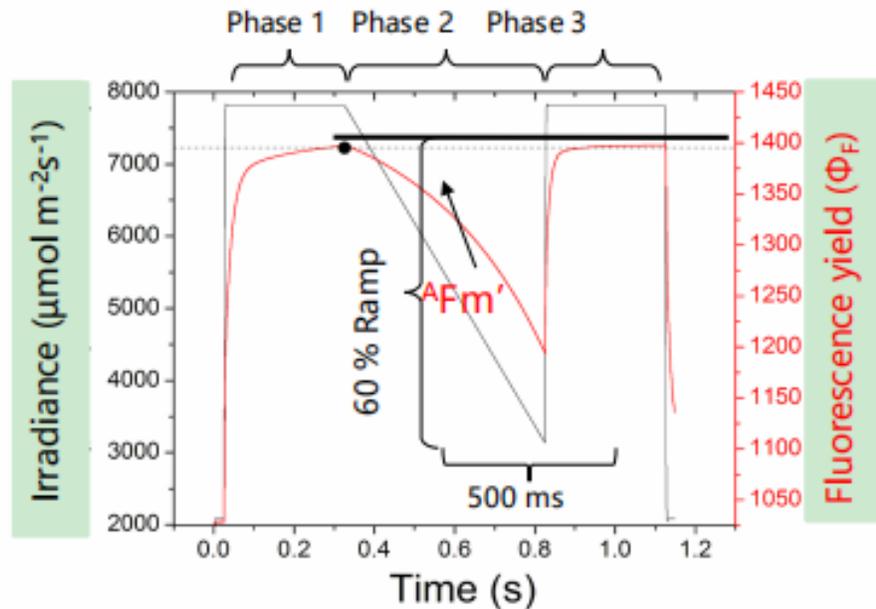


饱和闪光——多相闪光(Multiphase Flash)

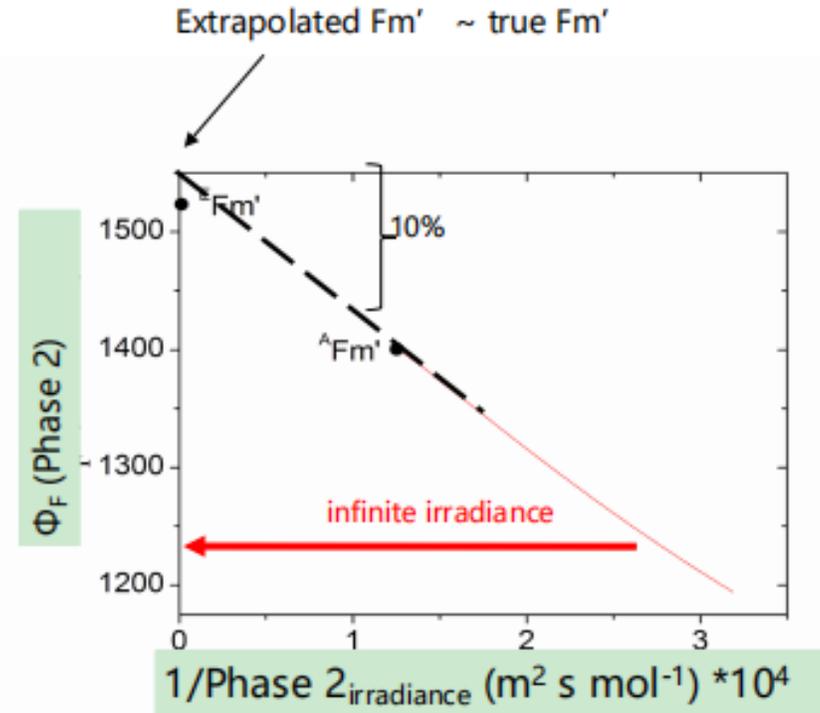


叶绿素a荧光的测定

Used to measure F_m' at infinite irradiance

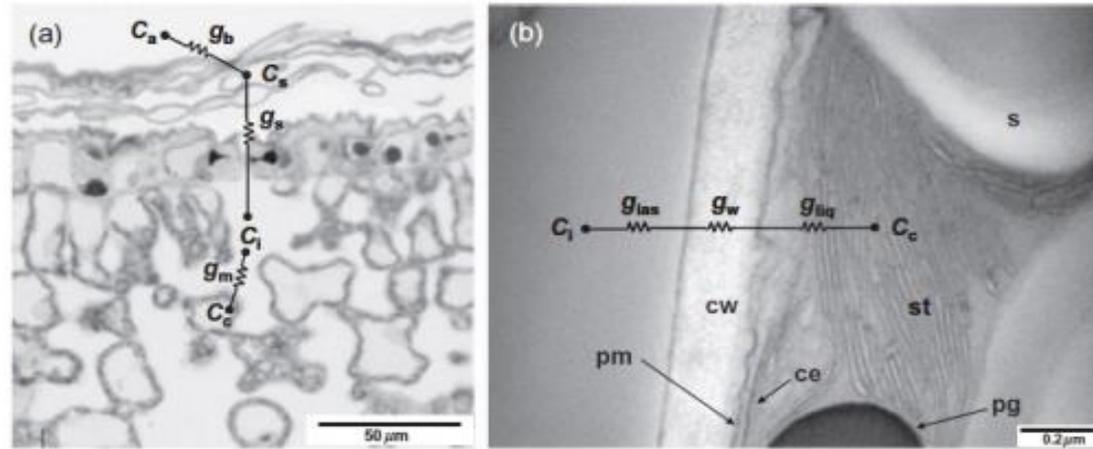


Ramp rate = $\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-2}$



叶绿素a荧光的测定

E_{Fm}' used to calculate mesophyll conductance to CO_2

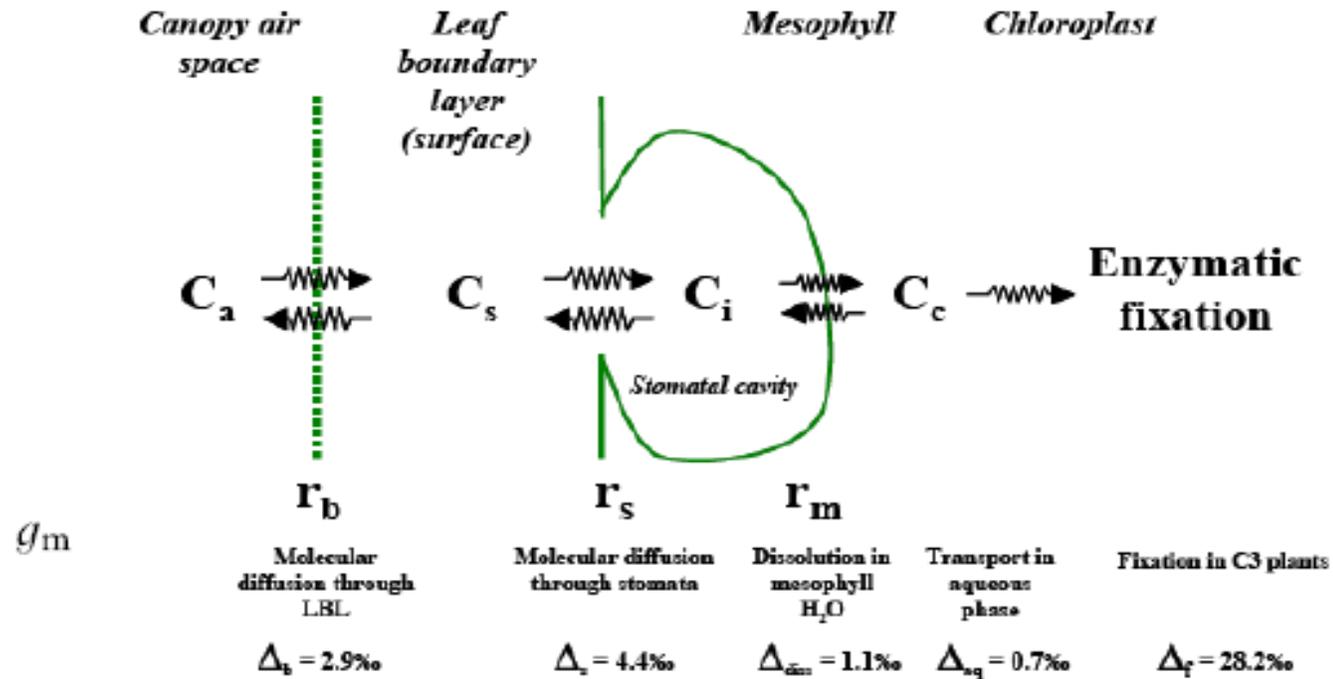


Flexas, J. et al. *Plant, Cell, and Environment* 2008

$$g_m = \frac{A}{C_i - \frac{\Gamma^*(J + 8(A + R_d))}{J - 4(A + R_d)}}$$

'J' corresponds to an estimate of electron transfer obtained by chlorophyll fluorescence

Cc值



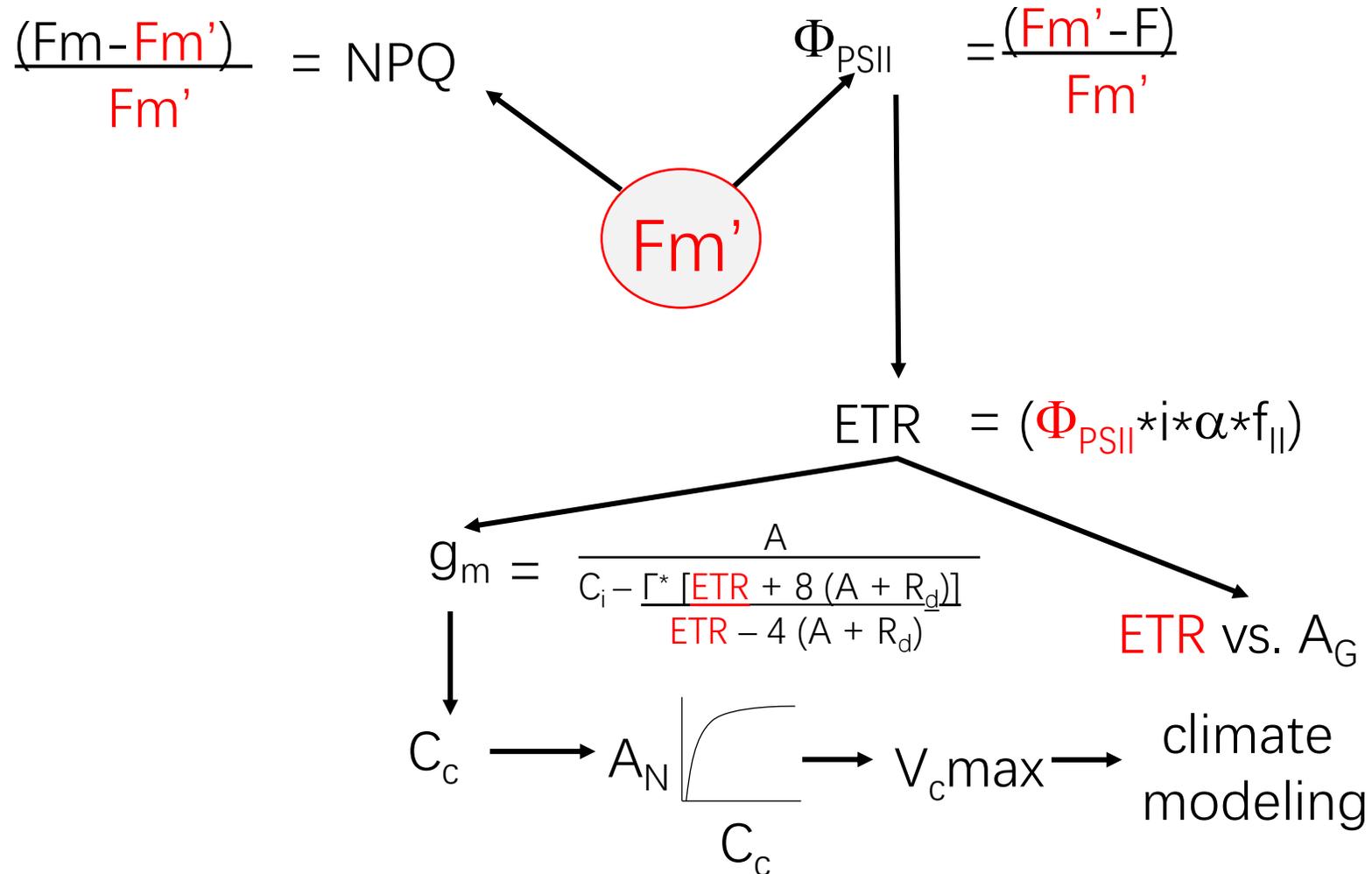
$$C_c = C_i - A/g_m$$

g_m = mesophyll conductance

C_c = [CO₂] at site of carboxylation



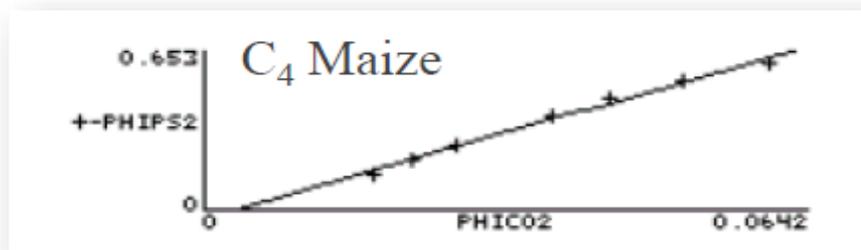
叶绿素a荧光参数





光合效率 (荧光光响应曲线)

Φ_{PSII} vs. Φ_{CO2}



$$\Phi_{PSII} = \frac{Fm' - Fs}{Fm'}$$

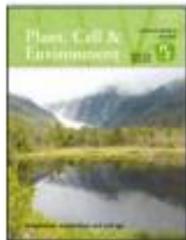
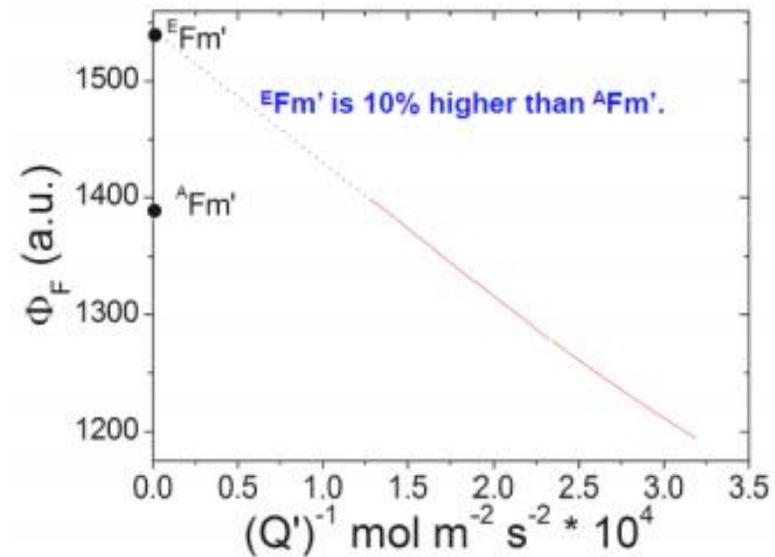
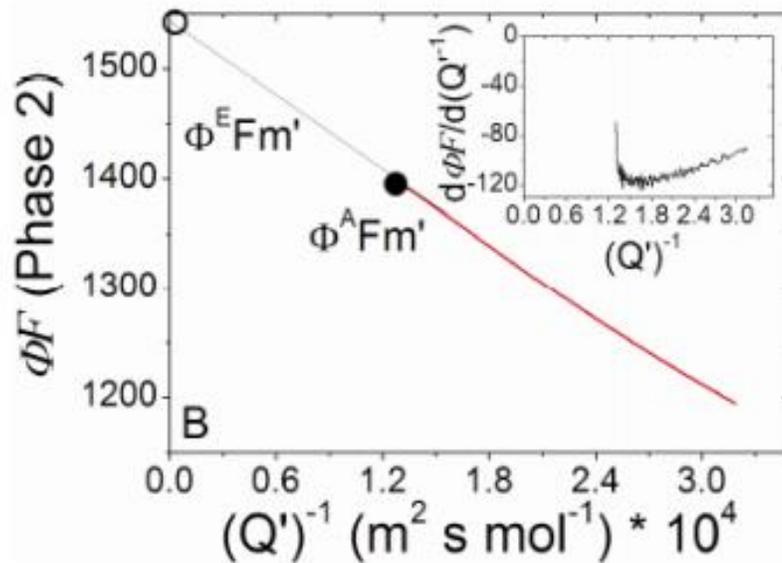
$$\Phi_{CO2} = \frac{A - A_{dark}}{I\alpha_{leaf}}$$

$$\Phi_{PSII} / \Phi_{CO2} = \text{mol } e^- / \text{mol } CO_2 \text{ fixed}$$

- Theoretical minimum quantum requirement for non-cyclic electron flow per CO₂ fixed: 8 (C₃), 12 (C₄)
- Depends on proportion of products of electron transport used for C assimilation relative to other processes (photorespiration, N₂ & S₂ metabolism)

叶绿素a荧光的测定

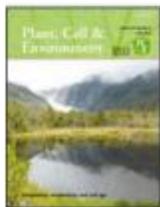
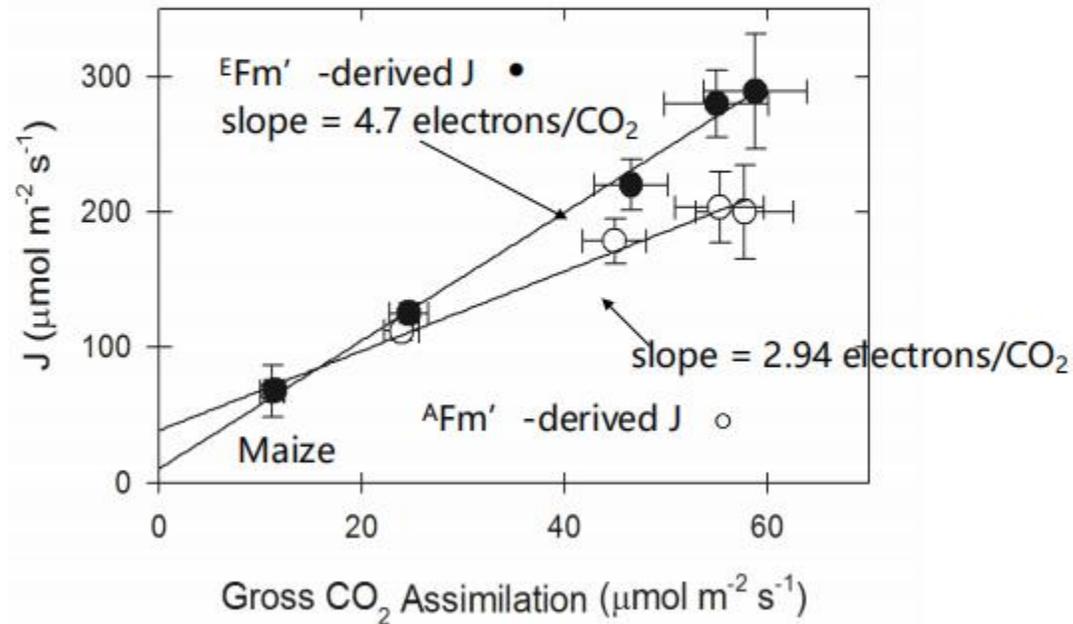
Multiphase Flash™ Fluorescence (MPF) ——LI-COR多相闪光技术



Loriaux S.D., Avenson T.J., Welles J.M., etc. *plant, cell & Environment*, 2013

叶绿素a荧光的测定

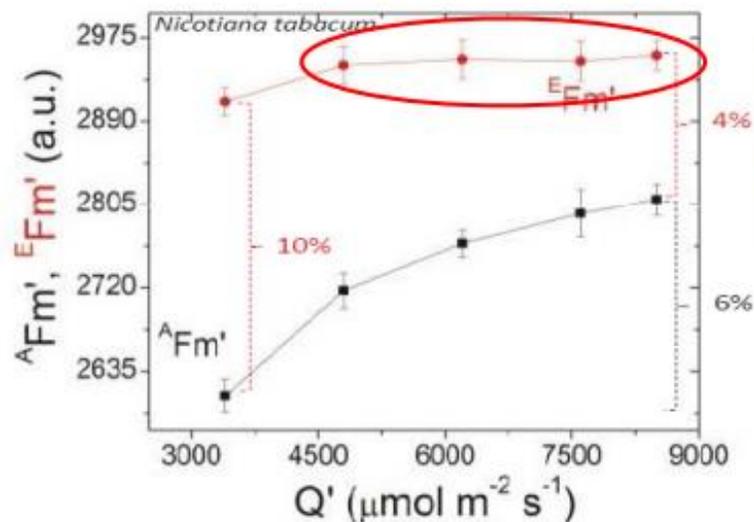
$E_{Fm'}$ results in accurate predictions of J and CO_2 assimilation coupling



Loriaux S.D., Avenson T.J., Welles J.M., etc. *plant, cell & Environment*, 2013

叶绿素a荧光的测定

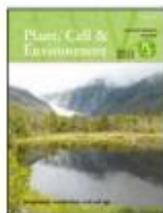
叶绿素a荧光的测定——MPF



NEW Accurate F_m' with the new Multiphase Flash™ Fluorometer

Is your F_m' accurate? An innovative technique called Multiphase Flash™ Fluorescence estimates F_m' more accurately than traditional methodology.

[Learn More](#)



Loriaux S.D., Avenson T.J., Welles J.M., etc. *plant, cell & Environment*, 2013



叶绿素a荧光的测定

Accurately estimate maximum
fluorescence yield using Multiphase
Flash™ Fluorescence methodology



Loriaux, S. D., T. J. Avenson, J. M. Welles, D. K. McDermitt, R. D. Eckles, B. Riensche
and B. Genty. 2013. *Closing in on maximum yield of chlorophyll fluorescence
using a single multiphase flash of sub-saturating intensity*. Plant, Cell &
Environment. doi: 10.1111/pce.12115

感谢各位老师的聆听

Thank you for listening



- 北京力高泰科技有限公司 电话： 010-64093960
- 传真： 010-66001652 邮编： 100035
- 电子邮件： info@ecotek.com.cn
- 地址： 北京市西城区西直门南大街2号成铭大厦A座22F