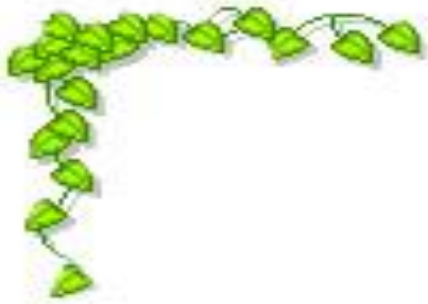


敬请关注我公司微信，输入关键词“光合仪”，
则6400的所有“手把手教您学会光合仪”的系列
资料及注意事项即可瞬间进驻您的手机，方便您
随时学习参考.....



基因有限公司 农业环境科学部
北京力高泰科技有限公司



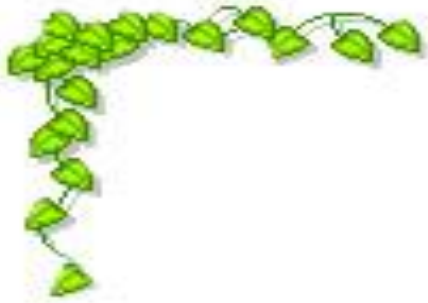


6400-40荧光叶室讲解

北京力高泰科技有限公司

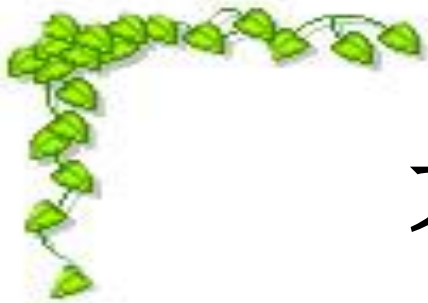
基因有限公司 农业环境科学部



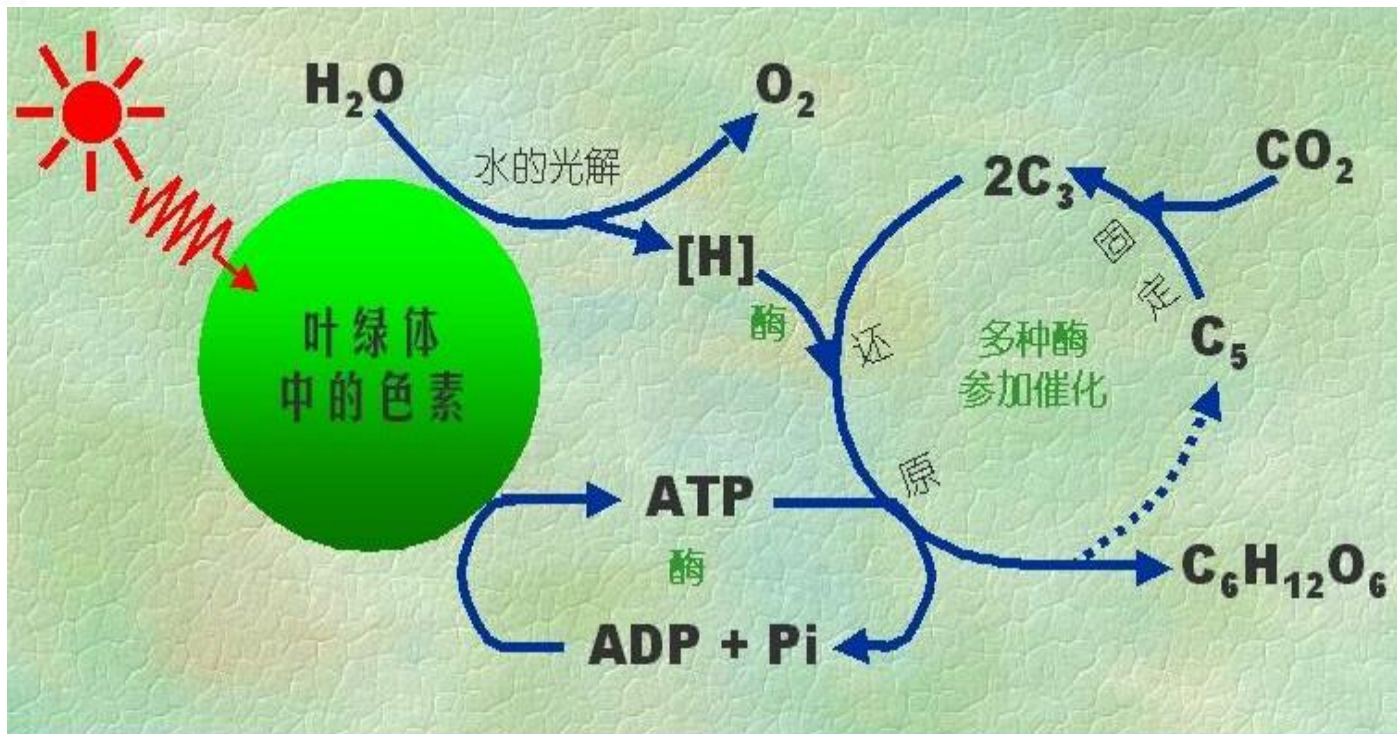


光合作用原理简介





光合作用过程



光反应

- ① 水的光解
- ② ATP的形成

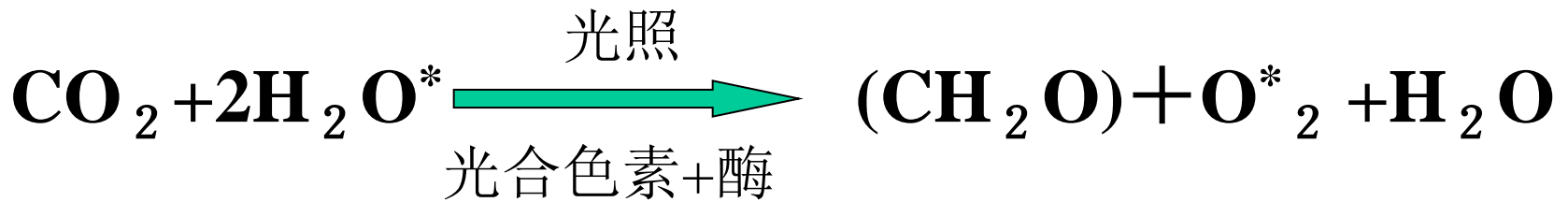
暗反应

- ① CO_2 的固定
- ② CO_2 的还原





光合作用基本原理

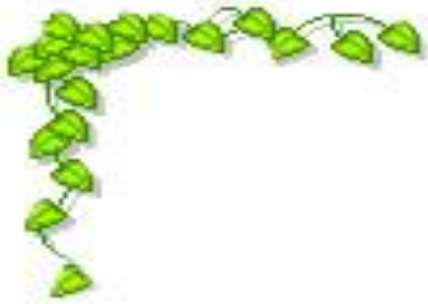


光合作用可分为光反应和碳反应（或暗反应）两个阶段。

光合作用的光反应在**囊状体片层**进行，暗反应在**基质**进行。

光合作用的突出特点是： H_2O 被氧化到 O_2 的水平； CO_2 被还原到糖的水平；氧化还原反应所需的能量来自光能，即发生光能的吸收、转换与贮存。



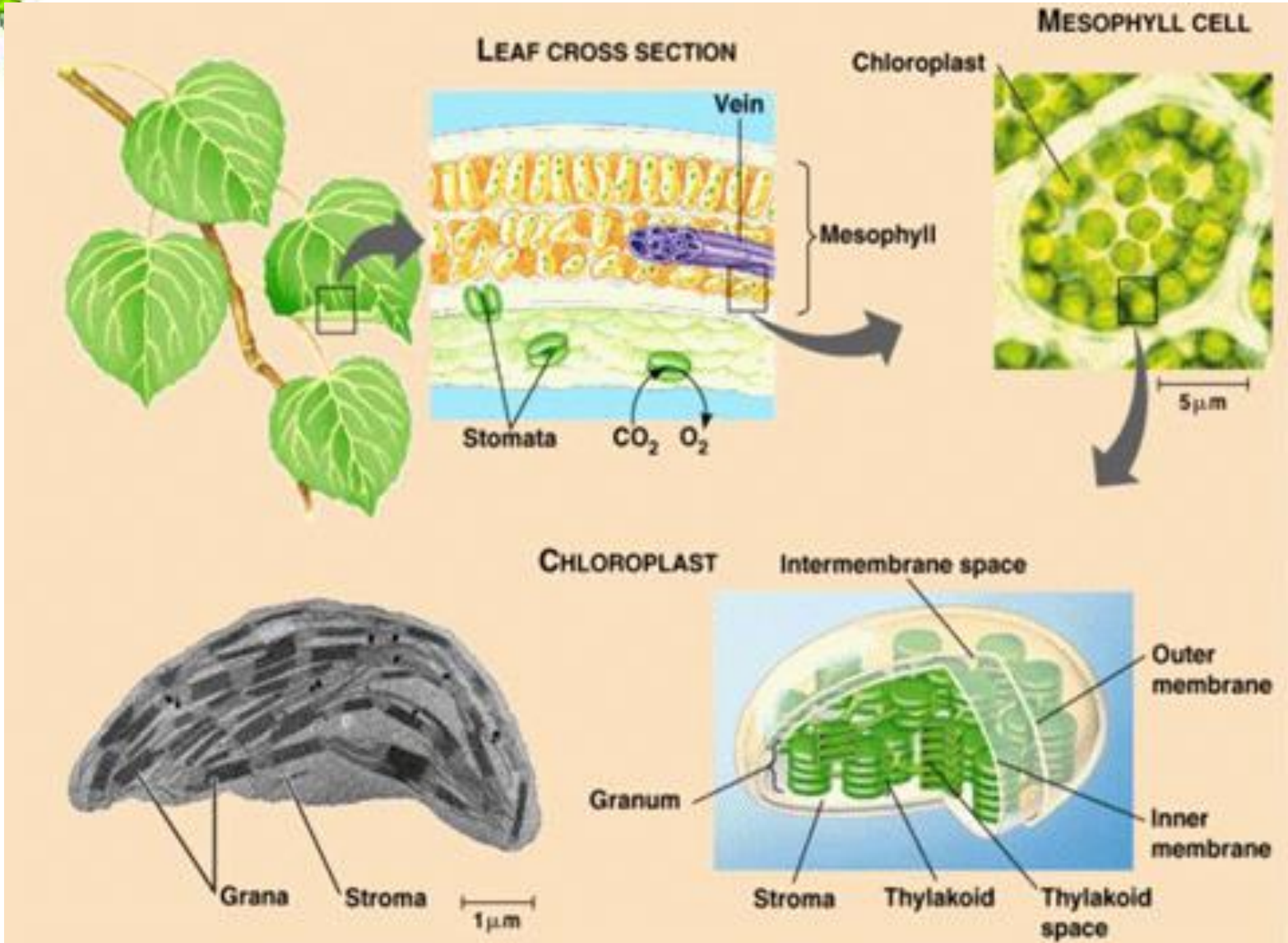


光反应过程

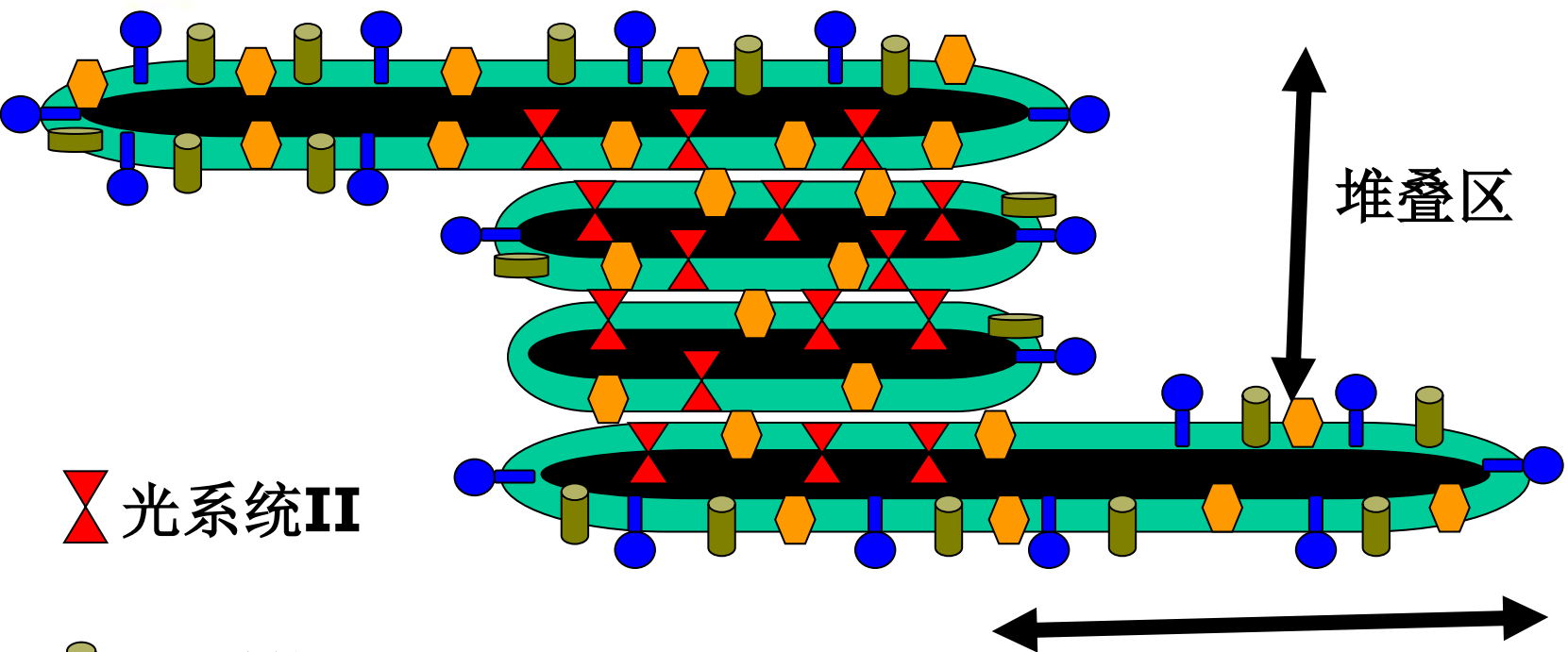
- 光反应是一个复杂的过程，包括原初反应、电子传递和光合磷酸化。
- 光反应为整个光合作用提供能量



叶绿体结构



• 叶绿体结构之类囊体二 encephaloid



▲ 光系统II

■ 光系统I

● ATP合成酶

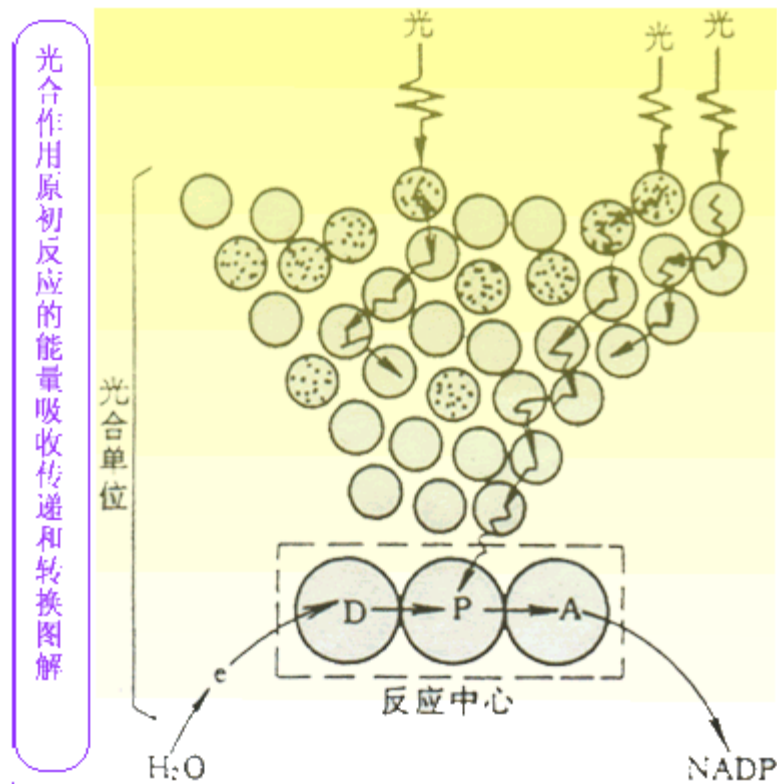
◆ 细胞色素Cytb6/f



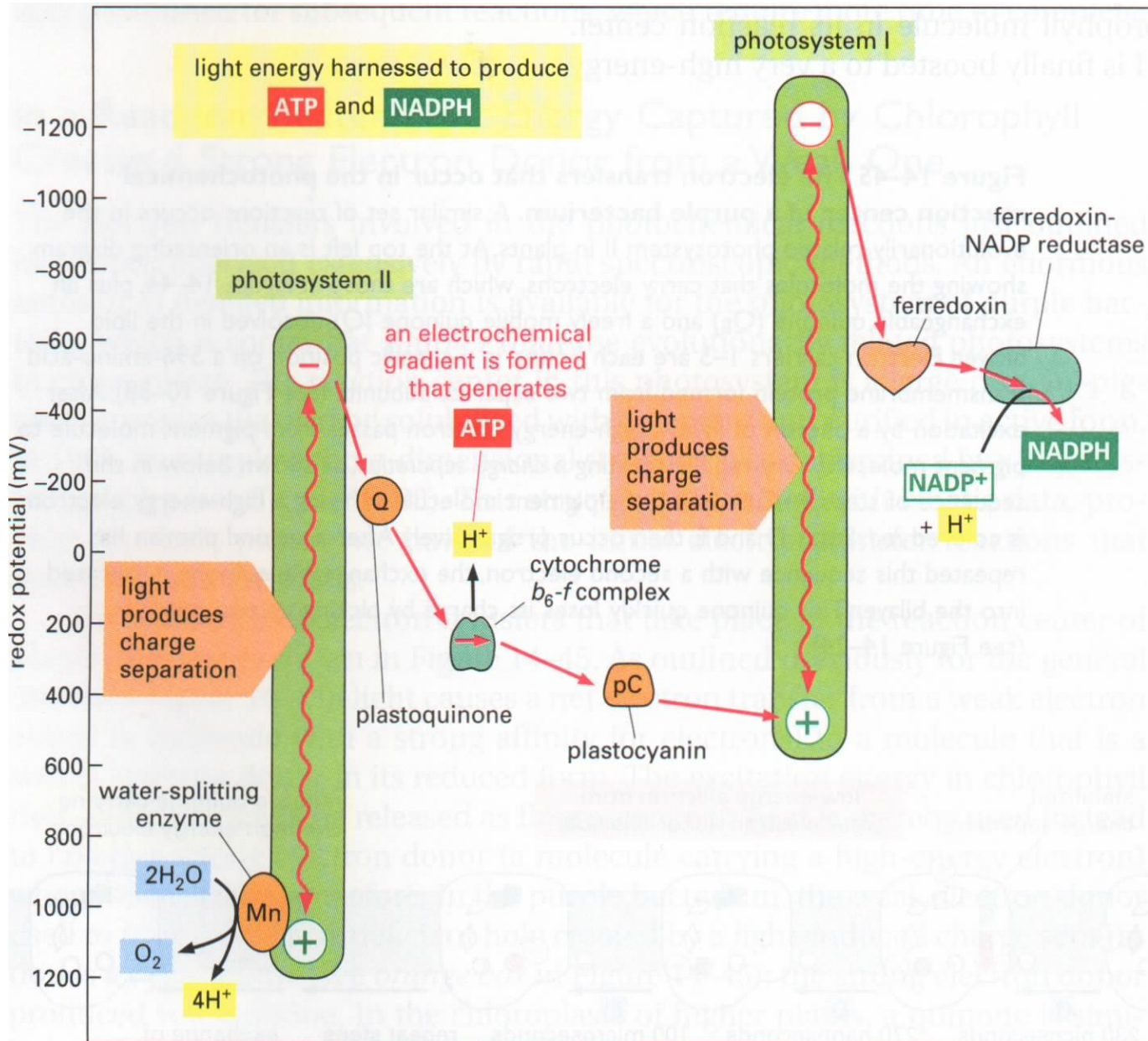


原初反应

光能被捕光色素分子吸收、传递至反应中心、光化学反应、电荷分离（光能转变为电能）。



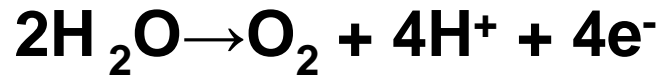
电子传递






电子传递

P680接受能量后，由基态变为激发态（**P680***），然后将电子传递给去镁叶绿素（原初电子受体），**P680***带正电荷，从原初电子供体**Z**得到电子而还原；**Z⁺**再从放氧复合体上获取电子；氧化态的放氧复合体从水中获取电子，使水光解。



同时去镁叶绿素将电子传给**D₂**上结合的**Q_A**，**Q_A**又迅速将电子传给**D₁**上的**Q_B**，还原型的质体醌从光系统II复合体上游离下来，另一个氧化态的质体醌占据其位置形成新的**Q_B**。质体醌将电子传给细胞色素**b₆/f**复合体，同时将质子由基质转移到类囊体腔。电子接着传递给位于类囊体腔一侧的含铜蛋白质体蓝素(plastocyanin, **PC**)中的**Cu²⁺**，再将电子传递到光系统I。



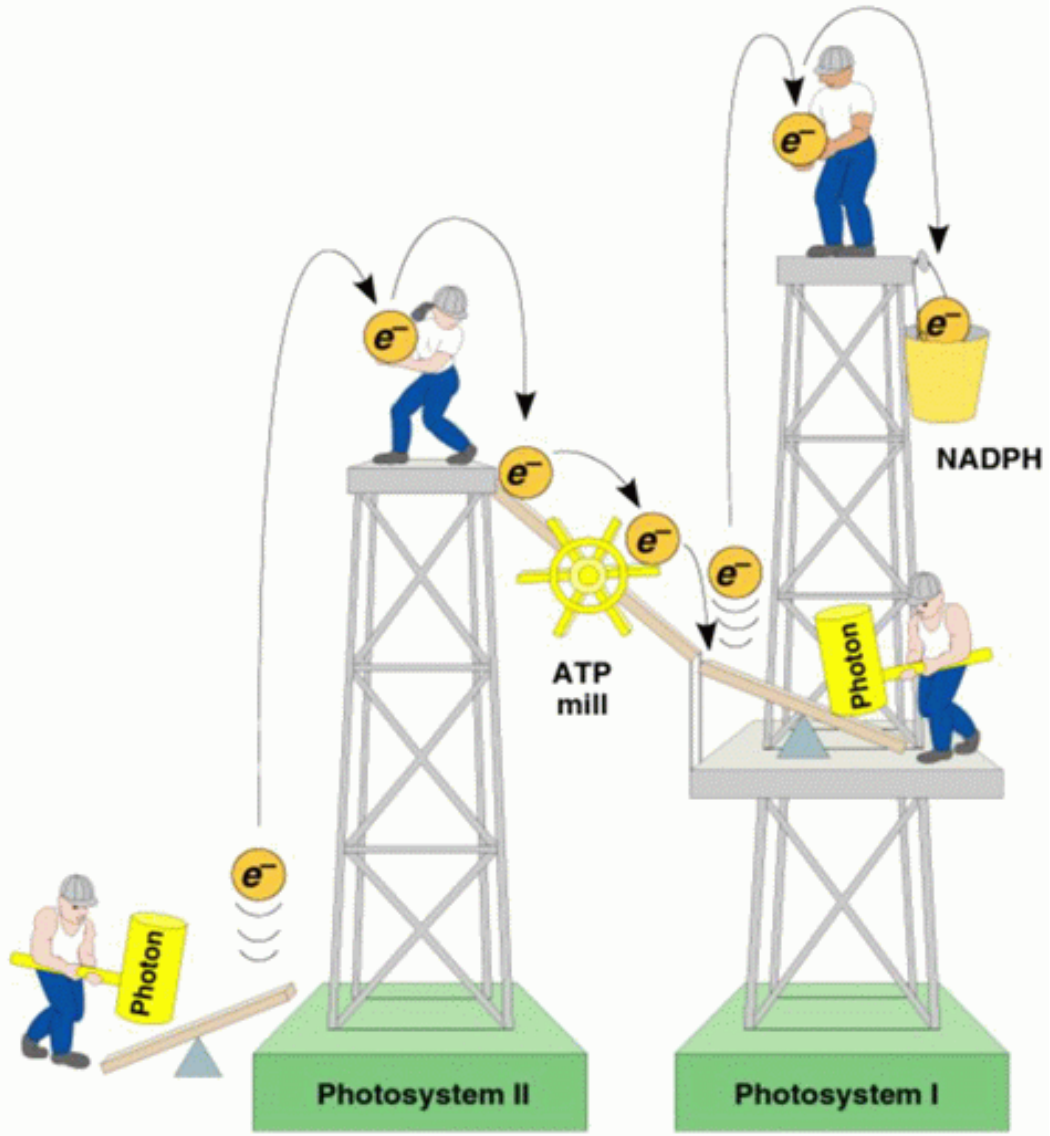


电子传递

P700被光能激发后释放出来的高能电子沿着**A0**→**A1**→**4Fe-4S**的方向依次传递，由类囊体腔一侧传向类囊体基质一侧的铁氧还蛋白（**ferredoxin, FD**）。最后在铁氧还蛋白-**NADP**还原酶的作用下，将电子传给**NADP⁺**，形成**NADPH**。失去电子的**P700**从**PC**处获取电子而还原。

以上电子呈**Z**形传递的过程称为非循环式光合磷酸化，当植物在缺乏**NADP⁺**时，电子在光系统内**I**流动，只合成**ATP**，不产生**NADPH**，称为循环式光合磷酸化。





两个光系统的协同作用





光合磷酸化（循环式和非循环式两种）

一对电子从**P680**经**P700**传至**NADP⁺**，在类囊体腔中增加**4个H⁺**，**2个**来源于**H₂O**光解，**2个**由**PQ**从基质转移而来，在基质外一个**H⁺**又被用于还原**NADP⁺**，所以类囊体腔内有较高的**H⁺**（**pH≈5**，基质**pH≈8**），形成质子动力势，**H⁺**经**ATP合成酶**，渗入基质、推动**ADP**和**Pi**结合形成**ATP**。

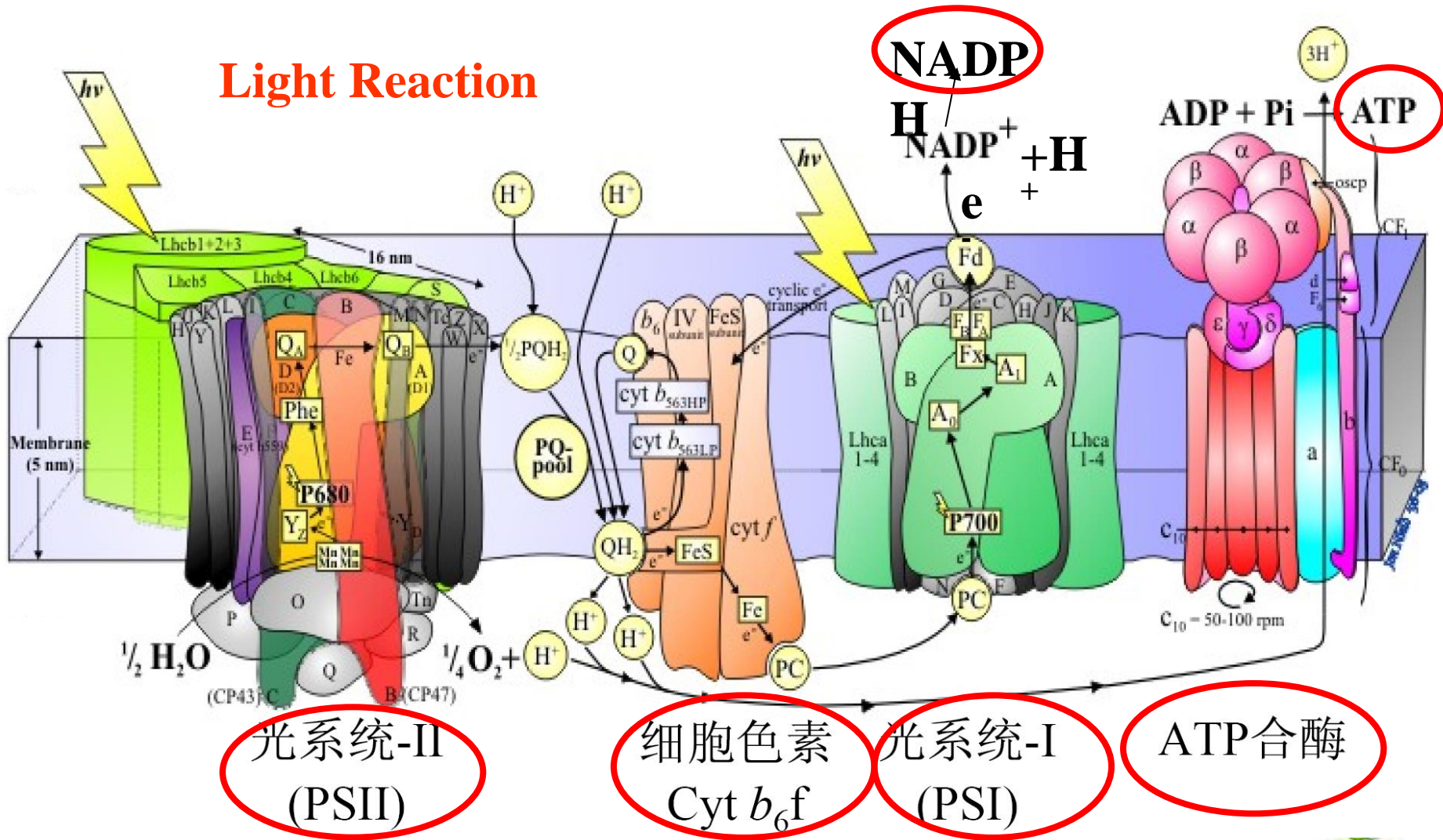
机制：**ATP合成酶**，即**CF₁-F₀**偶联因子，结构类似于线粒体**ATP合成酶**。**CF₁**同样由**5种**亚基组成**α₃β₃γδε**的结构。**CF₀**嵌在膜中，由**4种**亚基构成，是质子通过类囊体膜的通道。

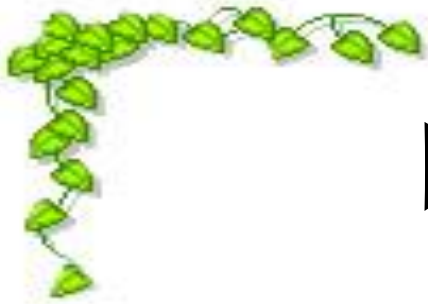




光能 \longrightarrow 电能 \longrightarrow ATP+NADPH

Light Reaction



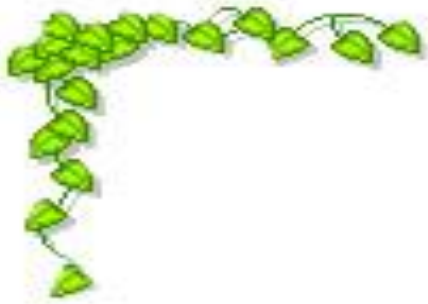


暗/碳反应过程

——卡尔文循环

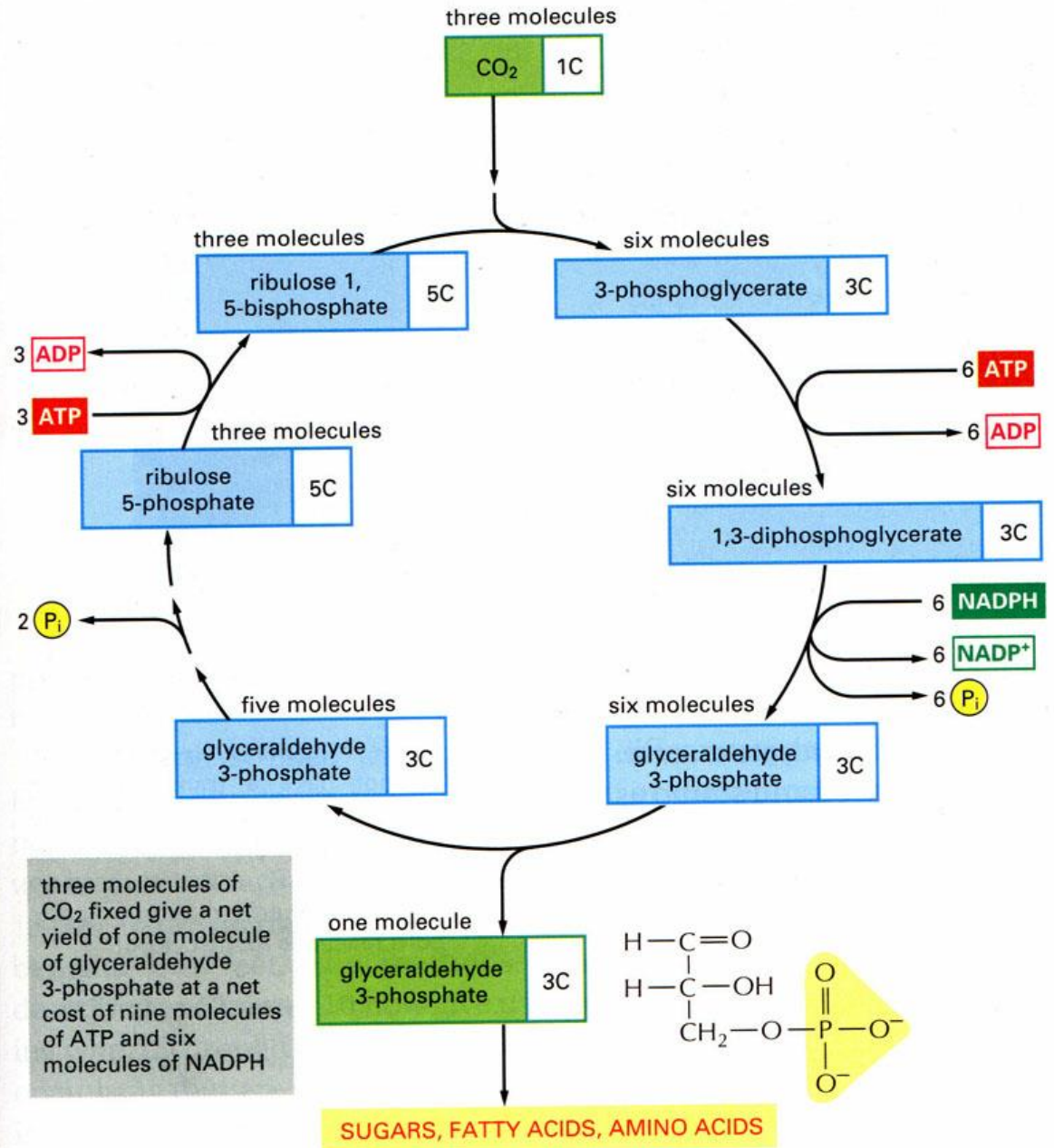
- 暗反应主要是碳循环。
- 空气中的 CO_2 与1,5-二磷酸核酮糖RuBP反应, 给出两个分子的3-磷酸甘油酸。在产生葡萄糖与再生1,5-二磷酸核酮糖的反应(用来吸收更多大气中的二氧化碳)中, 3-磷酸甘油酸被转化为其他糖类。而实现这些反应所需要的能量是由光反应产生的NADPH和ATP所提供的。

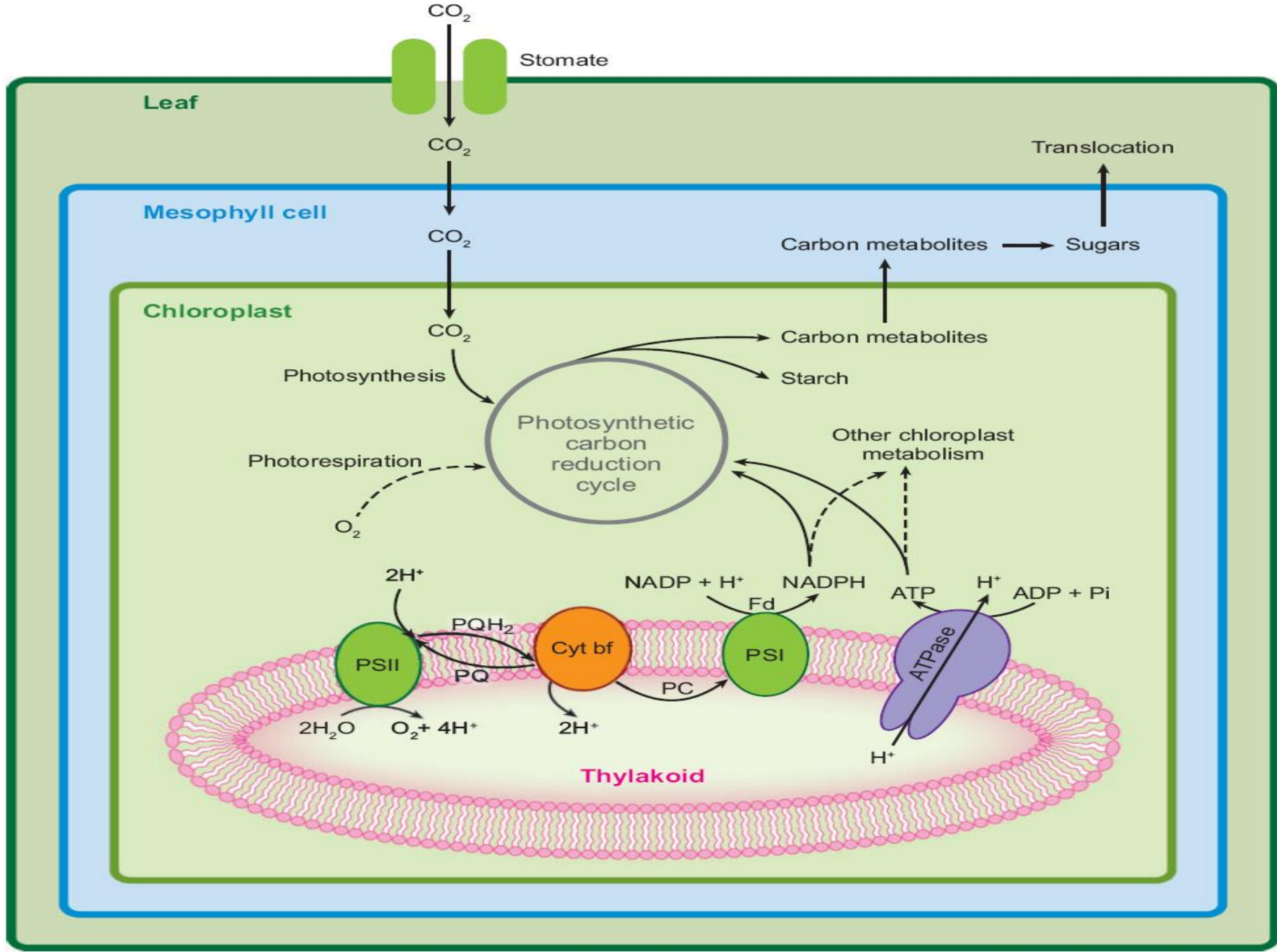


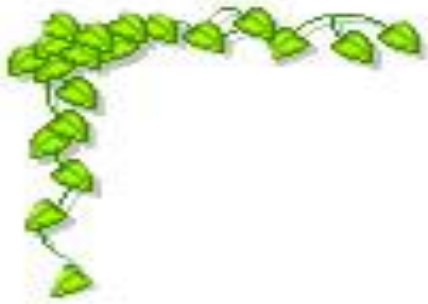


暗/碳反应 过程

——卡尔文循环







一. 什么是叶绿素荧光?





叶绿素荧光现象

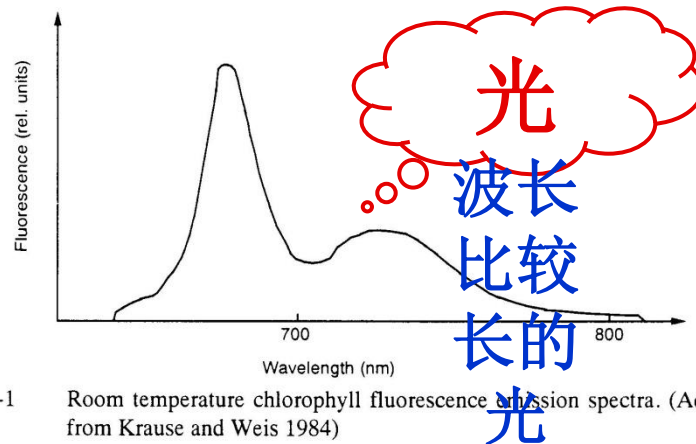


Fig. 1-1 Room temperature chlorophyll fluorescence emission spectra. (Adapted from Krause and Weis 1984)



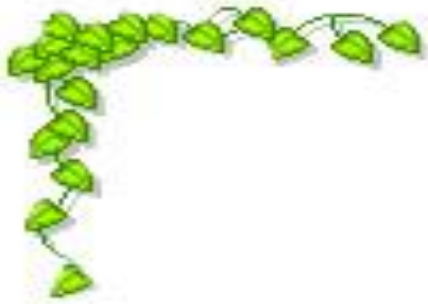
反射光下
呈绿色



入射光下
呈暗红色

在生理温度下，叶绿素荧光的波长峰值大约为**685nm**的红光，并且一直延伸到**800nm**的远红光处。

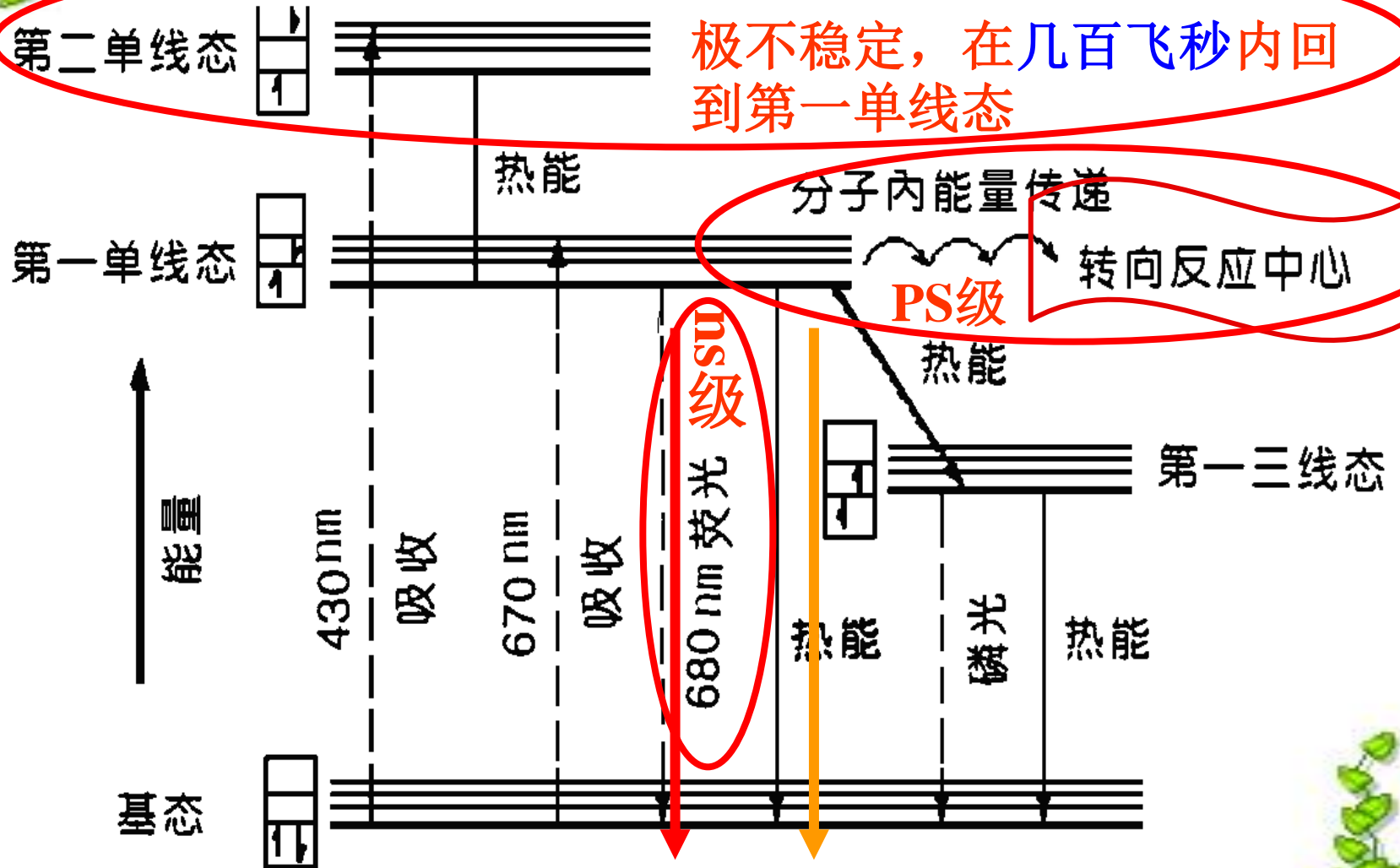


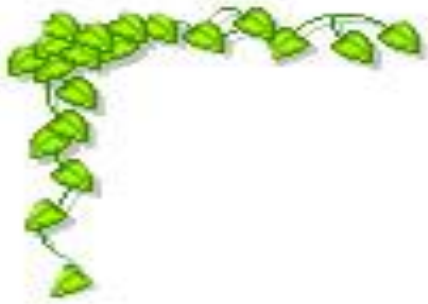


二. 为什么会产生荧光?



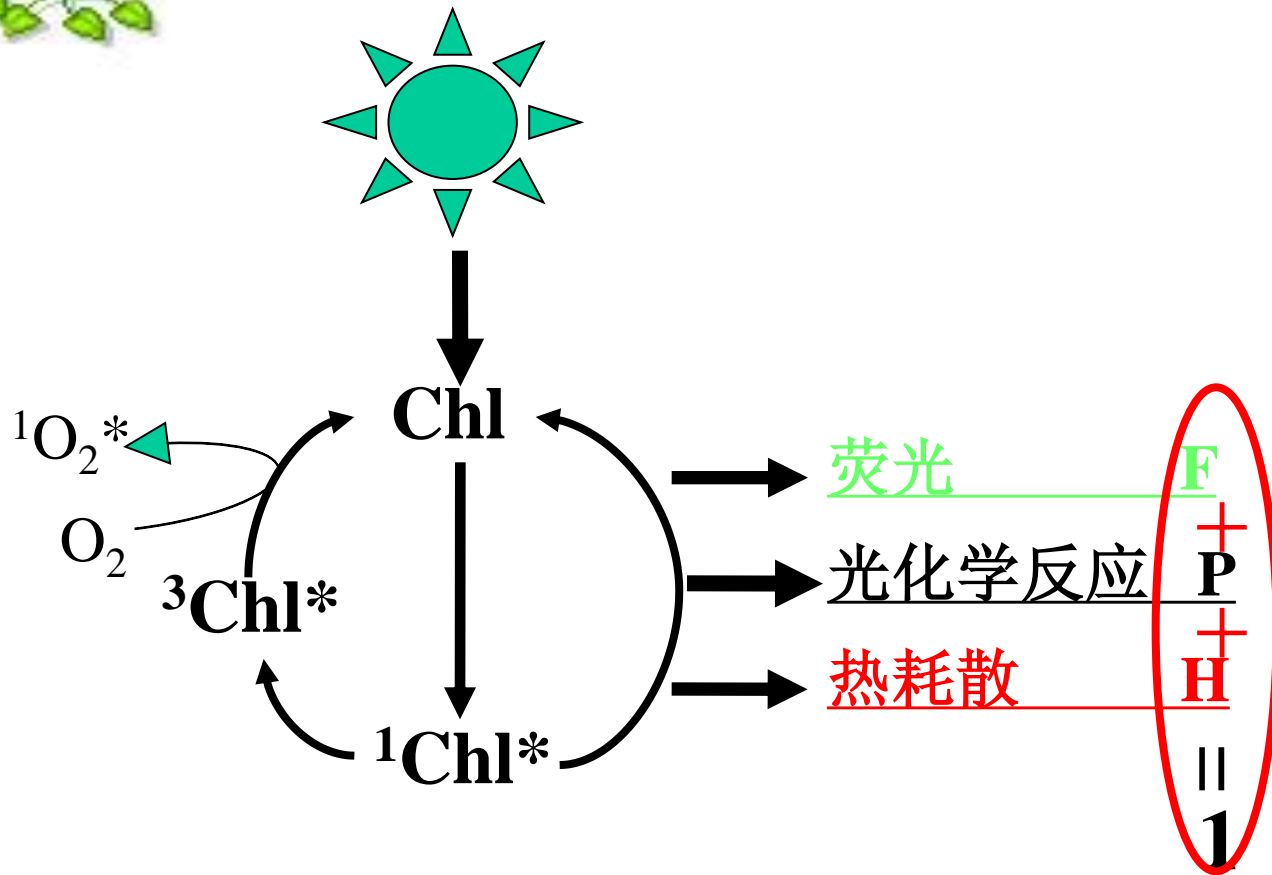
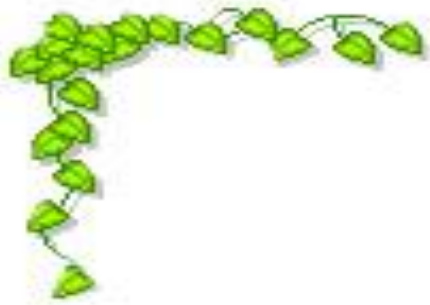
Chla荧光的产生？





三. 荧光分析技术的理论基础?





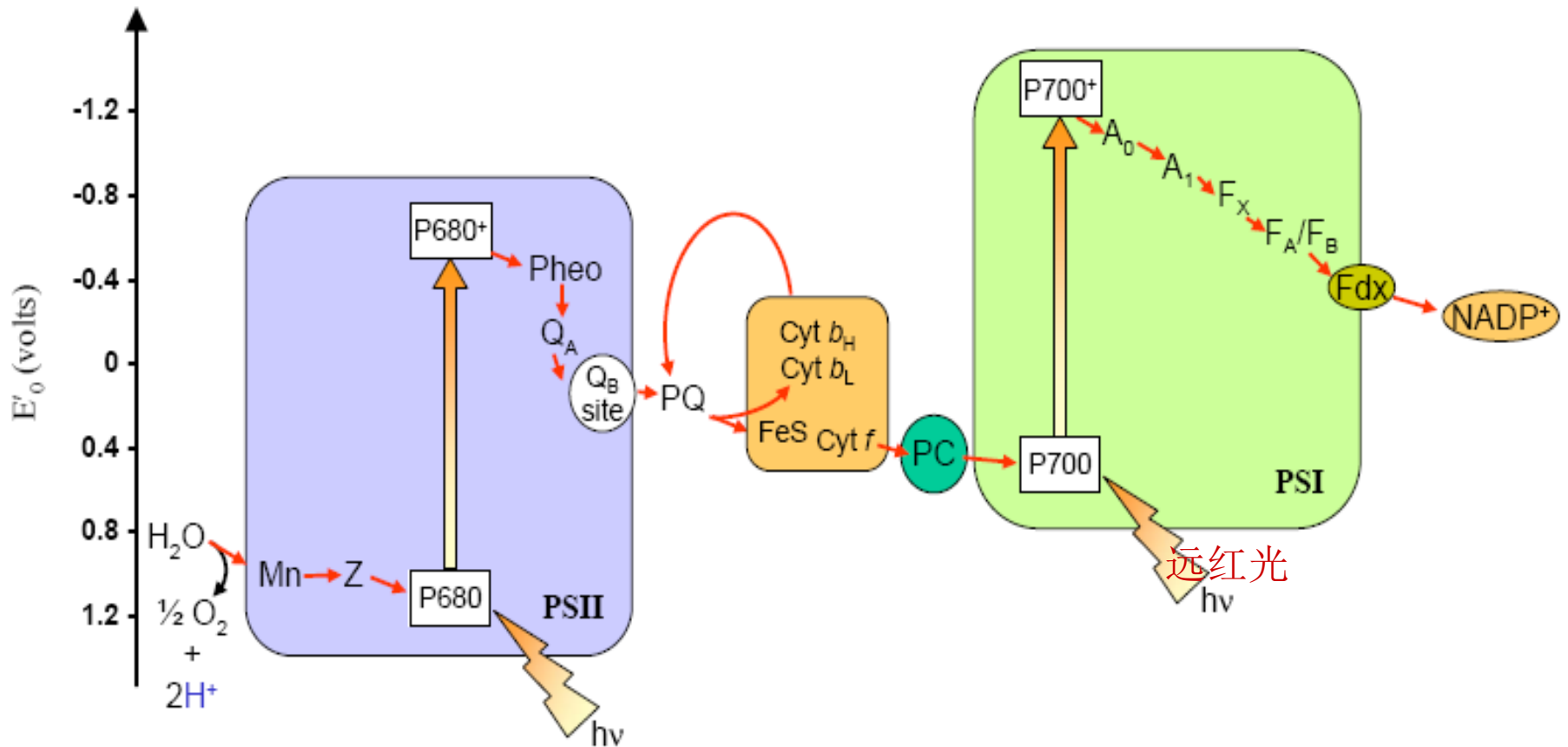
光合机构吸收的光能有三种可能的去向：

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。





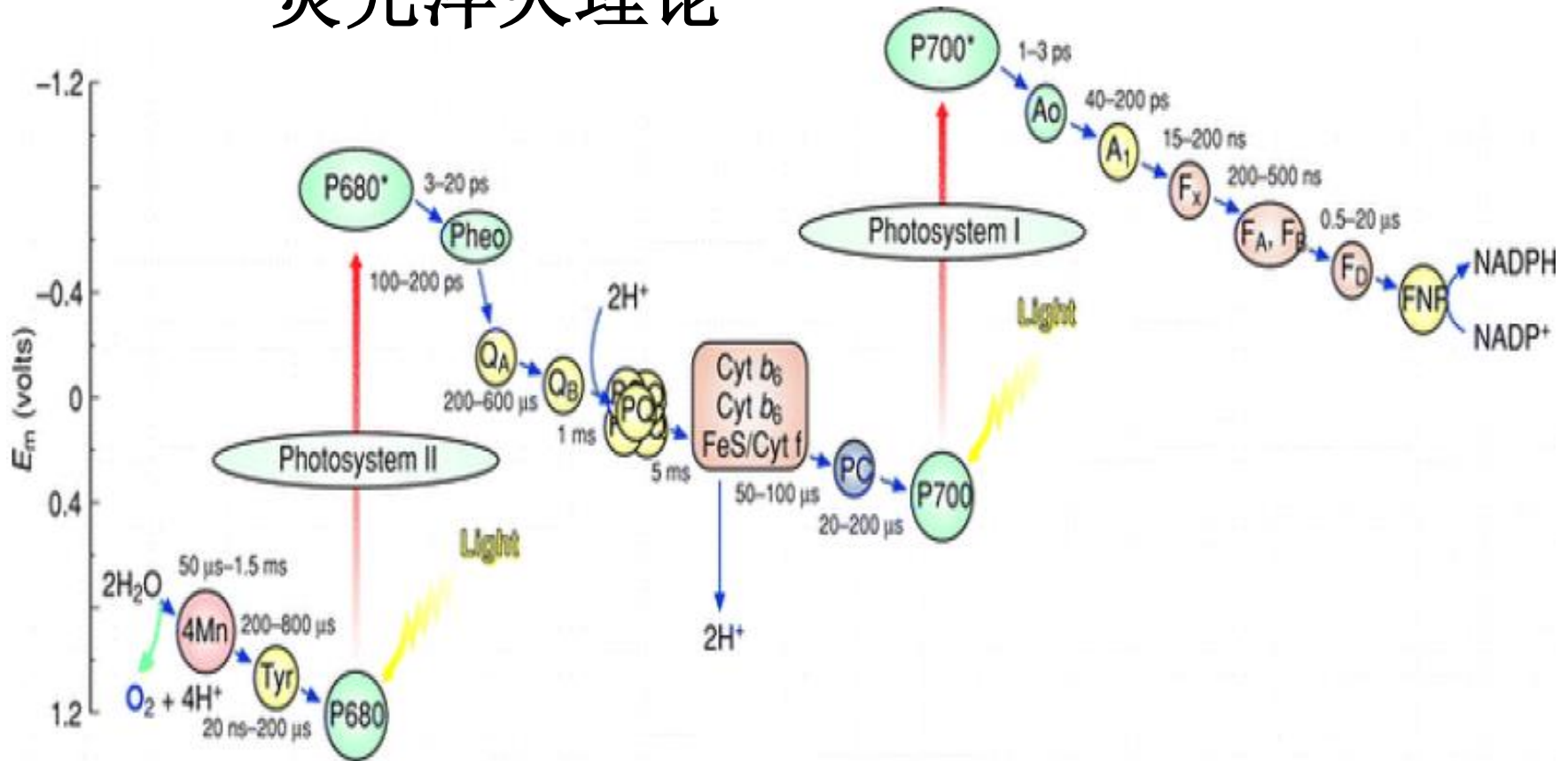
光合电子传递链 (Z链)





光合电子传递链 (Z链)

荧光淬灭理论



秒s, 毫秒ms, 微秒us, 纳秒ns, 皮秒ps

Taken from: Photosystem II
John Whitmarsh and Govindjee
Encyclopedia of Life Sciences / www.els.net
2001

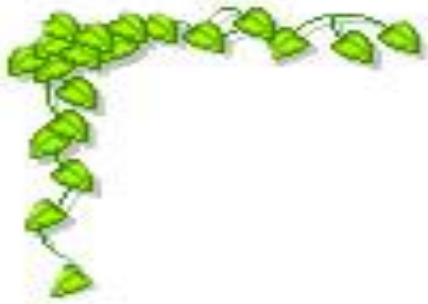


开放的反应中心和关闭的反应中心

“关闭” **RC**: 当反应中心的电子受体质体醌 (Q_A) 接受电子, 全部处于还原状态时, 不能再接受电子, 我们称之为关闭的**RC**。

“开放” **RC**: 如果 Q_A 的电子传出, **RC**的电子可以完全传递给 Q_A , 则此时**RC**称为开放的**RC**。





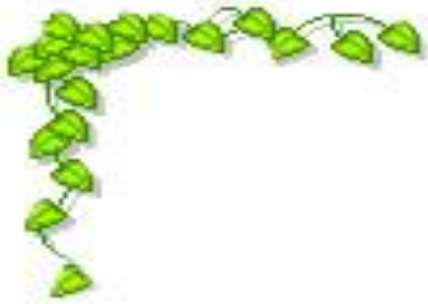
荧光测定的基本参数与意义



基础测量参数

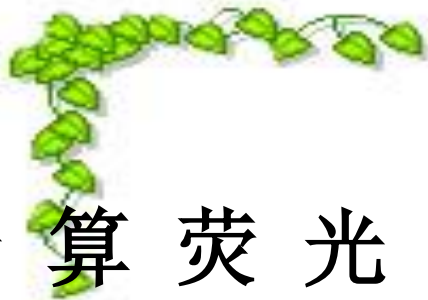
	测量参数	光源配置				参数意义
		测量光	作用光	饱和脉冲光	远红光	
暗适应参数	F_o	√				初始荧光: PSII 反应中心 (经过充分完全暗适应以后) 处于完全开放状态时的荧光产量
	F_m	√		√		最大荧光: PSII 反应中心处于完全关闭状态时的荧光产量 (通常叶片经过 30min 暗适应以后测得)
光适应参数	F_m'	√	√	√		光适应下的最大荧光
	F_s'	√	√			稳态荧光: 光照条件下, 光-暗反应达到动态稳定时的荧光产量
	F_o'	√			√	光适应下最小荧光





荧光参数特点及其应用





计算荧光参数

	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
	$\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m$	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 ($\alpha \approx 0.84$)
荧光淬灭参数	$q_P = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_o)$	光化学淬灭系数，反应 PSII 反应中心开放程度
	$1 - q_P = (F_s - F_o) / (F_m' - F_o)$	反应 PSII 反应中心关闭程度
	$q_{NP} = (F_m - F_m') / (F_m - F_o)$	非光化学淬灭系数
	$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$	非光化学淬灭





F_m: 最大荧光产量 (Maximal fluorescence yield) , 是PS II 反应中心完全关闭时的荧光产量。通常叶片经暗适应30min 后测得。

★**F_m**的大小与哪些因素有关?

①是否充分暗适应?

②天线大小是否发生改变?





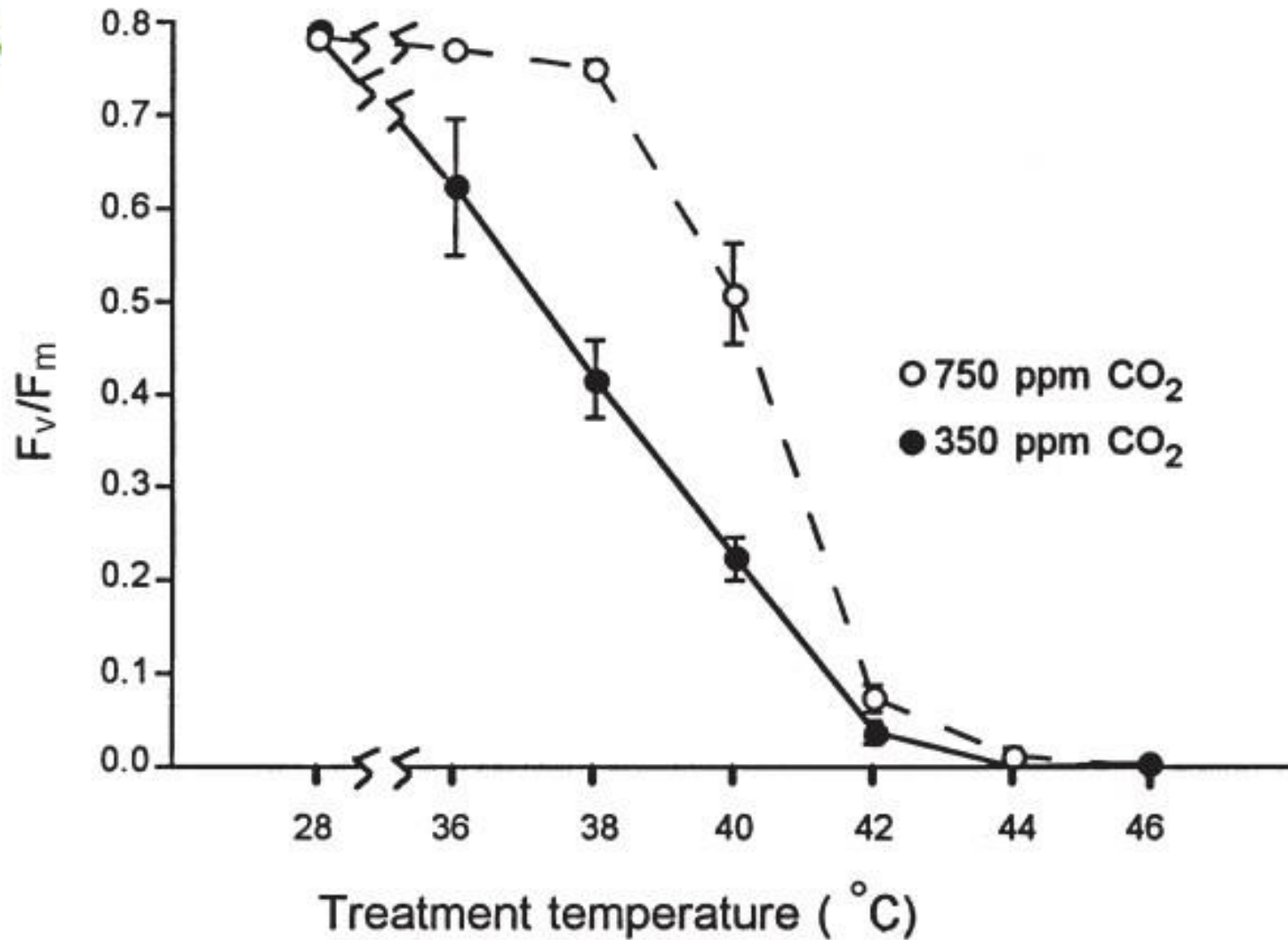
F_v/F_m ：暗适应下PS II 反应中心完全开放时的最大光化学效率，反映PS II 反应中心最大光能转换效率。
(3部分能量效率)

F_v' / F_m' ：光适应下PS II 最大光化学效率，它反映有热耗散存在时PS II 反应中心完全开放时的光化学效率，也称为最大天线转换效率。
(2部分能量效率)

$\Phi_{PS II}$ ：PS II 实际光化学效率，它反映在照光下PS II 反应中心部分关闭的情况下的实际光化学效率。
(1部分能量效率)

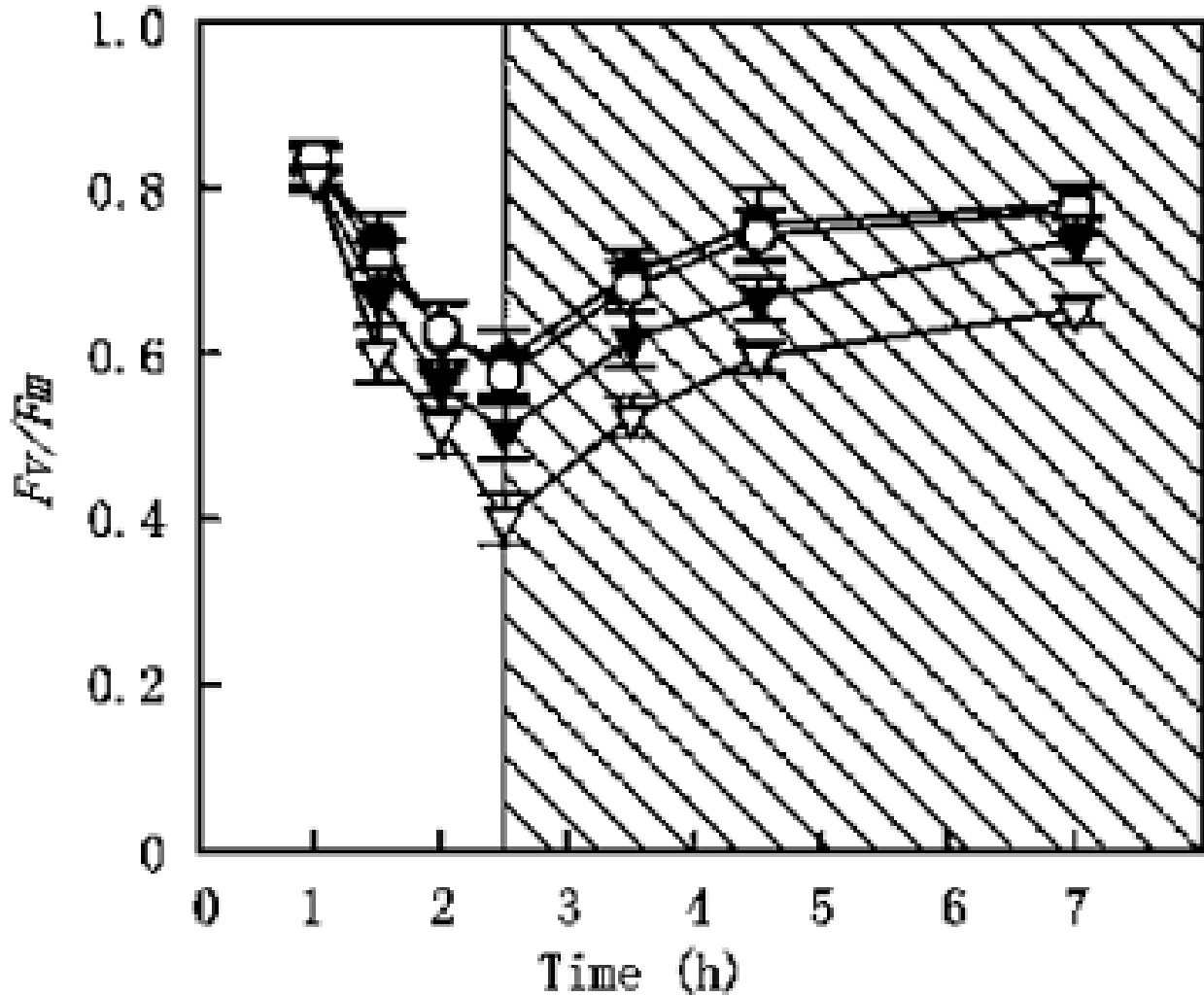


Fv/Fm 常用于表征植物的光抑制



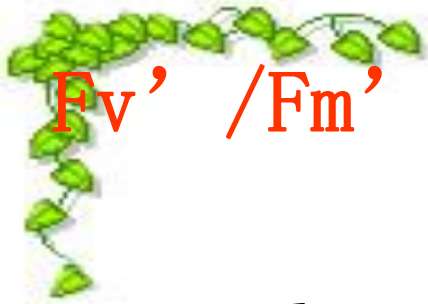


Fv/Fm 常用于表征植物的光抑制



- : 对照
- ▼: 盐胁迫 + 21% O_2
- △: 盐胁迫 + 2% O_2





F_v' / F_m' , $\Phi PSII$, qP 以及 NPQ 表征能量分配

$$F_v' / F_m' = F_m' - F_o' / F_m'$$

(光下最大光化学效率)

$$\Phi PSII = F_m' - F_s / F_m'$$

(实际光化学效率)

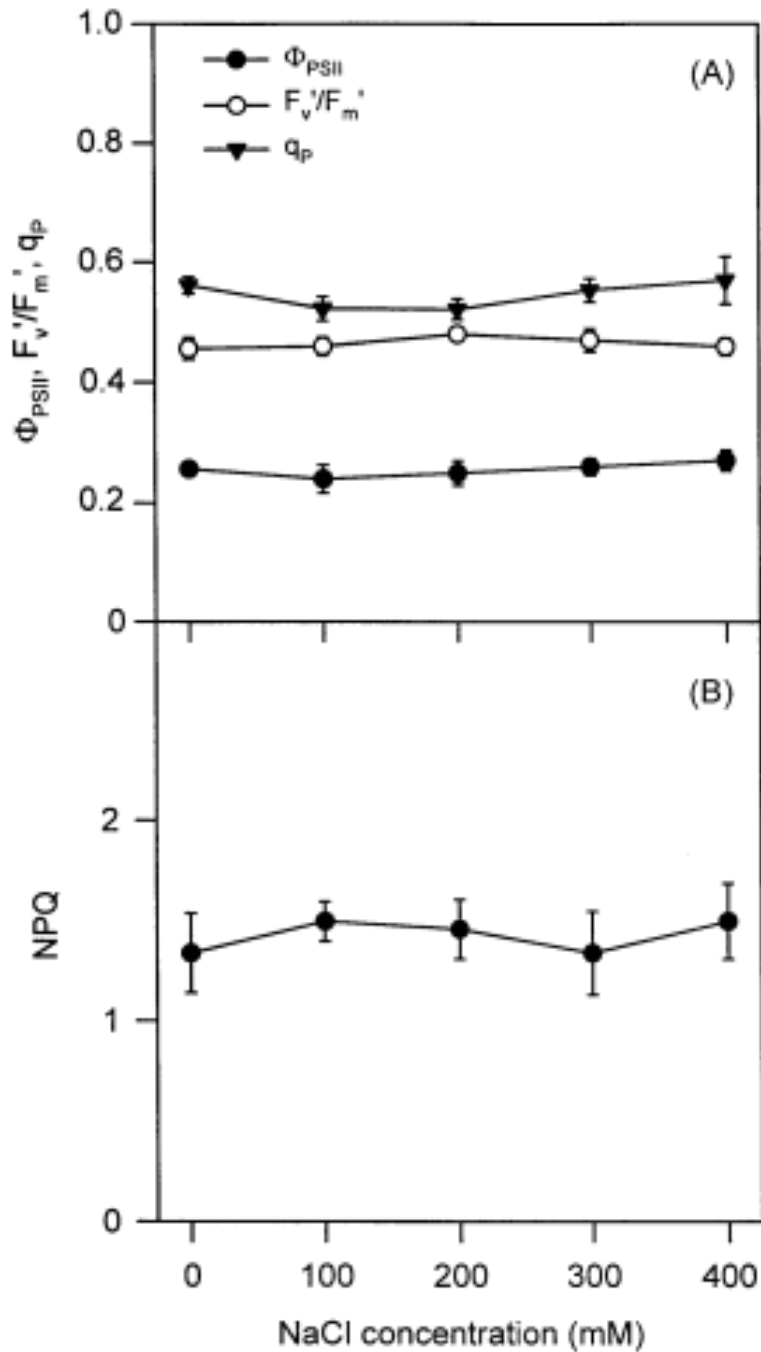
$$qP = F_m' - F_s / F_m' - F_o'$$

(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)





$$F_v' / F_m' = F_m' - F_o' / F_m'$$

$$\Phi_{PSII} = F_m' - F_s / F_m'$$

$$qP = F_m' - F_s / F_m' - F_o'$$

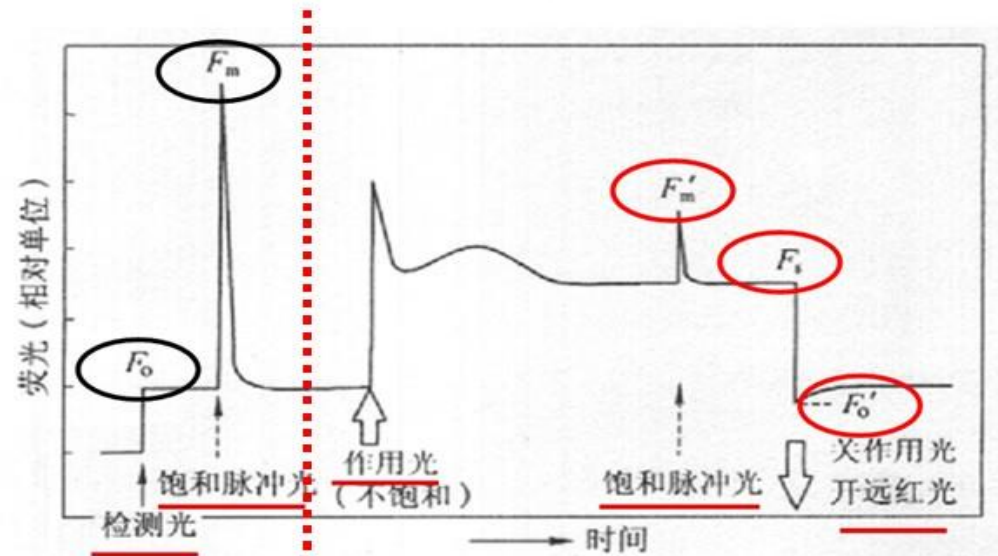


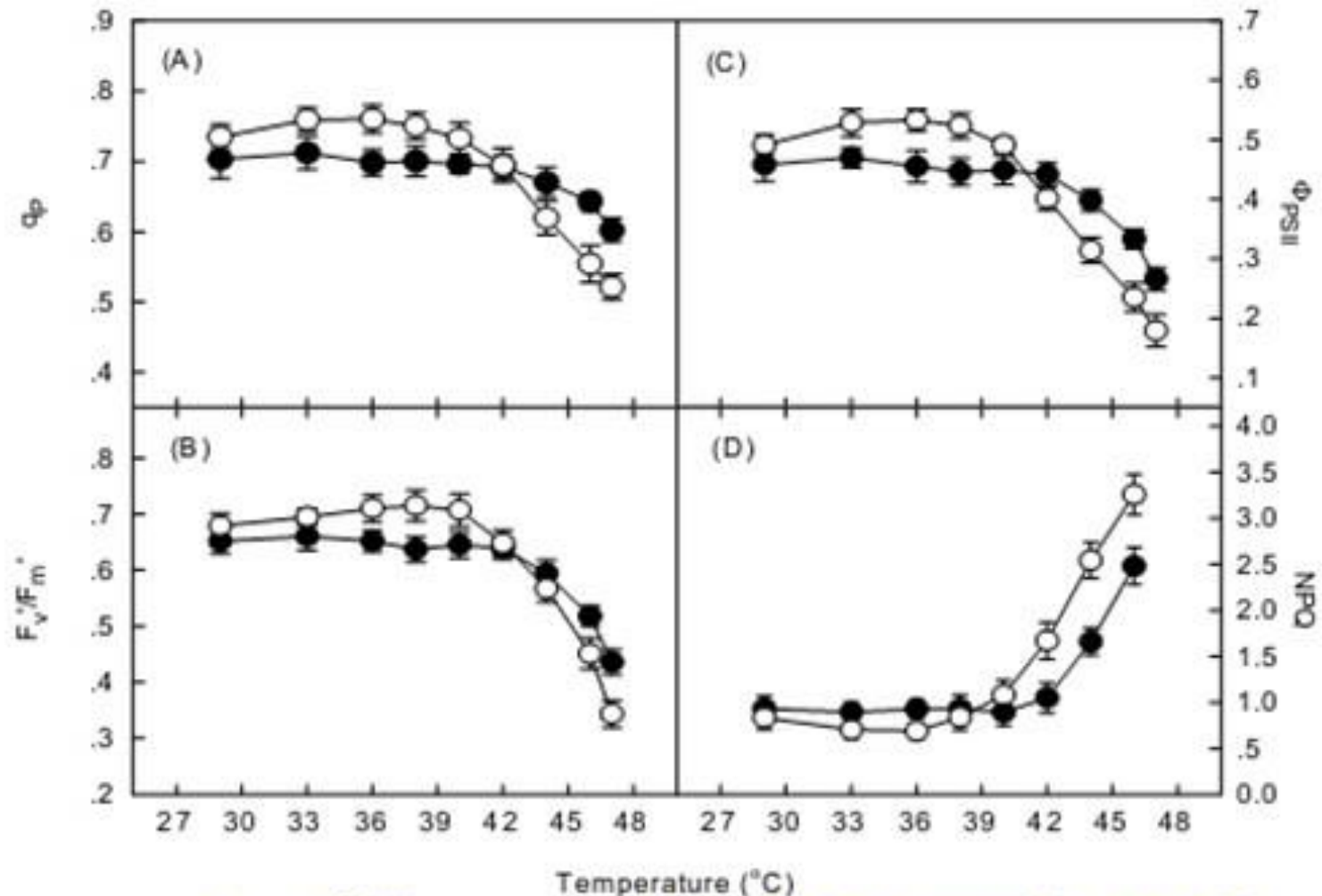
图4-4 叶绿素荧光分析方法示意图。





$$\Phi_{PSII} = F_m' - F_s / F_m' = 1 - F_s / F_m'$$

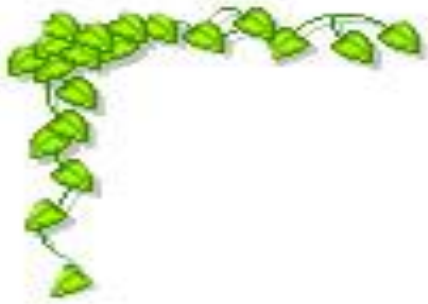
$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m' = F_m / F_m' - 1$$



○, 对照;

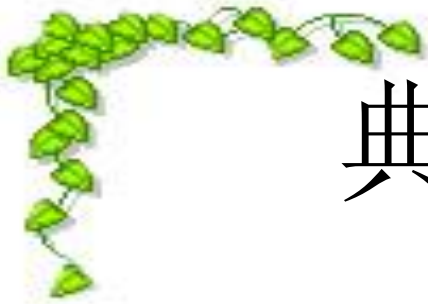
●, 200 mmol/L NaCl





LI-6400-40 荧光叶室操作介绍





典型实验介绍

实验1、测量 F_0 & F_m ——求得 F_v/F_m

实验2、测量 F_0' 、 F_m' 、 F_s ——求得 ETR、 F_v'/F_m' & Φ_{PSII} 及qP。

实验3、淬灭实验——测量实验1与实验2的参数，求得qN& NPQ。

实验4、荧光和气体交换参数同时测量——荧光光响应、荧光 CO_2 响应曲线。

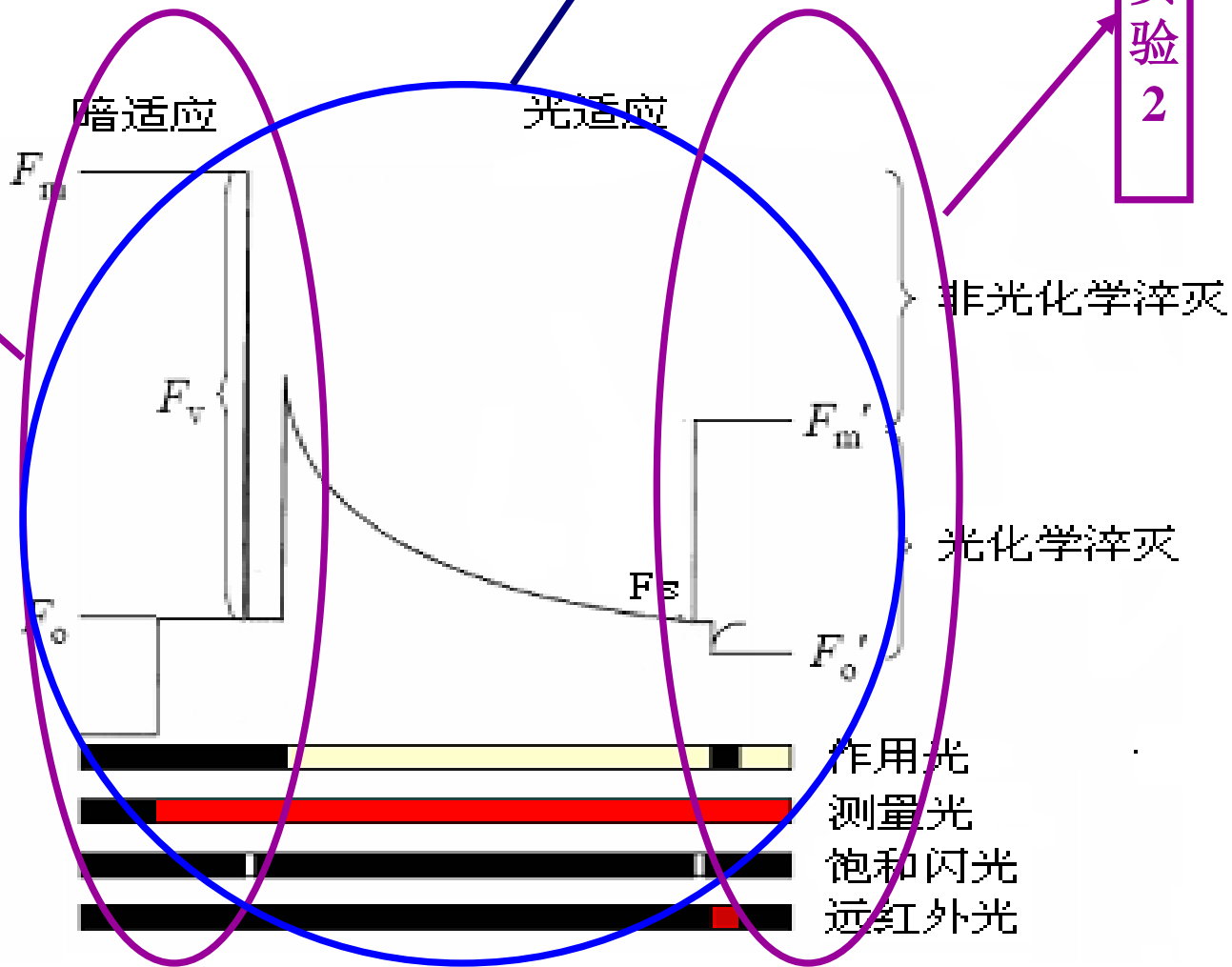


实验3

荧光测量的基本步骤

实验2

实验1

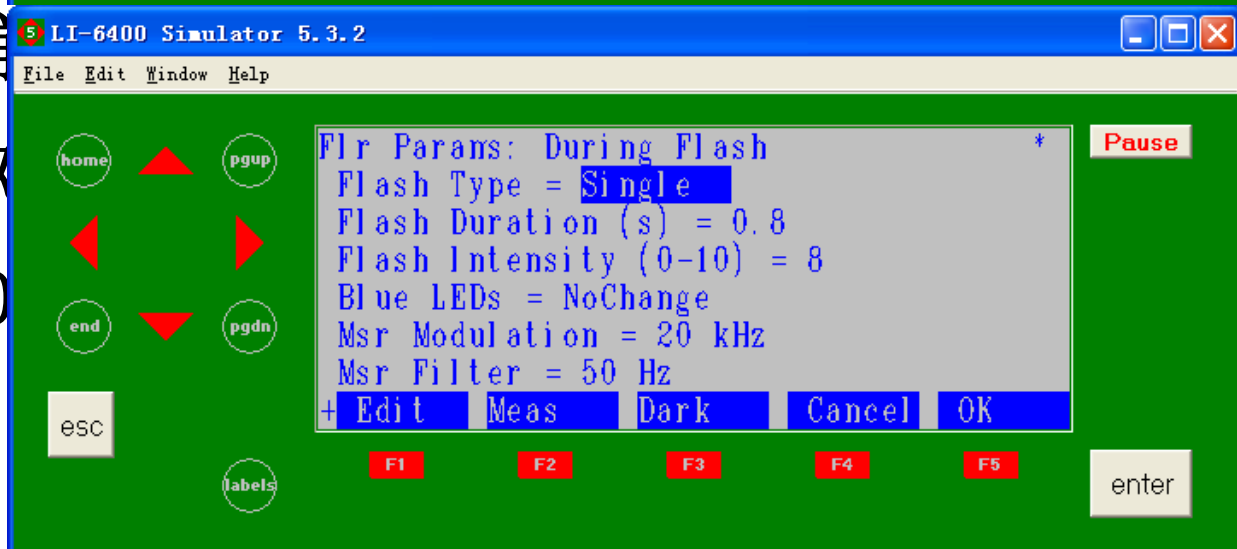
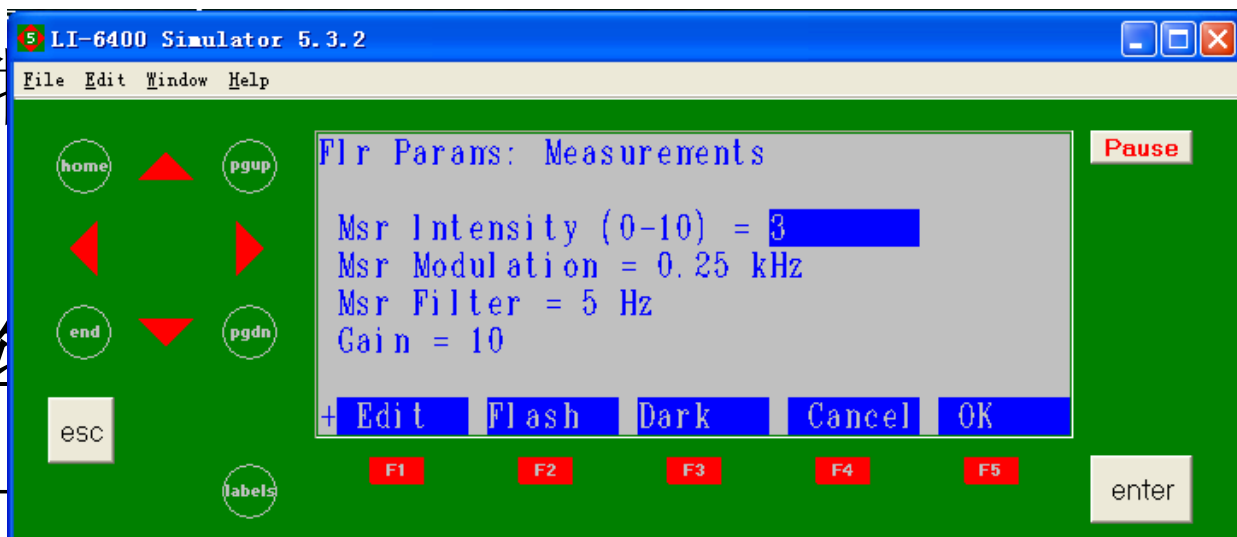




实验1——OPEN5.3及以下版本:

植物

1. 打开一个文件
2. 设置测量光、闪光
OK, 起名, eg:
3. 夹好叶片 (提前)
4. 等待 dF/dt 绝对
5. 记录数据 (按0)
6. 查看数据 (1,
7. 关闭文件 (1,

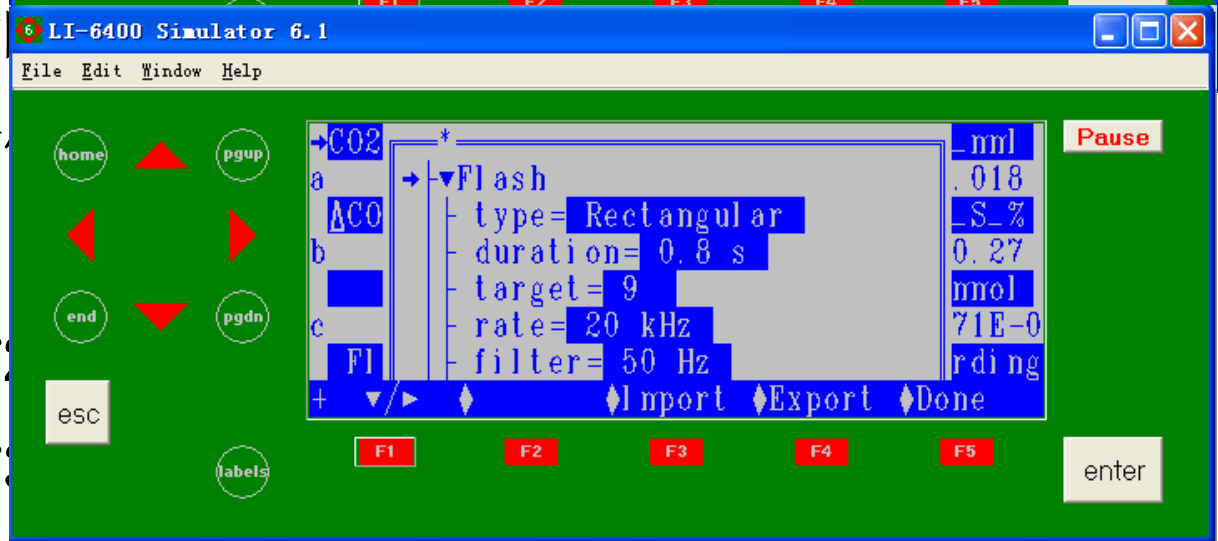
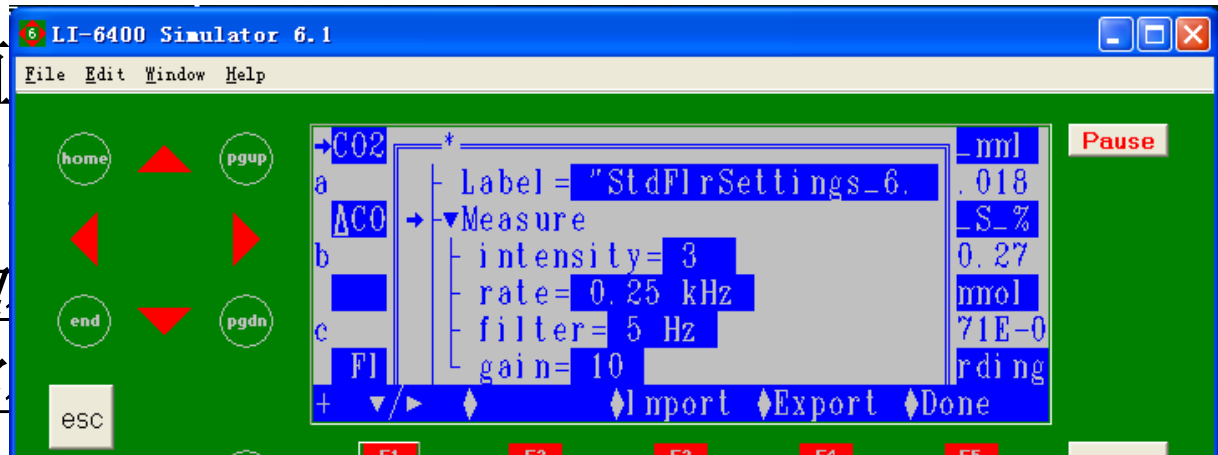


Type:single; Duration:0.8; Intensity:8; Blu: Nochange;
Modulation: 20; Filter: 50.

实验1——OPEN6.0及以上版本:

植

1. 打开一个文件 (
2. 设置测量光、饱和度，无须另取名
3. 夹好叶片 (提前
4. 等待 dF/dt 绝对
5. 记录数据 (按0,
6. 查看数据 (1, f
7. 关闭文件 (1, f
8. 传输文件 (同光合



Type:Rectangular; Duration:0.8; Intensity:9; rate: 20; Filter: 50.



实验2——open5.3及以下版本：

植物光适应状态的 F_0 、 F_m 、 F_s 、 F_v/F_m

1. 打开一个文件（1， f1），输入文件名，添加备注；
2. 直接在功能行8， F1下调用setup-01的设置；
3. 设置活化光强度（8， f3），根据植物当前适应下的光强或实验设定光强；
4. 打开活化光（9， f4）；
5. 夹好叶片（提前光适应好的叶片）；
6. 等待 dF/dt 绝对值 < 5 或 $F1rCV\% < 1$ ；
7. 记录数据（按0， f1/f2/f3/f4）；
8. 查看数据（1， f2）（不查看也可以）；
9. 关闭文件（1， f3）；
10. 传输文件（同光合操作）。



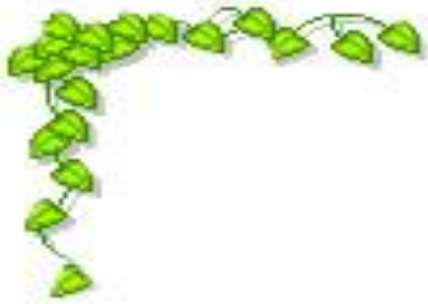


实验3:

猝灭研究, 测量 Φ_{PSII} 、 qP & qN & NPQ

- 1、打开一个文件 (1, f1), 输入文件名, 添加备注。
- 2、设置测量光 (满足暗适应叶片测定需求, 同实验一的设置)、饱和闪光 (满足暗适应叶片测定需求, 同实验一的设置) 和远红光 (采用默认即可), 保存设置。
- 3、设置活化光强度 (8, f3)。
- 4、夹好暗适应好的叶片。
- 5、等待 dF/dt 绝对值 < 5 或 $FlrCV\% < 1$ 。记录数据 (按0, f1/f2/f3/f4)。
- 6、打开活化光 (9, f4), 等待植物适应光环境。
- 7、等待 dF/dt 绝对值 < 5 或 $FlrCV\% < 1$ 。记录数据 (按0, f1/f2/f3/f4)。
- 8、查看数据 (1, f2), 关闭文件 (1, f3)。
- 9、传输文件 (同光合操作)。





注意：

- 测定暗适应植物，切忌打开活化光；反之，测定光适应植物，一定在夹叶片之前打开活化光。
- 做猝灭时，针对暗适应的叶片和光适应的叶片，要用同样配置的测量光与饱和闪光，否则淬灭数据错误。
- 植物一定要有充足的暗适应和光适应！





大量叶片淬灭测定注意事项

- **问题：**样品多，耗时长
- **解决途径：**

成批样品统一光适应、统一暗适应；

统一暗适应后测定所有植物的暗适应参数；

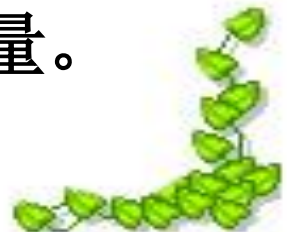
统一光适应后测定所有植物的光适应参数；





大量叶片淬灭测定注意事项

- **导致可能的问题：** 导出的数据或在当时看到的 p 行中的 qN 以及 NPQ 值为虚假错误值；
- **原因：** 非光化学参数 qN ， NPQ 是利用 n 行参数和 o 行参数进行运算得到，而 n 行参数和 o 行参数是随着测定的进行随时被更新的，对同一片叶子这两行参数已经错位，所以计算的值得错误；
- **解决途径：** 导出数据，在excel下用原始测定数据和 qN ， NPQ 计算公式，重新计算这两个变量。





谢谢各位老师、同学的支持
与合作！

