

植物在不同形态和不同状态下的 荧光光谱特征研究

吴 荣 张崇静 朱永豪 刘南英

(中国科学院安徽光学精密机械研究所)

沈 玉 其

(中国科学院南京分院)

徐彬彬 石晓日 李德成 周 斌

(中国科学院南京土壤研究所)

摘 要

本文从光合作用的角度出发,讨论了植物叶片在不同形态、不同状态下的荧光光谱特征以及它们对荧光光谱的影响。文章涉及了以下几方面的内容:(1)植物在离体形态和活体形态下的荧光光谱特征;(2)叶片正面与反面的荧光光谱特征;(3)植物不同器官对荧光光谱的影响;(4)叶片放置时间对荧光光谱的影响;(5)叶片经不同处理时对荧光光谱的影响等。其目的是为激光荧光技术用于植被遥感的实施提供基础数据。

关键词 荧光光谱 遥感

一、原 理

植物中含有叶绿素及其它一些色素,它们在适当波长的光激发下均会发射荧光。光合作用是在植物组织内的叶绿体上进行的,它是一个光能的吸收、转换和贮存的复杂过程。在光合作用期间辐射能的主要吸收体是叶绿素a。在绿色植物中,大部分叶绿素起着捕获光子并把能量转移给光合作用的中心色素。这类色素被称为天线色素,它们没有光化学反应活性。参与光化学反应活性的只有少部分叶绿素a。叶绿素吸收光后,其分子激发到高能态,当返回到基态时,激发的能量或者转化作用于植物的生化系统,或者作为荧光耗散^[1]。

光合作用效率的荧光测量法是以光合作用的能量转移机制为基础的,光合作用过程的效率越高,荧光强度就越低。由于植物组分以及光合作用效率和叶绿素浓度的差异,使得不同种类的植物或在不同状态下的同一植物在荧光光谱特征及强度上显示出明显的差异,这种差异正是用作遥感检测的依据。

二、测试仪器

实验中所用的测试仪器为：(1) 激光荧光雷达系统，它由 QJD-9 型 N_2 激光器、接收望远镜(室内实验不用)和 OSA-WP₄ 光谱分析仪系统三部分组成。 N_2 激光器的发射波长为 337nm，单脉冲能量最大为 5mJ，能量起伏 3%。OSA-WP₄ 光谱分析系统一次摄谱范围大约为 280nm；(2) 日立 850 型和 F3010 型荧光分光光度计(仪器指标见附录)。实验中均以 337 nm 作激发光。

三、结果与讨论

1. 植物在活体与离体状态下的荧光光谱

取阔叶灌木黄杨叶片作样品：(1) 活体，是直接取刚从植株上摘下来的叶片进行测量；(2) 离体，取相同叶片剪碎，称取 1g，在 40ml 无水乙醇中浸泡 24h 后，测上层悬浮液的荧光光谱，测得的结果见图 1。

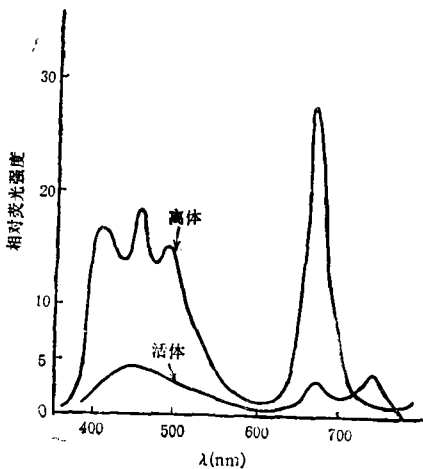


图 1 离体和活体植物叶片的荧光光谱

Fig. 1 Fluorescence spectra of the in vitro leaves and intravital leaves of plants

由图可见，活体与离体在荧光光谱上有很大差别。首先是在强度上，离体的荧光强度要比活体大，这并不是由于所用离体样品中的叶绿素浓度高而引起的。相反，我们可以粗略地证明在同样强度的激发光照射区内，活体样品中的叶绿素分子数量要比离体的酒精提取液中的叶绿素分子数量大。假定叶片中的叶绿素能百分之百的为酒精溶解的情况下，离体测试样品受光部分中的叶绿素量亦仅为叶片中之几分之一。活体状态下的荧光较弱，说明了活体中光合作用能力的存在，色素之间有效的能量转移，不论是高等植物或藻类，植物所吸收的日光能，最后都会转移到被称为光合作用反应中心的、具有某种特定构态的叶绿素 a 分子上。图 2 为紫球藻中各类色素间的能量转移方框图^[2]。

对高等植物虽尚未见到这样明确的结论，但类似传递机构是肯定存在的，吸取短波长光的色素将能量逐步传递给反应中心，在此进行光化学反应。受激色素所释放之相应波长的荧光强度，不仅与该色素的浓度有关，而且决定于传递效率(或光合作用效率)，且与后者呈相逆关系。

图 1 所示的谱形特征差异也给我们有益的启示：(1) 在波长 380—540nm 间，活体的荧光谱大约在 440nm 显示一个馒头状峰，而离体样品则有 3 个峰，分别为 410, 460 和 490nm。我们虽未能分别指定它们所对应的物质与机制，但至少说明，植物相应于这一光谱区的组成结构，绝不是单一的一二种色素，也不是某种色素的单一状态。而一旦

离体（如在乙醇提取的情况下）就会分解给出相应荧光特征。（2）活体在红光区得出 685 和 740nm 两个荧光峰，而离体的仅在 675nm 处有一强峰。前人之研究证明^[1]，685 和 740nm 分别相应光合作用系统 II 和系统 I 的两个反应中心的叶绿素 a，740nm 处的受激发，其能量来源于 680nm。我们的工作还说明，这种关系的强弱可通过两者之荧光来表征，且可用来判别植物生理过程是否正常^[3]。

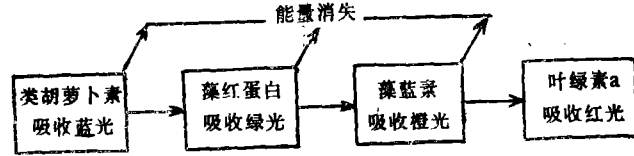


图 2 各类色素间的能量转移示意图

Fig. 2 Sketch map of energy transferring among various pigments

2. 叶片正面与反面的荧光光谱

叶片的荧光强度在正面和反面有所不同。一般来说，反面的荧光强度要大于正面的，在 440nm 处反面较正面的荧光强度大约高几倍至十几倍。表 1 列出了各种不同植物叶片反面的荧光强度相对于正面的荧光强度的变化情况，图 3 为枇杷叶片的正面与反面的荧光光谱图。

表 1 不同植物叶片的反面与正面的荧光强度变化

Table 1 Changes in fluorescence intensities of the back and the front of plant leaves

| 种 类 | 植物名称 | 荧光强度 | 种 类 | 植物名称 | 荧光强度 | |
|--------|--------|-------|-------|-------|------|-----|
| 阔叶树和灌木 | 樟 树 | 反>正 | 双 子 叶 | 花 生 | 反>正 | |
| | 槐 树 | 反>正 | | 大 豆 | 反>正 | |
| | 女 贞 | 反>正 | | 油 菜 | 反>正 | |
| | 白 杨 | 反>正 | | 蚕 豆 | 反≈正 | |
| | 乌 柏 | 反>正 | | 棉 花 | 反>正 | |
| | 黄 杨 | 反>正 | | | | |
| | 阔叶树和灌木 | 红 叶 李 | 反>正 | 单 子 叶 | 小 麦 | 反≈正 |
| | | 枇 杷 | 反>正 | | 大 麦 | 反≈正 |
| | | 亮叶冬青 | 反<正 | | 水 稻 | 反≈正 |
| | | | | | 玉 米 | 反≈正 |

结果表明，在阔叶树中，除亮叶冬青外，其余的叶片均为反面的荧光强度大于正面的。

在单子叶和双子叶植物中，大麦、小麦和蚕豆的叶片的反面荧光强度与正面的大致相当，其余则全是反面比正面大。

造成叶片正反两面荧光强度差别的原因可从多方面去分析。

首先可认为二者在形态上有着较大的差别，叶片两面组织结构不同，表皮的组织如茸毛密度与气孔的分布状态，正反两面就有所不同，叶子反面的气孔比正面要多^[4]。其次，正反两面的光合作用也有差别，其差别不仅与叶片的表皮组织有关，也与叶片的叶

肉组织以及两面的受光条件有关。叶片的叶肉组织，在正反两面是不相同的。叶肉组织由栅栏组织、海绵组织和叶绿体组成。对典型的叶片而言，正面表皮下面为栅栏组织，叶绿体约占 80%，而在反面，表皮下面为海绵组织，叶绿体仅占 20%。

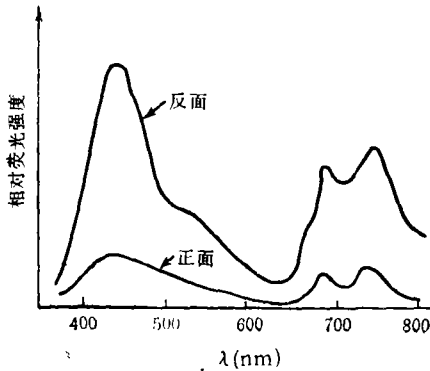


图 3 枇杷叶片的正面与反面的荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence spectra of the front and the back of plant leaves

双子叶植物叶片光合作用的特点是有正面和反面差异，因此，光合作用强度与叶片受光方向有关，并能分化出海绵组织与栅栏组织。而单子叶植物(禾本科)，则没有这两种组织的分化现象。对于单子叶植物来讲，即使从正面和反面各侧分别进行照光，光合作用强度也没有多大差异。另外，对正反两面均有气孔的植物，因光照方向不同，各侧所吸收的 CO_2 量也不同，从而也将导致两面光合作用强度的不同。

以上分析表明，对于大多数阔叶树和双子叶植物来说，由于光照条件，正反两面的结构和光合作用能力的差异，而使得反面的荧光强度比正面的大；对于单子叶植物大麦、小麦和双子叶植物蚕豆，其正反两面的荧光强度大约相同或差异不大，这是由于单子叶植物正反两面的组织结构差异不大，即正反两面没有组织分化现象的缘故，当然，表皮组织正反两面的气孔密度差别不大也是其原因之一。这可由表 2 看出。

表 2 几种植物的气孔分布密度 (每平方毫米个数)

Table 2 Stoma distribution densities of some plants (number/mm²)

| 植物名称 | 正 面 | 反 面 | 植物名称 | 正 面 | 反 面 |
|------|-------|--------|-------|-----|---------|
| 大 麦 | 50—57 | 40—60 | 油 菜 | — | 716 |
| 小 麦 | 47—61 | 32—43 | 大 豆 | 145 | 164 |
| 蚕 豆 | 65 | 75 | 七 叶 树 | — | 210 |
| 玉 米 | 90—98 | 83—158 | 苹 果 树 | 0 | 290—462 |

至于阔叶灌木亮叶冬青为什么叶片反面的荧光强度小于正面，是由于正反两面表皮组织的差异，还是由于亮叶冬青正反两面的组织结构与其它植物本身就存在着不同，则有待于进一步的研究。

从图 3 还可以看出，反面和正面的光谱特征也有不同，反面的荧光光谱在 530nm 处的相对强度显然增强了，而形成一明显的肩部。而正面的荧光光谱只是在黄叶情况下才能见到 530nm 峰^[5]。

3. 植物不同器官的荧光光谱

除了植物叶片组织被认为由叶绿体产生荧光外，我们注意到植物的其它器官也产生荧光，而且强度较大。植物的叶片与植物的不同器官的荧光光谱有相似之处，但也有一些差异，其差异来源是由于器官所含色素的不同，还是由于器官本身在光合作用方面与

叶片有着不同的差异而造成的，目前还尚难作出结论。图 4 为不同植物不同器官的荧光光谱图。

从这些光谱来看，它们的结构要比植物叶片丰富得多。图 4A—4C，测试波段为

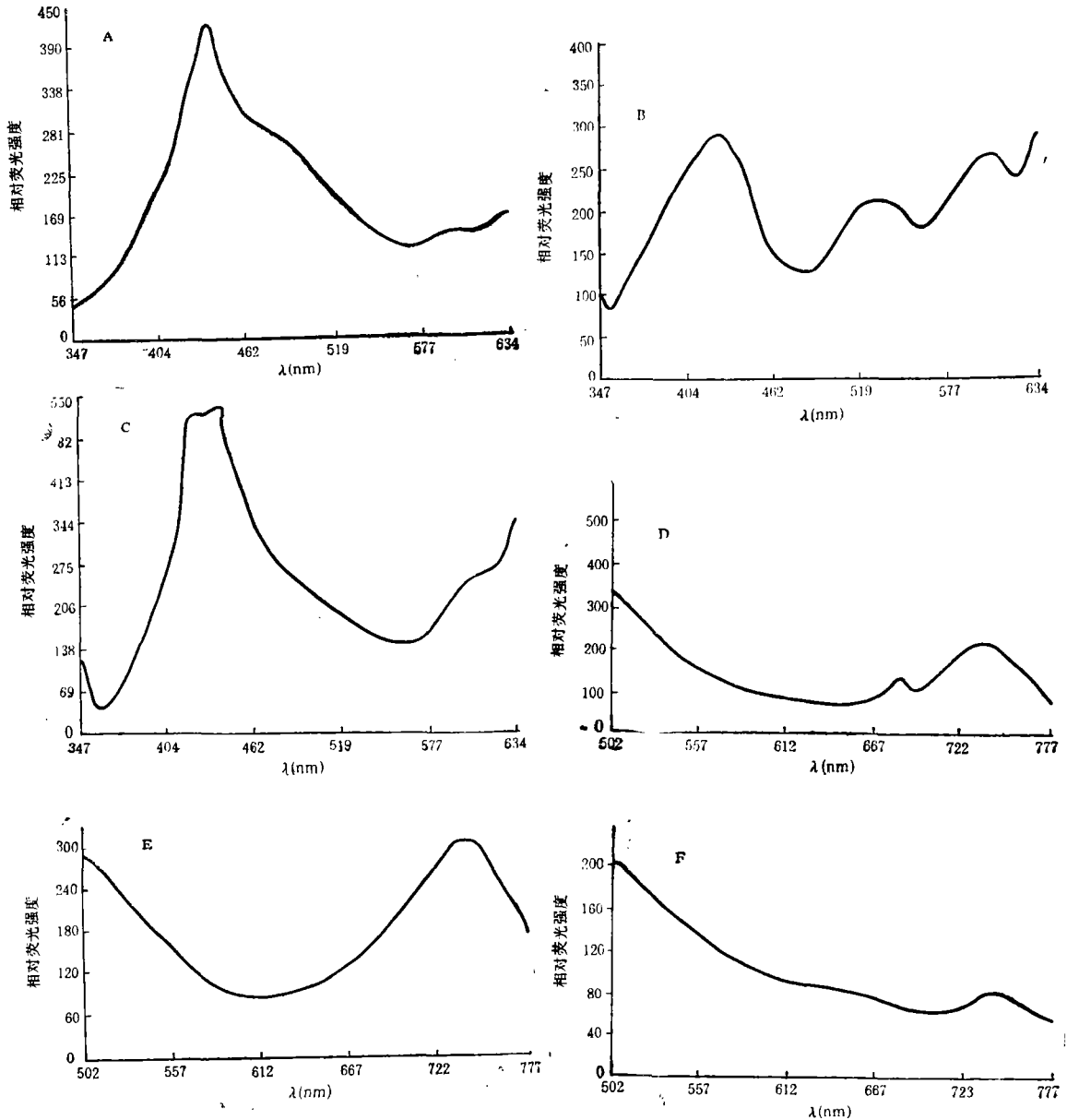


图 4 不同植物、不同器官的荧光光谱

Fig. 4 Fluorescence spectra of various plants and organs

A. 小麦秆叶 (秆叶混合) (Wheat straw and leaf (mixed)), 肉眼观察颜色为嫩黄绿 (tender yellowgreen); B. 油菜花 (rape flower), 黄色 (yellow); C. 蚕豆花 (broad bean flower), 青紫色 (greenpurple); D. 大麦麦穗 (barley ear), 淡绿 (light green); E. 油菜荚 (rape pod), 淡绿 (light green); F. 油菜荚 (rape pod), 黄色 (yellow)

347—634nm, 各器官除了呈现一般植被具有的 440nm 荧光峰外, 还各有差异。其中以图 4B 中的黄色油菜花最为显著, 它在可见光谱的黄色部分还有两个明显的峰, 分别位于 530 和 600nm 左右。而图 4D—4F 的测试波段为 502—777nm, 除了大麦麦穗在 680 和 740 nm 有荧光峰外, 油菜荚只有 740nm 处有峰, 且绿色的油菜荚的荧光强度要大于黄色的油菜荚。这说明绿色油菜荚比黄色油菜荚的叶绿素含量高, 因此在波长 740nm 处的荧光强度高于黄色油菜荚。这与植物叶片的变化情况是一致的。

4. 叶片不同处理时的荧光光谱

(1) 叶片离体放置时间

叶片放置的时间不仅会引起荧光强度的变化, 而且这种变化随植物种类而异。表 3 为叶片荧光强度随离体时间在波长 685nm 处的变化。

结果表明, 同一叶片随着离体放置时间的不同, 叶片的颜色也发生着一些变化, 同时伴随着水分的减少, 叶片颜色由绿变黄, 叶绿素成分遭到破坏, 使得光合作用减弱, 从而导致了光能从类胡萝卜素传递到叶绿素的效率降低, 使类胡萝卜素的荧光增强。有实验结果证明, 不同种类的叶片由于所含类胡萝卜素与叶绿素的比值不同, 其荧光强度也不同, 比值愈大, 荧光强度愈强^[6]。

(2) 几种不同处理后的叶片的荧光光谱

1) 叶片断面

选用阔叶灌木亮叶冬青的成叶作为测试样品, 先测量叶片正面的荧光光谱, 然后将几张叶片叠合起来上下横切, 并测量其横断面的荧光光谱。结果表明, 横断面的荧光强度较叶片的荧光强度在 525nm 处显著增加。这可能是由于叶片的横断面没有了叶面通常有的绿色保色膜(表皮), 使得叶绿素荧光能直接被仪器接收的缘故。

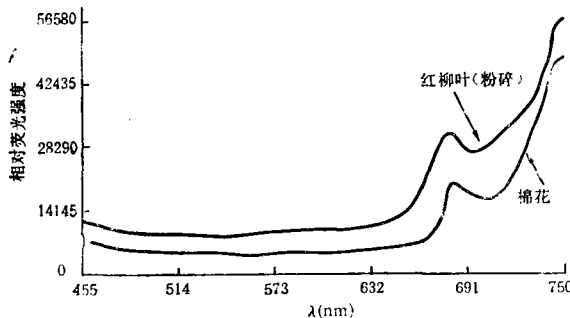


图 5 活叶和粉碎成小粒的干样的荧光光谱

Fig. 5 Fluorescence spectra of the live leaves and dried grain samples

2) 叶片粉碎干样

测量样品选择的是新疆盐生植被红柳叶、盐穗木等被粉碎成小粒的干样, 在干样处理中, 叶绿素没被分解, 使得色素稳定地保留。其目的是想了解干样与活叶的荧光特征峰的峰位变化。测试结果表明, 干样的荧光特征峰与活叶的荧光峰在峰位上大致相同, 只是在强度上有差异(图 5)。

3) 在太阳光下曝晒后的叶片

将刚采下的亮叶冬青成叶的活叶立即放入强光下曝晒 2h 后测量, 曝晒后的叶片与

放置几天后的叶片所不同的是, 放了一段时间的叶片其叶绿素没有完全被分解, 只是叶绿素和类胡萝卜素的比例发生了变化, 从而使光合作用变弱。曝晒后的叶片颜色由绿变为叶焦(肉眼观察叶片完全失绿), 其荧光强度变化如图 6 所示。

当刚采下的绿叶经太阳曝晒后, 叶片组织受到破坏, 使得叶片中的叶绿素被分解, 进而破坏了原生质, 使得叶片呈现叶焦。在荧光强度上则表现为 685 和 740nm 处极大下降。

四、结 论

植物在不同形态和不同状态下的荧光光谱都有着较大的差异。虽然我们的分析结果是对植物叶片某一状态而言, 但它反映了植物荧光光谱的基本特征和信息, 因此可作为激光荧光技术用于植物遥感的基础和依据。如利用油菜等作物开花、结荚时的不同荧光光谱特征, 可探测其成熟程度乃至估产。再如根据叶片正反两面的荧光特征等, 可分析遥感时作物叶片的随机状态(风吹, 倒状等)。然而自然界中的植物是一个非常复杂的混合物, 其影响因素很多, 且互相制约, 因此在实际应用中还有很多问题尚待研究。

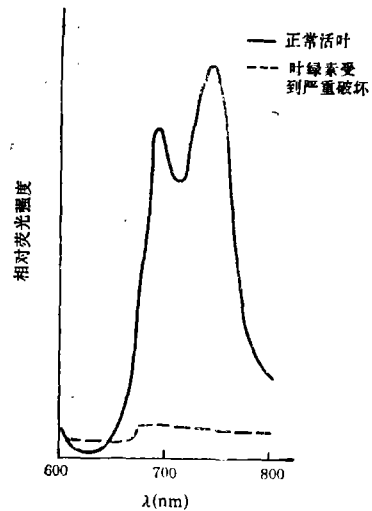


图 6 叶绿素受到严重破坏时的荧光光谱
Fig. 6 Fluorescence spectra of severely damaged chlorophyll

参 考 文 献

- [1] Chappelle, E. W., et al., Laser-Induced Fluorescence of Green Plants, 1: A technique for the remote detection of plant stress and species differentiation, *Applied Optics*, 1984, **23**(1): 134—138.
- [2] 程极济, 光生物物理学, 高等教育出版社, 1988 年。
- [3] 吴荣等, 应用荧光光谱特征对受害植物判别指标的研究, 本期增刊。
- [4] [日] 户苺义次主编 (薛德裕译), 作物的光合作用与物质生产, 科学出版社, 1979 年。
- [5] 张崇静等, 不同植物的激光诱导荧光光谱特征及其在遥感上的意义, 本期增刊。
- [6] 姜原等, 叶绿体内多光子荧光过程的研究, *应用激光*, **10** (4), 1989.

Study on Characteristics in Fluorescence Spectra of Plants at Various Forms and Various Conditions

Wu Rong Zhang Chongjing Zhu Yonghao Liu Nanying
(*Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Academia Sinica*)

Shen Yuqi
(*Nanjing Branch of Academia Sinica*)

Xu Binbin Shi Xiaori Li Decheng Zhou bin
(*Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing*)

Abstract

The paper discussed from photosynthesis view the characteristics in fluorescence spectra of plant leaves at various forms and various conditions, as well as influences on fluorescence spectra by those conditions. The contents included: 1. characteristics in fluorescence spectra of plants at in vitro conditions and intravital conditions; 2. characteristics in fluorescence spectra of the front and the back of leaves; 3. influence on fluorescence spectra by various plant organs; 4. influence on fluorescence spectra by layed time of plant leaves; 5. influence on fluorescence spectra by various treatments on leaves, and so on. The purpose of the paper is to provide basic data for the application of the laser fluorescence technology on plant remote sensing.

Key words Fluorescence spectra Remote sensing