

# 光声光谱技术在光合作用研究中的应用\*

## The Application of Photoacoustic Spectroscopy in the Research of Photosynthesis

聂琴<sup>1</sup> 樊大勇<sup>2</sup> 高文容<sup>3</sup> 高荣孚<sup>4</sup>  
Nie Qin<sup>1</sup> Fan Dayong<sup>2</sup> Gao Wenrong<sup>3</sup> Gao Rongfu<sup>4</sup>

(1. 吉首大学生物资源与环境科学学院张家界校区 湖南张家界市 427000; 2. 中国科学院植物研究所数量植被生态学重点实验室 北京 100093; 3. 山东华泰庄园园林有限公司 山东济南市 250001; 4. 北京林业大学生物学院 北京 100083)

(1. College of Biological Resource and Environmental Science, Zhangjiajie School, Jishou University, Zhangjiajie, Hunan, 427000, China; 2. Laboratory of Quantitative Vegetation Ecology, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100093, China; 3. Shandong Huatai Gardens Co. Ltd. Jnan, Shandong, 250001, China; 4. College of Biology, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, China)

**摘要** 当光照射密闭容器里的样品时, 容器内能产生声波, 这一现象称为光声效应, 光声光谱是基于光声效应的一种光谱技术。由于光声光谱技术本身的特点, 光合作用研究领域越来越多地应用该技术研究光合作用的机理, 比如: 光谱扫描、光声能量储存的性质、环式电子传递、状态转变与爱默生效应、光反应中心的原初光化学过程、光声瞬态研究、环境胁迫等。光声光谱技术在光合作用研究中的应用, 开拓了视野, 丰富了对光合作用机理的认识。

**关键词** 光声效应 光声光谱技术 光合作用

中图分类号 Q945.11

**Abstract** Photoacoustic spectroscopy technique has been introduced to photosynthetic research since the 1970 s. Compared with oxygen electrode, PA technique could probe the kinetics of oxygen evolution more sensitively and accurately. PA technique is now a convenient and frequently used method in study of the state transitions and cyclic electron transport activity. The energy transfer efficiency of PSI could be measured by PA technique. Photoacoustic signals detected by hydrophone in water could reveal the micro-volume change occurred during the primary photochemistry reaction. The "Depth Analysis" of photoacoustic spectrometer could be used to scan the light absorption spectra of tissue layer under different depth of sample's surface. This paper summarize the application of Photoacoustic spectroscopy technique in the research of photosynthesis.

**Key words** photoacoustic effect, photoacoustic spectroscopy, photosynthesis

当光照射密闭容器里的样品时, 容器内能产生声波, 这一现象称为光声效应。光声光谱是基于光声效应的一种光谱技术。早在 1880 年 Bell 就发现了光声效应, 但直到 20 世纪 70 年代, Robin 和 Rosenzweig 的研究工作<sup>[1]</sup>表明光声光谱法可以用来测定传统光谱法难以测定的光散射强或不透明样品时, 光声光谱才开始引起人们的广泛重视。近年来, 随着新光源、声传

感技术以及微弱信号检测技术不断进步, 加上光声光谱学理论逐步完善, 光声光谱技术得到迅速发展。目前, 光声光谱技术已广泛应用于物理学、化学、生物学、医学和环境保护等众多领域。

20 世纪 70 年代中期以来, 研究者开始应用光声光谱技术研究光合作用。Adams 等<sup>[2]</sup>得到完好和捣碎了的菠菜叶子的光声光谱图, 与所提取的叶绿素的吸收光谱完全一致; Malkin 等<sup>[3]</sup>首先应用光声光谱技术来检测光合作用的能量利用效率; Bults 等<sup>[4]</sup>发现在气态光声池装置下出现的强烈信号来自光合作用放

2003-08-29 收稿, 2003-10-13 修回。

\* 国家自然科学基金资助项目 (G2000046805) 和中国科学院生物科学和生物技术研究特别支持项目共同资助。

氧; Poulet<sup>[5]</sup>提供了分析光声矢量信号的数学分析方法,针对实验中出现的放氧信号以及为区分光声放氧信号和气体吸收信号; Reising等<sup>[6]</sup>组建了气态脉冲式光声仪。总之在不到30a时间,光声技术被越来越广泛地运用到光合作用研究领域。

## 1 光合作用研究中光声光谱技术的特点

光声光谱技术目前已普遍应用于光合作用的研究,相比于其它技术,光声光谱技术具有独特的特点。

(1)光声光谱技术是目前光合作用放氧测定技术中时间分辨率最好的一项技术。这是因为普通氧电极是通过电化学的方式,而光声光谱技术通过物理的光声效应来检测放氧信号。(2)利用光声技术可以方便地研究叶片的状态转换和环式电子传递生理功能,而过去对状态转换和环式电子传递的研究主要利用叶绿体。

(3)利用光声技术可以监测到光合作用中快速CO<sub>2</sub>吸收情况,而这一点用常规的气体交换技术是很难实现的。(4)利用光声技术还可以了解光合反应中心在光照后因为分子结构重排而导致的体积变化,从而研究这种体积变化对瞬态光谱吸收数据造成的影响。(5)利用光声光谱结合叶绿素荧光技术可以很好地研究自然状态下叶片的抗逆生理机制<sup>[7]</sup>。(6)利用光声光谱技术可以直接测量光热效应,也即所吸收的光能有多少转化为非辐射的热耗散,而目前常用的叶绿素荧光技术只能间接估计热耗散所占的份额。(7)光声光谱技术还能测定光合过程中的能量转化效率等等。

光声光谱技术特点的体现是与不断发展的光声光谱理论和不断改进的光声光谱设备紧密相关的。

## 2 光合作用研究中光声信号分析

光声信号可以为气态环境中的微音器和液态环境中的压电传感器所检测到。

用于光合作用研究的光声光谱仪有四种类型,即气态调制型光声光谱仪、气态脉冲型光声光谱仪、液态脉冲型光声光谱仪,以及目前已经出现液态调制型光声光谱仪<sup>[8]</sup>。

对气态光声光谱仪而言,如果光合样品是叶片,气体交换信号和样品周围气体的热胀缩是产生的光声信号的主要组分。两种组分的物理学性质不一样,热组分从叶绿体逸散到周围空气中的速度比气体交换组分要快。

对于气态脉冲式光声仪而言,由于上面所说的物理学性质上的差异,第一个光脉冲所产生的光声信号是光声热信号,其后均为气体交换信号,这样就可以区分这两种组分<sup>[9]</sup>;对于气态调制型光声光谱仪,当

加上饱和背景光时,光合系统处在饱和状态,光合气体交换速率不变,而光热组分随调制光变化,利用锁相放大器将光热信号检测出来,这样可以区分这两种组分<sup>[5]</sup>;如果将调制频率提高到100Hz以上,这时放氧信号跟不上调制频率的变化,锁相放大器只能将光热信号检测出来,采用这种方法也可以区分这两种组分;此外,可以利用特殊的传感器来区分这两种组分,如LiNbO<sub>3</sub>压电传感器晶体与气体之间的声学阻抗不匹配,因此,只能检测到光热信号<sup>[10]</sup>。

如果光合样品是叶绿体悬浮液等液态制品(包括PSII和PSI的光合反应中心),气态光声光谱仪只能检测到热涨效应,这是因为在液体中,氧的逸散途径变长以及液体表面的存在,大大衰减了放氧信号并导致调制放氧频率变小,因而锁相放大器不能检测到<sup>[11]</sup>。液态光声光谱仪不仅可以检测到热涨效应,而且可以检测到反应中心的体积变化<sup>[8]</sup>,热涨效应与样品温度相关而反应中心的体积变化与光照强度相关。

由于光合样品吸收一部分光能进行光合作用,将能量储存于光合作用的中间和最终产物,这种作用与光合样品的光声热涨效应相竞争,降低了光声热信号,降低部分的相对值即为能量储存或称光化学损失。对叶片能量储存的测定一般将调制频率调高到100Hz以上,或采用水渗叶的方式<sup>[12]</sup>。

气态光声技术还能检测光声放氧信号的相对大小,称为氧的相对量子产率。

## 3 光合作用研究中光声技术的发展

影响光声效应的因子很多,如样品的物理结构、传导性质及叶圆片的气体交换等,因此,光声技术和装置是多种多样的。

### 3.1 气态光声检测

通常所用的光声技术是将样品置入含有微小体积气体的光声池中,检测光声效应所引起的气体压强的变化,Ducharme等<sup>[13]</sup>首先设计了这种光声装置用于光合作用。这种装置很适合于活体叶(离体的或非离体的)的光声测量,可以方便地测定放氧的相对量子产率、能量储存等。

气态光声光谱仪一般由电源、光源、光声池、传感器、放大电路和输出设备构成。传感器一般采用微音器;放大电路有两种选择,对于调制型光声光谱仪,放大部分采用锁相放大器只对同频率的信号进行放大,这样可以提高仪器的信噪比并排除其它非调制信号的干扰<sup>[14]</sup>,对于脉冲型光声光谱仪,利用精密的放大电路直接将信号放大。研究者对气态光声光谱仪进行了各种改进以用于不同的研究目的,比如为研究植

物叶片不同层次细胞的光能利用情况, Han等<sup>[15]</sup>巧妙地改进这种气态调制式的光声仪,使之可以测定叶片不同层次的细胞的放氧相对量子效率

气态的光声装置有以下的局限性: (1) 因为光声池体积微小 ( $< 0.1 \text{ ml}$ ), 当加上较强的调制光或饱和背景光后, 池内的  $\text{CO}_2$  浓度在  $1 \text{ min}$  内降到补偿点<sup>[16]</sup>。如果活化光弱或强饱和背景光打开的时间短, 这种限制不严重, 但对于长时间或光量强的实验则存在问题。在这种情况下, 有研究者认为可以反映在  $\text{CO}_2$  补偿点下的总光合作用<sup>[17]</sup>。对于这个问题目前有两种改进的方法: 开放式的光声池<sup>[18]</sup>和气体渗透式的光声池<sup>[16]</sup>。(2) 气态光声测量的时间分辨率不可能小于  $1 \text{ ms}$ , 对于普通气态调制式光声光谱仪, 一般调制频率达不到  $1 \text{ kHz}$ , 这是由传感器的响应以及气体传导性质决定的。对于通常所用的气态周期调制的光声技术一般测量时间分辨率要大于  $5 \sim 10 \text{ ms}$ <sup>[19]</sup>。(3) 虽然气态光声技术可以检测叶绿体悬浮液等液态制品的光声热信号, 但会造成光声池的污染以及实验结果的假象, 因此, 在后期的研究中, 研究者不再用气态光声技术检测这些样品, 而改用液态的光声检测技术

脉冲式的光声技术可以检测到放氧蛋白复合体的 S 状态<sup>[20]</sup>, 第一个光脉冲所产生的光声信号不为二氯苯二甲脲 (DCMU) 热、水胁迫和光饱和所抑制, 因此, 是光声热信号, 其出现的时间是  $5 \text{ ms}$ , 其后脉冲产生的均是放氧信号, 可以观察到放氧的四量子过程。脉冲式的光声技术区分了光声热信号和光声气体交换信号。此外, 脉冲式的光声技术区分了光声气体交换信号中的氧气释放和气体吸收信号。

### 3.2 液态光声检测

利用压电传感器可以对渗水叶、叶绿体悬浮液等液态制品因照射光而产生的光声信号进行检测。此时光声池不必密封, 气态光声检测技术所出现的局限性都可以避免, 并且可以将时间分辨率提高到  $1 \text{ ms}$  以内<sup>[21]</sup>。Brumfeld等<sup>[8]</sup>改进的液态调制式光声技术将调制频率提高到  $10 \text{ kHz}$  (也即每周期  $100 \mu\text{s}$ ), 十分有利于研究光合反应中心从微秒级到毫秒级的反应。此外, 液态脉冲式光声仪的时间分辨率已经达到  $50 \text{ ps}$ <sup>[22]</sup>。

液态光声检测的局限性在于不能检测光合气体交换信号, 只能检测光声光热信号和体积信号的变化。

### 3.3 光声技术与叶绿素荧光技术的结合

普遍认为光声放氧信号、光声热信号与叶绿素荧光有密切的关系。为研究这种关系, Snel等<sup>[23]</sup>设计光

声与荧光结合的仪器, 光声池的下表面同时置上检测光声信号的声敏传感器和检测荧光的 PAM 101 的光纤。Kolbowski等<sup>[9]</sup>将脉冲式气态光声与 PAM 101 荧光仪结合起来, 初步显示了荧光、光声放氧、光声能量储存和光声气体吸收信号的同时测量。

## 4 光声光谱技术在光合作用中的应用

### 4.1 光谱扫描

如果单独考虑光声光热效应, 则光声光谱技术可以用来进行非破坏性的植物色素吸收光谱的扫描。改变调制频率和位相可以进行不同深度色素扫描分析<sup>[2, 24-27]</sup>。此外, 不同深度的能量储存扫描结合光纤微探测器可以用来研究不同层次叶肉组织的光能利用梯度<sup>[28]</sup>。但这种光谱扫描的方法具有一定的局限性, 即光声能量储存信号叠加在光声热信号上, 会对色素吸收光谱造成影响<sup>[17]</sup>。

### 4.2 光声能量储存的性质

Carpentier等<sup>[29-31]</sup>采用气态调制型光声技术研究了光系统 I (PS I) 和光系统 II (PS II) 的能量储存性质, 能量储存能量储存的倒数与入射光强 I 呈线性关系, DCMU 处理大大降低 PS II 的能量储存的光饱和曲线中的半光强  $i_{50}$ ; 电子受体铁氰化盐 ( $\text{Fe}(\text{CN})_{6-3}$ ) 也降低了 PS II 的  $i_{50}$ ; 二氯靛酚蓝 (DCIP) 四甲基对苯二胺 (TM PD) 增大了 DCMU 处理的 PS II 的  $i_{50}$  值, 这些结果说明, PS II 的能量储存值反映在调制周期时间内光照导致的 PS II 还原侧质体醌库 (PQ 库) 的还原状态。电子供体、电子受体对 PS I 反应中心能量储存的影响结果说明, PS I 的能量储存也反应在调制周期时间内 PS I 还原侧 FeS 中心的还原状态<sup>[32]</sup>。

### 4.3 环式电子传递

以 PS I 为中心的环式电子传递在生理上的功能和意义一直不太清楚, 其中原因之一是很难直接测量自然状态下环式电子传递。近年来通过光声技术对 PS I 的能量储存的研究, 给出了环式电子传递存在的有力证据。Veeranjaneyulu等<sup>[33]</sup>研究光声放氧信号和能量储存信号的波长谱, 放氧到  $710 \text{ nm}$  处降到 0, 而能量储存在  $700 \sim 720 \text{ nm}$  处还仍然存在; Carpentier等<sup>[30]</sup>用 DCMU 处理绿藻后发现还存在一小部分的能量储存; Canaani等<sup>[34]</sup>利用光声技术发现在光抑制的情况下 PS I 储存一定的能量; Canaani等<sup>[35]</sup>对绿藻 (*Dunaliella salina*) 进行盐胁迫处理 (4M), 与对照相比,  $710 \text{ nm}$  的能量储存上升, 而解耦联剂 nigericin 抑制这种能量储存的上升趋势; 而 DCMU 所抑制不了的能量储存可以用 2, 5-dibromo-

3-methyl 6-isopropyl-p-benzoquinone (DBMIB) 完全抑制, 这些结果都说明存在以 P<sub>680</sub> 为中心的环式电子传递, 而且这种电子传递对植物抗逆性起了十分重要的作用。

研究者利用光声技术对环式电子传递储能的大小和 P<sub>680</sub> 参与环式电子传递的程度以及环式电子流的大小和类型进行讨论<sup>[36-38]</sup>。Jacque<sup>[38]</sup>利用电子受体和抑制剂研究一种藻 *Chlamydomonas reinhardtii*, 以 P<sub>680</sub> 为中心的环式电子传递的类型: 一种环式电子传递对 DBMIB/MV (甲基紫精) 敏感, 说明 PQ 和铁氧还蛋白参与其间; 一种对抗菌素 A (ANT), 粘噻唑菌醇和 2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide (HQNO) 敏感, 说明细胞色素 b<sub>6</sub> (Cytb<sub>6</sub>) 参与其间; 一种为 NADPH 所调节。

#### 4.4 状态转变与爱默生效应

在光合系统中, 两光系统的能量分配可以发生变化, 称为状态转变; 爱默生增强效应直接反映在状态 I 下能量分配有利于 P<sub>SI</sub> 这一现象。利用光声技术可以方便地研究状态转换以及爱默生增强效应。

对于在状态 I 下能量分配有利于 P<sub>SI</sub>, 而在状态 II 下两个光系统的能量分配趋于平衡的机制目前仍解释得不清楚, 有研究者认为激能满溢造成了能量从光系统 II 向光系统 I 的倾斜。激能满溢假说有许多争议, 另一种可能原因是捕光色素蛋白复合物 II (LCHII) 的磷酸化并向基粒非垛叠区的 P<sub>SI</sub> 移动<sup>[39,40]</sup>, 增大了 P<sub>SI</sub> 的吸收光的截面积。

Canaani 等<sup>[40]</sup>利用光声技术和荧光技术研究一种藻 *Nostoc* 在 710nm 光下的爱默生效应, 结果说明在从状态 I 转变到状态 II 时, 有 15% ~ 21% 的能量从 P<sub>SI</sub> 转移到 P<sub>SII</sub>。在这种状态转变中捕光色素蛋白复合物 I (LHI) II 被磷酸化并发生可逆移动<sup>[34]</sup>, 这种转移导致 P<sub>SI</sub> /P<sub>SII</sub> 吸收截面积的显著变化<sup>[33]</sup>, 用磷酸化酶的抑制剂 NaF 可以抑制状态改变的发生<sup>[34]</sup>。

然而用 LCHII 的磷酸化并不能完全解释状态转变发生的机理。Canaani 等<sup>[35]</sup>发现缺失叶绿素的突变苗的状态转变产生的原因是激能满溢, 而正常植株却是 P<sub>SI</sub> /P<sub>SII</sub> 吸收截面积改变造成状态转变。Mullineaux 等<sup>[41]</sup>用液态脉冲式光声仪测量一种藻 (*Cyanobacterial*) 的细胞在状态转变过程中 630 nm 处光热变化过程, 发现在状态 I 和状态 II 下光热组分均为 20% 左右, 说明在状态 II 下, 藻胆蛋白体细胞的捕光复合物并没有离开 P<sub>SI</sub><sup>[42]</sup>。

#### 4.5 应用液态脉冲式光声仪研究光反应中心的原初光化学过程

通常用超快速吸收光谱研究反应中心的电子传

递过程, 但是照光后的反应中心由于分子重排导致结构发生变化, 这种结构变化可能对光谱造成影响<sup>[43]</sup>。近年来研究者应用液态脉冲式光声技术对反应中心在纳秒级到微秒级内光诱导的结构变化进行研究。液态脉冲光声信号由热信号和结构变化引起的体积变化信号所组成, 区分这两种信号可以采用降低温度的方法, 在 4°C 左右热变化信号消失, 只存在体积变化信号。出现的光声负信号被认为是分子重排导致的结构变化引起的, 出现的时间在 50 ns 以内<sup>[22]</sup>, 对于 *Phodobacter* sp-R-2 光合细菌, 这种结构变化发生在 Bchl<sup>+</sup> P<sub>QA</sub> 和 BchlP<sub>QA</sub><sup>-</sup> 之间。这种结构变化导致的体积变化大致在 10 × 10<sup>-10</sup> m<sup>3</sup>/ml<sup>[3]</sup>、20 × 10<sup>-10</sup> m<sup>3</sup>/ml<sup>[22]</sup> 和 32 × 10<sup>-10</sup> m<sup>3</sup>/ml<sup>[8]</sup> 之间, 由于时间分辨率目前还到不 10ps, 还需要进一步研究。

#### 4.6 光声瞬态研究

用气态调制光声技术检测的暗适应叶受光照后出现一个短周期的光声信号 (产生时间小于 1 s), 文献<sup>[17]</sup>上称为 Oxygen Gush 同时或随后出现一系列的复杂的瞬态, 包括光热信号 (能量储存信号), 氧气释放信号, 气体吸收信号, 最后趋向于稳态<sup>[17,42-46]</sup>。这种复杂的光声动态变化曲线和光照强度, 暗适应时间、温度、气体成分等环境因子相关。

暗适应叶在重新照光时, 叶绿素荧光迅速上升的同时光声信号的放氧组分下降<sup>[44,45,47]</sup>。Malkin<sup>[44]</sup>对暗适应 11 min 的叶照 70W m<sup>-2</sup> 强调制光时, 观察到氧峰的下降沿与荧光的上升沿明显相关。可能说明水到 PQ 库电子传递受限从而导致荧光上升而放氧下降。一般而言, 会出现第 2 个峰。在高浓度 CO<sub>2</sub> 下出现负信号, 该负信号被认为代表与光反应过程结合紧密的气体吸收。Havaux<sup>[45]</sup>认为第 1 个氧气释放峰与叶绿素荧光的 O-P 段线性相关, 其他的并没有显著的线形关系。Bukhov 等<sup>[48]</sup>对成熟叶测光声变化和可变荧光淬灭组分 Afast /Aslow 之间的关系发现光照初期 20 s 内, Afast /Aslow 没有变化而氧峰出现下降, 光化学淬灭不变; 20 s 过后, Afast /Aslow 与光声信号的线性相关程度逐渐变大, 光化学淬灭变大。这说明在光照初期 20 s 内, 光系统 II 的初级电子受体 (Q<sub>A</sub>) 全部还原而电子传递到 P<sub>SI</sub> 的能力低, 在 20 s 之后, 光合活性增强, Afast /Aslow 变大说明线性电子传递变强。可能第 1 个氧峰反映的是诱导初期 P<sub>SI</sub> 的电子传递的瓶颈现象<sup>[49]</sup>。

由于高频下光声的信噪比变小, 因而较难准确地观察到能量储存的瞬态变化<sup>[44]</sup>。Snel 等<sup>[23]</sup>以 370 Hz 的调制光测定光化学能量损失/光化学损失, 发现在强饱和背景光 (30W m<sup>-2</sup>) 下存在双相变化, 快过程反

映光合最小热耗散 (小于 10 ms, 此时光合机构处在最有效状态); 慢过程 1 s 内完成, 在这个时间段非光化学淬灭并未形成, 因而说明光合系统的电子传递受限。在前 30 s 内, 放氧与光化学损失不成比例, 可能是某种电子传递并未伴随着能量储存的产生。Malkin 等<sup>[12]</sup>用水渗叶在低频下观察能量储存的瞬态变化, 一开始出现最大光热信号 (即能量储存最小), 随后趋于稳态。然而这种瞬态并未小到可以忽视的程度, 因此, 他认为这种能量储存瞬态可能反映 PS I 途径的电子传递 (内源电子供体或循环式电子传递) 30 min 暗适应可使这种能量储存瞬态达到最小。低光强的能量储存瞬态接近于稳态而高光强的能量储存瞬态值下降, 说明甚至在光合诱导的初期, 低光强下的 PSII 仍保持着有效的光化学电子传递。诱导期间光声热信号也曾出现几个瞬态峰, 与放氧和气体吸收峰相对应。

在研究光声放氧动力学过程中, 有研究者发现在某些情况下出现气体吸收信号<sup>[50]</sup>。光声气体吸收信号是与光声氧气释放信号叠加在一起的, 为区分这两种信号, Kolbowski 等<sup>[9]</sup>设计计算机控制的脉冲调制系统分析光声信号, 发现氧气释放峰在 5 ms, 而气体吸收峰在 7 ms。Reising 等<sup>[6]</sup>利用这种结合荧光的新颖光声仪进一步研究光声气体吸收瞬态。发现气体吸收和类囊体膜能量化有紧密的关系, 非光化学淬灭上升伴随着气体净释放的略微下降。高浓度的 CO<sub>2</sub> 诱导这种气体吸收的发生。在 MV 存在的情况下, 低浓度的氧气和高浓度的氧气环境中, 气体吸收峰面积不一致, 说明这种气体吸收并不是 (1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶 加氧酶) 催化的羧化或加氧反应。因此目前认为这种气体吸收有两种可能: (1) 因为光诱导的基粒 pH 值升高<sup>[51]</sup> 随后高 pH 值诱导碳酸盐的形成导致 CO<sub>2</sub> 的吸收<sup>[52]</sup>; (2) 各种类型的 O<sub>2</sub> 吸收<sup>[53, 54]</sup>。

光声气体信号中出现气体吸收信号, 但这种气体吸收信号到底是 O<sub>2</sub> 吸收还是 CO<sub>2</sub> 吸收? 如果不解决这个问题, 光声技术研究在检测光合作用气体信号上就有很大的局限性。Reising 等<sup>[55]</sup>应用光声脉冲调制技术, 加入碳酸酐酶的抑制剂 ethoxzolamide, 部分抑制了这种吸收信号, 但不影响 O<sub>2</sub> 释放和荧光诱导曲线, 暗示这种吸收是 CO<sub>2</sub> 快速溶解所致 (为碳酸酐酶所催化) Havaux 等<sup>[50]</sup>在研究热胁迫时发现 48°C 3 min 热胁迫导致气体吸收的产生。起初他认为这种气体吸收是热胁迫导致的 Mehler 反应加速进行。在随后的研究中, Havaux 等<sup>[56]</sup>认为这种气体吸收是快速的 CO<sub>2</sub> 快速溶解, 热导致的这种气体吸收对 DCMU 不敏感, 对 PC 抑制剂 HgCl<sub>2</sub> 敏感, 这些结果说明了热

胁迫下气体吸收联系着 PSI, 而与 PSII 无关。Tabrizi 等<sup>[57]</sup>对 CO<sub>2</sub> 吸收曲线增加了一个修正系数, 解决了 CO<sub>2</sub> 吸收曲线随其浓度变化的影响, 其实验结果证明这种气体吸收与质子梯度的建立紧密相关。Reising 等<sup>[58]</sup>用烟草突变植株再次证明这种气体吸收是 CO<sub>2</sub> 快速吸收。

如果这种气体吸收是 CO<sub>2</sub> 快速吸收的话, 可以用光声技术研究自然状态下碳酸酐酶在光合作用中的功能, 而在以前是很难做到这一点的<sup>[58]</sup>; 可以采用 Poulet 等<sup>[5]</sup>的方法精确得到放氧的相对量子产率; 此外, 可以更好解释 Canaani 等<sup>[40, 59]</sup>所谓的弱光适应态。

## 4.7 环境胁迫

### 4.7.1 热胁迫与冷胁迫

Havaux 等<sup>[50]</sup>用光声技术测量两种蚕豆叶片在热胁迫下的氧相对量子产率和能量储存, 发现耐热品种的氧相对量子产率和能量储存比不耐热品种保持稳定的时间长, 而能量储存又比放氧稳定, 这说明 PS I 较 PSII 对热胁迫不敏感。低光强可以保护蚕豆叶片抵抗 40°C 的温和胁迫, 而且热胁迫刺激了 PS I 的能量储存, 这说明与 PS I 相连的环式磷酸化活性增强以产生 ATP 来修补被破坏的 PSII<sup>[60]</sup>。此外, 48°C 胁迫下 3 min 光声信号出现的气体吸收被认为是 Mehler 反应所产生的 O<sub>2</sub> 光还原<sup>[50]</sup>。Havaux 等<sup>[61]</sup>研究 PSII 对热胁迫的短期响应, 发现 PSII 存在着独立于 PSI 的电子流途径, 这说明在热胁迫条件下 PSII 存在着一种自我保护机制。

Yakir 等<sup>[62, 63]</sup>结合叶绿素荧光和光声技术研究冷胁迫对西红柿叶片的影响发现黑暗中冷胁迫对氧释放量子产率、叶绿素荧光和二氧化碳的吸收均无明显的影响, 而一旦照光, 三者均急剧下降。

### 4.7.2 光抑制

Buschman<sup>[64]</sup>在研究中发现萝卜子叶被强光 (600 W m<sup>-2</sup>) 抑制 15 min 内, 能量储存大大减小, 同时伴随可变荧光的降低。Havaux<sup>[65]</sup>在 329 Hz 频率下测豌豆叶片的光热值, 发现在强光 (4000 μmol photons/m<sup>2</sup> × s) 下 15 min 内, 光热值增长了两倍, 而在 685 nm 处叶绿素荧光和放氧信号 (14 Hz) 都降低。这说明非辐射的热耗散的升高是叶片对强光的一种保护机制的反映, 在强光胁迫下, 光合系统把吸收的过多能量以热的形式散发出去。Canaani 等<sup>[34]</sup>发现能量储存要比氧气释放对光抑制不敏感, 这也许是环式磷酸化的作用。

光抑制下光声热信号升高的机理目前并不清楚, 一个观点认为光系统热耗散的升高伴随着类囊体 pH

值梯度的建立和荧光发射的降低<sup>[11]</sup>。叶绿素荧光的能量淬灭 $q_E$ 反映了质子梯度的建立,然而 $q_E$ 在暗中数秒内即恢复,而光声热在暗中恢复很慢<sup>[65]</sup>。

Hav aux 等<sup>[60]</sup>用(DTT)二硫代苏糖醇处理受光抑制的叶片,抑制了玉米黄素的形成,同样造成了光热值的上升,说明热散失升高不是因为玉米黄素形成导致。

#### 4.7.3 水分胁迫

用光声技术和荧光技术结合起来的方法对水分胁迫下的西红柿叶片的研究表明,PSII的人工电子供体可以减缓干旱对PSII氧化侧的伤害,PSI相对来说不受干旱影响,状态I到状态II的改变受到抑制,这使叶片处在状态I,光能量分配有利于PSII<sup>[66]</sup>。快速的水分胁迫主要影响PSII的氧化侧,而慢的水分消耗在前6d主要影响能量储存,PSI保持稳定,进一步的缺水将损害PSI,使双光增益大大降低<sup>[67]</sup>。

## 5 结束语

应用光声光谱技术在研究光合作用的过程中出现了许多新的现象需要解释,比如说光热信号与叶绿素荧光的能量淬灭之间的关系;光声放氧信号中出现的氧峰信号产生的机理;光声气体吸收信号到底是O<sub>2</sub>吸收还是CO<sub>2</sub>的快速溶解;光声检测到的反应中心在原初光化学反应过程中体积变化所发生的时间和大小等等。这些现象有的已得到初步结论,有的还在研究过程中,但无疑光声光谱技术在光合作用研究中的应用大大开拓了视野,丰富了我们对光合作用机理的认识。

### 参考文献

- 1 Rosencwaig A, Gersho A. Theory of the photoacoustic effect with solid. *J Appl phys*, 1976, 47: 64~ 69.
- 2 Adams M J, Beadle B C, King A A, et al. Analytical photoacoustic spectrometry, part II. Ultra-violet and visible photoacoustic spectra of some inorganic, biochemical and phytochemical samples. *Analyst*, 1976, 101: 553~ 556.
- 3 Malkin S, Churio M S, Shochat S, et al. Photochemical energy storage and volume changes in the microsecond time range in bacterial photosynthesis—a laser induced photoacoustic study. *J Photochem Photobiol B Biol*, 1994, 23: 79~ 85.
- 4 Bults G, Horwitz B A, Malkin S, et al. Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in whole leaves photochemistry and gas exchange. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 679: 452~ 465.
- 5 Poulet P, Cahen D, Malkin S. Photoacoustic detection of

- photosynthetic evolution from leaves. *Biochim Biophys Acta*, 1983, 724: 433~ 446.
- 6 Reising H, Schreiber U. Pulse-modulated photoacoustic measurements reveal strong gas-uptake component at high CO<sub>2</sub>-concentrations. *Photosynth Res*, 1992, 31: 227~ 238.
- 7 Bukhov N G, Samson G, Carpentier R. Nonphotosynthetic reduction of the intersystem electron transport chain of chloroplasts following heat stress. *Photochem Photobiol*, 2000, 72(3): 351~ 357.
- 8 Brumfeld V, Nagy L, Kiss V, et al. Wide-frequency hydrophone detection of laser-induced photoacoustic signals in photosynthesis. *Photochem Photobiol*, 1999, 70(4): 607~ 615.
- 9 Kolbowski J, Reising H, Schreiber U. Computer-controlled pulse modulation system for analysis of photoacoustic signals in the ms time domain. *Photosynth Res*, 1990, 25: 309~ 316.
- 10 de Paula M H, Vinha C A, Cortez M A de A, et al. Determination of photochemical loss in leaves by an open-ended photothermal cell. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1321: 179~ 182.
- 11 Fork D C, Herbert S K. The application of photoacoustic techniques to studies of photosynthesis. *Photochem Photobiol*, 1993, 57(1): 207~ 220.
- 12 Malkin S, Charland M, Leblanc R M. A photoacoustic study of water infiltrated leaves. *Photosynth Res*, 1992, 33: 37~ 50.
- 13 Ducharme D A, Tessier, Leblanc R M. Design and characteristics of a cell for photoacoustic spectroscopy of condensed matter. *Rev Sci Instrum*, 1979, (50): 1461~ 1462.
- 14 樊大勇,高荣孚.对用于光合作用研究的光声光谱仪数据采集系统的改进. *分析仪器*, 2000, 1: 20~ 24.
- 15 Han T, Vogelmann T C. A photoacoustic spectrometer for measuring heat dissipation and oxygen quantum yield at the microscopic level within leaf tissues. *J Photochem Photobiol*, 1999, (48): 158~ 165.
- 16 Fork D C, Herbert S K. A gas-permeable photoacoustic cell. *Photosynth Res*, 1991, (27): 151~ 156.
- 17 Malkin S. The use and characteristics of the photoacoustic method in the study of photosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1994, 45: 493~ 526.
- 18 Bento A C, Aguiar M M F, Vargas M D, et al. Open photoacoustic cell X-ray detection. *Appl Phys B*, 1989, 48: 269~ 272.
- 19 Mauzerall D C. Determination of oxygen emission and uptake in leaves by pulsed, time resolved photoacoustics. *Plant Physiol*, 1990, 94: 278~ 283.
- 20 Canaani O, Malkin S, Mauzerall D. Pulsed photoacoustic detection of flash-induced oxygen evolution from intact leaves and its oscillations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, (85): 4725~ 4729.

- 21 Peters K S, Synder G J. Timed-resolved photoacoustic calorimetry probing the energetics and dynamics of fast chemical and biochemical reactions. *Science*, 1988, 241: 1053~ 1057.
- 22 Mauzerall D C, Gunner M R, Zhang J W. Volume contraction on photoexcitation of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 internal probe of dielectrics. *Biophysical J*, 1995, 68: 275~ 280.
- 23 Snel J F H, Kooijman M, Vredenberg W J. Correlation between chlorophyll fluorescence and photoacoustic signal transients in spinach leaves. *Photosynth Res*, 1990, 25: 259~ 268.
- 24 Buschmann C. Photoacoustic measurements application in plant science. *Phil Trans R Soc Lond*, 1989, (323): 423~ 434.
- 25 韩涛,高荣孚.用于光合作用研究的光声光谱仪.分析仪器,1991,4: 16~ 21.
- 26 杜浩,方建文.植物叶片的光声光谱.生物化学与生物物理进展,1991,18(1): 53~ 55.
- 27 杜浩,方建文,郑金菊.植物叶片的相位解析光声光谱和光声相位谱.生物化学与生物物理进展,1994,21(2): 158~ 161.
- 28 樊大勇,韩涛,李竟,等.大叶黄杨 (*Euonymus japonicus* T.)叶片内部光能利用梯度.植物学报,2003,45(2): 169~ 176.
- 29 Carpentier R, Matthija H C P, Leblanc R M, et al. Monitoring energy conversion in photosystem I of cyanobacteria heterocysts by photoacoustic spectroscopy. *Can J Phys*, 1986, (64): 1136~ 1138.
- 30 Carpentier R, Leblanc R M, Mimault M. Photoacoustic detection of photosynthetic energy storage in Photosystem II submembrane fractions. *Biochim Biophys Acta*, 1989, (975): 370~ 376.
- 31 Carpentier R, Owens T G, Leblanc R M. Simultaneous saturation of variable fluorescence yield and photoacoustically monitored chemical emission in thylakoid membranes. *Photochem Photobiol*, 1991, (53): 565~ 569.
- 32 Owens T G, Carpentier R, Leblanc R M. Detection of photosynthetic energy storage in a photosystem I reaction center preparation by photoacoustic spectroscopy. *Photosynth Res*, 1990, 24: 201~ 208.
- 33 Veeranjeyulu K, Charland M, Charleois D, et al. Photosynthetic energy storage of Photosystems I and II in the spectral range of photosynthetically active radiation in intact sugar maple leaves. *Photosynth Res*, 1991, 30: 131~ 138.
- 34 Canaani O, Schuster G, Ohad I. Photoinhibition in *Chlamydomonas reinhardtii*: effect on state transition; intersystem energy distribution and photosystem I cyclic electron flow. *Photosynth Res*, 1989, (20): 129~ 146.
- 35 Canaani O. The role of cyclic electron flows around Photosystem I and excitation energy transfer distribution between the photosystems upon acclimation to high ionic stress in *Dunaliella salina*. *Photochem Photobiol*, 1990, (52): 591~ 599.
- 36 Herberter S K, Fork D C, Malkin S. Photoacoustic measurements in-vivo of energy storage by cyclic electron flow in algae and higher plants. *Plant Physiol*, 1990, 94: 926~ 934.
- 37 Shmuel M. Light distribution, transfer and utilization in the marine red alga *Prophyra perforata* from photoacoustic energy-storage measurements. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 990: 177~ 189.
- 38 Jacques R. The cyclic electron pathways around photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii* as determined in vivo by photoacoustic measurements of energy storage. *Planta*, 1994, 193: 251~ 259.
- 39 Chow W S. State II transition in leaves and its association with ATP-induced chlorophyll fluorescence quenching. *Biochim Biophys Acta*, 1981, (638): 60~ 68.
- 40 Canaani O, Barber J, Malkin S. Evidence that phosphorylation and dephosphorylation regulate the distribution of excitation energy between the photosystems of photosynthesis in vivo: photoacoustic and fluorimetric study of an intact leaf. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, (81): 1614~ 1618.
- 41 Mullineaux C W, Griebenow S, Braslavsky S E. Photosynthetic energy storage in cyanobacterial cells adapted to light-states 1 and 2. A laser-induced photoacoustic study. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1060: 315~ 318.
- 42 Bruce D, Salehian O. The efficiency of primary photosynthetic processes in state 1 and state 2. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1100: 242~ 250.
- 43 Puchenkov O V, Kopf Z, Malkin S. Photoacoustic diagnostics of laser-induced processes in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1231: 197~ 212.
- 44 Malkin S. Fast photoacoustic transients from dark-adapted intact leaves: oxygen evolution and uptake pulses during photosynthetic induction: a phenomenology record. *Planta*, 1987, 171: 65~ 72.
- 45 Havaux M. Induction of photosynthesis in intact leaves under normal and stressing conditions followed simultaneously by transients in chlorophyll fluorescence and photoacoustically monitored O<sub>2</sub> evolution. *Plant Physiol Biochem*, 1988, 26: 695~ 704.
- 46 樊大勇,高荣孚.光声所检测的放氧动力学.北京林业大学学报,2001,2: 11~ 16.
- 47 Vredenberg W J, Snel J H F, Buurmeijer W F, et al. Application of non-invasive spectroscopic and photoacoustic techniques in research on photosynthetic performance of intact leaves. *Photosynthetica*, 1992, 27: 207~ 215.
- 48 Bukhov N G, Carpentier R. The efficiency of electron

- transfer from  $Q_A$  to the donor side of Photosystem II decreases during induction of photosynthesis. Evidences from chlorophyll fluorescence and photoacoustic techniques. *Photosynth Res*, 1996, 47: 13~ 20.
- 49 Bukhov N G, Boucher N, Carpentier R. The correlation between the induction kinetics of the photoacoustic signal and chlorophyll fluorescence in barley leaves is governed by changes in the redox state of the photosystem II acceptor side. A study under atmospheric and high CO<sub>2</sub> concentrations. *Can J Bot*, 1997, 75: 1399~ 1406.
- 50 Havaux M, Canaani O, Malkin S. Oxygen uptake by tobacco leaves after heat shock. *Plant Cell Environ*, 1987, 10: 677~ 683.
- 51 Laisk A, Oja V, Kürats O, et al. The state of the photosynthetic apparatus in leaves as analysed by rapid gas exchange and optical methods the pH of the chloroplast stroma and activation of enzymes *in vivo*. *Planta*, 1989, 177: 350~ 358.
- 52 Lonimer G H, Chen Y-R, Hartman F C. A role for the  $\epsilon$ -amino group of lysine-334 of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase in the addition of carbon dioxide to the 2, 3-enediol (ate) of ribulose-1, 5-bisphosphate. *Biochemistry*, 1993, 32: 9018~ 9024.
- 53 Park, YH, Chow W S, et al. Electron transport to oxygen mitigates against the photoinactivation of photosystem II *in vivo*. *Photosynth Res*, 1996, 50: 23~ 32.
- 54 Hormann H, Neubauer C, Schreiber U. An active Mehler-peroxide reaction sequence can prevent cyclic PSI electron transport in the presence of dioxygen in intact spinach chloroplasts. *Photosynth Res*, 1994, 41: 429~ 437.
- 55 Reising H, Schreiber U. Inhibition by ethoxzolamide of a photoacoustic uptake signal in leaves: evidence for carbonic anhydrase catalyzed CO<sub>2</sub>-solubilisation. *Photosynth Res*, 1994, 42: 65~ 73.
- 56 Havaux M, Malkin S. Studies on photoacoustic uptake signals in tobacco leaves under high carbon dioxide levels. *Photosynth Res*, 1998, 58: 293~ 302.
- 57 Tabrizi H, Schinner K, Spors J, et al. Deconvolution of the three components of the photoacoustic signal by curve fitting and the relationship of CO<sub>2</sub> uptake to proton fluxes. *Photosynth Res*, 1998, 57: 101~ 115.
- 58 Reising H, Keß, H, Price G D, Badger M R, et al. The main photoacoustic gas uptake signal reflects light-induced CO<sub>2</sub> uptake associated with stroma alkalization: new evidence based on carbonic-anhydrase-antisense transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39(40): 462~ 465.
- 59 Canaani O, Malkin S. Physiological adaptation to a newly observed low light intensity state in intact leaves, resulting in extreme imbalance in excitation energy distribution between the two Photosystems. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 766: 525~ 532.
- 60 Havaux M, Gruszehci W I, Dupont I, et al. Increased heat emission and its relationship to the xanthophylls cycle in pea leaves exposed to strong light stress. *J Photochem Photobiol B*, 1991, 36: 1~ 370.
- 61 Havaux M, Tardy F. Temperature-dependent adjustment of the thermal stability of photosystem II *in vivo*: possible involvement of xanthophyll-cycle pigments. *Planta*, 1996, 198: 324~ 333.
- 62 Yakir D, Rudich J, Bravdo B A, et al. Prolonged chilling under moderate light-effect on photosynthetic activity measured with the photoacoustic method. *Plant Cell Environ*, 1986, 9: 581~ 588.
- 63 Yakir D, Rudich J, Bravdo B-A. Photoacoustic and fluorescence measurements of the chilling response and their relationship to carbon dioxide uptake in tomato plants. *Planta*, 1985, 164: 345~ 353.
- 64 Buschmann C. Induction kinetics of heat emission before and after photoinhibition in cotyledons. *Photosynth Res*, 1987, (14): 229~ 240.
- 65 Havaux M. Increased thermal deactivation of excited pigments in pea leaves subjected to photoinhibitory treatments. *Plant Physiol*, 1989, (89): 286~ 292.
- 66 Michel H. Photosynthetic responses of leaves to water stress expressed by photoacoustic and related methods—the effect of rapid drought on the electron transport and the relative activities of the two photosystems. *Plant Physiol*, 1986, 82: 829~ 834.
- 67 Michel H. Photosynthetic responses of leaves to water stress, expressed by photoacoustic and related methods probing the photoacoustic method as indicator for water stress *in vivo*. *Plant Physiol*, 1989, 82: 827~ 833.

(责任编辑: 邓大玉)