如何选配最适用的叶绿素荧光成像系统

叶绿素荧光成像系统已经逐渐取代传统的叶绿素荧光仪，成为国内外植物生理生态及相关基因组、表型组学研究的必备仪器。本文主要给需要装备叶绿素荧光成像系统的老师，从技术应用的角度讲解一下如何选配最适用的叶绿素荧光成像系统。

一、 叶绿素荧光成像技术的发展

1. 传统叶绿素荧光仪

基于叶绿素荧光测量技术，目前国际上主流的商用叶绿素荧光仪主要有以下三大类（图 1）：

- 连续激发式荧光仪 Direct Fluorometer，代表仪器 PEA
- 脉冲调制式荧光仪 Pulse Amplitude Modulated Fluorometer，代表仪器 PAM
- 双调制式荧光仪 Double-Modulation Fluorometer，代表仪器 FL3500

其中的**双调制式荧光仪**无疑是目前功能最全面、性能最强的一类叶绿素荧光仪。

图 1. 国际主流商用叶绿素荧光仪

2. 叶绿素荧光仪的局限性

在多年的仪器使用研究之后，科学家们逐渐发现了叶绿素荧光仪有一些难以解决的局限性。

1） 仅能通过光纤测量一个点的总值。无法展示样品不同部位、结构的差异，更难以研究胁迫受损组织的分布以及受损部分和健康部分的差异，测量的数据无法代表测量样品的全部情况（图 2）。

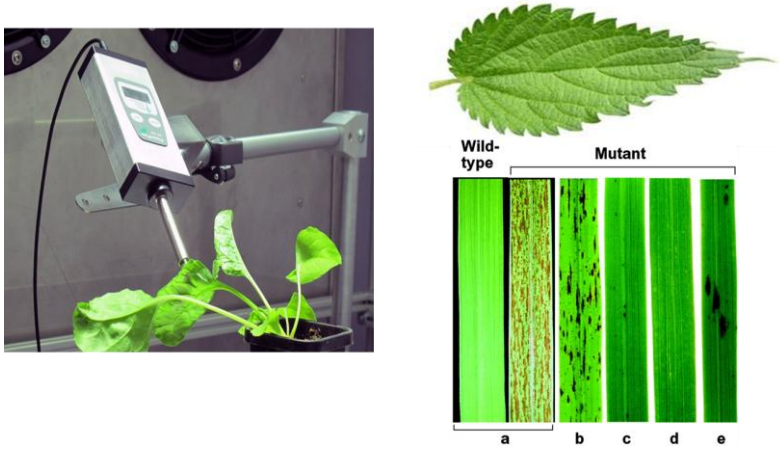


图 2. 仅能测量一点的叶绿素荧光仪无法全面反映植物的情况

2） 只能获得数据和动力学曲线图，结果不够直观（图 3）。

OJIP-455		NPQ1-455	
Bckg	195	Fo	26399
Fo	42329	Fm	68793
Fj	72141	Fp	51498
Fi	92656	Fm_L1	62356
Fm	110504	Fm_L2	61185
Fv	68175	Fm_L3	60795
Vj	0.437	Fm_L4	60308
Vi	0.738	Fm_Lss	59690
Fm/Fo	2.611	NPQ_L1	0.10
Fv/Fo	1.611	NPQ_L2	0.12
Fv/Fm	0.617	NPQ_L3	0.13
Mo	0.622	NPQ_L4	0.14
Area	24861640	NPQ_Lss	0.15
Fix Area	104907436	Qp_L1	0.36
HACH Area	62580129	Qp_L2	0.37
Sm	364.674	Qp_L3	0.39
Ss	0.703	Qp_L4	0.39
N	518.558	Qp_Lss	0.46
Phi_Po	0.617	Rfd	0.13
Psi_o	0.563	Fm_D1	64079
Phi_Eo	0.347	Fm_D2	66258
Phi_Do	0.383	Fm_D3	66680

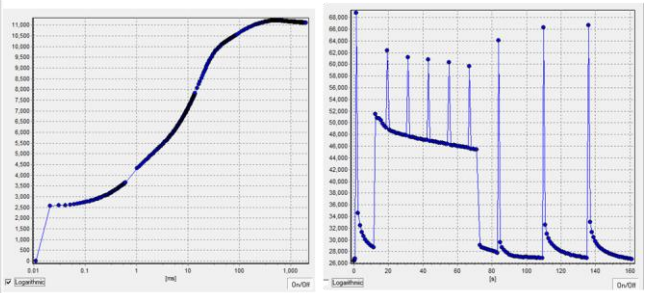


图 3. FP100 叶绿素荧光仪测量结果

3） 测量样品要求尽量平整，基本上只能测量叶片的一点或者藻液，不能测量果实、花朵、种子、整个叶片、整株植物和冠层等，微观上也不能测量单个微藻或植物细胞乃至叶绿体（图 4）。

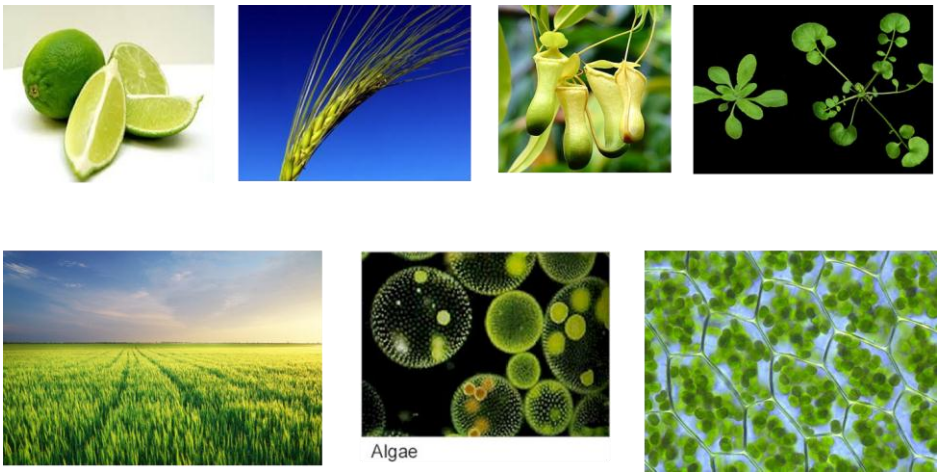


图 4. 叶绿素荧光仪难以测量的植物样品

4）在进行光合相关突变体筛选时经常要筛选几百到上千个样品，使用叶绿素荧光仪一次只能测量一个样品，工作量极大。

3. 叶绿素荧光成像技术的出现与成熟

随着 **Charge-Coupled Device(CCD)相机技术、电脑图像分析技术以及 LED 光源板技术**的成熟，从上世纪八十年代末开始，叶绿素荧光成像技术开始逐渐发展起来（Daley et al.1989; Raschke et al. 1990; Mott et al. 1993; Genty and Meyer 1994; Bro et al. 1995; Siebke and Weis 1995; Meyer and Genty 1998; Balachandran et al. 1994; Oxborough and Baker 1997；Nedbal 2004）。

Ladislav Nedbal 等于上世纪 90 年代末期发明了与 PAM 技术相结合的叶绿素荧光成像技术，研制成功了第一台 **FluorCam 调制式叶绿素荧光成像仪**（Nedbal，2000）。无论是叶绿素荧光权威书籍《Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis》（Nedbal 也是本书的合作作者之一），还是引用次数高达 1200 的叶绿素荧光研究综述《Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo》都将 FluorCam 调制式叶绿素荧光成像技术的出现作为叶绿素荧光研究进入二维时代的里程碑。

二、 如何选配叶绿素荧光成像系统

在选配仪器时，我们都要考虑这样两个相互关联的问题：

- **如何根据实验设计选择合适的叶绿素荧光成像系统型号和配置？**
- **如何分辨叶绿素荧光成像仪器的优劣？**

而在我们准备围绕叶绿素荧光成像系统进行实验设计时，一般需要考虑以下这些方面。这其中就包含着上面两个问题的答案。

- **文献发表情况**
- **测量什么样品**
- **室内实验还是野外实验**
- **测量哪些参数**
- **软件分析功能**
- **经费**

因为经费问题不是技术上能解决的，所以本文只分别讨论前五项问题。

1. 文献发表情况

在进行实验设计之前，我们都需要阅读大量的文献。这不但是为了从前人的研究中获得实验思路和灵感，也是为了从文献得到测量数据精确可靠、国际认可度高的仪器。这从发表文献的数量和质量上可以有一个直观的结果。谷歌学术就是很好的检索筛选平台（图 5）。虽然结果不一定准确，

比如说 FluorCam 因为有十余种不同型号，仅检索 FluorCam 很多文献都查不到；而 CF Imager 只有一种型号。但是在很大程度上，谷歌学术的检索结果是可以代表仪器的质量和在国际上的知名度的。

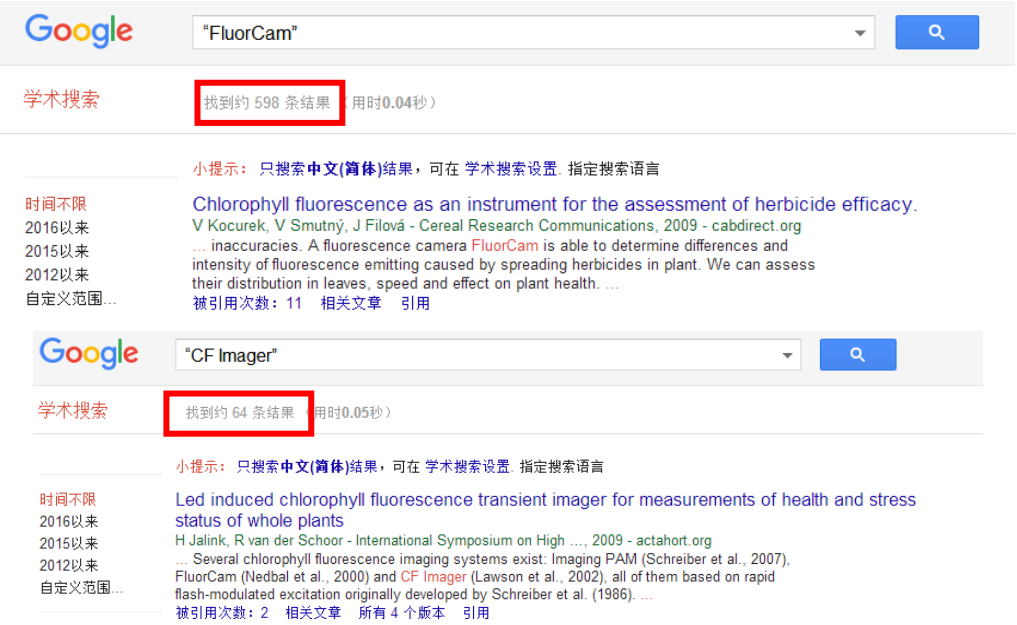


图 5. FluorCam 和 CF Imager 在谷歌学术上的检索结果

2. 测量什么样品

1） 成像面积

之后我们就需要根据研究的具体样品来确定我们需要的仪器成像面积。如果测量较小的叶片或者大叶片的一部分，那么 3.5×3.5cm^2 可能就足够了。如果需要测量大叶片、单株或多株小型植株如拟南芥、96 孔板（可以是刚发芽的拟南芥也可以是微藻），那就需要 13×13cm^2 或 20×20cm^2 的成像面积。测量较大的植株乃至冠层，那也许就要 35×35cm^2 的成像面积。如果是想研究微藻细胞甚至叶绿体，那么当然是需要配 20 倍/40 倍显微成像（图 6）。

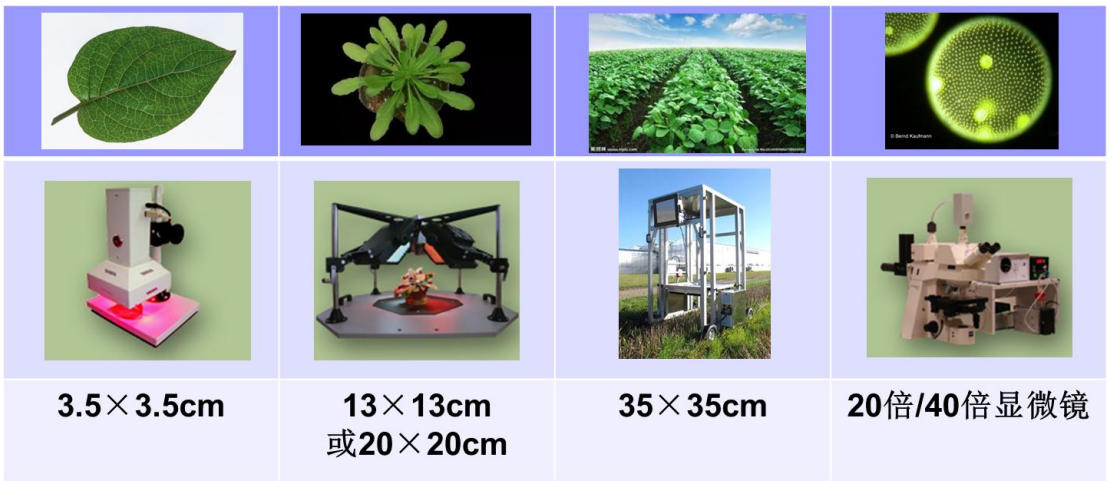


图 6. 不同实验样品决定了需要配备仪器的成像面积

那么仪器的成像面积是由什么决定的？这绝不是厂家宣传资料上随便说的，这需要一系列软硬件技术的支持。

Fluorescence imaging is a technique whose development has kept pace with improvements in LED technology. For reliable imaging measurements, it is critical that the whole sample area be illuminated homogeneously（Kalaji，2014）.

由此我们知道了**荧光成像首先就需要在整个成像面积中保证均匀一致的光照**。那么如何保证做到这一点呢？第一是使用最新的大型一体成型 LED 光源代替旧式的小型 LED，第二就是保证每块 LED 光源板的面积至少要和成像面积一样大，而不是使用较小光源板甚至用多块小型光源板进行光场拼接。对于超大成像面积 35×35cm^2，FluorCam 为了保证光场的均匀，甚至使用面积增加 4 倍 72×72cm^2 的光源板（图 7）。

图 7. 从左至右分别是：FluorCam 开放式的 4 块 13×13cm^2 光源板，野外移动式的 72×72cm^2 光源板和实际测量情况

另外一个决定成像面积和质量的硬件就是 CCD 传感器和镜头。这里可能会有一个误区，那就是**分辨率越高越好吗？**

当然不是，实际上这和我们使用的一般数码相机是类似的。荧光成像使用 CCD 的分辨率与灵敏度是存在如下竞争关系的（图 8）。

高灵敏度CCD		高分辨率CCD	
分辨率	灵敏度	分辨率	灵敏度
720 x 560	50帧/秒	1392 x 1040	1帧/秒
		1024 x 768	10帧/秒
		696 x 520	25帧/秒
		464 x 344	20帧/秒
		348 x 256	50帧/秒

图 8. 荧光成像 CCD 分辨率与灵敏度的关系

那么我们究竟应该选择什么样的 CCD？我们知道，叶绿素荧光是一种瞬态荧光，会随着光源的变化而快速变化。叶绿素荧光分析就是测量这一系列的动力学变化曲线。这样我们就很清楚 CCD 的

灵敏度要比分辨率更重要，灵敏度太低测量荧光动力学变化的精度肯定不够。而 50 帧/秒的灵敏度配合 720×560 的分辨率已经是现在商用叶绿素荧光成像仪器能够达到的上限了。1392×1040 分辨率其实是用于测量 GFP 等荧光蛋白发出的稳态荧光的。

真实的成像质量又如何考察呢？因为荧光成像获得的彩色成像图一般都会放到文献中，作为荧光参数分布变化的直接证据，所以我们从文献中就可以直接看出成像质量。图 9 即为中科院植物所两个科研团队发表文章中的叶绿素荧光成像图（Mao，2015；Fan，2015）。两篇文章的科研水平都非常高，但仅从其测量叶绿素荧光成像图的质量来说，优劣非常明显。叶绿素荧光成像技术最重要的目的就是要解决如何表现叶绿素荧光数据在植物样品上分布和差异的问题。但在图 9 左侧使用 CF Imager 得到的成像图中，我们只能看到叶绿素荧光数据在拟南芥叶片上的斑块分布，这种分布与叶片的结构及生理变化不能看出有什么关系。而右侧使用 FluorCam 成像图中，我们不但能很明显的看出不同叶片之间的差异，甚至可以看清叶脉和叶肉之间的差异。这可能就是由于 CF Imager CCD 性能不佳造成的。

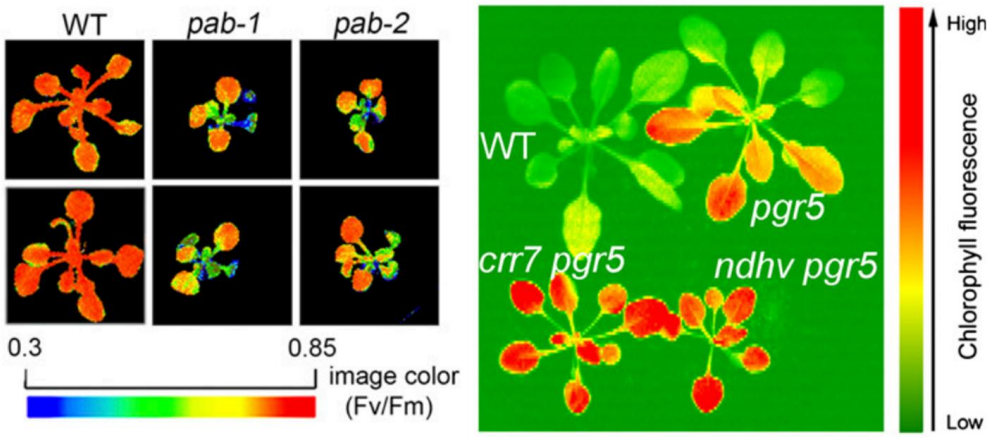


图 9. CF Imager（左，Mao，2015）和 FluorCam（右，Fan，2015）各自发表在文献中的成像图

2） 选择光源

我们还要确定仪器光源的光质和光强。进行叶绿素荧光成像测量时一般使用红光、蓝光或白光。白光能更好地模拟自然光照；红光和蓝光则与叶绿素吸收峰对应，效率较高。但在一些特殊情况下，比如测量色素复杂的藻类或者研究不同光质对植物荧光的影响，那就可能需要绿光、青光、棕色光等光源。

光强则需要根据研究的植物类型和研究目的来确定。一般来说，阳生植物需要仪器能达到较高的光强，阴生植物则使用较低的光强即可满足。图 10 为根据已经发表的几十篇文献中总结的不同植物样品使用的 actinic light（活化光）和 saturating pulse（饱和脉冲）光强。但这是文献中公开的数据，仅能作为参考，实验中还需要根据样品的实际情况通过一系列预实验获得真正适用的光强。

植物样品	Actinic light	Saturating pulse
拟南芥	50-1500	700-4000
水稻	400-1500	6000
冬小麦	400	3000
大麦		4000
高粱	200	1250
西红柿		2500,3500
小立碗藓	850	4000
鳄梨	400	2000
茅膏菜	100-1800	3000

图 10. 通过文献总结的不同植物样品使用的光强，单位为 μmol/m^2/s

另外还在测量中，还可能遇到一些别的情况。比如 2000 μmol/m^2/s 的饱和脉冲可能足够进行 Fm 的测量，但是对于在较高的光照下测量 Fm'则可能太低了（Murchie，2013）。对于 C4 植物，可能还需要更高的饱和光闪。Earl 和 Ennahli（2004）在研究玉米时甚至发现 7500 μmol/m^2/s 以上的饱和脉冲才能测得最大的 Fm'。这与样品类型和具体实验情况有很大关系，都需要在预实验中确定。

3. 室内实验还是室外实验

室内实验和室外实验的仪器型号有很大差异。室外实验使用的仪器如果强调便携，就只能设计成较小的成像面积和光源光强；如果要进行大型植株或者冠层测量，就只能将大型的成像光源板安装在野外移动支架上，体积、重量和成本都会大幅增加（图 11）。实验室和温室内则可以使用一些安装在普通实验台上的型号，或者与人工气候室相结合，组成自动表型成像系统（图 12）。一般来说，在空间运行的情况下，野外型号都可以用于室内。室内型号除了在少数情况下，一般不用于室外。另外，不同型号可以实现的扩展功能也有所不同。

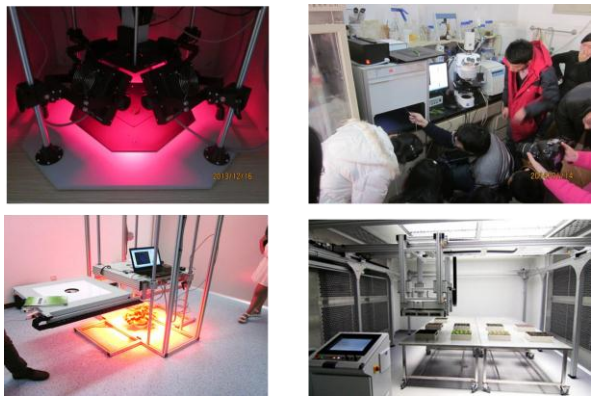


图 11. FluorCam 用于室内的开放式、封闭式、显微式、大型成像平台和表型成像平台

图 12. FluorCam 用于室外的便携式、光合联用式、野外移动式和野外表型成像平台

4. 测量哪些参数

1） 叶绿素荧光参数

FluorCam 的所有型号可以测量并自动计算几乎所有调制式叶绿素荧光参数及其动力学曲线，在目前的商用叶绿素荧光成像仪器中是最全面的。

a) **Fv/Fm：**测量参数包括 F_0，Fm，Fv，Fv/ Fm 等

b) **Kautsky 诱导效应：**F_0，Fp，Fv，Ft_Lss，QY，Rfd 等荧光参数

c) **荧光淬灭动力学分析：**F_0，Fm，Fp，Fs，Fv，Fv/ Fm，QY，Φ_{psII}，NPQ，qP，Rfd，qN，qL 等

d) **光响应曲线：**F_0，Fm，Fv/ Fm，QY_Ln，NPQ，qP ，ETR 等荧光参数

那么，**叶绿素荧光成像仪器可以测量 OJIP 快速荧光动力学曲线吗？**测量 OJIP 快速荧光动力学曲线需要仪器检测器的灵敏度达到 100 000 次/秒以上。这是一般叶绿素荧光成像仪器无法达到的。FluorCam 则有两个型号——FluorCam 封闭式荧光成像系统和 FKM 多光谱荧光动态显微成像系统可以测量 OJIP 和 QA 再氧化动力学曲线（这是双调制式荧光仪的特有功能），这也是国际上商用仪器中仅有的能实现这两个功能的荧光成像仪器（图 13）。

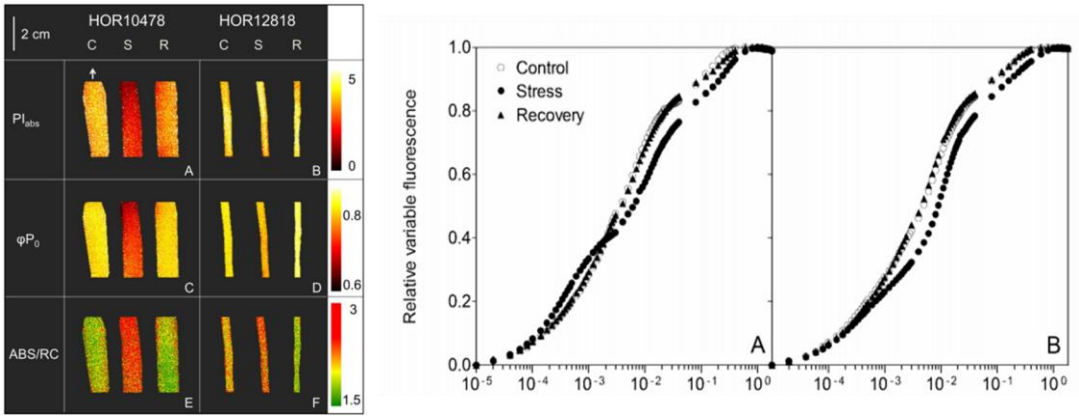


图 13.使用 FluorCam 封闭式荧光成像系统获得的 OJIP 参数成像图和动力学曲线（Jedmowski，2015）

叶绿素荧光成像仪器是如何获得 F_0'的？在进入 21 世纪以前，由于技术限制，叶绿素荧光成像仪器不能直接测量 F_0'。1997 年，Oxborough 和 Baker 提出了一个 F_0'的估算公式：

$$F_O' = \frac{F_O}{\frac{F_V}{F_M} + \frac{F_O}{F_M'}}$$

之后的一系列研究证明，这个公式估算得到的数据是可信的。但这个数据终究不是直接测量得到的。随着 LED 技术的进步，FluorCam 则通过配备专用的远红光源板来对 F_0'进行实测。从另外一

个方面说，没有配备远红光源的叶绿素荧光仪或者荧光成像仪都是不能实际测量 F_0'的。

2） PAR 吸收率成像

我们都知道叶绿素荧光参数电子传递速率 ETR=Φ_{psII}×PAR×0.5×leaf PAR absorptivity。一般的公式中会默认植物光合有效辐射吸收率（PAR absorptivity）为 0.84。但这仅仅是一个经验数据。对于不同植物、植物的不同部位、不同生理状态和生长阶段，其吸收率都是不同的。因此在实际应用中，光合有效辐射吸收率应该进行实测。光合有效辐射吸收率的实测是应用了植物反射光谱的原理。植物对红光是高吸收的，而对于近红外则是高反射的（图 14）。因此，通过红色光源与红外光源照射植物样品，测量植物样品对每种光源的反射率，根据公式计算得出光合有效辐射吸收率。其计算公式为：

$$\mathrm{Abs} = 1 - (\mathrm{R/NIR})$$ （Ulstrup，2007）

FluorCam 通过配备专用的红色与红外光源板、相应的滤波轮和滤波片实现了对 PAR 吸收率以及 NDVI 的成像（图 15），不但使 ETR 的计算结果更加真实可信，而且 PAR 吸收率和 NDVI 的变化也可以直接反应植物结构生理和叶绿素含量的改变等。

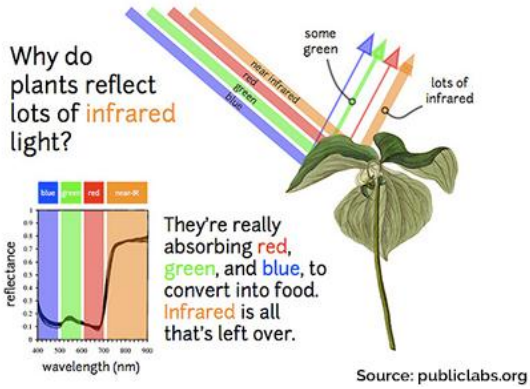


图 14.植物在可见光和近红外区的反射光谱

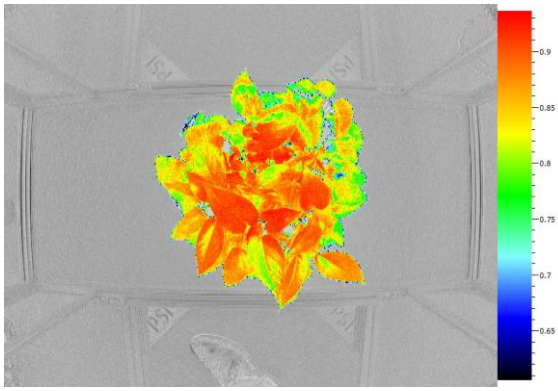


图 15. FluorCam 获得的 PAR 吸收率成像图

3） GFP、EGFP、wtGFP、YFP、BFP、DAPI 等荧光蛋白或荧光染料成像

在进行分子生物学研究时，经常需要用到 GFP 等各种荧光蛋白或荧光染料。以前在鉴定这些荧光蛋白表达时一般都是使用荧光显微镜对每一个样品逐一筛查，工作量很大。FluorCam 由于能够配备多种不同波段的激发光源和相应滤波片，具备了对荧光蛋白的高通量宏观筛查的能力（图 16）。同时由于其具备的荧光定量分析功能，还能对荧光蛋白的表达进行相对定量分析。

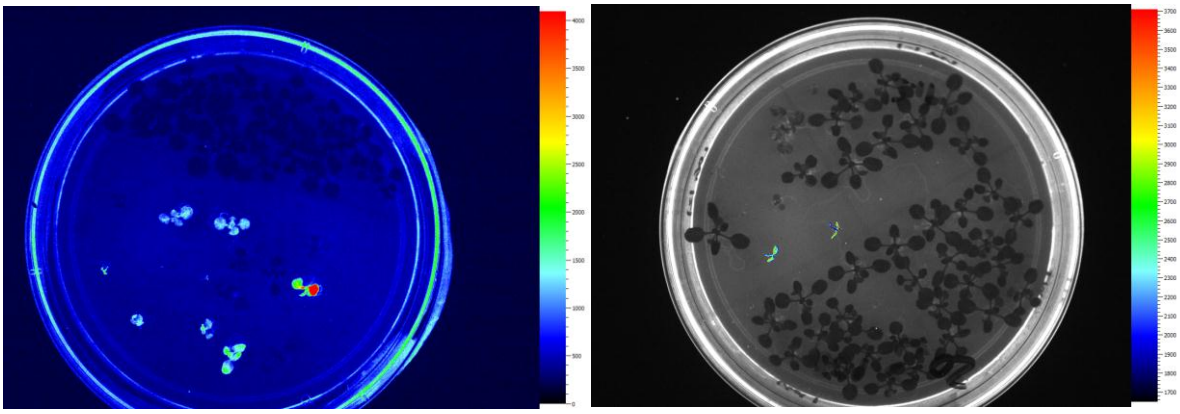


图 16. FluorCam GFP 成像图，图中发出明亮颜色的植株即为表达了 GFP 的植株，其颜色越偏向红色，则表明其表达的 GFP 更多，暗色的植株即为没有表达 GFP 的植株

4）MCF 多光谱荧光成像

二十世纪八九十年代，对植物活体荧光——主要是叶绿素荧光研究不断深入，同时荧光成像技术也开始逐渐成熟。科学家发现使用 UV 紫外光对植物进行激发，可以产生具备 4 个特征性波峰的荧光光谱（图 17，Buschmann，1998）

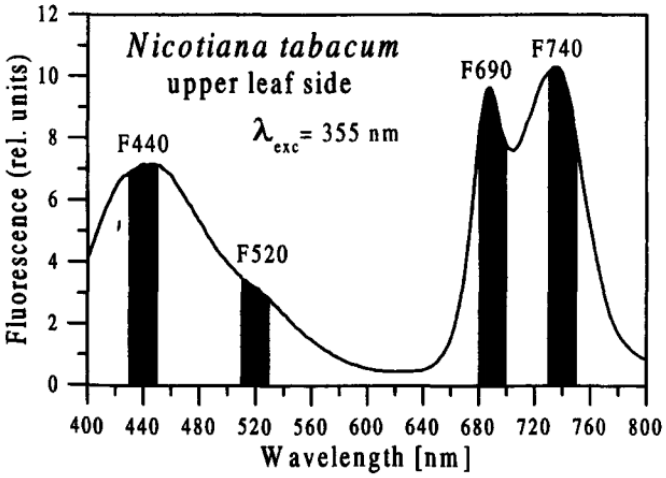


图 17. 烟草叶片上表面 UV 激发荧光光谱（Buschmann，1998）

这个激发荧光光谱就称为**多光谱荧光（Multi-Color Fluorescence，MCF）**。结合荧光成像技术对 MCF 进行成像分析的技术即为 **MCF 多光谱荧光成像技术**。MCF 特性见表 1。

FluorCam 系列叶绿素荧光成像系统中可以进行 MCF 成像分析的型号有 FluorCam 封闭式多光谱荧光成像系统，FluorCam 开放式多光谱荧光成像系统和 FKM 多光谱荧光动态显微成像系统。

MCF 多光谱荧光成像技术目前主要应用于两个方面：**1. 作物病害早期无损检测；2. 与 FluorCam 叶绿素荧光成像技术结合进行共同研究胁迫对光合系统和次生代谢的影响。**

表 1.UV 激发多光谱荧光特性（Buschmann，1998，略有修改）

A．蓝绿荧光（Blue-Green Fluorescence，BGF）	
荧光色素：	主要是细胞壁中共价结合的阿魏酸，由液泡中的肉桂酸和类黄酮调控
位置和来源：	a） 细胞壁（主要来自于叶片表皮） b） 液泡（与溶解的酚类有相互作用）
激发：	UV
荧光特性：	
辐射范围：	400-570nm
最大值（波峰）：	440-450nm（蓝光，F440），520-530nm（绿光，F520）
胁迫指示：	蓝色荧光与红色和远红荧光比例：F440/F690，F440/F740 的增加或减少；某些植物中绿色荧光的增加
B．叶绿素荧光（Chlorophyll Fluorescence，Chl. F）	
荧光色素：	叶绿素 a
位置和来源：	叶片叶肉细胞，叶绿体
激发：	红光、绿光、蓝光、UV 等
荧光特性：	
辐射范围：	650-800nm
最大值（波峰）：	690nm（红光，F690），730-740nm（远红光，F740）
胁迫指示：	
短期胁迫：	荧光诱导动力学变化（通过叶绿素荧光技术进行分析），F690/F740 增加 30%
长期胁迫：	荧光诱导动力学变化（通过叶绿素荧光技术进行分析），叶绿素含量减少，F690/F740 大幅增加。F690/F740 是原位叶绿素含量的反向指标。

植物最主要的抗病化学物质为水杨酸和苯丙烷化合物，其中包括类黄酮和香豆素。而作为一种胁迫应答机制，植物也会积聚酚类化合物，但它不能增加植物的抗性。而酚类具有在 UV 激发下发出荧光的特性，这就提供了一种植物无损病害检测的方法（Sandor Lenk, 2007）。Chaerle 使用 MCF 技术对感染烟草花叶病毒的烟草叶片进行了连续观测。结果发现，在病毒感染的早期症状检测中，对比红色叶绿素（F690）荧光图，蓝色（F440）和绿色（F550）荧光成像图能提供更好的对比度和更大的感染面积。**无论是 MCF 多光谱荧光还是叶绿素荧光都能比人眼或者 RGB 彩色相机更早的发现病害症状**（图 18，Chaerle，2006）。

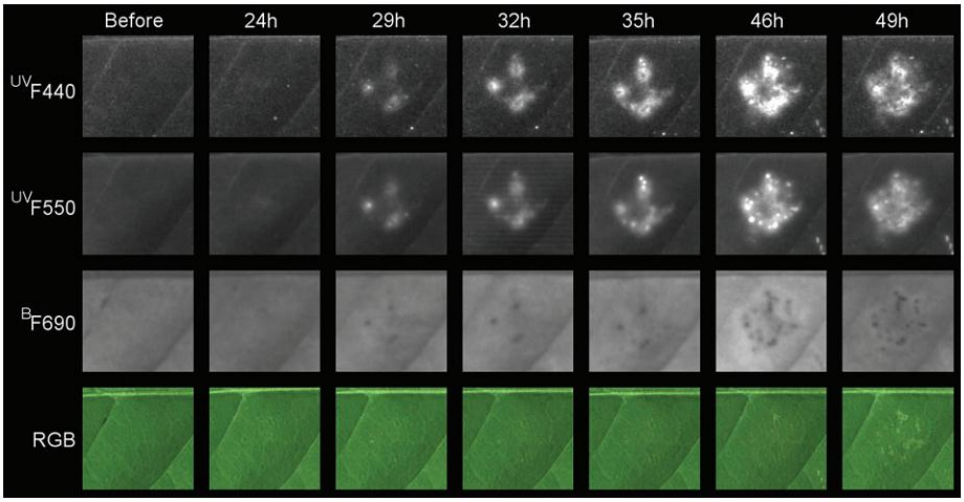


图 18. 烟草花叶病毒感染前和感染 24-49 小时的烟草（*Nicotiana tabacum* L.）叶片荧光成像图。第一行，UV 激发的 440nm 蓝色荧光；第二行，UV 激发的 550nm 绿色荧光；第三行，蓝光激发的 690nm 叶绿素荧光；第四行，通过 RGB 相机获取的可视图像（Chaerle，2006）

由于 FluorCam 叶绿素荧光成像技术可以获得大量与植物光合机理相关的数据与荧光成像图，因此在测量 MCF 时往往还需要进行单独的叶绿素荧光成像分析，而不是仅仅使用 MCF 获得的 F690 和 F740。**这也正是能同时进行 PAM 叶绿素荧光成像分析和 MCF 多光谱荧光成像分析的 FluorCam 多光谱荧光成像系统的优势。**

在 2015 年发表于 Physiologia Plantarum 的一篇最新文献中，研究者直接使用 FluorCam 多光谱荧光成像系统研究两个丁香假单胞菌株（*Pseudomonas syringae*）感染的菜豆（*Phaseolus vulgaris*）（Pérez-Bueno，2015）。叶绿素荧光成像分析研究感染对菜豆光合系统的影响（图 19），MCF 成像分析则研究其对次生代谢的影响（图 20）。

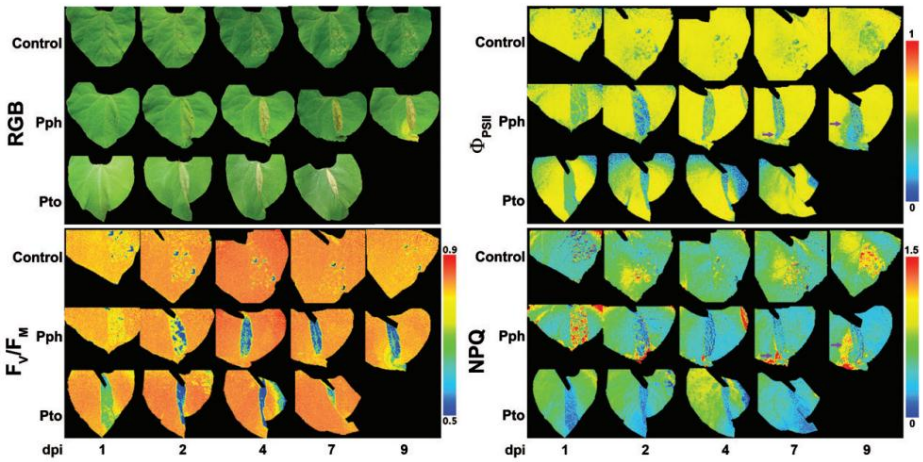


图 19. 细菌感染对叶片光合的长期影响，进行了不同感染天数（dpi）的 RGB 彩色成像、ΦPSII、Fv/Fm 和 NPQ 成像（Pérez-Bueno，2015）

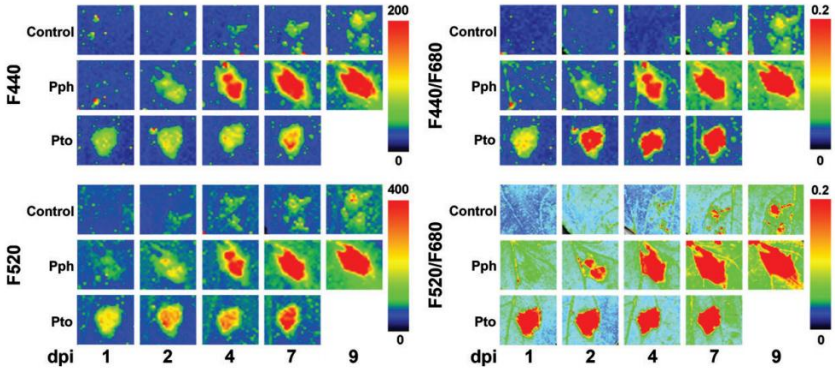


图 20. 细菌感染对叶片次生代谢的长期影响，测量了不同感染天数（dpi）的 F440、F520、F440/F680、F520/F680（Pérez-Bueno，2015）

5） FKM 多光谱荧光动态显微成像技术

FKM 多光谱荧光动态显微成像技术是将 FluorCam 荧光成像技术与生物荧光显微成像技术有机结合起来，再辅以多光谱荧光测量技术和光谱分析技术，进而成为了目前功能最为强大全面的藻类／植物显微荧光研究技术。它不仅可以进行微藻、单个细胞、单个叶绿体甚至基粒-基质类囊体片段进行 Fv/Fm、Kautsky 诱导效应、荧光淬灭、OJIP 快速荧光响应曲线、QA 再氧化等各种荧光成像动力学分析；还能通过激发光源组进行任意荧光激发和荧光释放波段的光谱分析测量，从而进行藻青蛋白、藻红蛋白等藻类特有光合色素的成像分析；更可以利用光谱仪对各种激发光和荧光进行光谱分析，区分各发色团（例如，PSI 和 PSII 及各种捕光色素复合体等）并进行深入分析。除对叶绿素荧光动态进行成像光谱分析外，还可对静态荧光如 GFP 荧光、DAPI 荧光、DiBAC4 荧光、SYTOX 绿色荧光、CTC 荧光染色等荧光蛋白、荧光素进行成像分析（图 21）。

这一技术开发出来最先就是用于研究藻类单个藻丝乃至单个细胞的显微叶绿素荧光特性（图 22 左、中，Berman-Frank，2001，Ferimazova，2013）。后来，Küpper 与 PSI 公司合作将 FKM 的应用扩展到了高等植物（图 22，右）。镉、铜、锌、铬等重金属胁迫可以严重影响植物的光合能力，FluorCam 叶绿素荧光成像技术能够研究重金属对植物叶片或其他器官宏观上的伤害，而 FKM 技术可以直观地研究单个植物细胞里重金属积累对叶绿体的影响及不同细胞之间的差异（Küpper，2007）

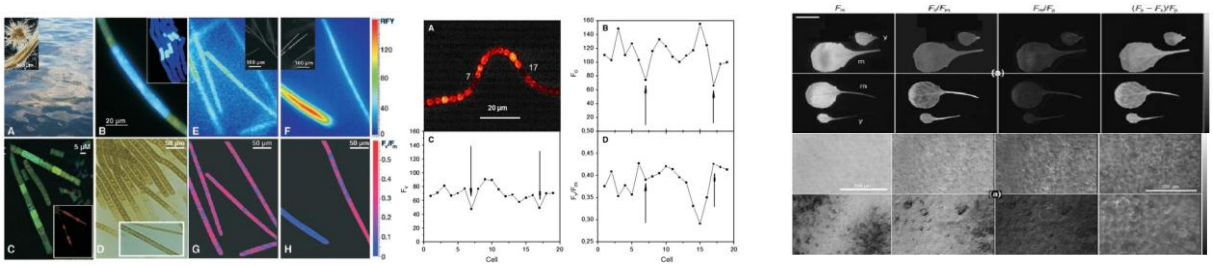
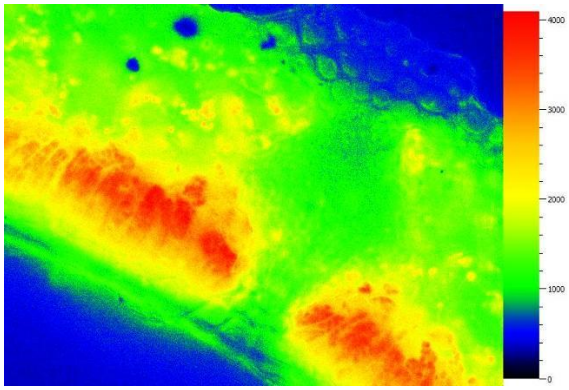
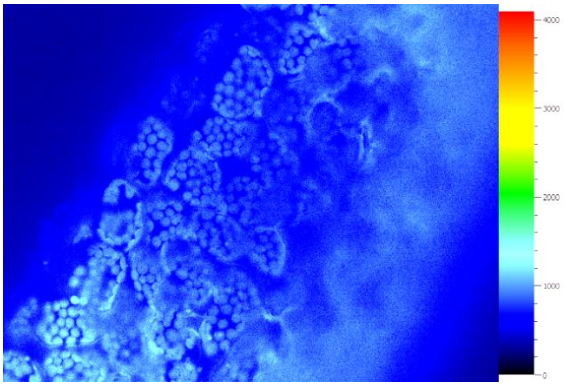


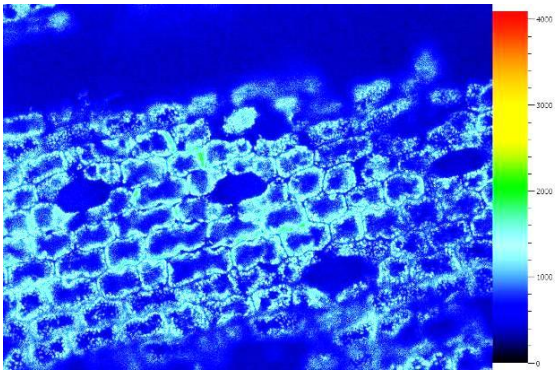
图 22. 左：束毛藻叶绿素荧光特性（Berman-Frank，2001）；中：鱼腥藻异形胞 PSII 反应中心变化（Ferimazova，2013）；右：重金属胁迫对拟南芥光合同在宏观和微观两个层次的影响（Küpper，2007）



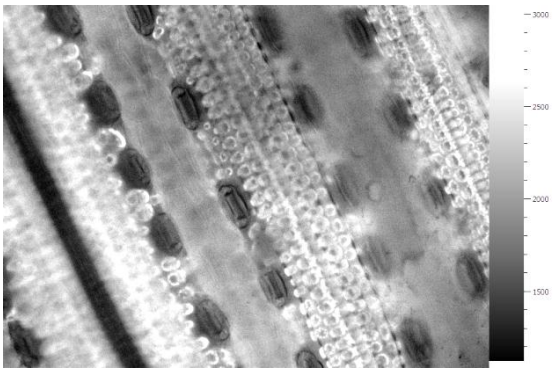
忍冬叶片横切荧光成像：栅栏组织和海绵组织



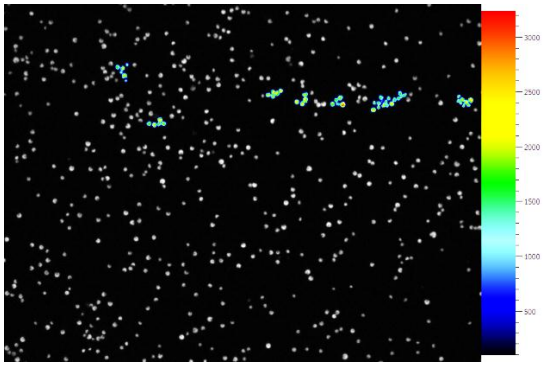
拟南芥表面荧光成像：细胞内的叶绿体分布



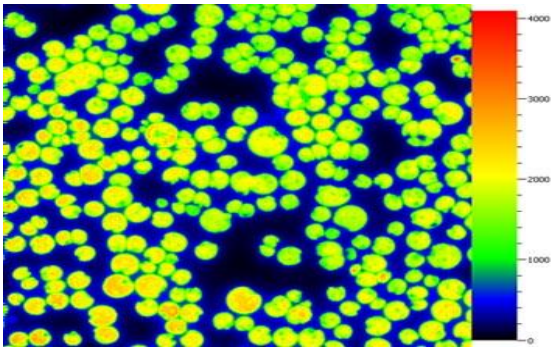
鸢尾表皮细胞荧光成像：气孔与叶绿体



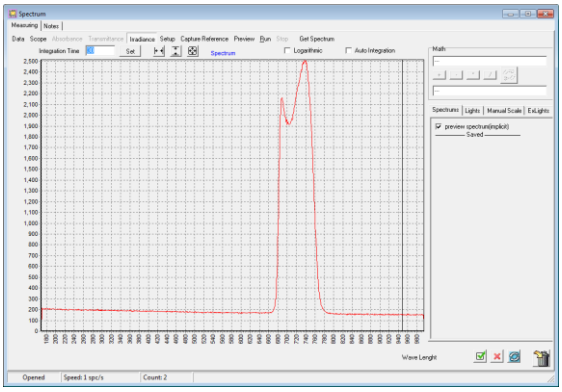
玉米表皮细胞荧光成像



绿藻显微荧光成像



衣藻显微荧光成像



叶绿素荧光光谱分析

图 21.FKM 获得的各种荧光成像图和光谱图

5. 软件功能

最后我们要看仪器的软件是否能够简便、快捷、全面地支持我们的实验设计。

1） 软件基础功能

对于叶绿素荧光成像软件来说，其基本功能是需要能够进行**光源及 CCD 调节、内置自动测量程序、自动样品识别、计算参数并成像**（图 23）。

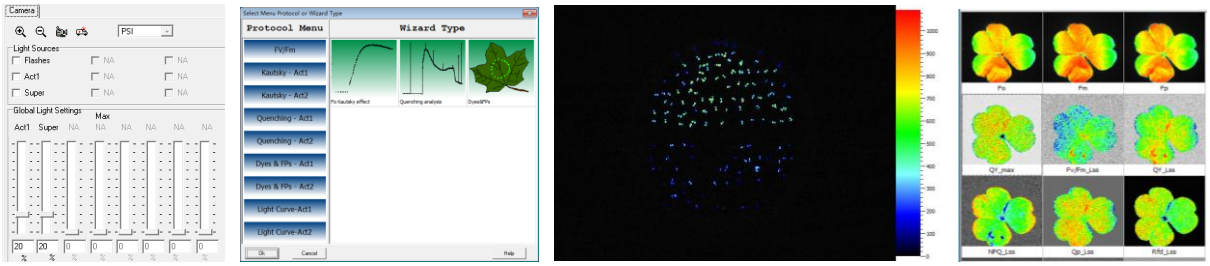


图 23. 从左至右：FluorCam 软件的光源及 CCD 调节、内置自动测量程序、自动样品识别、计算参数并成像功能

2） 软件高级功能

但实验中进行会需要到一些高级功能，这就不是所有软件都能具备的了。

智能图像识别：在胁迫实验中，样品表面会经常会产生一些由于严重受损产生的斑块。图像的智能识别功能可以让我们对同一个样品的严重受损部位和仍健康的部分分别进行叶绿素荧光分析（图 24）。通过校准，我们还可以获得两者的叶面积数据。

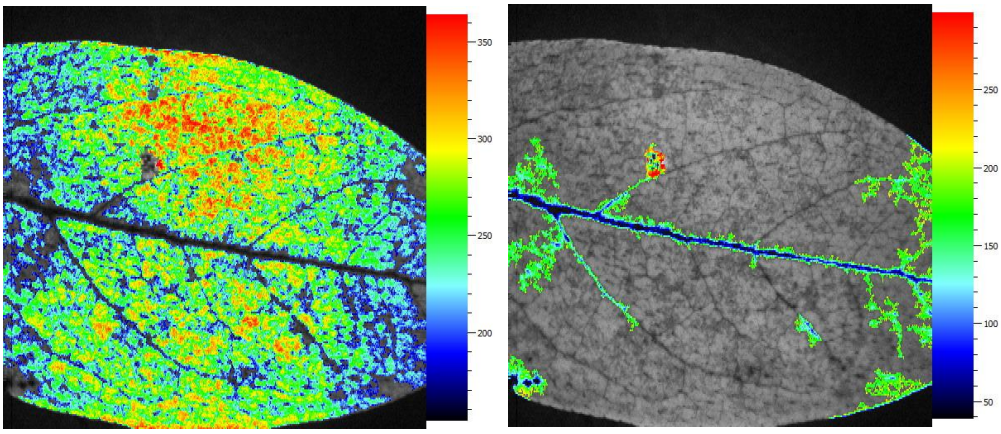


图 24.智能识别健康部位和受损部位

手动图像选区：很多时候，我们不希望对整个图像区域中所有实验样品进行分析，而只想分析样品的某些特定部位或者多个样品的几个样品。这就要求软件具备手动选区的功能。一般需要用的选区形状是方形、圆形、任意多边形、扇形（主要用于在培养皿中培养多株样品是使用）以及 96 孔板等（图 25）。

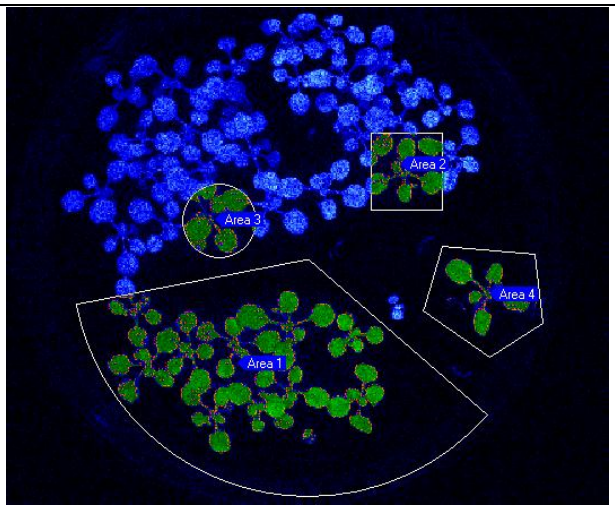


图 25.FluorCam 软件的手动选区功能

根据荧光参数，分级定量计算其在样品上的分布情况：荧光成像的优点就是区分样品不同部分荧光值的差异。通过图像分级，我们可以定量计算并通过直方图的形式表示不同荧光值的相对或绝对面积。这样我们就能够定量地反映这种样品不同部分的差别，甚至反映叶片气孔开闭动力学和不均一行为，即气孔斑块化（stomatal patchiness）现象（图 26，Nejad，2006）。

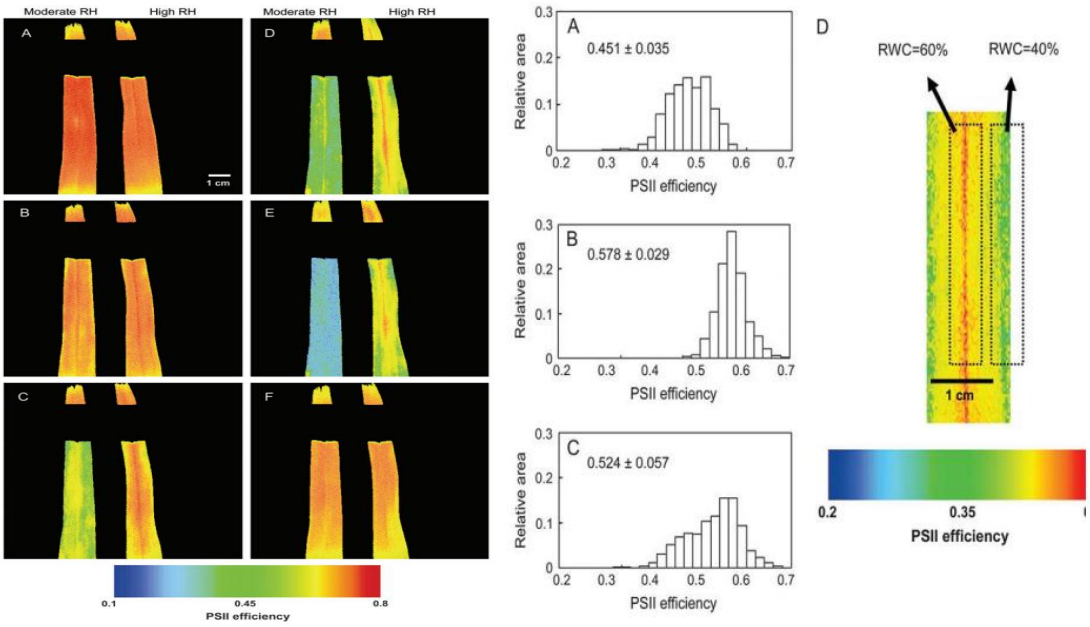


图 26. 不同浓度 CO_2、RH 对紫露草气孔行为的影响（Nejad，2006）

无人值守自动监测：有些研究需要对样品进行定时监测。如果人工来进行实验对人力损耗很大，时间上也难以精确。FluorCam 提供无人值守自动监测功能则可以让研究者很轻松地进行这一类实验（图 27，Lichtenthaler，2013）。

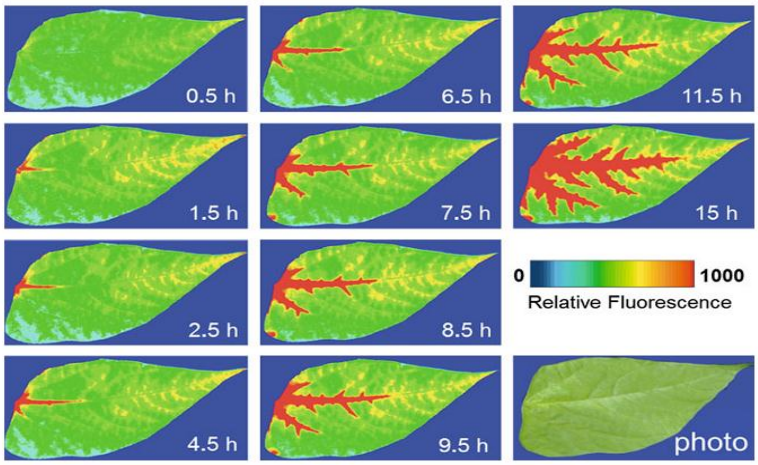


图 27. 敌草隆吸收随时间对叶片的损伤（Lichtenthaler，2013）

高级自定义荧光测量程序：对于一些精通叶绿素荧光测量的研究者来说，他们希望研究的荧光动力学曲线和参数并不是常用的 Fv/Fm、Kautsky 诱导效应、荧光淬灭动力学曲线或光响应曲线之类的内置自动测量程序，而是根据理论推导和实际需要确定的特殊动力学曲线。一般的荧光成像仪器都不会内置这样的测量程序，同时也不具备用户自编程的功能。而 FluorCam 软件则提供了专用的编程语言，可以对光质、光照时间、光照长度、光照顺序、测量检测点、计算公式等一系列参数的自由编辑，从而实现各种特殊动力学曲线的测量、参数计算和成像（图 28）。如果有老师需要使用特殊程序，Ecolab 生态实验室可以提供帮助并根据具体要求编写程序。

```
;*** Fo Measurement ***************************************************
F0duration = 2s
F0period = 200ms
<0,F0period..F0duration>=>mfmsub
<0s>=>checkPoint,"startFo"
<F0duration - F0period>=>checkPoint,"endFo"
;
PulseDuration = 960ms;
;******* Dark Relaxation Measurement ********************************
DarkRelaxation1 = 10s;   ##
b1 = F0duration+40ms+PulseDuration
b2 = 80ms
b3 = 2s
<b1+b2, b1+2*b2, b1+4*b2, b1+8*b2, b1+16*b2>=>mfmsub
<b1+b3, b1+2*b3..b1+DarkRelaxation1-b3>=>mfmsub
<b1+DarkRelaxation1-80ms>=>mfmsub
;
;******* Actinic light Exposure *************************************
ALPeriod = 282s;              ##
c1 = F0duration+40ms+PulseDuration+DarkRelaxation1
<c1>=>act1(ALPeriod)
;
;******* Kautsky Effect Measurement *********************************
c2 = 3s
c3 = 2s
<c1+TS, c1+TS+80ms .. c1+c2>=>mfmsub
<c1+c2+80ms, c1+c2+2*80ms, c1+c2+4*80ms, c1+c2+8*80ms, c1+c2+16*80ms>=>mfmsub
<c1+c2+c3, c1+c2+2*c3..c1+ALPeriod>=>mfmsub

<c1>=>checkPoint,"startFp"
<c1+c2+c3>=>checkPoint,"endFp"
;
;******* Saturating Pulses - Fm' Quenching Analysis
```

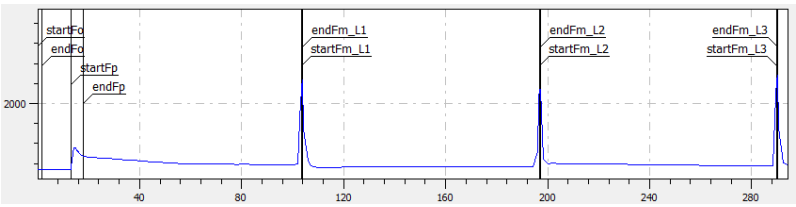


图 28. Ecolab 生态实验室为中科院植物所编制的特殊荧光动力学曲线测量程序

参考文献：

1. Nedbal L & Whitmarsh J. 2004. Chlorophyll fluorescence imaging of leaves and fruits. Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. *Dordrecht, The Netherlands: Springer*, 389 – 407
2. Nedbal L, Soukupová J, Kaftan D, Whitmarsh J & Trtílek M. 2000. Kinetic imaging of chlorophyll fluorescence using modulated light. *Photosynthesis research* 66, 3 – 12
3. Baker N R. 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:89–113
4. Kalaji H M. *et al.* 2014. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynth Res.* 122:121–158
5. Mao J. *et al.* 2015. PAB is an assembly chaperone that functions downstream of chaperonin 60 in the assembly of chloroplast ATP synthase coupling factor 1. PNAS 112(13): 4152–4157
6. Fan X. *et al.* 2015. The NdhV subunit is required to stabilize the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. The Plant Journal 82: 221–231
7. Murchie E H. *et al.* 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. Journal of Experimental Botany 64(13):3983-3998
8. Earl H J, Ennahli S. 2004. Estimating photosynthetic electron transport via chlorophyll fluorometry without photosystem II light saturation. Photosynth Res 82:177–186
9. Jedmowski C, *et al.* 2015. Imaging of fast chlorophyll fluorescence induction curve (OJIP) parameters, applied in a screening study with wild barley (*Hordeum spontaneum*) genotypes under heat stress. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 151:153-160
10. Ulstrup K E. *et al.* 2007. Zooxanthellae Harvested by Ciliates Associated with Brown Band Syndrome of Corals Remain Photosynthetically Competent. Applied And Environmental Microbiology, 73(6):1968–1975
11. Sandor Lenk, *et al.* 2007. Multispectral fluorescence and reflectance imaging at the leaf level and its possible applications, Journal of Experimental Botany, 58(4): 807-814
12. Chaerle L, Lenk S, Hagenbeek D, Buschmann C, Van Der Straeten D. 2006. Multi-color fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus, Journal of Plant Physiology, doi:10.1016/j.jplph.2006.01.011

13. Pérez-Bueno M L, *et al.* 2015. Spatial and temporal dynamics of primary and secondary metabolism in *Phaseolus vulgaris* challenged by *Pseudomonas syringae*, Physiologia Plantarum 153: 161-174.
14. Berman-Frank I, *et al.* 2001. Segregation of Nitrogen Fixation and Oxygenic Photosynthesis in the Marine Cyanobacterium *Trichodesmium*. Science, 294: 1534-1537
15. Ferimazova N, *et al.* 2013. Regulation of photosynthesis during heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 investigated in vivo at single-cell level by chlorophyll fluorescence kinetic microscopy. Photosynthesis Research, 116(1): 79-91
16. Küpper H, *et al.* 2007. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. New Phytologist, 175: 655-674
17. Nejad A R, *et al.* 2006. Dynamics of spatial heterogeneity of stomatal closure in *Tradescantia virginiana* altered by growth at high relative air humidity. Journal of Experimental Botany, 57(14): 3669-3678
18. Lichtenthaler, H.K. *et al.* 2013. Uptake of diuron and concomitant loss of photosynthetic activity in leaves as visualized by imaging the red chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research* 116(2-3):355-361