

英文缩写符号及中英文对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
·OH	hydroxyl radical	羟基自由基
A	absorbency	吸光度值
ATP	adenosine triphosphatase	腺苷三磷酸酶
CaCl ₂	calcium chloride	氯化钙
CAT	catalase	过氧化氢酶
CO ₂	carbon dioxide	二氧化碳
cm	centimeter	厘米
d	day	天
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DPS	data processing system	数据处理系统
FW	fresh weight	鲜重
g	gram	克
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide	过氧化氢
h	hour	小时
l	liter	升
LD	long day	长日照
MDA	malondialdehyde	丙二醛
m	metter	米
m ²	square meter	平方米
mg	milligram	毫克
min	minute	分钟
ml	milliliter	毫升
mmol	millimole	毫摩尔
mol	mole	摩尔
NAA	1-naphthylacetic acid	α-萘乙酸
NBT	nitroblue tetrazolium	氮蓝四唑
nm	nanometer	纳米
OD	optical density	光密度
pH	potential of hydrogen	酸碱度
PFD	photon flux density	光量子通量密度
POD	peroxidase	过氧化物酶
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
s	second	秒
SD	short day	短日照

英文缩写	英文全称	中文名称
SOD	superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
T	temperature	温度
TBA	thiobarbitric	硫代巴比妥酸
UWL	ultraweak luminescence	超微弱发光
μmol	micromol	微摩尔

目录

摘要	1
Abstract.....	3
1 引言	6
1.1 生物发光概述	8
1.1.1 发光的基本原理	8
1.1.2 化学发光与生物系统发光	10
1.1.2.1 化学发光	16
1.1.2.2 生物发光	16
1.1.3 生物的超微弱发光	13
1.1.3.1 超微弱发光机制	16
1.1.3.2 影响超微弱发光的因素	20
1.1.3.3 超微弱发光的应用	22
1.2 本研究的目的意义	26
2 材料与方法	27
2.1 材料	27
2.2 实验设计	27
2.2.1 菊花花芽分化期 UWL 及生理生化代谢的变化	28
2.2.2 菊花扦插生根过程中 UWL 及生理生化代谢的变化	28
2.2.3 低温弱光胁迫下菊花 UWL 及生理生化代谢的变化	28
2.3 测定内容与方法	28
2.3.1 UWL 的测定	28
2.3.2 荧光强度的测定	29
2.3.3 磷光强度的测定	29
2.3.4 ATP 含量的测定	29
2.3.5 呼吸速率的测定	29
2.3.6 DNA 和 RNA 含量的测定	29
2.3.7 超氧阴离子释放速率的测定	30
2.3.8 SOD、POD、CAT 活性, MDA 和可溶性蛋白含量的测定	30
2.3.9 可溶性糖含量的测定	31
2.4 数据分析	32
3 结果与分析	32
3.1 菊花花芽分化期 UWL 及呼吸速率等的变化	32
3.1.1 花芽分化期菊花叶片 UWL 的变化	32
3.1.2 花芽分化期菊花叶片呼吸速率的变化	32
3.1.3 花芽分化期菊花叶片 ATP 含量的变化	32
3.1.4 花芽分化期菊花叶片可溶性糖含量的变化	34

3.1.5 花芽分化期菊花叶片可溶性蛋白含量的变化	34
3.2 菊花花芽分化期 UWL 及核酸等的变化	34
3.2.1 花芽分化期菊花叶片 UWL 的变化	35
3.2.2 花芽分化期菊花叶片荧光强度的变化	36
3.2.3 花芽分化期菊花叶片磷光强度的变化	36
3.2.4 花芽分化期菊花叶片 DNA 和 RNA 含量的变化	37
3.3 菊花花芽分化期 UWL 及超氧阴离子等的变化	38
3.3.1 花芽分化期菊花叶片 UWL 的变化	38
3.3.2 花芽分化期菊花叶片超氧阴离子释放速率的变化	39
3.3.3 花芽分化期菊花叶片 SOD 活性的变化	39
3.3.4 花芽分化期菊花叶片 POD 活性的变化	41
3.3.5 花芽分化期菊花叶片 CAT 活性的变化	41
3.3.6 花芽分化期菊花叶片 MDA 含量的变化	41
3.4 菊花扦插生根过程中 UWL 及其他生理代谢的变化	43
3.4.1 扦插生根过程中菊花叶片 UWL 的变化	43
3.4.2 扦插生根过程中菊花叶片荧光的变化	43
3.4.3 扦插生根过程中菊花叶片磷光的变化	44
3.5 低温弱光胁迫下菊花 UWL 及生理生化等代谢的变化	45
3.5.1 低温弱光胁迫下菊花叶片 UWL 的变化	45
3.5.2 低温弱光胁迫下菊花叶片 SOD 活性的变化	45
3.5.3 低温弱光胁迫下菊花叶片 POD 活性的变化	46
3.5.4 低温弱光胁迫下菊花叶片 CAT 活性的变化	47
3.5.5 低温弱光胁迫下菊花叶片 MDA 含量的变化	47
4 讨论	48
4.1 菊花花芽分化期 UWL 及呼吸速率等的变化	48
4.2 菊花花芽分化期 UWL 与核酸等的变化	49
4.3 菊花花芽分化期 UWL 及超氧阴离子等的变化	50
4.4 菊花扦插生根过程中 UWL 及生理生化代谢的变化	51
4.5 低温弱光胁迫下菊花 UWL 及生理生化代谢的变化	52
5 结论	52
5.1 菊花花芽分化期 UWL 及生理生化代谢的变化	53
5.2 菊花扦插生根过程中 UWL 及生理生化代谢的变化	54
5.3 低温弱光胁迫下菊花 UWL 及生理生化代谢的变化	54
参考文献	55
附 录	64
致 谢	65
攻读硕士学位期间发表论文	66

摘要

本试验以切花菊品种‘神马’(*Dendranthema×grandiflora*‘Jinba’)为试材,分别研究了菊花花芽分化期、菊花扦插生根期、低温弱光胁迫下菊花超微弱发光及生理生化代谢的变化。花芽分化实验是将长到40~50 cm的营养生长的植株分别经过短日照处理(昼8/夜16 h)和长日照处理(昼16/夜8 h),根据花芽分化的五个时期分别研究了这两种条件下的UWL及生理生化代谢的变化。扦插生根实验是取8~10 cm的插穗分别经过蒸馏水、NAA和NAA+CaCl₂处理,研究了这三种处理扦插生根过程中的UWL及生理生化代谢的变化。低温弱光胁迫实验是将植株分别在正常温光处理(22℃/18℃, PFD 450 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$),偏低温弱光(16℃/12℃, PFD 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)和临界低温弱光(12℃/8℃, PFD 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)下处理11 d,测定这个过程UWL及生理生化代谢的变化。主要研究结果如下:

1、菊花花芽分化起动期(II)与未分化期(I)相比,UWL强度增加119.31%,呼吸速率提高102.42%,ATP含量增加148.61%,可溶性糖增加95.53%,可溶性蛋白质增加32.52%,然后在总苞鳞片分化期(III)、小花原基分化期(IV)和花冠形成期(V),UWL强度、呼吸速率和ATP含量逐渐下降;可溶性糖在IV期和V期下降幅度很大,并接近对照水平;可溶性蛋白质在II期、III期和IV期保持较高水平,在V期下降幅度较大;但仍比对照增加14.00%;而未发生花芽分化的长日照处理的菊花UWL强度、呼吸速率以及ATP、可溶性糖和可溶性蛋白质含量等指标基本保持稳定。显示菊花花芽分化期叶片UWL与呼吸速率和能量代谢密切相关。

2、菊花花芽分化起动期(II)与未分化期(I)相比,超微弱发光强度提高119.31%,荧光和磷光发光强度分别提高33.41%和41.32%,DNA和RNA含量分别增加62.21%和32.12%,在总苞分化期(III)、小花原基分化期(IV)和花冠形成期(V),超微弱发光和荧光强度和DNA含量逐渐下

降；磷光强度和RNA含量在III期继续增加，之后在IV期和V期下降；而长日照处理的对照菊花超微弱发光、荧光和磷光发光强度以及DNA和RNA含量变化幅度较小，基本保持较稳定的状态，表明菊花花芽分化期叶片生物发光水平提高，并与核酸代谢密切相关。

3、菊花花芽分化期超微弱发光、SOD、POD、CAT 活性呈现先上升后下降的趋势，菊花花芽分化起动期（II）与未分化期（I）相比，超氧阴离子自由基上升了 58.00%。最终表明，活性氧是菊花花芽分化期 UWL 的产生的原因之一，各种抗氧化酶系统也可以通过调节活性氧的量来间接影响 UWL 的产生，相关性分析显示菊花花芽分化期叶片 UWL 水平与超氧阴离子产生速率和抗氧化系统酶活性变化密切相关。

4、UWL 与荧光和磷光均出现规律性变化，对照的菊花叶片 UWL 和荧光分别在第 0 d 和第 15 d 左右出现两个高峰，磷光的变化规律与 UWL 和荧光的变化刚好相反，经过相关性分析，荧光和 UWL 呈显著正相关，磷光与 UWL 呈显著负相关。三种处理的 UWL 和荧光值中，经过 NAA 和 CaCl_2 复配处理的最高，其次是经过 NAA 处理的，最后是对照。这说明 UWL 和荧光强度能反应扦插生根情况。

5、UWL 随着胁迫时间和胁迫程度的增大而增加，临界低温弱光处理的 UWL 值要比偏低温弱光处理的大。偏低温弱光处理使 SOD 活性在胁迫 1~11 d 中持续上升，而临界低温弱光处理使 SOD 活性在前期（1~5 d）上升，后期（5~11 d）下降。随着低温弱光胁迫程度的增加和时间的延长，两处理均使菊花叶片中 POD 活性提高，但膜脂过氧化逐渐加剧，丙二醛（MDA）大量积累，临界低温弱光处理比偏低温弱光处理对植株的影响更为显著。这说明体内的 MDA 与 UWL 有很强的相关性。

关键词：菊花；UWL；花芽分化；扦插；低温弱光；生理生化

Studies on Ultraweak Lunescence and Physiological and Biochemical Metabolism of Chrysanthemum

Lin Guiyu

Directed by Zheng Chengshu

ABSTRACT

In order to investigate the physiological and biochemical metabolism of chrysanthemum during the stage of floral differentiation, of rooting of cutting and of the stress of low temperature and poor light, we used *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Jinba' as materials. In the rooting of cutting experiment, the shoots were about 8~10 cm long, and they were treated respectively with distilled water, NAA and NAA+CaCl₂, we studied ultraweak lunescence and physiological and biochemical metabolism during the process of rooting of cutting. In the floral differentiation experiment, When the length of plants were about 40~50 cm, we treated plants respectively with short-day (daylight 8 h/night 16 h) and long-day (daylight 16 h/night 8 h), then we studied ultraweak lunescence and physiological and biochemical metabolism during the five stages of floral differentiation. In the stress of low temperature and poor light experiment, When the length of plants were about 40~50 cm, they were treated with the normal temperature and light (22 °C/18 °C, PFD 450 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), the combination of lower temperature and poor light (16 °C/12 °C, PFD 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), critical temperature and poor light (12 °C/8 °C, PFD 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) stress for 11 days, then we studied ultraweak lunescence and physiological and biochemical metabolism in the 11 days. The results showed as follows:

1. The UWL intensity of the leaves of chrysanthemum increased 119.31%, respiration rate increased by 102.42%, content of ATP, soluble sugar and soluble protein of the leaves of chrysanthemum increased by 148.61%, 95.53%, 32.52% respectively at initial stage of floral bud differentiation (II) compared with those of vegetative stage of apical bud (I), and then UWL intensity, respiration rate and content of ATP reduced slowly respectively at stage of involucre primordial differentiation (III), stage of floral primordial differentiation (IV) and stage of crown form (V). Content of soluble sugar decreased

mostly at stage IV and stage V, and the levels neared to those of controls. Content of soluble protein maintained higher levels at stage II, stage III, and stage IV, decreased mostly at stage V, but it still increased by 14.00% compared with those of controls. But all of UWL intensity, respiration rate, and content of ATP, soluble sugar and soluble protein maintained stable status in all stages of controls of non-short day treatments. This suggested that the UWL has close relation to respiration and energy metabolism of leaves during differentiation of chrysanthemum.

2. The intensity of ultraweak luminescence, fluorescence and phosphorescence, and content of DNA and RNA of the leaves of chrysanthemum were increased by 119.31%, 33.41%, 41.32%, 62.21% and 32.12% respectively at initial stage of floral bud differentiation (II) compared with those of control plants, then intensity of ultraweak luminescence, fluorescence and content of DNA reduced slowly respectively at stage of involucre primordial differentiation (III), stage of floret primordial differentiation (IV) and stage of crown form (V), while phosphorescence intensity and RNA content increased continuously, and then decreased. But all of indexes of above maintained stable status during all stages of controls of non-short day treatments. This suggested that the bioluminescence intensity increased, and close relative to nucleic acid metabolism of leaves during differentiation of chrysanthemum.

3. The UWL intensity, SOD, POD and CAT activity of the leaves of chrysanthemum increased quickly at first but decreased quickly after that, finally they tend to be stable during floral differentiation in chrysanthemum. O_2^- production rate increased 58.00% at initial stage of floral bud differentiation (II). All of these indicators were higher in short day condition than in long day condition. moreover, they maintained stable status in long day condition. All the results showed that reactive oxygen species were one of the reasons of UWL production. All kinds of antioxidase can indirectly influenced the production of UWL through regulation of reactive oxygen species. This suggested that UWL is close relative to O_2^- production.

4. The UWL, fluorescence and phosphorescence of the leaves of chrysanthemum have a regular variation during the process of rooting of cutting, UWL and fluorescence of cutting slips treated by distilled water have a higher value during the 0 day and the 15 days after treatment. The regularity for change of phosphorescence is opposite to fluorescence. Relevance analysis indicates that fluorescence has a significant positive correlation with UWL, phosphorescence has a significant negative correlation with

UWL.UWL and fluorescence of cutting slips treated by exogenous growth hormone is higher than the cutting slips treated by distilled water, furthermore, the value of cutting slips treated by NAA and CaCl_2 is the highest. This suggested that UWL can select the condition of rooting of cutting in chrysanthemum .

5.The UWL intensity will increase when stress degree increasing and time prolonging.The SOD activity of the leaves of chrysanthemum continually increased during the stress for days under stress of lower temperature and poor light, but SOD activity increased in the earlier stages (1~5 d) and decreased in the later stages (5~11 d). Membrane permeabilities, POD activity increased, while membrane lipid peroxidization pricked up, following MDA accumulation in chrysanthemum leaves with stress degree increasing and time prolonging.The effects of stress of lower temperature and poor light more obvious than the stress of critical temperature and poor light.

Key Words: chrysanthemum; UWL; foral differentiation; cutting; low temperature and poor light

1 引言

菊花 (*Dendranthema×grandiflora*)是我国十大传统名花之一, 也称花中四君子之一, 也是世界四大切花之一, 产量和销量都位于世界花卉前列。由于切花菊在国内需求量大, 经济效益高, 因此, 无论栽培面积、产量和销量一直都位于我国鲜切花的前列, 始终保持快速稳步发展态势。

扦插法是目前国内常用的繁殖方法。扦插繁殖是用植物营养器官的一部分或全部作为繁殖材料, 促使其形成不定根或不定芽, 培育成根茎兼备、完全独立植株的一种无性繁殖方法。其理论基础在于植物的再生作用。所谓植物再生是指植物体的某一部分因受伤或被切除致使植物整体的协调受到破坏时, 所表现出的一种弥补损伤和恢复协调的机能(森下等, 1988和梁玉堂等, 1989)。

扦插繁殖作为一种最常用的无性繁殖方法, 它具有遗传性状稳定、提早开花结实育苗周期短、设备简单、繁殖系数高、规模大、成本低等优点。20世纪以前, 扦插繁殖仅用于易生根植物的繁殖上。到本世纪40年代, 随着人工合成生长素的研制成功, 人工喷雾装置和自控温度、湿度及光照等设备的出现, 许多难生根树种的扦插繁殖获得了很大成功(王景章等, 1990; 朴楚炳等, 1996; 李庆卫等, 2000)。

近年来, 随着无性系繁殖的蓬勃发展, 扦插育苗技术有了很高的研究价值, 通过多学科共同努力, 扦插繁殖的技术和理论都得到了迅速发展。纵观文献资料, 关于树木扦插繁殖的研究工作主要集中在两个方面: 一是研究提高插穗成活率的技术措施, 有效地解决了许多较难生根树种的扦插繁殖。其二则侧重于解剖生理和生化方面的研究, 试图从理论上阐明不定根发端、发育的机理和过程, 为扦插繁殖的技术措施提供生理依据。

菊花(秋菊和冬菊)是典型的短日植物, 要想达到周年生产切花的目的就不可避免地要进行花期调控。因此研究花芽分化期间的形态和生理生化变化可以为周年生产切花提供理论依据。菊花花芽分化已有研究报道, 石万里和姚毓(1990)研究了秋菊‘黄金球’和‘银蜂铃’每6天自然花期的花芽分化进程, 并参照冈田(1957)的标准分为9个阶段; 张伟等(1996)研究了日本8个菊花品种每10天自然花期的花芽分化, 同样划分为这9个阶段。杨娜等对‘神马’花芽分化过程的花芽形态做了系统的解剖和电镜

观察,并且也明确地划分了9个时期。结果均表明花芽分化的形态进程大体相似,但时间进程因品种和栽培环境不同而存在差异,取样间隔过长会对准确划分分化阶段和描述分化进程产生影响。熊济华(1998)发现光周期和温度共同影响菊花花芽分化,花期促控技术亦有地区差异。此外,Kardailsky等(1999)和 Samach等(2000)已在拟南芥和水稻中克隆了调节光周期响应及花原基分化的相关基因,这些基因的作用模式正在深入研究。

另外,菊花花芽分化期间的各种生理生化变化的研究也比较多。石万里,夏宜平(1993)研究了‘银蜂玲’花芽分化期间的核酸变化,他们的研究表明不管是在芽内还是在叶片里,RNA和总核酸含量都是呈现双峰曲线的变化规律,而DNA的变化趋势不是很明显,核酸的变化主要集中在顶芽中。他们同时也对蛋白质含量的变化做了研究,结果显示蛋白质含量的变化动态与核酸(主要是RNA)的基本相似。但峰值出现的时间较核酸向后推迟。这些都说明核酸(主要是RNA)和蛋白质在花芽分化过程中起很重要的作用。梁芳等(2007)通过研究菊花品种‘神马’和‘万盛’发现,花芽分化过程中芽和叶的碳水化合物(可溶性糖、蔗糖、淀粉)都呈现先上升后下降的趋势,但是芽中的碳水化合物比叶中的要多。这些变化也说明花芽分化过程需要各种碳水化合物的参与。

温度和光照是植物生长和发育的必要条件,也是制约植物自然地理分布的主要环境因素。植物在生长发育过程中往往经受昼夜和季节的温度和光照的变化,这种变化不仅影响许多生物化学过程,而且也影响植物体内的物质扩散等过程(许大全,1998)。随着保护地栽培面积的逐年增加,在冬、春温室保护地栽培条件下,低温弱光已成为限制植物生长的重要因素,尤其是它对喜温植物的影响不可低估。低温和弱光的普遍发生,往往成为影响植物正常生长发育,制约农业生产的重要逆境条件(许大全,1998)。因此,研究植物在低温弱光逆境中的适应性及其反应机制,不仅是探索提高植物抗逆能力途径的需要,而且也是提高农业生产效率的要求。

尽管从二十世纪二十年代就有人开始研究低温和弱光对植物的影响,但在相当长的一段时间内,绝大部分研究都集中在单一低温和单一弱光对

植物的影响方面,而对低温及弱光共同作用的研究还较少。近年来的研究表明,单一的低温、单一的弱光与低温弱光交互胁迫对植物的影响是不同的。因此,研究植物对低温弱光胁迫下的响应机制十分必要。

1.1 生物发光概述

1.1.1 发光的基本原理

光是自然界最普遍的现象之一。十九世纪末到二十世纪初,光的研究深入到光的发生、光和物质相互作用的微观机构中,人们这才对发光的原理有了本质的认识。

发光的定义是物体在同温度下,把本身热辐射或多余能量以光的形式辐射出去,且辐射持续时间远远超过光学光谱波段范围内的辐射周期,这种光辐射称为发光。

从物质的微观结构来看,物质都是由原子、分子构成,原子又包含了原子核及高速运动的核外电子。原子可以通过不同类型的结合构成分子。分子内部存在着复杂的运动。除了分子中的电子运动外,还存在构成分子的诸原子之间的振动和分子整体的转动。分子的不同电子运动状态、振动状态和转动状态分别对应不同的电子能级、振动能级和转动能级。如果用 E_e , E_v 和 E_r 分别代表上述三种运动状态的能量,分子的能量可表作 $E=E_e+E_v+E_r$ 。在分子的许多可能状态中,总有一个状态的能量最低,这个状态叫做基态。其它的状态都具有比基态高的能量,叫做激发态。分子的电子能级之间的跃迁是辐射或吸收可见光光子和紫外光光子;单纯的振动能级间的跃迁是辐射或吸收近红外区的光子;单纯的转动能级间的跃迁是辐射或吸收远红外区的光子。

分子吸收足够的能量后就会从基态跃迁至激发态,处于激发态的分子由于有较高的能量而不稳定,就要将多余的能量释放,转入较低的激发态或基态,这个过程即激发态的弛豫过程(参见图 1.1)。激发态的弛豫有辐射弛豫和非辐射弛豫两种。

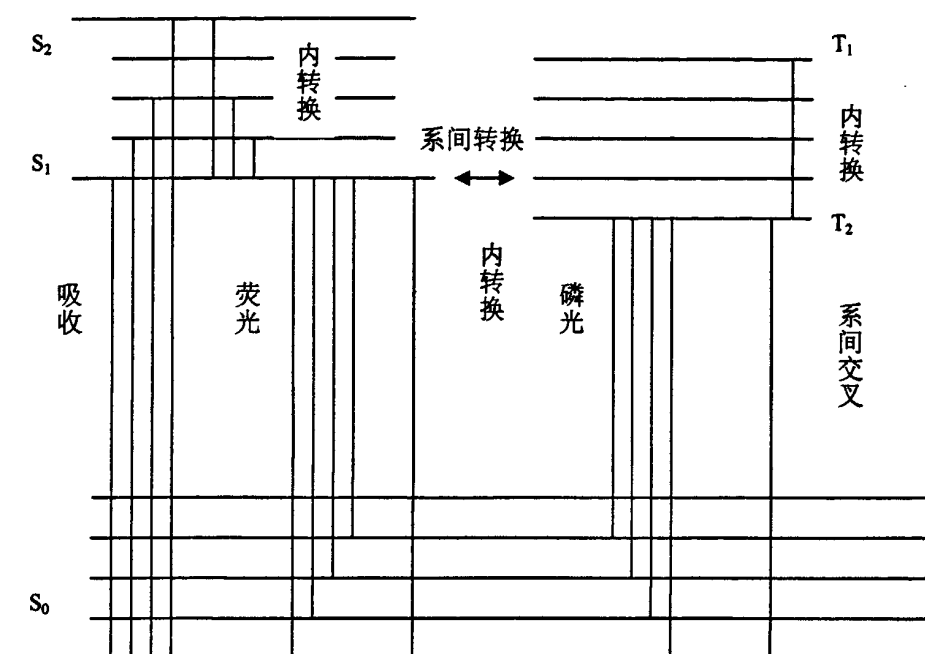


图 1.1 激发态分子的弛豫过程

辐射弛豫包括荧光与磷光。分子从最低激发单线态 (S_1) 的最低振动能级向基态 (S_0) 跃迁时的辐射, 称为荧光。分子的荧光期间往往很短, 在 10^{-9} s 左右。由于内转换损失了部分能量, 荧光光谱与吸收光谱比较会出现红移现象。分子从最低激发三重态 (T_1) 的最低振动能级向基态 (S_0) 跃迁时的辐射, 称为磷光。多重性不同的态间能量转换是禁戒的, 即跃迁几率很小, 但在有些条件下仍会发生。自旋禁戒可导致 T_1 态的长寿命, 所以磷光寿命可达 $10^{-5} \sim 10$ s, 甚至几分钟。

分子处于基态, 两个电子自旋方向相反且耦合得很强。当吸收光子处于激发态时, 虽然能量提高了, 但电子自旋力方向并未改变, 这时的激发态仍然是单线态, 所以叫单线激发态并相应有第一与第二单线激发态等等。处于激发态时, 两个电子自旋方向虽未改变, 但它们之间的耦合程度减小了。这时如果有外力存在, 如电子和原子核轨道的磁距较大, 就会使一个电子自旋方向反转, 从而使两个电子自旋方向相同 (或相平行), 这时的分子就是处于三重态。

非辐射弛豫有内转换与系间交叉两种。内转换是指同一电子激发态的不同振动能级间或不同电子激发态间,因振动或碰撞而以热能的形式释放能量回到较低激发态或基态的过程。系间交叉是指从单线激发态向三重激发态的无辐射跃迁。

激发态分子除了前述的各种光物理的衰减途径外,还可以以能量转移和光化学反应途径退激发光。能量转移是指能量以同一种形式从一处传递到另一处,广义的能量转移包括激发能转移与激发电子转移,激发能转移的主要形式是非辐射的共振转移。光化学反应是分子吸收光能后处于激发态时发生的化学反应,光化反应实际包括两个步骤:第一步是光量子的吸收,此过程是在光作用下直接产生的反应,叫做光反应;第二步才是化学反应,它是光反应后的继发反应,所以叫暗反应。

光化学反应主要有光解离、异构化、光氧化还原、取代、环化加成和光敏化反应等等。

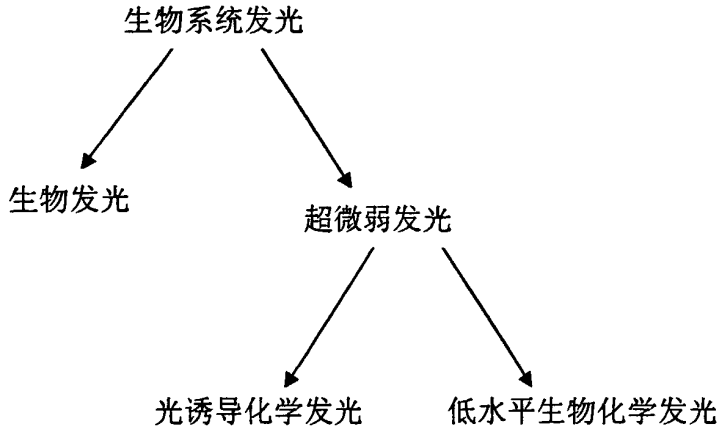
1.1.2 化学发光与生物系统发光

能引起物体发光的原因很多,根据激发源的种类可分为:

- (1) 光致发光 (Photoluminescence)
- (2) 阴极射线致发光 (Cathodoluminescence)
- (3) 电致发光 (Electroluminescence)
- (4) 化学发光 (Chemiluminescence)

化学发光 (Chemiluminescence) 是指伴随化学反应过程的发光。化学反应过程中形成了激发态的反应产物,若此产物分子具有发射荧光的能力,则可发出光子,或通过能量转移机制将激发能转移至受体分子,由受体分子发射出光子。

生物系统的发光是一个很古老和普遍的生物学现象,生物发光体系是化学发光体系的一种特例。它是有机体和生物基质由于放热反应、生物化学反应中释放能量时产生的光。生物系统发光有不同的类型:



生物发光 (Bioluminescence) 是生物体系将化学能有效地转变为光能的过程。生物发光是化学发光的一种特殊情况，它与荧光很相似，差别在于两者产生激发态的机制不一样。生物发光是光生物中唯一与其它由光产生的生物效应相反的过程，即由代谢反应而发光。生物发光是一个很古老和普遍的生物学现象，人类对生物发光的认识是从发光生物开始的。但随着高灵敏度探测仪器的出现，现在有了许多新的发展，如对普遍存在于生物界的超微弱生物光子辐射 (Ultraweak Biophoton Emission) 的认识，尤其是对化学发光研究的较多，而生物发光的本质就是化学发光。近年来生物发光与化学发光已经广泛地应用于科学研究和医学实践。

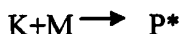
1.1.2.1 化学发光

许多生物学过程中的生化反应，都是通过放热阶段释放能量，这些反应分子都具有较高能量，即处于非平衡的激发态。而激发能是由热反应能与活化能构成，分子的去激发可有许多途径，其中一种就是释放光能，即化学发光。

化学发光的激发能是化学反应过程中释放出的化学能。某些物质在进行化学反应时，吸收了反应时产生的化学能，使反应分子激发至电子激发态，再由第一电子激发态最低振动能级回到基态的各个振动能级时产生辐射或能量转移时发射出光子。化学发光常伴有氧化还原反应以提供足够的激发能，有时发生放热反应。

化学发光的整个过程可看成是从开始反应物 K 与 M 产生激发态产物

P^* , 然后 P^* 释放光子回到基态。



从总体上讲, 化学发光又分为直接发光和间接发光。直接发光中被测物作为反应物直接参加化学发光反应, 反应过程为:



被测物 A 或 B, 通过反应产生电子激发态 C^* , 当 C^* 跃迁回基态时发出光子。

间接发光是被测物起化学反应后不直接发光, 而是生成一个具有较大能量的中间体(C), 中间体能将能量转移于另一物质而发光, 其过程为:



式中 C^* 为能量供体, F^* 为能量受体按照反应机理, 化学发光可分为 4 类:

(1) 生成过氧化物中间体的反应

反应过程中生成一个不稳定的过氧化物中间体, 中间体分解形成两个羰基, 同时大量放热, 满足化学发光反应的能量需要。如酰肼(鲁米诺等)、咪唑、呀啉盐类化合物的化学发光等。

(2) 生成单线激发态氧的化学发光

多羟基化合物在碱性介质中被 H_2O_2 或 O_2 氧化时产生的化学发光现象。

(3) 电子转移化学发光

电子供体和电子受体间的单电子氧化还原反应, 如芳香族多环烃化合物中的发光。

(4) 通过酶转化的化学发光 通常称生物发光(Bioluminescence)。

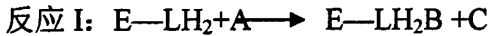
1.1.2.2 生物发光

人们对生物发光的认识是从萤火虫的发光以及海洋水面上的“磷光”开始的。生物发光是化学发光的特例, 即酶促的化学发光, 它是生物体系将化学能有效地转变为光能的过程。生物发光是一个很普遍的生物学现象, 能发光的生物种类很多, 在动物界从原生动物到脊椎动物都有, 在植

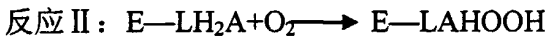
物界只有细菌和高等真菌中才有。

生物发光从生化的角度至少可分为两大类,即虫萤光素—虫萤光素酶体系与钙活化的光蛋白体系。

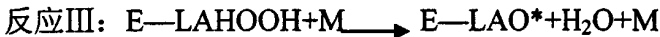
生物发光一般是酶促氧化脱羧反应。Lee 将生物发光概括成四个连续反应,每一种生物发光可以具有其中的几个反应,他认为真正的化学发光只是其中的一个反应。下述反应中 E 表示虫萤光素酶, LH_2 表示虫萤光素, A 是辅助因子。



这一步叫虫萤光素的活化,式中 A 在萤火虫中就是 ATP;



这一步叫加氧反应,海萤的发光是从这一步开始的,而不需要第一步活化反应;



这一反应是激发过程,即所谓真正的化学反应发光。M 是另一辅助因子,例如光蛋白生物发光中的 Ca^{2+} 。当 E-LAO* 去激发时就会发光。



这一反应是由酶催化的。

生物发光和化学发光过程都是将化学能有效地转变为光能,并向环境释放。

1.1.3 生物的超微弱发光

萤火虫发光是一种广为人知的生物发光现象。自然界中能够发光的生物成千上万,不胜枚举;在海洋中有造成“海火”奇观的发光浮游生物;在森林里有晶莹闪烁的发光蘑菇;在草地上有发光的软体动物;在空中有形形色色的发光昆虫。这些发光生物都有一个共同的特点,它们所发出的光都是在体内酶促化学反应下所产生的肉眼可见光。然而,在生物界还普遍存在着一种为肉眼所不能见到的发光—生物的超微弱发光。

这种发光的光谱范围是 180~800nm,强度是 $10 \sim 10^4$ 光子/ cm^2s ,量子效率是 $10^{-14} \sim 10^{-9}$,现代光子计数技术能够确认这种光的存在。有机体这种普遍发光现象与机体的氧化代谢、脱氧化作用、光合作用、细胞的分裂和死亡以及生长调节作用等都有联系。并把这种现象称为生物系统的超

微弱光子发射, 即生物超微弱发光 (ultraweak luminescence, UWL)。

这种生物的化学发光(即低水平的发光)产生于不同的细胞和不同的反应。如线粒体、肝细胞以及一些细胞的正常的生理活动, 微粒体甚至是组织匀浆都可进行化学发光, 释放 O_2^- 、 H_2O_2 等, 并进行以后的反应。

对植物的重要化合物(光合色素、蛋白质、核酸和其他有机物)参与反应的过程进行研究, 把植物系统发光的超微弱生物化学发光分为光诱导化学发光和低水平化学发光两个过程。暗反应时低水平化学发光也称固定超微弱生物化学发光, 这是真正意义上的生物超弱化学发光。它和可逆光化反应发光有共同的性质, 发光是与还原产物的剧烈氧化有关, 同时与过氧化物最后的分解有关, 但固定超微弱生物化学发光强度依赖于氧和温度的变化, 这种发光与细胞的生命活动过程密切相关。

生物超微弱发光的发现可追溯到本世纪 20 年代。发现的前期 Schmeinzky (1916) 以培养的酵母和细菌做为研究材料, 发现在各种生物化学过程中, 它们能发出一些高能辐射, 这种辐射能穿透光不透性的纸, 并能为蛋白质所吸收 Ludwin (1918), 暗示着辐射可能处于 uv 区带, 但当时由于对光认识的局限性而没有意识到。1923 年俄罗斯细胞生物学家 Gurwitsch 做了一个著名的实验。他将正在萌发的洋葱根放在一个可透过紫外线的玻璃管中, 外面再套上一个中部有孔的金属管。将另一个带有玻璃管的洋葱根垂直放置在金属管的有孔一侧。这一设置的用意在于, 将一头洋葱根的根尖分生区垂直在另一洋葱根的伸长区。几小时后, 由于根尖细胞在不断分裂时所产生的某种作用, 使得另一洋葱伸长区细胞的分裂增加, 在小孔相应位置形成一个外突体。进一步研究发现, 这一试验结果是由于根尖细胞在分裂时所产生的的一种很微弱的光辐射所致。当时还不能对这种辐射的强度和波长范围进行测定, 只知道用一块不透紫外线的玻璃就可以挡住这种光辐射, 从而确定它是一种短 350 nm 的紫外光。根据这一实验, Gurwitsch 提出一种假说: 分裂的细胞能够发出一种射线, 当它照射到其它细胞上时, 可以刺激受照细胞进行有丝分裂, 并称这种射线为分生射线。

50 年代初, 由于光灵敏度较高的光电倍增管的问世, 使得进一步研究生物超微弱发光成为可能。Colli 等人 (1954) 利用装有光电倍增管的

仪器首次科学证明了超微弱生物化学发光现象的存在。他们探测了禾谷类实生苗超微弱生物化学发光的强度和光谱。他们以小麦、菜豆、小扁豆和玉米米的萌发种子作为实验材料,测试结果发现被测物都具有超微弱发光的能力,其发光强度为 $250 \sim 700$ 个光子/ $s \cdot cm^2$,波谱范围 $400 \sim 600$ nm,,峰值大约在 550 nm。他们通过实验得到以下结论:(1) 由于对实验材料进行了严格的消毒,从而证明所测到的发光来自幼苗本身而不是某些细菌的发光;(2) 这些幼苗的超微弱发光强度随幼苗的日龄变化,在 14~17 日龄时达到最大值;(3) 超微弱发光与 pH 值关系密切,在 pH7.5 时发光值最大;(4) 当幼苗被切碎时,发光强度比全株的发光强 2~3 倍。

60 年代以后,前苏联的研究者对生物超微弱发光现象给予了极大的关注,进行了较为全面的研究。除了植物之外,还测试了许多动物组织以及一些低等动、植物。在对大量生物样品研究的基础上,提出生物超微弱发光研究的三个重要结果:(1) 当光子由亚稳状态发射时,常常预先受另一光源的激发,这时生物所发射的光子并不是其本身自发发光,而是一种受激发光。由于实验不可能在完全黑暗中进行,所以这种受激发光在许多情况下都不能排除。(2) 超弱光子辐射的能量来自化学反应,这时光子发射过程与生物组织的正常代谢有关。(3) 生物超微弱发光与普通生物发光截然不同,普遍生物发光多来自细菌、真菌、昆虫、鱼类等。高等植物和哺乳动物都不具有普通生物发光,而只具有超微弱发光。普通生物发光的强度远远大于超微弱发光的强度。

70 年代以后,德国学者波普等从实验和理论两个方面对生物的超微弱发光进行系统研究。他们研制了一台精度较高的生物超微弱发光探测仪。采用循环冷却系统降低光电倍增管的工作温度,以减少噪声,提高仪器的精度。在他们的研究中证实:DNA 是生物超微弱发光的一个辐射源,生物细胞间超微弱发光具有一定的相干性,并提出生物超微弱发光与细胞间通讯有关的假设。超微弱发光的研究进入了细胞和亚细胞的水平,在许多动植物细胞、细胞器都自发辐射不同强度的光子:多型核白细胞,小鼠肝微粒体,线粒体,牛心脏细胞中的亚线粒体,植物中的叶绿体都相继被证实,令人振奋的是,黄瓜幼苗,大豆悬浮细胞,落叶松小孢子母细胞等生物的超微弱发光强度与细胞内的 DNA 构象存在着显著的相关关系:松

弛状态的 DNA 比高度浓缩的 DNA 辐射更多的光子, 在基于大量试验结果和理论分析的基础上, 许多研究者认为生物系统的超微弱发光是自然界普遍存在的现象, 是生物体本身固有的一种功能, 生物超微弱发光具有:

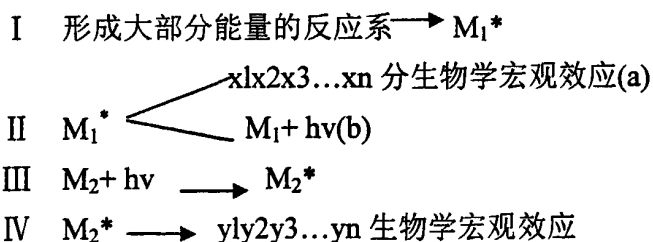
a、发光强度低, 一般在几个至几百个光子/s·cm²; 光谱分布在 200~800 m; 发光量子效率低。b、发光现象普遍: 包括细菌、藻类、真菌、动植物和人体等都能发光, 不仅生物个体, 而且生物的器官、组织、细胞, 甚至是 DNA 分子都能向外界辐射光子。c、这种光子的辐射是生命活动的一般过程, 是生物在代谢活动和生理调控过程辐射出来的, 联系着生物有机体的氧化代谢、清除毒物、细胞分裂、死亡和癌变过程。

80 年代以来, 各国学者以各种不同的动植物、微生物等为材料, 从宏观的探测进入微观水平的研究, 旨在从细胞或亚细胞水平、分子或亚分子水平探讨超微弱生物化学发光的过程和机制, 生物超微弱发光的机理研究更加深入, 应用研究也更加广泛。已涉及到农业、医学药理学、环境科学等许多领域。

目前的研究更加深入, 已经有研究指出, 可见光区的 UWL 可能是源于各种活性氧家族 (ROS) 的羰基化合物和单线态氧, 例如活细胞氧化还原代谢产生的 O₂⁻、H₂O₂、OH⁻、¹O₂ 等。而紫外光区的超微弱发光可能与 DNA 有很大的关联。

1.1.3.1 超微弱发光机制

目前, 对于生物的超微弱化学发光机制的研究也是一个非常令人感兴趣的问题。大量超微弱生物化学发光现象在有机物氧化时被观察到, 特别是有机物按链式机制进行反应时发光更强。其按链式机制进行反应的步骤如下:



从生化的角度来看, 生物超微弱化学发光实质上是生命系统的化学发光。生理生化过程中形成的激发态中间物质 ¹O₂^{*}(=C=O)^{*}退激时, 一部分

能量便以光子的形式释放出来。

目前对生物的超微弱化学发光的解释有以下几种理论。

能量跃迁机制：

在生物体内的生理生化反应过程中，处于基态的基团获得能量跃迁至激发态，处于激发态的基团不稳定，它将释放能量回到基态。释放能量的形式有热、电、光子、离子等，其中以光子形式释放能量的过程叫低水平化学发光，即超微弱生物化学发光。由于生物体的能量传递包括一系列化学和物理学过程，化学反应引发的原子或原子团激发的效率分别为 10^{-1} ，和 $10^{-5} \sim 10^{-2}$ ，甚至更低。因此，生物体内的光子传递不完全产生光子辐射。根据已报道的超微弱生物化学发光波长（180~800 nm）计算，能级跃迁释放的能量至少为 1.55 eV 才能产生一个光子。大豆、小麦、黄瓜、大麦根和毛白杨叶片能级跃迁释放的能量分别是 2.0~2.7，1.77~2.48，2.34，3.27~4.97 和 1.67~2.62 eV。这种发光强度很弱只相当于在几英里之外燃烧着的一支蜡烛的光亮。

活性氧机制：

①非发光的丙二醛（MDA）和过氧化物（HOOH）：

②激发态物质：羰基化合物（ $R=O^*$ ）、单线态分子氧（ $^1O_2^*$ ）和醇（ROH）。 $R=O^*$ 和 $^1O_2^*$ 退激时分别发出蓝光和红光。

活性氧机制把自由基作为超微弱生物化学发光源，它包括了自由基的生成和控制两个方面，能较好的解释自由基引起 UWL 的可能性。一些自由基化合反应释放的能量高 480 KJ/mol (3.028×10^5 MeV/mol) 足以产生大约 230 nm 的紫外光子。同时，由于活体内的氧化反应受抗氧化剂的控制，它们清除活性氧自由基。因此，动植物在正常代谢过程中产生的自由基是少量的，超微弱生物化学发光强度也低。但是当生物体内的天然抗氧化剂和氧化脂类之间的平衡被破坏后，体内抗氧化剂不能及时补充，氧化即进入不稳定状态并开始自由加速，将导致发光强度瞬时剧增，即出现生物超微弱生物化学发光的“闪光现象”。

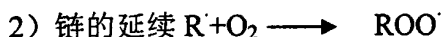
活性氧机制只能解释部分超微弱生物化学发光现象，这说明活性氧仅是产生超微弱生物化学发光的原因之一（周禾等，1997）。

电子泄漏理论：在生物氧化的电子传递链中，电子有可能通过某种转

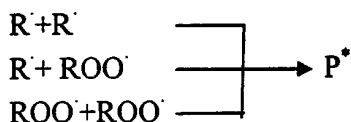
移途经不生成 ATP, 而产生自由基 R· 从而引起 UWL。这种可能性是存在的。

代谢发光机制:

以光生物化学为基础, 把生物 UWL 与有机体内的代谢过程联系起来, 认为这种发光主要来源于氧化还原等代谢反应, 如脂肪酸氧化、酚和醛的氧化、 H_2O_2 的酶解、花生四烯酸的氧化、儿茶酚胺和单宁的过氧化、醌的氧化裂解、氨基酸的氧化等其中脂类自由基在超微弱发光中的作用尤为重要, 因为在生物膜的磷脂中含有许多不饱和脂肪酸, 它们在一定条件下可以按照自由基锁链反应机制进行氧化反应。锁链反应的特点是自由基在与其它分子反应后并不消失, 而是转化为另一种自由基, 因此, 脂类锁链氧化的过程包括在一自由基引导下, 引发产生一脂自由基, 然后此自由基反应继续发展, 并产生分支, 从而产生更多的脂自由基。不饱和脂肪酸的氧化作用产生了过氧化自由基, 过氧化自由基复合时能形成处于激发态的过氧化物, 其退激时即可产生 UWL。其反应的一般模式为:



4) 复合反应形成激发态



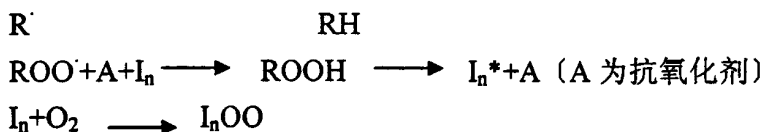
5) 介质中无活化剂时, 激发态产物自身发光, 这些产物为醛、酮、酸等。



6) 介质中有活化剂如麦角脂醇、芳香氨基酸、蛋白质等时, 则发生能量转移, 使活化剂激发, 它们在跃迁至基态时发出光子, 但通常其发射波长都移向长波方向。添加各种活化剂可以提高反应时的发光强度。



7) 介质中存在抗氧化剂或抑制剂时则能使活化剂不被氧化, 而转化为低活性基团, 从而终止链式氧化。



“代谢发光”机制的实验依据来自多方面,添加各种活化剂可以提高化学反应时的发光强度,同样,阻氧化剂可以截获原子团并转化为低活性基团,终止链式氧化反应。小鼠肝脏微粒体的化学发光与脂类过氧化的研究表明,脂肪酸的最大发光值都与脂肪酸氧化酶呈线性关系;药物提取物对超微弱生物化学发光和脂肪酸氧化酶有相似的抑制作用;脂肪酸氧化酶抑制剂 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 和 EDTA (乙二胺四乙酸) 等同样也抑制超微弱生物化学发光。用呼吸代谢电子传递链的抑制剂 NaN_3 所做的实验表明, NaN_3 对萌发绿豆的超微弱生物化学发光有高达 72% 的抑制作用 (毛大璋等, 1988), 因而说明植物种子中可能至少有 72% 的超弱化学发光与呼吸代谢等氧化过程相关联。证明脂肪酸氧化是超微弱生物化学发光的主要来源之一。

“代谢发光”机制也包括了自由基活性氧机制,包括自由基生成与控制两个方面,能较好地解释自由基引起超微弱生物化学发光。生物分子在 O_2 存在时,自动氧化生成 O_2^- 。在乙醇酸氧化酶的作用下乙醇酸转化为乙醛酸,同时生成 H_2O_2 。在线粒体中形成的半醌自由基,自氧化产生 O_2^- 在细胞正常生长时,产生率与清除率相等,从而使细胞内的活性氧浓度保持恒定。

关于代谢发光的机理, Valadimirov 曾提出过酶反应机制学说,认为它来源于代谢产生的过氧化物的酶解;但现在一般认为代谢发光是饱和脂肪酸氧化产生的过氧化自由基复合后形成的三重态过氧化物退激所致。一般认为代谢产生的发光可达到天然组织均浆总发光的 75%。有机体在细胞代谢过程中产生的非特异性化学发光、吞噬作用化学发光、过氧化物酶解时发光、尤其是与氧化代谢无关的有丝分裂产生的超弱射线等,都对生物低水平化学发光有所贡献。

然而,上述“代谢发光”机制并不能对 UWL 的所有特点进行解释,如:对生物超微弱发光的非线性效应、光子计数统计服从泊松分布、借助生物光子细胞间的光通讯联络以及延迟发光不遵从指数而遵从双曲线衰减规律都无法解释。

DNA 发光:

有些研究者 (Popp 等, 1984; 顾樵, 1989) 认为, DNA 类似于一个品质因素极高的“光子存储器”, 球状的细胞像一个“谐振腔”, 有利于引发非线性光学效应。DNA 可能是植物体另一个非常重要的光子辐射来源 (Rattemeyer 等, 1981)。当用不同的浓度的溴化乙锭 (EB) 诱导 DNA 从超螺旋向解螺旋转变时, 生物的 UWL 强度会随 DNA 构象的改变从低到高。核酸合成抑制剂放线菌素 D 对 DNA 的合成的抑制与对 UWL 的抑制是相关的, 而且用蛋白质合成抑制剂环己亚胺所做的实验, 排除了与 DNA、RNA 合成有关的酶合成过程中产生 UWL 的可能性 (毛大璋等, 1988)。由此说明, DNA 和 RNA 分子的合成反应可能是一个产生 UWL 的源, 不过在体外的 DNA 分子中, 并没有观察到这种效应。

综上所述, 上述发光机制都只能解释部分超微弱发光现象, 刘颂豪等 (1997) 利用量子化学和辐射与物质相互作用的时间量子理论研究了生物光子的全同粒子模型, 对“代谢发光”等机制的统一性进行了有益的探讨。但是生命是一个及其复杂的运动形式, 每种生物都具有高度有序和复杂的结构, 虽然 UWL 只是生物众多物理特性的一个, 但是它与生物的有序性及许多重要特性及过程相关联, 包含着大量的生物学信息, 产生机制非常复杂, 目前人们对它的认识还具有一定的局限性, 仍需要在理论和实验方面进行深入研究。

1.1.3.2 影响超微弱发光的因素

UWL 与植物的代谢及生长活性有关, 影响植物生长与代谢的各种因素 (如物理的、化学的、生物学的等) 大多影响 UWL 的强度及其变化规律, 现仅从以下几个方面加以介绍。

物理因素物理因素有许多, 但对植物 UWL 比较大的主要是与体内氧化还原过程有关的一些因素, 如氧、温度、创伤等。氧气或活性氧是 UWL 的关键成分。当植物在 N_2 中培养时会使其 UWL 值消失或降低 (Abeles, 1986)。在 3% 的 O_2 中的 UWL 只为最大值的一半 (Yafarova 和 Veselovskii, 1969)。当 O_2 的浓度从 0% 上升到 20% 时, 大麦根部的 UWL 成直线增加 (Veselovskii 等, 1963)。在密环菌发光条件研究的实验中也证明了只有有氧存在时, 才能使某些生物体发光 (谭周进等, 2001)。植物在感染疾

病、电或机械损伤等导致的伤害时，都会导致 UWL 的升高（胡献明等，2002；马斌等，1992，邢达等，1999，Chenetal, 2003a; Patricketal, 1998）。细胞紊乱以后升高的过氧化活性导致了 UWL 的升高（Salin 和 Bridges, 1983）。温度控制着氧气或活性氧与脂类和其它不饱和底物的反应速率，也控制着氧气在氧化酶和其它酶作用下形成活性氧的速率，且极端高温和低温会对细胞产生致死影响等，而 UWL 对温度的依赖性呈一平滑的对数曲线关系（Abeles, 1986）。

化学因素也很多，如氧化剂、代谢抑制剂、金属离子以及甲醛或放线菌素 D 等化学物质，它们都可强烈的影响体内的氧化还原以及其它代谢反应，所以对 UWL 也有不同程度的影响（潘伟槐等，1997；Maccarrone 等，2000；Michel, 2003）。周禾与杨起简（1996）发现，将萌发后 6 h 和 72 h 的小麦放在石英杯内，分别加入等量 1% KMnO_4 溶液，前者 UWL 值为在蒸馏水中正常萌发 6 h 后平均发光值的 8 倍，后者为 2.5 倍，可见氧化剂可使植物萌发时的发光有不同程度的增强。呼吸代谢抑制剂 NaN_3 对萌发绿豆的 UWL 高达 72% 的抑制，甲醛或放线菌素 D 等化学物质处理植物时，会导致植物细胞紊乱使 UWL 升高（毛大璋等，1988）。此外，不同的金属离子对植物 UWL 也有不同程度的影响，如 Cu^+ 过量时会使植物的 UWL 下降，而 Hg^{2+} 可使 UWL 增加，用 0.2 mol/L 的 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 溶液会使植物的呼吸和 UWL 都降低（Abeles 等，1986）。

其它因素除以上因素外，影响植物体 UWL 的因素还很多，如磁场、pH、辐射、光质、激素以及环境胁迫等（马玉琴等，1988；王树禹等，2000；Eva and Humio, 1991）。低磁场使 UWL 增加 40%，高磁场 UWL 降低（李光林与杨亚玲，1995）。大麦根系在 pH=9.2 的环境中培养时的 UWL 比在 pH=7.3 的环境中生长时要高，而较低的 pH 值可使黑麦根系晶状态匀浆的 UWL 达到最大（Grabiecetal, 1968）。用特定电磁辐射处理大豆种子可使发光值增高（谭辉玲与色莫代，1989）。不同的光质对 UWL 也有影响，花生和水稻幼苗的 UWL 在白光下最强，其次是红光，蓝光最弱（李德红等，1998a；李德红等，1998b）。植物的 UWL 也受逆境条件的影响（刘大森，2001；吴文福等，2002），例如，种子在萌发期间分别放入 1% NaCl 和 20% PEG 中（相当于 -5.96 bar）时，发光强度逐步下降

(周禾和杨起简, 1996)。IAA 从可减少大豆根系的 UWL, 然而在受伤情况下, 用 IAA 处理根系或 IAA 与 H_2O_2 一块用于草莓的花托上时, 其 UWL 都会升高等 (Salinand; Bridges, 1983)。这些变化可能与植物生长活性的改变有关。

1.1.3.3 微弱发光的应用

(1) 生物学领域的应用

生物超微弱发光即生命体系本身性质的研究是一项前沿性探索工作, 还不够成熟、并存在较多争议但至今已在生物学领域开展了应用。

自由基医学, 自由基过氧化反应中均伴有低水平化学发光, 借此可以监测和研究自由基反应与此相关的衰老、中毒、氧化磷酸化及超氧化物歧化酶的研究也广泛地应用了超微弱发光探测技术。

细胞吞噬发光, O_2 在发光中的作用及细胞免疫状态对发光的影响, 为临床诊断增加了判断依据。目前细胞吞噬发光几乎形成一个模型系统, 用以观测有关指标 (如黄嘌呤氧化酶系)。Stjernolm 等 (1973) 提出了用吞噬发光确定肉芽肿瘤病的观点。他指出肉芽肿瘤病患者不出现化学发光。鲁米诺依赖的化学发光可以减少采血量, 便于临床应用 (Allen 等, 1976)。

细胞耐受性研究, 细胞损伤时, 蜕变光子辐射及放射性照射后细胞发光现象, 成了农作物抗性 (耐寒、耐碱、耐热性) 以及放射性监测的手段, 同时大量地用于环境监测。另外, 在体表及脏器表面自发超微弱发光、电化学发光等方面均有应用。

(2) 环境中的应用

生物发光技术也可以用于环境中综合危害的监测。例如: ①对药剂的评价。用植物发光强度的变化检测除草剂喷施时期和施用量对植物的影响, 其敏感度比用生物生长指标 (如生长量、叶重、叶面积等) 要高出三个数量级; ②元素的测定。生物发光对许多金属离子很敏感, 用生物超微弱发光可定量测定 Ca、Cu、Zn、Mn、Fe 等元素的浓度; ③对环境毒物的测定。生物发光法检验 SO_2 对植物毒害的精度, 比卫生检测标准要求高得多; 对废水、废液、工业污水中重金属及致病菌的检测, 灵敏度可达十亿分之几的数量级。

(3) 在农业中的应用

作物的超微弱发光特征：作物幼苗不同器官间超微弱发光强度有差别，根（或胚根）发光最强（周禾等，1996），因为种子萌发后，细胞分裂活动主要集中在胚根的分生区。于这一点，国外有类似报道，对小麦、菜豆、扁豆和玉米的研究显示，根的发光强度是茎的 10 多倍（Colli, 1955）。但也有例外，在玉米根、芽、胚、种中，芽的发光强度最大。对大豆的研究显示，子叶的发光强度高于真叶，究其原因，子叶是苗期养分的主要来源，而真叶才刚开始生长。作物萌发过程中，超微弱发光的动态变化呈现单峰曲线，中期发光强度萌发比前期和后期高出 2~3 倍，发光量在总发光量中占绝大部分。但有的研究也显示萌发过程中发光强度呈双峰曲线；并认为第一峰主要与营养物质的分解代谢（主要是不饱和脂肪酸的氧化）有关，第二峰主要与有丝分裂有关，两者同时并存；但峰值出现的早晚因作物种类而不同。不同作物种类间超微弱发光强度有所不同，比如苗期发光强度大麦>小麦>玉米，反映了它们在干旱适应性上的差异。种子超微弱发光强度与某些物质的含量有关，豆科牧草种子萌动之初，超微弱发光强度与干种子中饱和脂肪酸 C₁₄₋₁₈、棕榈酸、ATP 含量呈负相关，和双键不饱和脂肪酸

C₁₈₋₂₄ 含量成正相关，这和一些沙生植物是一致的。作物籽粒的发光强度与成熟度及着生部位有关，对玉米的研究表明，成熟度小的籽粒高于成熟度大的籽粒。其原因在于，授粉初期籽粒主要是器官分化，细胞分裂和呼吸作用强；进入完熟期后，籽粒新陈代谢和细胞分裂减弱，超微弱发光也相应减弱。此外，不同着生部位的籽粒超微弱发光强度也有所不同，授粉 48 天后的玉米果穗，上部籽粒<中部籽粒<下部籽粒；采后贮存 30 天的果穗，发光趋势正好相反，前者反映了果穗的发育和成熟过程，后者则反映了玉米果穗收获后穗部营养物质转运和累积的规律。

缺失体和种子活力：三种大豆脂肪酸氧化酶同工酶缺失体 Lox1、Lox2、Lox3 及其组合缺失体的子叶和真叶有相同的发光规律，双缺失体>单缺失体>正常品种，表明缺失体苗期叶片的超微弱发光与脂肪酸氧化酶的基因型有关，这也许可以成为鉴别脂肪酸氧化单线态氧和激发态羰基退激发光。酶同工酶缺失体的指标。国外对这三种缺失体也有研究，三者及

其组合的组织匀浆中, Lox1+Lox3 的发光强度最低 (Wang 等, 1990) 报道。种子超微弱发光强度的高低能在一定程度上反映种子活力的大小, 马铃薯整种子及其粉碎后的提取液超微弱发光强度均与发芽率和发芽指数呈显著或极显著正相关关系。用超微弱发光强度鉴定种子活力, 样品量少又不破坏种子, 对于种子量少的珍贵品种极其有益。

抗性研究: 植物在极限逆境条件下或造成死亡, 或造成细胞解体时有发光增强现象, 利用这个原理可以探索植物能耐受的临界条件, 确定植物的具体适应极限试验表明逆境条件下微弱发光动力学测量是具有理论价值和应用前景的新方法。已有学者把超微弱发光作为一种耐盐碱、抗旱、抗热、抗寒乃至抗病的指标。

抗盐碱 用 NaCl 溶液对种子进行盐分胁迫处理, 结果显示, 高抗盐品种的发芽率和超微弱发光强度均高于敏感品种, 耐盐苜蓿的发光值、代谢和生长速率无大的变化, 敏感品种则有显著改变。盐分胁迫将降低超微弱发光强度, 用 0.15% NaCl 溶液萌发的大麦发光强度显著低于对照。另外 UWL 能够指示红豆苗受盐胁迫的伤害程度 (Ohya 等, 2000), 在植物生长的前期, 盐浓度越高, UWL 越低。通过对盐胁迫下绿豆幼苗的研究也发现, 随着盐浓度的增加, UWL 逐渐降低 (曹晓兵等, 2004)。作物达到盐碱临界度时亦有“闪光”现象出现, 如 2% NaCl 溶液萌发的大麦发光强度反而比用低浓度 NaCl 溶液萌发时高。盐胁迫引起的发光变化反映了作物抗盐性的差异, 用 1% NaCl 溶液萌发的小麦发光强度和对照无显著差异, 大豆则差异明显, 这是因为小麦属中抗盐作物, 而大豆属不抗盐作物。稀土能提高作物耐盐能力, 稀土都比对照高将近两倍, 而照射 60 min 的大豆种子反而明显低于对照; 加入冷光剂后发光作用得到了加强, 但发光趋势不变。

抗旱 干旱条件下, 抗旱性强的小麦种子的萌发速度和发光强度比不抗旱小麦种子高的多, 测定作物种子的超微弱发光强度可作为一种鉴定和选育抗旱品种的简便、准确和有效的方法 (汪沛洪, 1990)。同时也有学者发现, 在低温下抗旱性强的玉米种子萌发时超微弱发光强度明显高于抗旱性差的种子, 测定作物种子超微弱发光强度也可以作为鉴定挑选抗旱品种的一种有效的方法。通过研究激素对红豆的影响, 结果发现 UWL 与干

旱成正相关, UWL 可以检测水分的亏缺 (Ka 等, 1995)。通过对苹果幼苗的研究发现, 随着盐胁迫时间的延长, UWL 会呈现降低的趋势, 并且, UWL 反映幼苗品种抗旱性结果与用其它生理指标测定的结果一致 (张新华等, 2004)。

抗热 UWL 也是一种反映抗热性的有效指标。小麦、玉米和棉花种子萌发时 UWL 值随环境温度升高而增大, UWL 出现峰值时温度达到临界温度, 根据临界温度的高低, 可以判断植物抗热性的强弱 (习岗等, 1994)。高温胁迫初期, 平邑甜茶幼苗叶片超微弱发光下降, 但随着高温胁迫时间的延长, 超微弱发光的强度会逐渐上升, 并在 48 h 时恢复到对照水平 (国颖等, 2008)。高温胁迫下大白菜的超微弱发光, 结果显示经过高温胁迫后, 幼苗的 UWL 呈先上升后下降的趋势, 并且抗热品种的 UWL 比不耐热品种高, 并且 UWL 反映品种耐热性的结果与其他生理指标测定的结果一致 (杨妍妍等, 2006)。

抗寒 低温能降低超微弱发光强度, 低温下萌动 7~8 d 的玉米籽粒发光强度不及室温下的三分之一, 且同样的低温, 抗寒品种发光强度显著高于不抗寒品种 (杨起简, 1984), 对蔷薇属植物冷冻前后 UWL 的动力学研究显示, 做冷冻处理的试验植物发光动力学曲线衰减明显快于不冷冻的材料且不同的品种解冻后发光动力学曲线明显不同。这种低温萌动时品种间发光强度的差异性与品种抗冷性一致的表现, 为筛选抗寒品种提供了一种简捷的鉴定方法 (包志毅, 2001)。稀土有利于提高根系活力和发光强度, 但稀土只是在作物自身抗寒基础上发挥效力。随着温度的下降可能出现类似“闪光”的现象, 比如冬小麦在 ($4^{\circ}\text{C} \sim 0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$) 降温过程中, 根系活力随之下下降, 根系超微弱发光强度却反而有所提高。水果对低温的反应和萌发种子有所不同, 将葡萄和金桔分别贮藏在低温和室温下, 结果, 在贮藏过程中发光强度没有显著变化, 而且两种处理间亦无显著差异 (杨起简, 1993)。

抗病 外源激发子处理后的番茄、天甜胡椒、烟草的悬浮细胞, 能引起 Luminol (一种发光增强剂) 的发光增强, 发光分析结果表明激发子之所以引起植物超敏死亡的原因是由于产生了 H_2O_2 和 O_2 。低温、强光照处理的植物超微弱发光明显增强, 这是因为在胁迫条件下, 植物产生了大量

的活性自由基,这与核磁共振的研究结果相一致。超微弱发光可以作为自由基产生的指示剂,用于早期监视冷害对温度敏感植物的影响。昆虫体内分泌物可以对玉米叶片起直接作用从而引起超微弱发光的产生(Iyozumi等,2005)。作为机体抵抗外源病害的巨噬细胞,它的发光反映着机体的病理状态。感染真菌过程中,甜胡椒产生随时间变化的超微弱发光,光谱、二维成像动态地反映植物抵抗病害的反应过程,为研究生物抗病抗逆的机制提供了一个新的技术。

另外,超微弱发光还有更广泛的应用,利用高压静电场处理甜菜、玉米种子,发现超微弱发光强度与增产效果存在一定的正相关性,超微弱发光最强组也是增产效果最好组(白亚乡等,2002)。由于发芽种子的超微弱发光强度易测量,且测量时间短、成本低、不受天气及土地条件的影响,应用此项技术筛选静电场的最佳处理剂量将节省大量的人力、物力,大大缩短筛选周期从而进一步推进静电技术在农业生产中的推广与应用。超微弱发光也可以显示抗穗发芽的能力,虽然不同抗穗发芽能力小麦品种完熟期和贮藏期幼苗的超微弱发光强度有相同趋势,但是发光的强度却呈现,休眠期短的品种(易带穗发芽)>中抗品种>抗性品种。因此,籽粒超微弱发光强度可作为鉴定和筛选抗穗发芽品种的依据。只要把品种按发光值和统计结果排列,即可把抗性品种和抗性差的品种分开,而且条件单一,不需模拟逆境。

1.2 本研究的目的意义

切花菊品种‘神马’是日本市场上目前普遍受欢迎的一个白色秋菊品种,从当年10月到次年5月一直在国际市场上占有主导地位。尤其是在日本市场上更广受欢迎,由于‘神马’菊花为日本国内不受保护的菊花品种,所以目前我国菊花生产企业能够合法出口到日本菊花品种主要为‘神马’白菊。因此研究‘神马’有非常大的经济效益。扦插是菊花最主要的繁殖方式,目前研究扦插主要采用形态观察和各种生理生化指标的测定上,前者比较主观不精确,而后者的工作量也很大。另外,菊花的花期调控是周年生产切花的关键,这就必须要了解花芽分化的各种生理生化状态,以便为菊花的花期调控提供理论指导。但是与扦插的研究一样,研究花芽分化也存在与研究扦插相同的问题,就是要么就是太主观,要么工作量就很大。

为了解决上述问题,我们采用一种全新的方法——超微弱发光的方法来研究菊花的生命过程。UWL 与生物系统的氧化代谢、细胞凋亡、光合作用、生长调节以及能量转换等都有密切的关系,并且其具有可靠、方便、快捷和实时性的特点,是一种很好的研究生命现象的新方法。另外,许多研究表明,UWL 与植物的抗性显著相关,可以作为植物抗性的灵敏指标,因此,UWL 作为一种重要的生物物理现象,对菊花的繁殖,发育与环境适应有重要的意义。本论文探讨了扦插繁殖过程中,菊花花芽分化过程以及低温胁迫下的 UWL 的变化与能量代谢等其他的生理生化指标之间的关系,期望从生物物理方面揭示菊花中的一些现象,为深入探讨菊花的生命本质以及利用生物 UWL 为菊花的生产与研究服务提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 材料

试验于山东农业大学园艺科学与工程学院中心实验室、花卉栽培生理实验室以及山东农业大学南校区园艺站进行。供试材料为目前生产上采用的白色主导切花菊品种‘神马’(*Dendranthema grandiflora* ‘Jinba’)。

2.2 实验设计

2.2.1 菊花花芽分化期 UWL 及生理生化代谢的变化

2007 年 5 月末取生长一致的株高约 50 cm 的菊花(一盆一株,共 240 株)放入一个人工气候室中进行短日照处理(18:00~8:00, 16 h 暗期, SD)(120 株),对照组放入另一个人工气候室中进行长日照处理(21:00~7:00, 8 h 暗期, LD)(120 株)。温度设为 22℃昼/18℃夜;光照 370 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。参考杨娜等(2007)方法,显微镜观察花芽分化各时期,并确定未分化期(I);花芽分化起动期(II);总苞鳞片分化期(III);小花原基分化期(IV);花冠形成期(V)(见版图)。各分化期分别出现在处理后第 2d(I 期);处理后 4~5d(II 期);处理后 7~8d(III 期);处理后 14~16d(IV 期);处理后 18~20d(V 期)。取样时,在不同花芽分化期分别取生长点以下第 5~6 节位叶片,对照组分别与不同花芽分化期同步

取材, 待测各生理指标。重复 3 次。

2.2.2 菊花扦插生根过程中 UWL 及生理生化代谢的变化

2009 年 3 月取生长健壮, 无病虫害的枝条做插穗, 插穗长约为 8~10cm, 将基部的叶片摘掉, 分别将插穗浸入 NAA、NAA+CaCl₂、蒸馏水不同的处理液中, 大约浸蘸 30 s, 最后将插穗扦插于扦插床上。喷雾时间设为一天喷四次, 从早上 9 点开始每隔 2 h 喷一次。分别在扦插的第 0 d、第 5 d, 第 10 d, 第 15 d, 第 20 d 和第 25 d 取材, 取材时取插穗中部的叶片, 重复 3 次。

2.2.3 低温弱光胁迫下菊花 UWL 及生理生化代谢的变化

2009 年 3 月在山东农业大学园艺站进行育苗。将扦插生根幼苗定植于装有蛭石和珍珠岩 (1:1) 的花盆中 (1 盆 1 株), 在日光温室内自然光下进行营养生长至株高 40 cm、叶片数 20 片左右时, 挑选生长健壮, 长势一致的植株 (共 120 株) 移入人工气候室, 在 22℃/18℃下适应 1 d, 测定各参数值作为初始值, 第 2 d 分别移入宁波产 GXZ 型光照培养箱内进行偏低温弱光 T1 (昼/夜温度 16℃/12℃, 光量子通量密度 PFD 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)、临界低温弱光 T2 (温度 12℃/8℃, PFD 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 胁迫处理, 以正常温光处理 (温度 22℃/18℃, PFD 450 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 做对照 (每处理 40 株)。光周期均设为白天 16 h, 黑夜 8 h。选取植株上部第 5~6 片叶, 在胁迫处理后的第 1、3、5、7、9、11 d 测定各项指标。重复 3 次。

2.3 测定内容与方法

2.3.1 UWL 的测定

取完整无损伤的菊花成熟叶片 (生长点以下第 5~6 节位), 以鲜重 0.5 g 左右叶片为单位 (从 I~V 期测定叶片总计 15 片以上), 经白炽灯 (光强 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 照射 5 min 后立即放入测量杯中测量 (从放入到开始计数时间间隔 2 s)。仪器采用中国科学院生物物理研究所研制的超微弱发光测量仪 (BPCL)。测量参数为: 调解高压为 800 V, 标准光源发光强度 7000 $\text{counts}\cdot\text{s}^{-1}$, 本底强度 5 $\text{counts}\cdot\text{s}^{-1}$, 采样时间 200 s, 采样间隔时间 1 s。每个样品测试 3 次, 取平均值。超微弱发光的强度测定在暗室及恒温

($20\pm 1^{\circ}\text{C}$), 湿度 ($75\pm 2\%$) 条件下进行。

2.3.2 荧光强度的测定

采用荧光仪测定 (日立 F4500), 激发光 EX 波长 440 nm, 发射光 EM 波长 500~700 nm, 缝宽 EX/EM 为 10.0 nm/5.0 nm, 扫描速度 12000 nm/min, 扫描间隔 EX/EM 为 10.0 nm/5.0 nm。

2.3.3 磷光强度的测定

采用荧光仪测定 (日立 F4500), 激发光 EX 波长 210 nm, 发射光 EM 波长 400~500 nm, 缝宽 EX/EM 为 10.0 nm/5.0nm, 扫描速度 2400 nm/min, 扫描间隔 EX/EM 为 10.0 nm/5.0 nm。

2.3.4 ATP 含量测定

参照王维光和顾俭本 (1986) 的方法测定。

首先制取荧光素酶液。(1) 0.05 M 甘氨酸甘氨酸缓冲溶液配制: 称取 0.66 g 甘氨酸甘氨酸 (0.05 M), 0.247 g $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (10 mm), 0.0372 g EDTA(1mm), 依次溶于蒸馏水中, 用 0.5 N KOH 调至 $\text{PH}=7.4\sim 7.8$, 定容至 100 ml, 备用, 此溶液可保存在冰箱里。(2) 配酶液时 1 ml 甘氨酸甘氨酸缓冲液加入牛血清蛋白 1 mg, 以维持酶的稳定性。(3) 用分析天平称取 40 mg 的酶粉, 倒入玻璃匀浆器内, 加入含有牛血清蛋白的 0.05 M 甘氨酸甘氨酸缓冲溶液, 研磨后, 置于 3000 转/min 离心机中离心 5 min, 倾出上清液备用。酶液可在 4°C 条件下保持两天。

取 0.5 g 菊花叶片剪碎, 加入 10 ml 的去离子水中, 沸水浴 10 min, 冰浴冷却, 摇匀, 取 0.2 ml 的上清液, 倒在 5 mm 的比色杯中, 将比色杯放入光度计暗盒中, 关闭暗盒, 再注入已经制备好的荧光素酶液, 同时记录发光的高峰值读数即发光强度, 按照上述方法作标准曲线, 根据测定的 ATP 标准曲线得出 ATP 的含量。

2.3.5 呼吸速率测定

在活体植株生长点以下第 5~6 节位叶片, 用 COMBO280 型 O_2/CO_2 气体分析仪测定, 当光强为零时, 所得光合速率即为呼吸速率, 单位 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

2.3.6 DNA 和 RNA 含量测定

称取 1 g 样品, 置于预冷的研钵中, 加 1 ml 冰冻 100% 甲醇冰浴研磨。匀浆于 4℃、4000 rpm 离心 10 min, 去掉上清液, 所得沉淀按照以下步骤进行, 依次用各种溶液洗涤 (沉淀用每一种溶液悬浮, 放置 10 min 后离心弃去上清液, 所有过程在 4℃)。

植物组织 (预冷) → 10 ml 冰冻 100% 甲醇冰浴研磨 (4000 rpm 离心 10 min, 下同) → 2 ml 含 0.05 M 甲酸的甲醇洗 2 次 (4~6℃) → 2 ml 95% 乙醇: 乙醚 (2:1) 混合液洗 2 次 (4~6℃) → 1 ml 0.5 M 过氯酸洗 2 次 (4~6℃) → 2 ml 95% 乙醇洗 2 次 (4~6℃) → 2 ml 95% 乙醇煮沸 20 s, 重复 2 次 → 2 ml 95% 乙醇: 乙醚 (2:1) 混合液煮沸 20 s, 重复 2 次。洗涤过的沉淀加 2 ml 0.5 M 的过氯酸 80℃ 水解 15 min, 离心收集上清液, 重复 5 次, 每次 1 ml, 收集上清液混匀。

取上述过氯酸提取液在 260 nm 和 280 nm 波长下, 用 1 cm 石英比色杯比色, 以加热过的 0.5 M 的过氯酸为对照, 测定吸光度值。总核酸浓度 ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) = $0.0629 A_{260} - 0.0360 A_{280}$ 。

DNA 含量测定采用二苯胺显色法, 取上述过氯酸提取液 1 ml 加 2 ml 反应液 (由 20 ml 二苯胺溶液 (1.5 g 二苯胺溶于 100 ml 冰醋酸中, 再加 1.5 ml 浓硫酸摇匀, 贮存于棕色瓶中) 加 0.1 ml 乙醛溶液 (1.0 ml 加水稀释到 50 ml) 组成), 在具塞试管内充分混合, 室温放置 20~25 h。反应充分后, 在 600 nm 波长下比色。以小牛胸腺 DNA 钠盐为标准, 称取 5.0 mg 小牛胸腺 DNA 钠盐, 溶于 5.0 ml 0.005 M NaOH, 然后与等量的 1 N 的过氯酸混合。70℃ 水浴 15 min, 然后冷却。以此为标准稀释成不同浓度, 按照上述测定方法制作标准曲线计算。用所得的总核酸的含量减去 DNA 含量即得 RNA 含量。

2.3.7 超氧阴离子释放速率的测定

采用羟胺法测定。取 5 g 鲜重材料, 用 6 ml 65 mmol/L 磷缓 (PH 7.8) 研磨, 经四层纱布过滤, 滤液在 5000×g 离心 10 min, 取上清液 1 ml (约 0.5 mg 蛋白) 加入磷缓 0.9 ml 和 10 mmol/l 羟氨氯化物 0.1 ml, 在 25℃ 混合培养 20 min, 取 0.5 ml 培养液依次加入 0.5 ml 17 mmol/对氨基苯磺酸和 0.5 ml 7 mmol/l α -萘胺, 在 25℃ 反应 20 min, 反应后的显色液用同体积正丁醇充分摇匀, 静置 (或离心) 分层, 取正丁醇相测 A_{580} , 用磷缓代替

样品作空白。如样品含有大量的叶绿素则改用乙醚，在充分摇匀后于 1500×g 离心 5 min，吸出部分粉红色的水相液测 A580。

2.3.8 SOD、POD、CAT 活性、MDA 与可溶性蛋白含量的测定

称取叶片 0.5 g，于研钵中加 5 ml pH 7.8 的 50 mmol·l⁻¹ 磷酸缓冲液，冰浴研磨，0~4℃下 10000 rpm 离心 15 min，上清液即为酶提取液。供酶活性、MDA 含量和可溶性蛋白测定。

SOD 活性用 NBT 还原法 (Giannopolitis, 1977): 3 ml 反应液 (内含 2.7 ml 144 mmol·l⁻¹ 的蛋氨酸, 0.1 ml 22.5 μmol·l⁻¹ 氮蓝四唑, 0.1 ml 3 μmol·l⁻¹ 的 EDTA-Na₂, 0.1 ml 60 μmol·l⁻¹ 的核黄素) 加入 20 μl 酶提取液, 60 μmol·m⁻²·s⁻¹ 左右光照下反应 30 min, 于 560 nm 比色, 以抑制 NBT 光化还原的 50% 为一个酶活性单位。

POD 活性采用愈创木酚法 (Omran, 1980): 3 ml 反应液 (其中 H₂O₂ 的浓度为 0.1 mol·l⁻¹, 愈创木酚浓度为 3.5 mmol·l⁻¹, 用 0.1 mol·l⁻¹ pH 6.0 的磷酸缓冲液配制) 中加入 20 μl 酶提取液, 紫外分光光度计马上读 OD₄₇₀ 值, 每隔一分钟读一次, 读反应前 2 min 的 OD 值, 活性 ΔOD₄₇₀·min⁻¹·g⁻¹FW 表示。

CAT 活性用 Chance 等方法测定 (Chance 等, 1995), 3 ml 反应液 (0.01 mol·l⁻¹ pH 7.0 的磷酸缓冲液 20 ml 中加入 0.1 mol·l⁻¹ 的 H₂O₂ 5 ml) 中加入 100 μl 酶液, 立即读取 OD₂₄₀ 值, 每隔一分钟读一次, 读反应前 2 min 的 OD 值, 活性以 ΔOD₂₄₀·min⁻¹·g⁻¹FW 表示。

MDA 含量测定用硫代巴比妥酸法 (赵世杰等, 1998): 取酶提取液 1 ml, 加 2 ml 0.67% 的 TBA 溶液, 沸水浴 15 min, 4000 rpm 离心 20 min, 于 600 nm, 532 nm, 450 nm 下比色。MDA 含量以 μmol·g⁻¹FW 表示。

可溶性蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝比色法 (赵世杰, 1998)。取上清液 20 μl (对照加 20 μl 水), 加 3 ml 考马斯亮蓝 (100 mg 考马斯亮蓝, 溶于 50 ml 95% 的乙醇, 加 85% 的磷酸 100 ml, 定容至 1000 ml), 放置 2 min 马上于 595 nm 下比色。可溶性蛋白含量以 mg·g⁻¹FW 表示。

2.3.9 可溶性糖的测定

可溶性糖的测定采用蒽酮比色法。0.3 g 鲜样加 10 ml 蒸馏水, 封口沸水浴 30 min (2 次), 滤纸漏斗过滤入 50 ml 容量瓶中, 冲洗残渣, 定容。

吸提取液 1 ml, 加蒸馏水 1 ml (对照加 2 ml 蒸馏水), 加蒽酮乙酸乙酯液 (称 1 g 蒽酮溶于 50 ml 乙酸乙酯中) 0.5 ml, 加浓硫酸 5 ml, 振荡, 沸水浴 1 min, 自然冷却后, 于 630 nm 下比色 (李合生等, 2001)。

2.4 数据分析

采用 Excel 软件处理数据、制图, 采用 SPSS 软件进行相关性分析。

3 结果与分析

3.1 菊花花芽分化期 UWL 及呼吸速率等的变化

3.1.1 花芽分化期菊花叶片 UWL 的变化

从图 1.1 可以看出, 对照的菊花叶片 UWL 强度随着时间的推移, 虽略有波动, 但没有出现显著变化。短日照处理的菊花叶片 UWL 强度在花

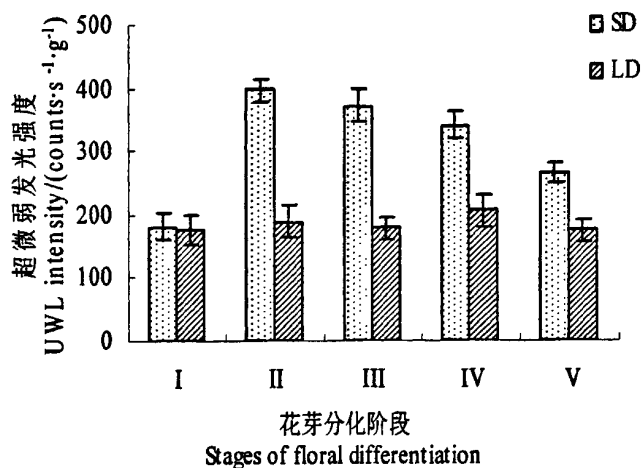


图 1.1 花芽分化期菊花超微弱发光强度的变化

Fig. 1.1 Changes in UWL intensity of chrysanthemum during floral differentiation

I, 未分化期; II, 花芽分化起动期; III, 总苞分化期; IV, 小花原基分化期; V, 花冠形成期。下同。

I, Vegetative stage of apical bud; II, Initial stage of floral bud differentiation; III, Stage of involucre primordial differentiation; IV, Stage of floret primordial differentiation; V, Stage of crown form. The same below.

芽未分化期 (I) 和对照相比没有显著差异, 并都处于较低的水平 (176~

181 counts·g⁻¹·s⁻¹), 但当进入花芽分化起动期 (II) 时, UWL 强度迅速上升, 此时与未分化期相比增加 119.31%, 之后出现缓慢下降趋势, 并在花冠形成期 (V) 下降幅度最大, 但与对照相比增加 52.63%。

3.1.2 花芽分化期菊花叶片呼吸速率的变化

从图 1.2 可以看出, 对照的菊花叶片呼吸速率在整个试验过程中, 出现上升趋势, 但变化趋势缓慢, 基本没有明显变化。短日照处理的菊花叶片呼吸速率在未分化期 (I) 与对照没有明显差异, 但在花芽分化起动期 (II) 迅速增加, 此时与未分化期相比增加 102.42%, 在总苞分化期 (III) 和小花原基分化期 (IV) 有所下降, 但仍保持较高水平, 最后在花冠形成期 (V) 明显下降, 但仍比对照增加 16.72%。

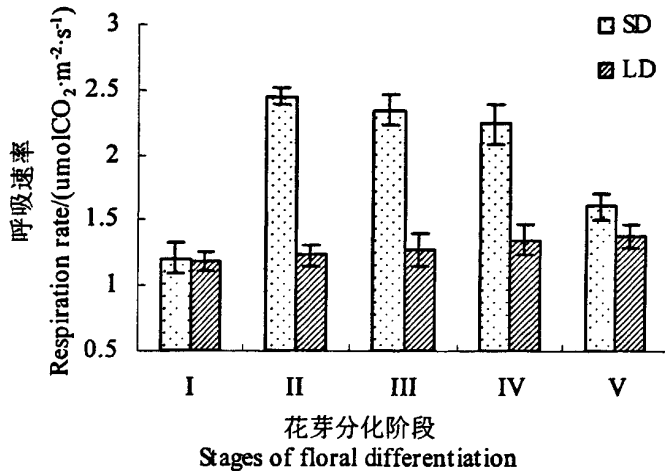


图 1.2 花芽分化期菊花叶片呼吸速率的变化

Fig. 1.2 Changes of respiration rate of chrysanthemum leaves during floral differentiation

3.1.3 花芽分化期菊花叶片 ATP 含量的变化

从图 1.3 可以看出, 对照的菊花叶片 ATP 含量在整个试验过程中都处于较稳定的状态。短日照处理的菊花叶片 ATP 含量在未分化期 (I) 和对照相比没有明显差异。但在花芽分化起动期 (II) 迅速上升, 此时与未分化期 (I) 相比增加 148.61%, 之后出现逐渐下降的趋势, 在花冠形成期 (V) 下降幅度较大, 但仍比对照相比显著增加。

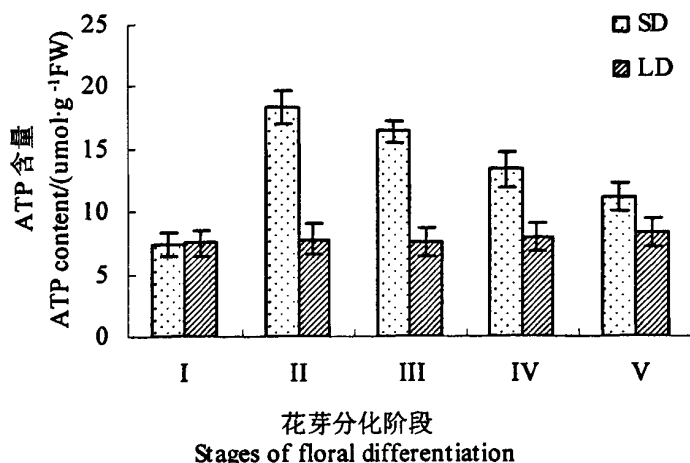


图 3 花芽分化期菊花叶片 ATP 含量的变化

Fig. 1.3 Changes of ATP content of chrysanthemum leaves during floral differentiation

3.1.4 花芽分化期菊花叶片可溶性糖含量的变化

从图 1.4 可以看出,对照的可溶性糖含量随着时间的推移出现有所上升的趋势,但总体保持较稳定状态。短日照处理的菊花叶片可溶性糖含量在未分化期与对照相比没有明显差异,都处于较低水平。但在花芽分化启动期(II)迅速增加,此时与未分化期相比增加 95.53%,然后在总苞鳞片分化期(III)有所减少,但仍保持较高水平,之后迅速减少,在小花原基分化期(IV)和花冠形成期(V)与对照相比没有显著性差异。

3.1.5 花芽分化期菊花叶片可溶性蛋白含量的变化

从图 1.5 可以看出,对照的菊花叶片可溶性蛋白含量在整个试验过程中没有出现大幅度变化。短日照处理的菊花叶片可溶性蛋白质含量在花芽未分化期(I)与对照相比没有显著差异,但随着花芽分化的启动(II),可溶性蛋白质含量迅速增加,此时与对照相比增加 32.52%,然后在总苞分化期(III)和小花原基分化期(IV)没有出现大的变化,仍保持较高水平,最后在花冠形成期(V)明显减少,但仍比对照显著增加。

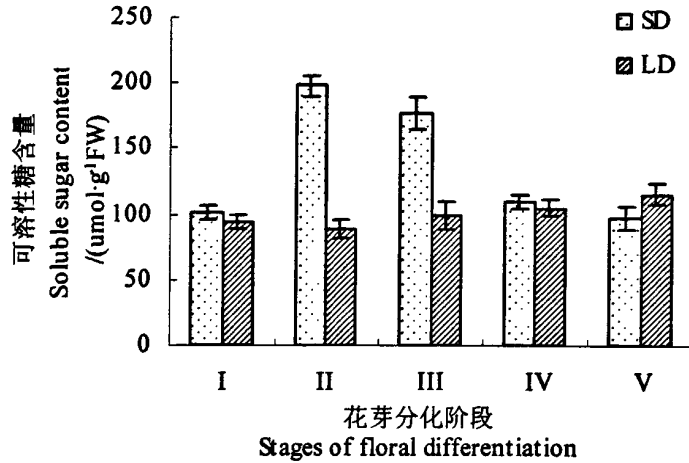


图 1.4 花芽分化期菊花叶片可溶性糖含量的变化

Fig. 1.4 Changes of content of soluble sugar of chrysanthemum leaves during floral differentiation

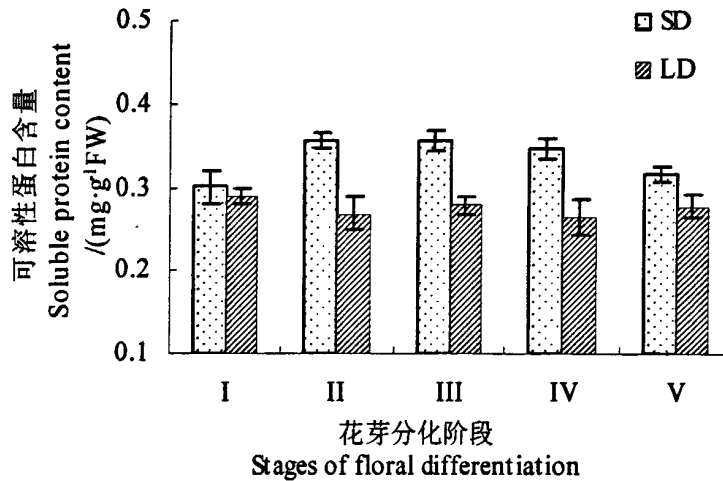


图 1.5 花芽分化期菊花叶片可溶性蛋白质含量的变化

Fig. 1.5 Changes of content of soluble protein of chrysanthemum leaves during floral differentiation

3.2 菊花花芽分化期 UWL 与核酸等的变化

3.2.1 花芽分化期菊花叶片 UWL 的变化

从图 2.1 可以看出,对照的菊花叶片超微弱发光强度随着时间的推移,虽略有波动,但没有出现显著变化。短日照处理的菊花叶片超微弱发光强度在花芽未分化期 (I) 和对照相比没有显著差异,并都处于较低的水平 (约 $200 \text{ counts} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$),但当进入花芽分化起动期 (II) 时,迅速上升,此时与对照相比增加 119.31%,之后出现缓慢下降趋势,并在花冠形成期 (V) 下降幅度最大,但与对照相比仍保持较高水平。

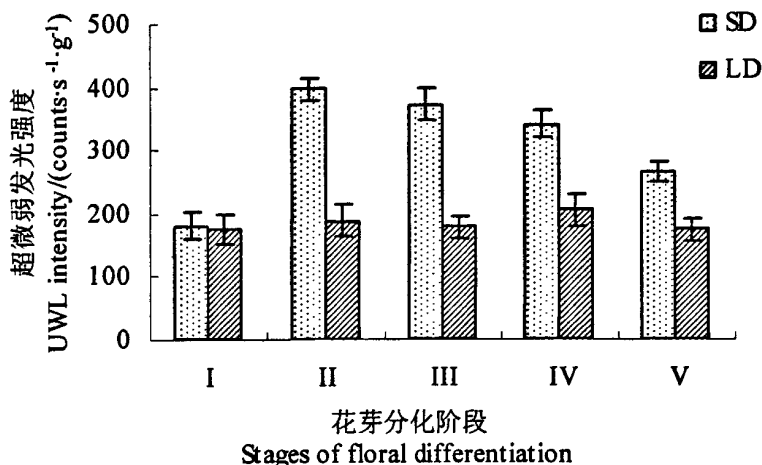


图 2.1 花芽分化期菊花叶片超微弱发光强度的变化

Fig.2.1 Changes in ultraweak luminescence intensity of chrysanthemum leaves during floral differentiation

3.2.2 花芽分化期菊花叶片荧光强度的变化

从图 2.2 可以看出,对照的菊花叶片荧光强度在整个花芽分化过程中没有出现明显的变化。短日照处理的菊花叶片荧光强度在未分化期 (I) 与对照没有明显差异,但在花芽分化起动期 (II) 迅速增加,此时与对照相比提高 33.41%,在小花原基分化期 (IV) 和花冠形成期 (V) 有所下降。

3.2.3 花芽分化期菊花叶片磷光强度的变化

从图 2.3 可以看出,对照的菊花叶片磷光强度在整个花芽分化期变化幅度不大,基本处于平稳状态。短日照处理的菊花叶片磷光强度在 I 期与对照没有明显差异,但在 II 期迅速增加,此时与对照相比增加 41.32%,之后在 III 期继续增加,此时比对照增加 69.11%,IV 期和 V 期有所下降。

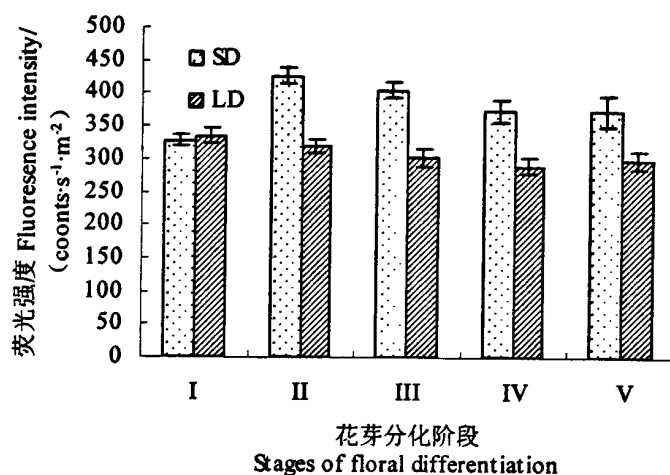


图 2.2 花芽分化期菊花叶片呼吸速率的变化

Fig. 2.2 Changes in fluorescence intensity of chrysanthemum leaves during floral differentiation

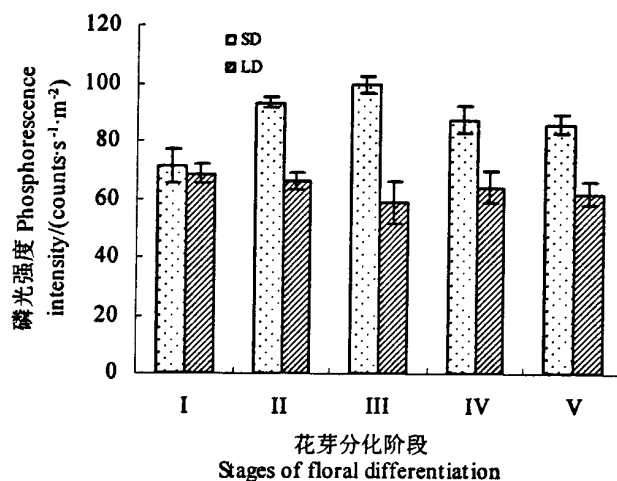


图 2.3 花芽分化期菊花叶片磷光发光强度的变化

Fig. 2.3 Changes in phosphorescence intensity of chrysanthemum leaves during floral differentiation

3.2.4 花芽分化期菊花叶片 DNA 和 RNA 含量的变化

从图 2.4 可以看出, 对照的 DNA 和 RNA 含量随着花芽分化的进程,

DNA 含量较平稳, RNA 含量有所增加, 但总体来看, 基本保持稳定状态。短日照处理的菊花叶片 DAN 和 RNA 含量在 II 期均迅速增加, 然后 DNA 含量出现缓慢减少, RNA 含量在 III 期继续增加, 然后下降。

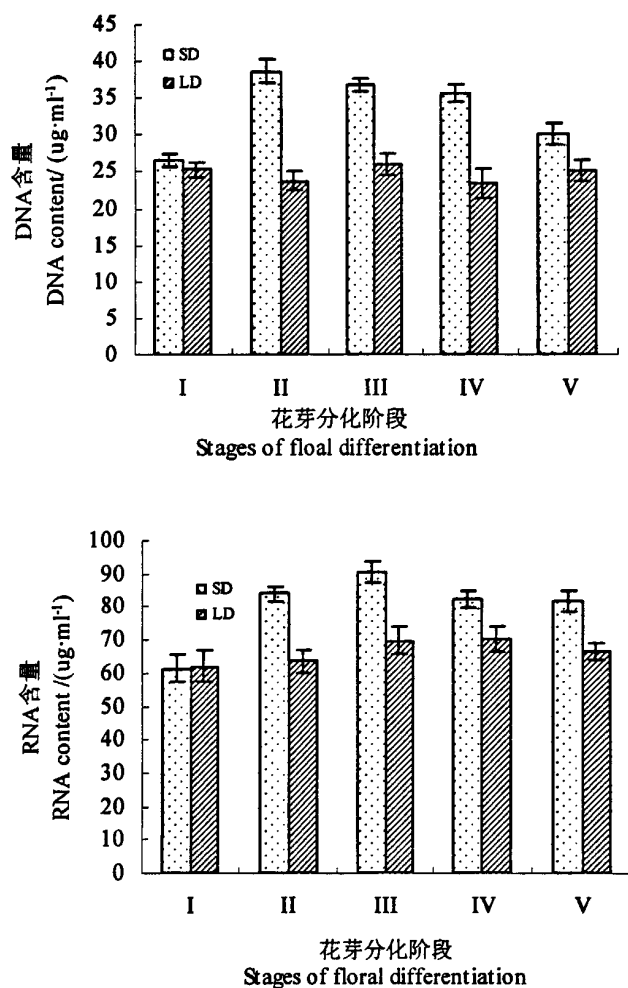


图 2.4 花芽分化期菊花叶片 DNA 和 RNA 含量的变化

Fig. 2.4 Changes in content of DNA and RNA of chrysanthemum leaves during floral differentiation

3.3 菊花花芽分化期 UWL 及超氧阴离子等的变化

3.3.1 花芽分化期菊花叶片 UWL 的变化

从图 3.1 可以看出, 对照的菊花叶片超微弱发光强度随着时间的推移,

虽略有波动,但没有出现显著变化。短日照处理的菊花叶片超微弱发光强度在花芽未分化期(I)和对照相比没有显著差异,但当进入花芽分化起动期(II)时,迅速上升,此时与对照相比增加 119.31%,之后出现缓慢下降趋势,并在花冠形成期(V)下降幅度最大,但与对照相比仍保持较高水平。

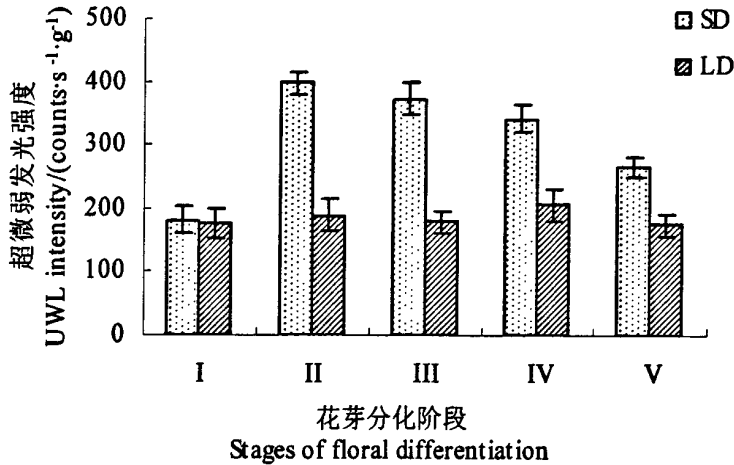


图 3.1 花芽分化期菊花叶片 UWL 的变化

Fig. 3.1 Changes in ultraweak luminescence intensity of chrysanthemum leaves during floral differentiation

3.3.2 花芽分化期菊花叶片超氧阴离子释放速率的变化

图 3.2 可以看出,对照的菊花叶片超氧阴离子自由基随着时间的推移,虽略有波动,但没有出现显著变化。短日照处理的菊花叶片超氧阴离子自由基在花芽分化起动期(II)时达到很高的值,比对照增加了 58.00%,但当进入总苞分化期(III)时,开始下降,之后出现缓慢下降的趋势。在花冠形成期(V)与 I 期基本达到一致。

3.3.3 花芽分化期菊花叶片 SOD 活性的变化

从图 3.3 可以看出,对照的菊花叶片 SOD 活性随着时间的推移,虽略有波动,但没有出现显著变化。短日照处理的菊花叶片 SOD 的活性在花芽未分化期(I)和对照相比没有显著差异,但在花芽分化起动期(II)时 SOD 活性与对照相比增加了 23.42%,后出现缓慢下降趋势,最终 SOD

活性变化趋于平稳,整个花芽分化过程中 SOD 活性比对照高,即使在 SOD 活性最低的花冠形成期 (V) SOD 活性也比对照多 21.43%。

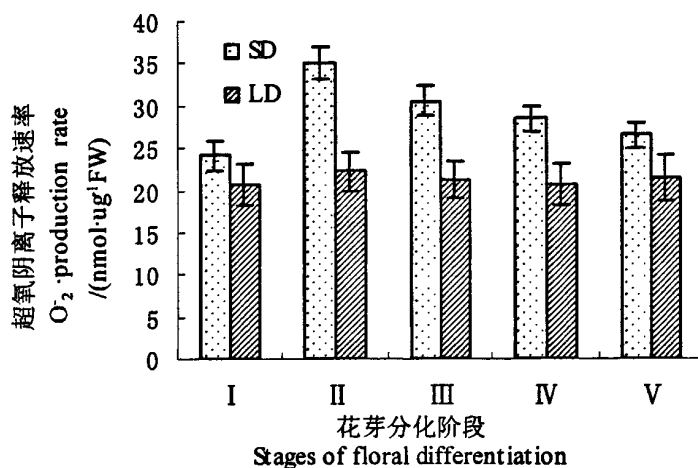


图 3.2 花芽分化期菊花叶片超氧阴离子自由基产生速率的变化

Fig. 3.2 Changes of $O_2^{\cdot -}$ production rate of chrysanthemum leaves during floral differentiation

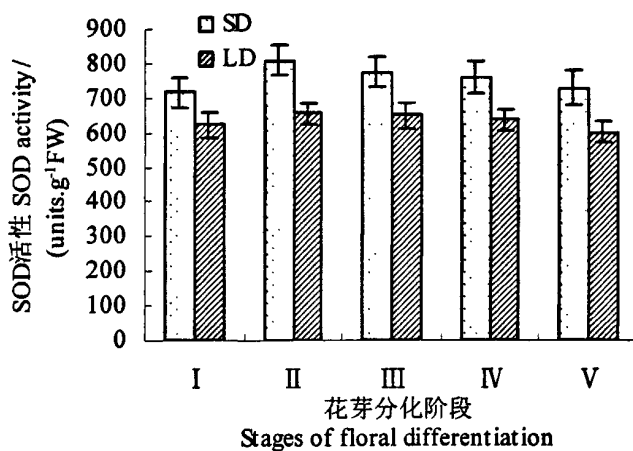


图 3.3 花芽分化期菊花叶片 SOD 活性的变化

Fig. 3.3 Changes of SOD activity of chrysanthemum leaves during floral differentiation

3.3.4 花芽分化期菊花叶片 POD 活性的变化

从图 3.4 可以看出, 对照的菊花叶片 POD 活性随着时间的推移, 虽略有波动, 但没有出现显著变化。短日照处理的菊花叶片 POD 的活性呈现先上升后下降的趋势, 并且在花芽分化起动机 (II) 达到最高值, 比对照增加了 12.53%, 之后出现缓慢下降趋势, 在花冠形成期 (V) 与 I 期基本达到一致。整个花芽分化过程中 POD 活性比对照高。

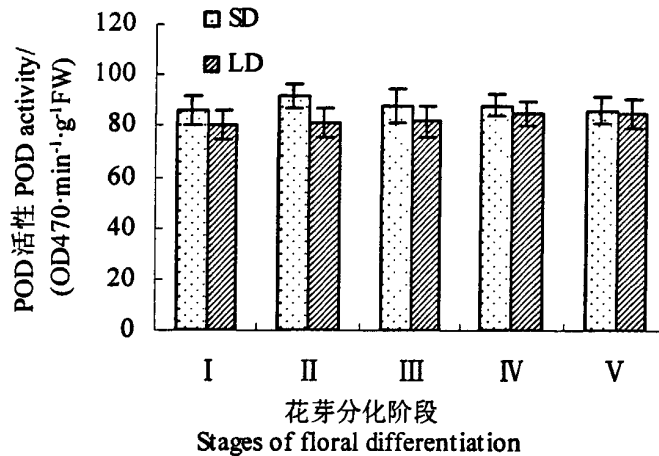


图 3.4 花芽分化期菊花叶片 POD 活性的变化

Fig. 3.4 Changes of POD activity of chrysanthemum leaves during floral differentiation

3.3.5 花芽分化期菊花叶片 CAT 活性的变化

从图 3.5 可以看出, CAT 活性的变化趋势基本上与 SOD, POD 活性一致, 对照的菊花叶片 CAT 活性随着时间的推移, 虽略有波动, 但没有出现显著变化。短日照处理的菊花叶片 CAT 的活性呈现先上升后下降的趋势, 并且在花芽分化起动机 (II) 达到最高值, 比对照增加了 78.02%, 之后出现缓慢下降趋势, 在花冠形成期 (V) 与 I 期基本达到一致。整个花芽分化过程中 CAT 活性比对照高。

3.3.6 花芽分化期菊花叶片 MDA 含量的变化

从图 3.6 可以看出, 对照的菊花叶片 MDA 含量随着时间的推移, 虽

略有波动,但没有出现显著变化。短日照处理的菊花叶片 MDA 含量呈现先上升后下降的趋势,并且在花芽分化起动期(II)达到最高值,比对照增加了 37.44%,之后出现缓慢下降趋势,最终趋于平稳。整个花芽分化过程中 MDA 含量比对照高。

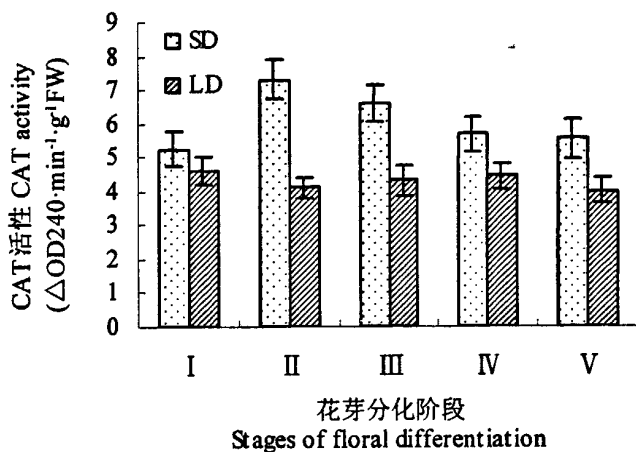


图 3.5 花芽分化期菊花叶片 CAT 活性的变化

Fig. 3.5 Changes of CAT activity of chrysanthemum leaves during floral differentiation

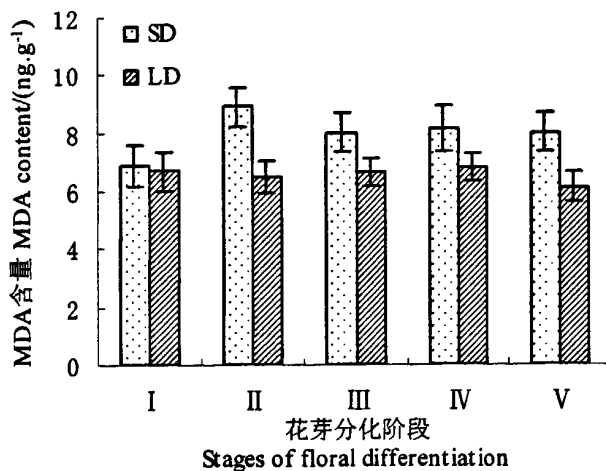


图 3.6 花芽分化期菊花叶片 MDA 含量的变化

Fig. 3.6 Changes of MDA content of chrysanthemum leaves during floral differentiation

3.4 菊花扦插生根过程中 UWL 及生理生化代谢的变化

3.4.1 扦插生根过程中菊花叶片 UWL 的变化

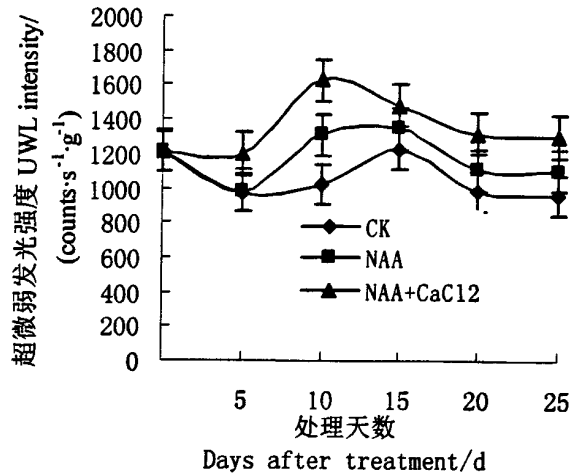


图 4.1 扦插生根过程中菊花叶片的超微弱发光变化

Fig.4.1 Changes of UWL intensity of chrysanthemum leaves during cutting

从图 4.1 中可以看出处理与对照的 UWL 都呈现先下降再上升最后趋于平稳的变化趋势, 经过 NAA 和 CaCl_2 复配处理的 UWL 在第 10 天达到最高值, 而 NAA 处理的 UWL 在第 12 天达到最高值, 对照的 UWL 在第 15 天出现高峰。其中 NAA 和 CaCl_2 复配处理的 UWL 值最高, 其次为 NAA, 对照的值最低。

3.4.2 扦插生根过程中菊花叶片荧光强度的变化

从图 4.2 中可以看出, 处理与对照的菊花叶片荧光强度在扦插当天出现一个高峰值, 在第 10~15d 期间出现第二次高峰, 其中 NAA 和 CaCl_2 复配处理和 NAA 处理的荧光强度在第 12d 达到最高值, 对照的菊花叶片荧光强度在第 15d 出现高峰。经过 NAA 和 CaCl_2 复配处理的荧光强度最高, 其次为 NAA 处理, 对照的荧光强度最低。

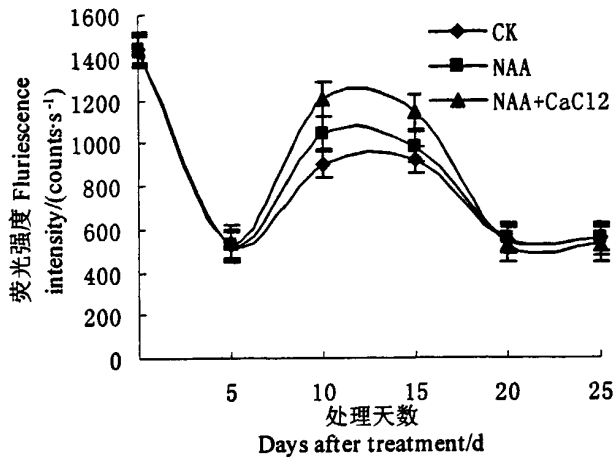


图 4.2 扦插过程菊花叶片荧光的变化

Fig.4.2 Changes of fluorescence intensity of chrysanthemum leaves during cutting

3.4.3 扦插生根过程中菊花叶片磷光强度的变化

从图 4.3 中可以看出处理与对照的磷光在扦插当天出现第一个低谷, 在第 10~15d 期间出现第二次低谷, 从图中可以看出经过 NAA 和 CaCl_2 复配处理的菊花叶片磷光强度最低, 其次为 NAA 处理, 对照的磷光强度最高。

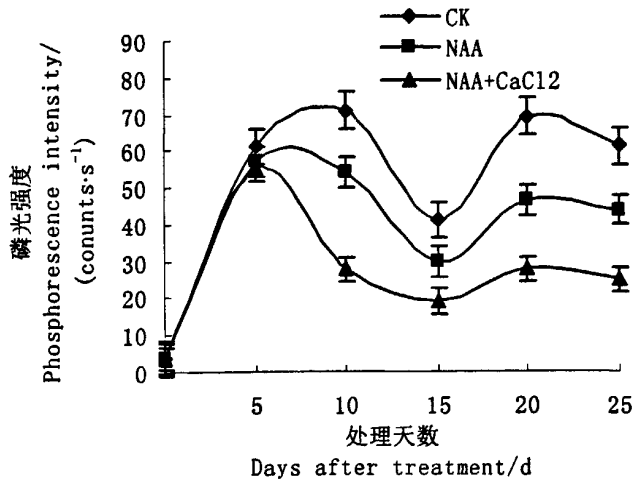


图 4.3 扦插过程中菊花叶片磷光的变化

Fig.4.3 Changes of phosphorescence chrysanthemum leaves during rooting of cutting

3.5 低温弱光胁迫下菊花 UWL 及生理生化代谢的变化

3.5.1 低温弱光胁迫下菊花叶片 UWL 的变化

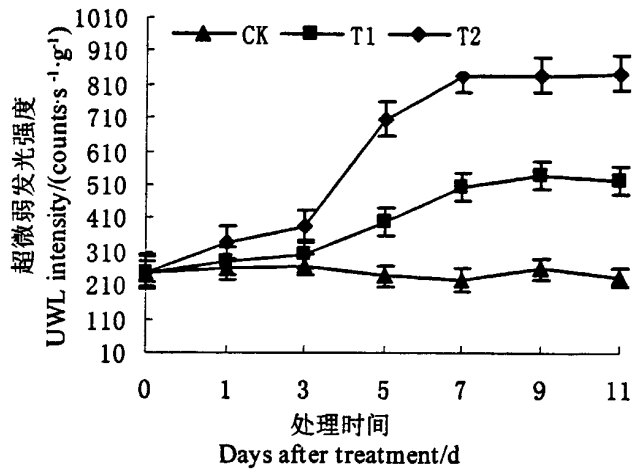


图 5.1 低温弱光胁迫下菊花叶片超微弱发光强度的变化

Changes in ultraweak luminescence intensity of chrysanthemum leaves under the stress of low temperature and poor light

从图 5.1 中可以看出,与对照相比,低温弱光胁迫导致叶片中的 UWL 强度上升,且随着胁迫时间的延长 UWL 的值会增加。胁迫 11 d 后,偏低温弱光和临界低温弱光分别比对照增加了 2.61 倍和 1.25 倍。对照的 UWL 变化不大。

3.5.2 低温弱光胁迫下菊花叶片 SOD 活性的变化

从图 5.2 可以看出,偏低温弱光胁迫下,菊花叶片的 SOD 活性一直处于上升趋势,临界低温弱光处理导致叶片的 SOD 活性前期略有上升,当低温弱光胁迫时间为 5 d 时,各处理叶片的 SOD 活性最强,然后下降,这说明胁迫达到一定程度时, SOD 活性会下降。但胁迫 11 d 时, SOD 活性高于胁迫前的数值,说明持续的低温弱光胁迫虽然导致其活性降低,但没有对其功能造成太大影响。胁迫 11 d 后,两处理的 SOD 活性分别较对照升高了 18.52%和 8.15%。对照的 SOD 活性变化不大。

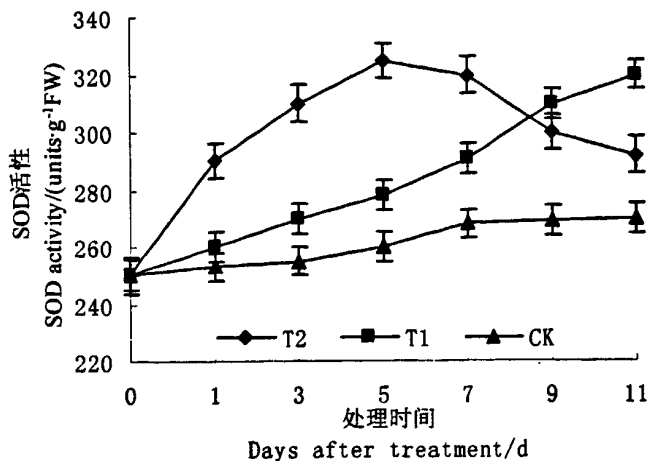


图 5.2 低温弱光胁迫下菊花叶片 SOD 活性的变化

Fig. 5.2 Changes of SOD activity of chrysanthemum leaves under the stress of low temperature and poor light

3.5.3 低温弱光胁迫下菊花叶片 POD 活性变化

低温弱光处理均导致菊花叶片中的 POD 活性显著上升, 胁迫 11 d 偏低温弱光处理和临界低温弱光处理的 POD 活性分别较对照升高了 74.13% 和 46.55%。对照的 POD 活性变化不大。

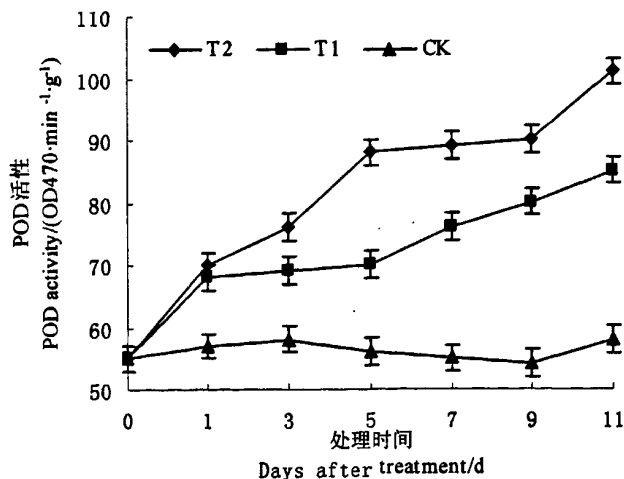


图 5.3 低温弱光胁迫下菊花叶片 POD 活性的变化

Fig. 5.3 Changes of POD activity of chrysanthemum leaves under the stress of low temperature and poor light

3.5.4 低温弱光胁迫下菊花叶片 CAT 活性的变化

由图 5.4 可以看出,低温弱光处理均导致菊花叶片中 CAT 活性显著下降。胁迫 11 d 后,偏低温弱光处理和临界低温弱光处理的 CAT 活性分别较对照降低了 57.57%和 27.27%。对照的 CAT 活性变化不大。

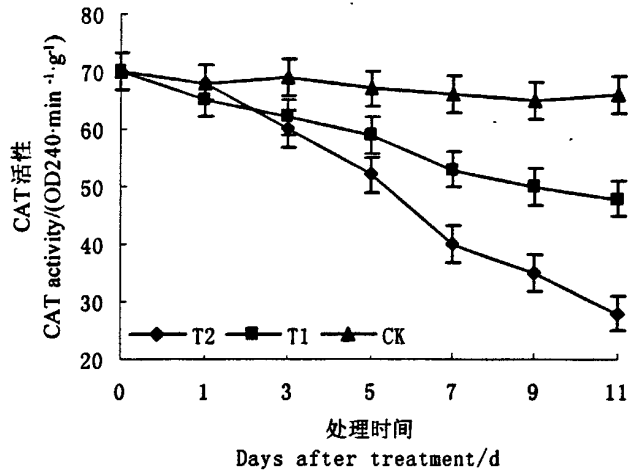


图 5.4 低温弱光胁迫下菊花叶片 CAT 活性的变化

Fig. 5.4 Changes of CAT activity of chrysanthemum leaves under the stress of low temperature and poor light

3.5.5 低温弱光胁迫下菊花叶片 MDA 含量的变化

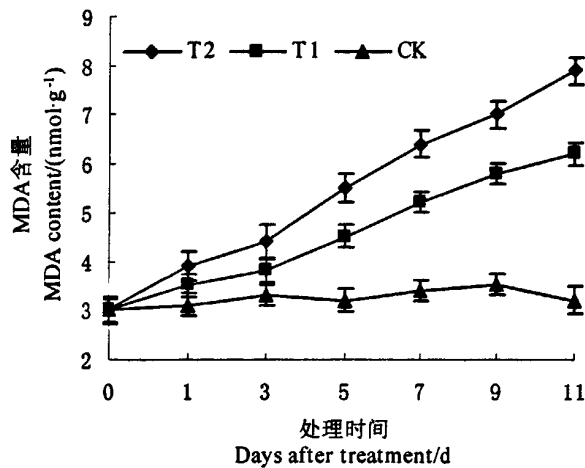


图 5.5 低温弱光胁迫下菊花叶片 MDA 含量的变化

Fig. 5.5 Changes of MDA content of chrysanthemum leaves under the stress of low temperature and poor light

由图 5.5 看出,与对照相比,低温弱光胁迫均导致菊花叶片中 MDA 含量的上升,且随胁迫时间的延长,MDA 积累增加。胁迫 11 d 后,偏低温弱光处理和临界低温弱光处理的 MDA 含量分别较对照升高了 2.63 倍和 1.25 倍。这说明经过低温弱光胁迫后,菊花叶片细胞膜均遭到不同程度的破坏。其中,临界低温弱光处理植株的细胞膜破坏程度更为显著。对照的 MDA 含量变化不大。

4 讨论

4.1 菊花花芽分化期 UWL 及呼吸速率等的变化

超微弱发光是普遍存在于生命体中强度极低的光子辐射现象。生物发射的超微弱光子与生物系统内的氧化代谢、细胞分裂、能量转移、光合作用、细胞内和细胞间的信息传递和功能调节等重要的生命过程有内在联系 (Slawinski, 1988)。超微弱发光的优点在于它可以不破坏植物生命活动的情况下可以向人们提供一系列生物化学和物理作用信息。目前,确定植物花芽分化进程常采用生长点显微镜观察法,对植株破坏性强(林桂玉等, 2008),因此,用 UWL 强度来鉴定植物花芽分化进程,可以减少对植株的伤害和产量的减少。

植物花芽分化起动期是从营养生长向生殖生长转变的转折点,此时植物体内新陈代谢活跃,生命力旺盛,而且新陈代谢方式也发生相应变化(林桂玉等, 2008)。植物旺盛的生命活动需要旺盛的呼吸作用生成的大量能源物质,但同时在电子传递时因电子渗漏而导致活性氧的生成,而活性氧对呼吸又有促进作用,从而引起 UWL 水平的提高(王华芳等, 1996)。ATP 是光合磷酸化和氧化磷酸化的产物,是生命活动中最重要的能量携带者,维持一定水平的 ATP 含量是植物进行生命活动的重要前提。其含量能够反映植物本身的能量状况。任何生成或消耗 ATP、NAD (H_2)、FMN (H_2) 的反应均可导致部分代谢能以光子的形式释放出来,而出现 UWL 现象。从本试验结果发现,菊花的 UWL 强度在花芽未分化期(I)处于较低水平,而在花芽分化起动期(II)迅速增强,之后出现逐渐变弱趋势。与此同时,呼吸速率和 ATP 含量、可溶性糖和可溶性蛋白质也出现先后下降的现象。相关性分析表明,花芽分化期菊花叶片 UWL 水平与呼吸

速率、ATP 和蛋白质含量呈极显著相关, 相关系数分别为 0.8916、0.9038 和 0.7717。UWL 强度与可溶性糖含量的相关性不显著。林桂玉等 (2008) 前期研究发现, 菊花花芽分化期叶片可溶性糖含量迅速增加。本试验结果也发现, 在 II 期和 III 期的可溶性糖含量与 UWL 变化趋势基本相似, 但在 IV 期和 V 期减少幅度较大, 这可能与叶片上积累的大量的可溶性糖, 随着花芽的分化, 逐渐转移到芽中, 供花芽分化之用有关 (梁芳等, 2008)。孙乃波和张志宏 (2006) 认为, 草莓花芽分化开始期蛋白质的大量积累是其成花的重要物质基础。本试验结果表明, 菊花花芽分化起动期可溶性蛋白质含量迅速增加, 之后保持一段时间较高水平后, 逐渐降低, 这可能是在花芽分化起动期, 与一些蛋白质水解酶活性增强, 使组合蛋白分解成可溶性蛋白质, 或形成特异结构和功能的蛋白质以满足花芽分化所需特异蛋白质物质有关 (刘玲玲等, 2004)。

通过本试验结果, 认为菊花花芽分化期 UWL 与 ATP 等能量代谢、碳水化合物和蛋白质等物质代谢以及呼吸速率等生理活动关系密切, 因此, 可用于菊花是否进入花芽分化期的指标, 但不同菊花品种或相同的品种在不同环境条件下具有不同的生命活动规律, 因此, 还需进一步深入研究。

4.2 菊花花芽分化期 UWL 及核酸等的变化

生物发光是反映生物体内部机能的一个窗口, 可在不破坏植物生命活动的情况下向人们提供一系列生物化学和物理作用信息。目前, 判断植物花芽分化进程常采用生长点显微镜观察法, 对植株破坏性强, 而采用生物发光强度来鉴定植物花芽分化进程, 可减少对植株的伤害和产量的减少。

超微弱发光、荧光和磷光都属于生物发光, 它们三者发光的机理均属受激发光。但超微弱发光的激发能来自化学能, 而荧光和磷光发光的激发能则来自光能 (周禾和杨起简, 1995)。荧光和磷光是在可见光或紫外光辐射下, 分子获得外源能量跃迁到不稳定的激发态, 激发能转换后, 分子重新返回至基态时发出的光子辐射。其中荧光是分子从最低激发单线态向基态跃迁时产生, 而磷光则是分子从最低激发三重态向基态跃迁时产生。因此, UWL 属化学发光, 荧光和磷光属光致发光。目前还不能 UWL 与植物的某一生理过程或某一化学反应联系起来, 而圆满解释植物超微弱发

光现象,但普遍认为植物的UWL和外界激发光有直接联系。郭颖和杨洪强(2008)研究表明,杏树叶片在高温胁迫下超微弱发光、磷光和荧光均显著增加,并与能量代谢呈显著正相关。本试验结果表明,菊花花芽分化起动期(II)超微弱发光、荧光和磷光都显著增加,说明菊花花芽分化起动期,体内物质代谢和能量代谢旺盛(梁芳等,2008)。

植物由营养生长转向生殖生长的过程中,核酸的合成迅速增加(孙庆华等,2007),而核酸的生物合成是超微弱发光主要来源之一,而核酸碱基中只有腺嘌呤是超微弱发光的主要来源,并与DNA浓度呈正相线性关系(Rattemeyer,1991)。本研究结果表明,菊花花芽分化过程中DNA和RNA含量在花芽分化起动期(II)迅速增加,并随着花芽分化的进程,DNA含量逐渐减少,RNA含量在总苞分化期(III)继续增加,之后逐渐减少。经SPSS分析,UWL、荧光和DNA含量呈显著正相关;磷光与RNA含量呈显著正相关。RNA是DNA转录合成产物,本试验结果说明,生物发光来源于细胞内不同的生理生化过程,其机理有待进一步研究。

通过本试验结果认为,超微弱发光、荧光和磷光发光强度相结合,可作为快速判断菊花花芽分化期的有效指标,但还需进一步深入研究。

4.3 菊花花芽分化期UWL及超氧阴离子等的变化

生物的超微弱发光与能量代谢有密切关系,也受体内活性氧的影响(Boveris等1981;1984)。当菊花从营养生长向生殖生长的过程中,相当于给菊花一个胁迫信号,菊花体内的活性氧如超氧阴离子自由基含量就会增加,这时的超氧阴离子自由基与对照相比增加了58.00%,这就引起抗氧化的防御系统启动,这时超氧阴离子自由基开始降低,最后由于活性氧的释放和控制达到平衡状态,超氧阴离子自由基的水平也基本上处于稳定的状态(图3.2)。超氧阴离子伤害植物的机理之一在于启动膜脂过氧化,从而造成膜脂过氧化产物MDA含量的增加(蔡志全,2003)。因此MDA含量的变化与超氧阴离子自由基的释放变化趋势基本是一致的,经相关性分析得其相关系数为0.9032。

伴随着菊花花芽分化的启动,菊花叶片UWL呈现先上升后下降的趋势,这与超氧阴离子的变化趋势是一致的。当生物体内的天然抗氧化剂和氧化脂类之间的平衡被破坏后,体内抗氧化剂不能及时补充,氧化即进入

不稳定状态并开始自由加速,将导致发光强度瞬时剧增,即出现生物超微弱生物化学发光的“闪光现象”。当菊花体内的抗氧化酶系统开始启动时,超氧阴离子的含量就会降低,UWL 的值就会相应的降低。

各种抗氧化酶对 UWL 的影响,都是通过影响超氧阴离子的变化来间接影响 UWL。SOD 的作用是将有害的超氧自由基转换成 H_2O_2 ,随后由 POD、CAT 再转换成无伤害的水和氧。在花芽分化的初期,由于活性氧的突然上升,诱导了抗氧化酶系统的启动,这时 SOD 和 POD、CAT 的活性会突然升高,达到一个很高的水平之后,由于生物体内活性氧的生成和抗氧化酶系统达到平衡,SOD 和 POD、CAT 的活性也趋于稳定(图 5.2,图 5.3,图 5.4)。本实验表明短日照处理的 SOD 和 POD、CAT 的活性与对照相比变化不是很大,这可能是由于菊花花芽分化并不是一个典型的胁迫环境,因此,超氧阴离子的水平和 MDA 含量不是很高,这就不会引起各种抗氧化酶系统的大幅度的变化。

通过本试验结果,认为经过相关性分析表明 UWL 与超氧阴离子呈显著正相关。各种抗氧化酶对 UWL 的影响,都是通过影响超氧阴离子的变化来间接影响 UWL。

4.4 菊花扦插生根过程中 UWL 及生理生化代谢的变化

从实验结果中发现,菊花扦插生根过程中对照的菊花叶片在第 0d 时 UWL 与荧光强度很大,这可能是因为插穗刚从母体切割下来导致体内的一种适应性反应。在扦插第 15d 时生根基本已经完成,此时各种生化代谢反应非常活跃,这就导致 UWL 与荧光强度突然增加。磷光的变化规律与 UWL 和荧光强度的变化则相反,经过相关性分析表明,荧光和 UWL 呈显著正相关,磷光与 UWL 呈显著负相关。

UWL 是体内的代谢产生的发光,而荧光和磷光则是经过外界激发产生的,即前者是自身体内的发光,而后者则是激发光。两种指标都能指示体内的代谢变化。实验表明三种处理 UWL 和荧光值中,经过 NAA 和 $CaCl_2$ 复配处理的最高,其次是经过 NAA 处理的,最后是对照。同时,经过激素处理的 UWL 和荧光出现峰值的时间会提前,郑成淑等(2008)研究表明包括 NAA 在内的各种植物激素可以促进生根,用适当浓度的 Ca 处理可以提高插穗叶片 SOD、POD、和 CAT 等保护酶的活性和降低 MDA

含量,从而促进菊花扦插生根,并提高扦插苗品质。

荧光与磷光虽然都是经过光激发产生的光,但是两者的变化趋势却正好相反,这可能是由于体内的可以发光的原子分子或是原子团或分子团是有限的,因此荧光强度和磷光强度是互补的,即发光的物质如果用于发射荧光,则磷光就会减少,反之亦然。

从实验结果中我们可以看出,荧光、磷光和 UWL 在扦插生根过程中出现了规律性的变化,因此可以作为扦插生根进程的有效指标。

4.5 低温弱光胁迫下菊花 UWL 及生理生化代谢的变化

正常情况下,细胞内自由基的产生和清除处于动态平衡,许多逆境可以打破这种平衡(武孟祥等,1994)。低温弱光胁迫就可能打破此平衡,导致自由基的积累和膜脂的过氧化,膜的完整性受到破坏。植物在长期进化形成了一定的机制来清除这些对自身有害的物质,其中最为重要的就是酶保护系统,包括 SOD、POD 和 CAT(王宝山等,1988)。

本试验中,菊花在低温弱光胁迫下启动了自身的应激反应,引起了一系列的抗氧化酶的变化。偏低温弱光处理使菊花叶片中的 SOD 活性一直处于上升趋势,说明偏低温弱光处理处理下菊花叶片中活性氧的产生量在一定的范围内,从而促进了 SOD 活性的上升(刘鸿先等,1985);临界低温弱光处理导致叶片中的 SOD 活性前期略有上升,后期则迅速下降。原因是由于植物机体的适应性保护应激机制,临界低温弱光处理处理下叶片中活性氧清除剂活性会随着自由基的积累而升高,但随着时间的延长,活性氧产生过量,超出了一定的阈值,植物体内的活性氧代谢的平衡被破坏,一些氧化能力特别强的活性氧对 SOD 具有直接的伤害作用,而造成叶片中 SOD 活性的下降(胡文海等,2001;余纪柱等,2003)。从中我们可以得出 SOD 对低温弱光的适应性则随胁迫程度而异。两处理的 POD 活性均随着胁迫时间的延长显著上升, CAT 活性则逐渐降低。这可能是由于当菊花受到低温弱光胁迫后引起了活性氧产率的增加,从而诱导了 POD 活性的增加,说明 POD 对低温弱光有着良好适应性(曾韶西等,1990)。CAT 则具有高度冷敏感性,低温弱光下活性降低(郁继华等,2004)。

膜脂过氧化是在膜脂不饱和脂肪酸中发生的一系列自由基反应,膜脂过氧化的中间产物是自由基,最终产物为 MDA。膜脂过氧化作用会引发

和加剧蛋白质分子内和分子间的交联,使细胞膜的结构和功能受到破坏;因此在一定程度上MDA含量的高低可以表示细胞膜脂过氧化程度和植物对逆境条件反应的强弱(王建华等,1989)。

本试验结果表明,低温弱光处理后菊花叶片MDA含量增加,细胞膜透性增大,表明植株为避免遭受低温弱光逆境的伤害也作出了适应性反应,但植株在逆境下,体内已生成相应的氧自由基,而且氧自由基的产生已超过SOD、POD和CAT等抗氧化系的清除能力,故部分未能清除的活性氧引起膜脂过氧化(MDA含量的增加),导致膜系统的损伤。就温度而言,临界低温弱光处理比偏低温弱光处理对植株的影响更为显著。

低温弱光胁迫下菊花叶片中UWL值随着胁迫时间的延长和胁迫程度的增加而增大。低温弱光逆境胁迫条件下,MDA含量增加,这说明体内的脂质氧化开始起作用,体内会积累大量的自由基。当生物体内的天然抗氧化剂和氧化脂类之间的平衡被破坏后,体内抗氧化剂不能及时补充,氧化即进入不稳定状态并开始自由加速,将导致发光强度瞬时剧增,即出现生物超微弱生物化学发光的“闪光现象”。本实验结果表明MDA含量和UWL呈极显著相关,即体内的自由基引起了UWL的变化,这符合UWL产生的自由基机制。同时,UWL可以作为检测植物体内受逆境伤害程度的一种快捷指标。

5 结论

5.1 菊花花芽分化期UWL及生理生化代谢的变化

菊花叶片中UWL和各项生理指标在花芽分化起动期达到最高值。花芽分化期菊花叶片UWL水平与呼吸速率、ATP和蛋白质含量呈极显著相关。UWL强度与可溶性糖含量的相关性不显著,UWL、荧光和DNA含量呈显著正相关,磷光与RNA含量呈显著正相关。菊花花芽分化的过程中超氧阴离子的释放速率与UWL呈显著正相关。各种抗氧化酶对UWL的影响,都是通过影响超氧阴离子的变化来间接影响UWL。因此,ATP、活性氧、DNA等各种生理指标都对菊花花芽分化过程中UWL的产生有贡献,菊花花芽分化过程中UWL的产生可能是多种指标在不同时间和不同空间相互作用的综合结果。UWL可用于检测菊花花芽分化进程。

5.2 菊花扦插过程中 UWL 及生理生化代谢的变化

UWL 与荧光、在扦插过程中的变化规律基本相同,对照处理的插穗,在扦插当天和第 15d 出现两个高峰,UWL 和荧光呈显著相关。扦插过程中磷光的变化规律与 UWL 和荧光的变化趋势正好相反,经过相关性分析表明磷光和 UWL 呈显著负相关。

经过生根激素处理的插穗生根时间与对照相比都会有不同程度的提前,其中经过 NAA 和 CaCl_2 复配处理的提前的最多,大约比对照提前 5d。另外,经过生长素处理的插穗的 UWL 和荧光值都要比对照的值高,这说明 UWL 和荧光能反应扦插生根的情况。

综上所述 UWL 可对扦插生根进程作出预测。

5.3 低温弱光胁迫下菊花 UWL 及生理生化代谢的变化

低温弱光处理后,菊花叶片中 UWL 上升,其中临界低温的 UWL 值要高于偏低温的值。SOD 活性的变化与低温弱光胁迫的强度有关。偏低温弱光条件下 SOD 活性呈现逐渐上升的趋势,临界低温弱光胁迫条件下 SOD 活性呈现先上升后下降的趋势。两种低温弱光处理的 POD 活性升高和 CAT 活性降低,MDA 含量增加,其中临界低温弱光的 POD 活性和 MDA 含量比偏低温弱光高。临界低温弱光处理的 CAT 活性低于偏低温弱光处理。MDA 与 UWL 的变化趋势是一致的,相关性分析表明 MDA 含量与 UWL 呈显著正相关,这就为 UWL 产生的活性氧机制提供了实验依据。

参考文献

- 白亚乡, 胡玉才. 农机化研究. 2002, (4): 79~81.
- 陈胜, 黄楚云, 李默然. 生物超微弱发光及其应用. 黄石理工学院学报, 2006, 22(4): 82~84.
- 陈有君. 萌发马铃薯实生种子超微弱生物化学发光与种子活力指标的相关分析, 生物物理学报. 1995, 11(1): 125~126.
- 陈由强, 黄羌维. 植物体内单线态氧的产生及其淬灭. 植物生理学通讯, 1987, (6): 1~8.
- 陈少裕. 膜脂过氧化对植物细胞的伤害. 植物生理学通讯, 1991, 27(2): 84~90.
- 程海鹏, 薛建华, 王君晖. 生物中的超微弱发光. 生物学通报, 1999, 34(11): 15~17.
- 曹晓兵, 李光, 廖祥儒, 杨海莲, 徐景智. 盐胁迫下绿豆幼苗的超微弱发光. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(3): 261~264.
- 崔哲, 廖祥儒, 吴立峰, 赵慧. 发育过程中小麦叶片超微弱发光及酶活变化. 河北大学学报, 2005, 25(2): 189~193.
- 蔡志全, 曹坤芳, 冯玉龙. 夜间低温胁迫对两种生长下藤黄幼苗叶片荧光特性和活性氧代谢的影响. 应用生态学, 2003, 14(3): 326~331.
- 陈青君, 张福墁, 王永健. 临界低温弱光对黄瓜光合特性及其酶变化的影响. 华北农学报, 2002, 18(4): 3~34.
- 陈青君, 张福墁, 王永健. 黄瓜对低温弱光反应的生理特性研究. 中国农业科学, 2003, 36(1): 77~81.
- 国颖, 杨洪强. 高温对平邑甜茶幼苗生物发光与能量代谢的影响. 园艺学报, 2008, 35(1): 99~102.
- 胡献明, 潘建伟, 陈虹, 朱睦元. 铝胁迫诱导大麦根尖细胞超微弱发光的变化. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2002, 28(4): 383~386.
- 胡文海, 喻景权. 低温弱光对番茄叶片光合作用和叶绿素荧光参数的影响. 园艺学报, 2001, 28(1): 41~46.
- 何洁, 刘鸿先, 王以柔等. 低温与植物的光合作用. 植物生理学通讯, 1986, 2: 1~6.
- 黄伟, 任华中, 张福墁. 低温弱光对番茄苗期生长和光合作用的影响. 中国蔬菜, 2002, 4: 15~17.
- 康恩祥, 陈年来, 谭雪莲. 低温弱光逆境对西葫芦幼苗生理指标的影响研究. 甘肃农业科技, 2006(6): 14~16.
- 梁芳, 郑成淑, 张翠华, 孙庆春. 菊花花芽分化过程中芽和叶片碳水化合物含量的变化. 山东农业科学, 2008, 1: 40~42.
- 梁芳, 郑成淑, 孙宪芝, 王文莉. 低温弱光胁迫及恢复对切花菊光合作用和叶绿素荧光参数的影响. 应用生态学报, 2010, 21(1): 29~35.

- 刘高峰, 杨洪强, 张伟, 马方放. 水杨酸对湖北海棠活性氧代谢及超微弱发光的影响. 园艺学报, 2006, 33(1): 118~121.
- 刘玲玲, 李军, 李长辉, 夏平. 马铃薯可溶性蛋白质、叶绿素及ATP含量变化与品种抗寒性关系的研究. 中国马铃薯, 2004, 18(4): 201~204.
- 刘颂豪, 孟耀勇, 刘承宜. 生物光子特点及其可能机制. 激光与红外, 1997, 27(2): 67~69.
- 刘大森, 张鹏. 低剂量 γ 辐照小麦种子逆境下超微弱发光初报. 东北农业大学学报, 2001, 32(2): 198~200.
- 刘鸿先, 王以柔, 曾韶西. 低温对不同耐冷力的黄瓜幼苗呼吸代谢的影响. 植物生理学报, 1984(3): 191~198.
- 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 高等教育出版社, 北京, 2000, 184~197.
- 李德红, 邓江明, 邢达. 光质对水稻幼苗超弱发光和谷氨酰胺合成酶活性的影响. 生命科学研究, 1998a, 2(2): 109~112.
- 李德红, 何永红, 罗明珠等. 生长在不同光质下的花生幼苗的超弱发光. 生物物理学报, 1998b, 14(3): 548~552.
- 李德红, 邢达, 谭石慈等. 绿豆和花生的超弱发光. 植物生理学报, 1998c, 24(2): 177~182.
- 李德红, 邢达, 罗明珠, 廖飞雄, 谭石慈. 不同作物品种超弱生物光子发射的比较. 光子学报, 1999, 28(12): 1057~1060.
- 李德红, 唐永红, 何永红等. 白菜叶绿体的超弱发光机理初探. 激光生物学报, 2002, 11(1): 64.
- 李光林, 杨亚玲. 电磁场对绿豆萌芽的超弱发光和腺苷三磷酸的影响. 西南农业大学学报, 1995, 17(2): 176~178.
- 李茜, 毛凯, 熊曦. 暖季型草坪草抗寒性研究进展. 草业科学, 2001, 4: 53~58.
- 李建设, 耿广东, 程智慧. 低温胁迫对茄子幼苗抗寒性生理生化指标的影响. 西北农林科技大学学报, 2003, 1: 91~96.
- 李庆卫. 金叶锦熟黄杨、金叶侧柏扦插繁殖与离体快繁研究. 北京: 北京林业大学园林学院, 2000(2): 45~47.
- 马斌, 马玉琴, 苏震, 赵克俭, 张仲伦, 郑雁珍, 刘成祥, 王英彦. 雨水对毛白杨树叶片低水平化学发光的影响. 科学通报, 1992, 24: 2270~2274.
- 马玉琴, 于明珠, 张月敬, 李心愿, 代军, 沈洵. 电离辐射对活细胞超弱发光的影响. 生物物理学报, 1988, 4(3): 215~220.
- 马玉琴, 赵克俭, 张仲伦, 苏震, 马斌, 郑雁珍, 杨光洁, 米志勇, 陈昕. 羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子($\text{O}_2\cdot^-$)与线粒体低水平化学发光相关性的研究. 感光科学与光化学, 1994b, 12(4): 312~317.

- 毛大璋, 沈询, 张月敬等. 代谢抑制剂对萌发绿豆超微弱生物化学发光的影响. 生物物理学报, 1988, 4(2): 116~120.
- 聂继云, 彭运生. 生物超弱发光及其应用研究概述. 激光生物学报, 1998, 7(2): 124~130.
- 潘伟槐, 周建华, 董微星, 朱睦元. 大麦根尖细胞有丝分裂抑制和微弱发光与耐 Al^{3+} 性. 上海农业学报, 1997, 13(2): 27~31.
- 朴楚炳. 促进红松插穗生根能力的研究. 世界林业研究, 1996, 9(6): 5~8.
- 孙宪芝, 郭先锋, 郑成淑. 高温胁迫下外源钙对菊花光合机构与活性氧清除酶系统的影响. 应用生态学报, 2008, 19(9): 1983~1988.
- 孙宪芝, 郑成淑, 王秀峰. 高温胁迫对切花菊‘神马’光合作用与叶绿素荧光的影响. 应用生态学报, 2008, 19(10): 2149~2154.
- 沈询, 傅世蜜, 张月敬. 生物系统超微弱生物化学发光的探测: 绿豆、大鼠血液和3T3细胞的发光. 生物物理学报, 1988, 4(2): 98~102.
- 孙乃波, 张志宏. 草莓花芽分化过程中叶片碳水化合物和蛋白质含量的变化. 安徽农业科学, 2006, 34(11): 2328~2329.
- 孙庆华, 徐杰, 韩振海. 不同倍性苹果花芽发育过程中花芽核酸含量的变化. 物生理科学, 2007, 23(7): 306~309.
- 石万里, 夏宜平. 核酸、蛋白质代谢与菊花花芽分化的关系. 园艺学报, 1993, 20(1): 99~100.
- 森下义朗, 大山浪雄著, 李云森译. 植物扦插理论与技术. 北京: 中国林业出版社, 1988, 2(3)20~23.
- 田国忠, 李怀方, 裘维蕃. 植物过氧化物酶研究进展. 武汉植物学研究, 2001, 9(4): 332~344.
- 谭周进, 谢达平, 王征等. 蜜环菌发光条件的研究. 激光生物学报, 2001, 10(3): 187~190.
- 谭辉玲, 色莫代. 特定电磁辐射增强大豆种子超弱光子辐射. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16(3): 210.
- 王文莉, 王秀峰, 郑成淑, 朱翠英, 林桂玉. A23187和EGTA对光周期诱导菊花成花及其过程中叶片 Ca^{2+} 分布及碳水化合物的影响. 应用生态学报, 2010, 21(3): 675~682.
- 王维江, 韩俊英. 生物超弱发光机制及其检测方法研究进展. 广东工业大学学报, 2000, 17(1): 49~54.
- 王维光, 顾俭本. 从叶片中提取ATP方法的比较. 植物生理学通讯, 1986, 5: 54~55.
- 王华芳, 尹伟伦, 郑彩霞, 梁海英, 路永斌, 卫蓉. 植物的超微弱发光. 北京林业大学学报, 1996, 18(2): 83~89.

- 王树禹, 包平安, 李茫雪, 刘勇, 张鹏, 王亚玲. 作物种子辐照剂量与超弱发光强度相关性研究. 激光生物学报, 1999, 8(3): 183~186.
- 王树禹, 赵越, 李茫雪, 包平安, 刘勇, 王亚玲. 低剂量 γ 辐射诱导作物种子超弱发光研究. 核农学报, 2000, 14(1): 12~16.
- 王建华. 超氧化物歧化酶在植物逆境和衰老生理中的作用. 植物生理学通讯, 1989, 1: 1~7.
- 汪沛洪, 吕金印. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(5): 399~400.
- 王景章, 丁振芳. 日本落叶松、杂种落叶松嫩枝全光喷雾扦插的研究. 东北林业大学学报, 1990, 18(3): 9~17.
- 吴立峰, 廖祥儒, 崔少强. PEG预处理对小麦种子萌发过程中的生物发光及抗氧化酶活性的影响. 河北大学学报, 自然科学版, 2005, 25(增刊): 97~100.
- 吴文福, 夏艳辉, 周德义, 赵学笃, 陈晓光. 干燥后玉米种子生物超弱发光与活力相关性的研究. 农业工程学报, 2002, 18(3): 8~10.
- 邢达, 谭石慈, 唐永红, 何永红, 李德红. 植物体应激反应中生物光子发射的实验观测. 科学通报, 1999, 44(21): 2299~2302.
- 习岗. 植物超微弱发光及其在农业上的应用. 物理, 1994, 23(9): 548~552.
- 徐玉乔, 惠延平, 马世荣. 环孢素A逆转人白血病耐药细胞系HL-60/ADM及其超微弱发光的观察. 现代生物医学进展, 2007, 7(5): 663~666.
- 徐玉乔, 惠延平, 马世荣. 环孢霉素A逆转人白血病耐药细胞系HL-60/ADM前后细胞内氧自由基水平的变化. 中国实验血液学杂志, 2008, 16(5): 1050~1054.
- 许大全, 沈允钢. 光合作用的限制因素. 植物生理与分子生物学(第二版), 1998, 262~274.
- 许大全, 徐宝基, 沈允钢. C_3 植物光合效率的日变化. 植物生理学报, 1990, 16: 1~5.
- 杨迎东, 苏均伟. 神马花芽分化与环境因子相互作用关系初步研究. 辽宁农业科学, 2006(1): 45~46.
- 杨妍妍, 杨建平, 王清华, 陈圣栋. 高温胁迫对大白菜超微弱发光及其他生理指标的影响. 西北农业学报, 2006, 15(5): 218~221.
- 杨娜, 郭维明, 陈发棣, 房伟民. 光周期对秋菊品种‘神马’花芽分化和开花的影响. 2007, 34(4): 965~972.
- 杨起简. 玉米籽粒超弱发光及其抗冷性研究. 生物化学与生物物理进展, 1984, 2: 37~41.
- 杨起简. NaCl溶液对不同大豆种子萌发时超弱发光的影响. 北京农学院学报, 1989, (3): 112~115.
- 杨起简. 大豆, 小麦, 玉米的超弱发光与干旱条件下种子萌发的关系. 生物化学与生物物理进展, 1989, 6: 452~454.

- 杨起简.几种作物籽粒萌发时超微弱生物化学发光与抗逆性关系. 生物化学与生物物理进展. 1993, 20(4): 315~317.
- 杨起简, 刘亚宁, 殷启琴. 葡萄, 金桔在贮藏过程中超微弱发光的表现. 北京农学院学报, 1993, 8(2): 15~20.
- 杨起简, 周禾. 盐胁迫下苜蓿种子超弱发光特征研究. 北京农学院学报, 1996, 11(1): 102~105.
- 杨晖, 杨兰廷. 杏花序分化期芽和叶片核酸含量的变化. 园艺学报, 2000, 7 (2): 90~94.
- 余纪柱, 李建吾, 王美平等. 温弱光对不同生态型黄瓜苗期若干测定指标及光合特性的影响. 上海农业学报, 2003, 19(4): 46~50.
- 郁继华, 舒英杰, 吕军芬, 张国斌. 低温弱光对茄子幼苗光合特性的影响. 西北植物学报, 2004, 24(5): 831~836.
- 郑成淑, 王文莉, 孙宪芝, 梁芳, 张翠华. 硝酸钙处理对菊花扦插生根及抗氧化酶活性的影响. 园艺学报, 2008, 35(2): 263~268.
- 郑成淑, 孙宪芝, 王文莉, 梁芳. 光周期对菊花花芽分化及其叶片芽内源多胺含量的影响. 西北植物学报, 2008, 28(7): 1349~1353.
- 张新华, 杨洪强. 植物的超微弱发光. 山东农业大学学报, 2003, 34(4): 605~608.
- 张新华, 杨洪强. 植物叶绿体和线粒体的超微弱发光. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 111~114.
- 张新华, 杨洪强, 李富军, 张伟. 杏花开放过程中超弱发光和ATP及活性氧含量的变化. 植物生理与分子生物学学报, 2004a, 30(1): 41~44.
- 张新华, 杨洪强, 李富军. 水分胁迫下苹果幼苗超弱发光及一些生理特性的变化. 西北植物学报, 2004b, 4(4): 720~724.
- 周禾, 杨起简. 生物发光与生物超微弱发光. 北京农学院学报, 1995, 10(2): 84~93.
- 周禾, 杨起简. 不同类型植物种子在萌发期的超弱发光研究. 生物物理学报, 1996, 12(1): 1157~1160.
- 周禾, 杨起简. 成熟小麦抗穗发芽能力与超弱发光关系的研究. 生物化学与生物物理进展, 1995a, 3: 241~244.
- 周禾, 杨起简. 成熟小麦抗穗发芽能力与超微弱生物化学发光关系的研究. 生物化学与生物物理进展. 1995b, 22(3): 1240~1243.
- 周禾, 杨起简. 生物超弱发光的研究. 核农学通报, 1997, (4): 193~195.
- 曾韶西, 王以柔, 刘鸿先. 低温光照下与黄瓜子叶叶绿素降低有关的酶促反应. 植物生理学报, 1991, 17(2): 177~182.
- Abeles F.B.. Plant chemiluminescence. Ann. Rev. Plant Physiol. 1986, 37: 49~72.
- Allen R.C.et al. Biochem. Biophys. Res. Commun, 1976, 69: 245.

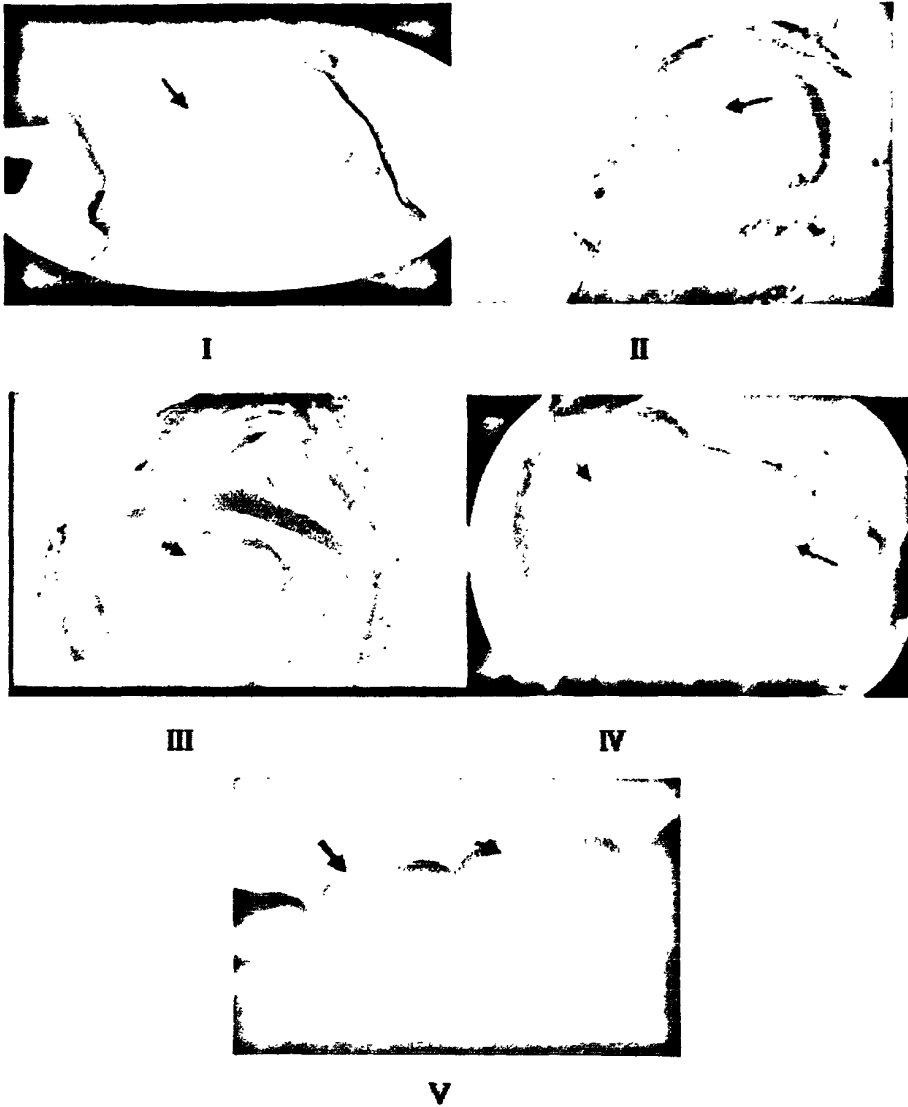
- Aoshima Y., Kato K., and Makino T., Endogenous enzyme reactions closely related to photon emission in the plant defense response. *Indian J Exp. Biol* 2003, 41: 494-499.
- Boveris A., Cadenas E., Chance B.. Ultraweak Chemiluminescence : a sensitive assay for oxidative radical reaction. *Fed Proc*, 40: 125~128.
- Boveris A., Puntarulo S.A., Roy A.H., Sanchez R.A.. Spontaneous Chemiluminescence of soybean embryonic axes ring imbibition. *Plant Physiol*, 1981, 76: 447 ~451.
- Belousov, L.V., Exploring the dynamic background of the developmental processes and cell reactions with the use of an ultraweak photon emission. *BioSystems* 2003, 68: 199.
- Belousov, L.V., Burlakov, A.B. and Loouchinskaia, N.N., Biophotonic patterns of optical interactions between fish eggs and embryos. *Indian J. Exp. Biol.* 2003, 41: 424~430.
- Belousov, L.V., and Loouchinskaia, N.N., Biophoton emission from developing eggs and embryos: non-linearity, holistic properties and indications of energy transfer, in *Biophotons*, Jiin-Ju Chang, J. Fish and F.-A. Popped., Kluwer Acad Publ. Dordrecht, Boston, London, 1998, 121~142.
- Belousov, L.V., F.-A. Popp and N.I. Kazakova. Ultraweak photon emission from hen eggs and embryos: non-additive interaction of two emitters and stable non-equilibricity. *Ontogenez (Russ. J. Devel. Biol.)* 1997, 28: 377~388.
- Bilger W. and Schreiber U. Chlorophyll luminescence as an indicator of stress-induced damage to the photosynthetic apparatus. Effects of heat-stress in isolated chloroplasts. *Photosynth Res* 1990, 25: 161~171.
- Colli L., Facchini V., Guidotti G., et al. Further measurement on the bioluminescence of the seedling. *Experiment*, 1955, 11: 497~481.
- Chen W. .L., Xing D., He Y.H.. Determination the vigor of rice seed with different degrees of aging with ultraweak chemiluminescence during early imbibition. *Acta Botanica Sinica*, 2002a, 44(11): 1376~1379.
- Chen W.L., Xing .D, He Y.H., Rapid determination of rice seed vigor by ultrweak chemiluminescence during early imbibition. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2002b, 28(5): 357~362.
- Chen W.L., Xing D., Tan S.C., Tang Y.H., He Y.H.. Imaging of ultrweak biochemiluminescence and singlet oxygen generation in germination soybean in response to wounding, *Luminescence*, 2003a, 18(1): 37~41.
- Chen W.L., Xing D., Wang J., He Y.H.. Rapid determination of rice seed vigour by spontaneous chemiluminescence and singlet oxygen generation during early imbibition. *Luminescence*, 2003b, 18(1): 19~24.
- Devaraj B., Scott R. Q., Roschger P. and Inaba H., Ultraweak light emission from rat liver nuclei, *Photochem. Photobiol.* 1991, 54, 289~293 .
- Eva H., Humio T.. Dark adapted leaves of paraquat resistant tobacco Plants emit less

- ultraeweak light than susceptible ones *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 78(2): 38~443.
- Felton G.W., Bi J.L., Summers C.B., Mueller A.J., Duffey S.S.. Potential role of lipoxygenases in defense against insect herbivory. *J Chem Ecol*. 1994, 20: 651~666.
- Grasso F., Grillo, C. Musumec F., Triglia A., Rodolico G., Cammisuli F., Rinzivillo C., Fragati G., Santuccio A. and Rodolic M., Photon emission from normal and tumor human tissues, *Experientia* 1992, 48: 10~13.
- Gu Q., Popp F.A.. Nonlinear response of biophoton emission to external perturbations. *Experientia* 1992, 48: 1069~1082.
- Gurwitsch A .G. Die natur des spezifischen erregers der zellteilung. *Arch. EntMech. Org.* 1923, 100: 11~40.
- Grabiec S., Bogdanski K., Marczukajtis A.. Variability of chemiluminescence intensity of grain tissues in rye of various Periods of storage durations. *Bull. Acad. ol. ci. er. ci. Iol*, 1968, 16: 761~764.
- Hideg E., On the spontaneous ultraweak light emission of plants. *J. Photochem. Photobiol.* 1993, 18, 239~244.
- Hiroyuki I., Kimihiko K., Takahiro K.. Spectral shift of ultraweak photon emission from sweet potato during a defense response. *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 75: 322~325.
- Iyozumi H, Kato K. and Kageyama C. et al, Plant defense activators potentiate the generation of elicitor~responsive photon emission in rice, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2005, 68~74.
- Jinye Wang et al. Sensitive of lipoxygenase lack in soybean seeds to accelerated aging and their chemiluminescence levels. *Phytochemistry*, 1990, 12: 3739~3742.
- Kai S., Ohya T., Morita K. and Fujimoto T., Growth control and photon radiation by plant hormones in red bean, *Jpn. J. Appl. Phys.* 1995, 34: 6530~6538.
- Ohya T., Kurashige H., Okabe H. and Kai S., Early detection of salt stress damage by biophotons in red bean seedlings, *Jpn. J. Appl. Phys.* 2000, 39: 3696~3700.
- Ohya T., Yoshida S., Kawabata R., Okabe H. and Kai S., Biophoton emission due to drought injury in red beans: possibility of early detection of drought injury, *Jpn. J. Appl. Phys.* 2002, 41: pp. 4766~4771.
- Popp F.A., et al. Biophoton emission, *Experientia*, 1988, 44(7): 543~571.
- Popp F A, K H Li, Q Gu (ed). Recent advances in biophoton research and it's application, World Scientific, Singapore. 1992, 517.
- Popp F.A. and Belousov L., Integrative Biophysics: Biophotons (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2003(2): 21~24.
- Patrick Billard, Michael, Du Bow. Bioluminescence based assays for detection and characterization of bacteria and chemicals in clinical laboratories, *Clinical Biochemistry*, 1998, 31(1): 1~14.

- Roschger P., Devaraj B., Scott R. Q., and Inaba H., Induction of a transient enhancement of low level chemiluminescence in intact leaves by anaerobic treatment. *Photochem. Photobiol* 1992, 56: 281~284 .
- Rattemeyer M. Evidence of photon emission from DNA in living cells. *Archives of Biochemi. Biophys*, 1991, 68: 572~573.
- Scordino A., Triglia A., Musumeci F., Grasso F. and Raifur Z., Influence of the prescence of Atrazine in water on in-vivo delayed luminescence of acetabularium acetabulum, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1996, 32: 11~17.
- Stjernholm R.L. et al. *Infect. Immun.*, 1973, 7:313.
- Saeid Eshghi, Enayatollah Tafazoli, Shahram Dokhani, Majid Rahemi, Yahya Emam. Changes in carbohydrate content in shoot tips, leaves and roots of strawberry *Fragaria × ananassa* Duch.) during flower~bud differentiation *Scientia Horticulturæ*, 2007, 113(3): 255~260.
- Slawinski J. Luminescence research and its relation to ultraweak cell radiation. *Experientia*, 1988, 33(7):559~571.
- Slaeinska D., Slwainski J.. Biological chemiluminescence. *photochem. photobiol.* 1983, 37(6): 709~715.
- Salin M.L., Bridges S.M.. Chemiluminescence in soybean root issue:effect of various substrate and inhibitors. *Photobiochem. photobiophys.* 1983, 6: 57~64.
- Scheminzy F.. Photographic proof of emanations in biochemical processed. *Biochem Z.*, 1916, 77: 14~168.
- Triglia A., Lamalfa G., Musumeci F., Leonardi C., Scordino A.. Delayed luminescence as an indicator of tomato fruit quality. *J Food Sic*, 1988, 63: 512~515.
- Ludwin E. Radiation from yeast. *Wsch. Brau*, 1918, 35: 19~20.
- Maccarrone M, Zadelhoff G V, Veldink GA, Johannes F, Vliegenthart G, Alessandro F.A.. Early activation of lipoxygenase in lentil (*Lens culinaris*) root protoplasts by oxidative stress induces programmed cell death. *Eur.J.Biochem*, 2000, 267: 5078~5084.
- Michel Havaux. Spontaneous and thermoinduced photon emission: new methods to detect and quantify oxidative stress in plants. *Trends in Plant Scince*, 2003, 1016 (10): 185~191.
- Ma Yuqin, Song Xueling, Zhao Kejian, Zhang Zhonglun, Ma Bin, Zheng Yanzhen, Liu Chengxiang, Su Zhen. Investigation of tumorigenic effect on ultreaweak luminescence from nude mouse for animal model. *Chinese Journal Cancer Research* , 1992, 4(4) : 46~50.
- Niggli H. J., Scaletta C., Yan Y., Popp F. A. and Applegate L. A., Ultraweak photon emission in assessing bone growth factor efficiency using fibroblastic differentiation, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2001, 64: 62~68 .
- Niggli H. J., The cell nucleus of cultured melanoma cells as a source of ultraweak photon

- emission, *Naturwissenschaften* 1996, 83: 41~44.
- Wang Yingyan, Ma Yuqin, Li Da, Li Shenxun, Zhang Yujing and Song Xueling Changes in Ultraweak Luminescence from Living Fish Induced by Three Chemicals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1991, 46: 456~460.
- Watanabe H., Kobayashi M. and Suzuki S. et al., Aldehyde-enhanced photon emission from crude extracts of soybean seedlings, *Biochim. Biophys. Acta* 1058, pp. 209~216.
- Veselovskii V.A., Sedamoba E.N., Tarusov V.N.. Mechanism of ultraweak spontaneous luminescence of organisms. *Biofizika*, 1963, 18: 364~366.
- Van Wijk R. and Van Aken H., Spontaneous and light-induced photon emission by rat and by hepatoma cells, *Cell Biophys.* 1991, 18: 15~29.
- Yafarova I.O., Veselovskii V.A.. Study of the kinetic patterns of the luminescence of the root system of seedling. *Biofizika*, 1969, 14: 364~366.
- Yoshinaga N., Kato C., Kageyama C., Fujisaki K., Nishida R. and Mori N., Ultraweak photon emission from herbivory-injured maize plants, *Naturwissenschaften* 2006, 93: 38~41.

附 录



版图说明: I. 未分化期; II. 花芽分化起动期; III. 总苞鳞片分化期; IV. 小花原基分化期; V. 花冠形成期。

Explanation of plates: I, Vegetative stage of apical bud; II, Initial stage of floral bud differentiation; III, Stage of involucre primordial differentiation; IV, Stage of floret primordial differentiation; V, Stage of crown form

致 谢

本论文是在郑成淑教授的悉心指导下完成的。从科研选题、试验设计、方案实施，一直到论文撰写，无不凝聚着导师的辛勤汗水。导师渊博的知识、敏锐的洞察力、严谨的治学态度和忘我的工作精神是我学习的楷模；导师仁爱、宽容、诚恳、坦荡的为人作风是我做人的榜样，这些将永远激励我攀登更高的科学高峰，令我终身受益。近三年的学习和科研工作，不仅使我的知识结构和科研能力上了一个新台阶，更重要的是，各方面的素质得到了提高。而这一切，都要归功于郑老师的深切教诲与热情鼓励。值此论文顺利完成之际，我首先要向我尊敬的郑老师表达深深地敬意和无以言表的感谢。

在这里，还要深深感谢王文莉老师、孙霞老师、孙宪芝老师。求学的三年时间里，我得到诸位老师在实验和生活中无微不至的关怀和细心的指导。在课题研究的过程中，各位老师给予了细心指导和宝贵意见，为本研究提供无私帮助。园艺科学与工程学院中心实验室史作安主任、陈利平老师和园艺科学与工程学院的杨洪强老师为我提供了便利的实验条件，在此一并表示真诚的感谢。

同时非常感谢姜倩倩师姐在实验中给予的大力帮助，以及实验室的师姐梁芳、张翠华、孙庆春，师弟田素波，师妹郭春晓、谢红英等同学在实验过程中给予的帮助。感谢我的舍友刘凤，孙翠，王爱喜等，和他们在一起度过了很多快乐又充实的日子。无论欢乐与泪水，谢谢有他们陪我一起走过。

最后深深地感谢呵护我成长的父母。父母的爱是天下最无私的最宽厚的爱。大恩无以言报，惟有以永无止境的奋斗，期待将来辉煌的事业让父母为之骄傲。

在此谨向所有在学习、生活、工作中给予我指导、关心、支持和帮助的恩师、朋友和家人致以最崇高的敬意和最衷心的感谢！

林桂玉

2010年6月4日于泰安

攻读硕士学位期间发表论文

林桂玉, 黄在范, 张翠华, 郑成淑. 菊花花芽分化期超微弱发光和生理代谢的变化. 园艺学报, 2008, 35(12): 1819~1824.

林桂玉, 郑成淑, 孙宪芝等. 光周期对菊花花芽分化与内源激素的影响. 山东农业科学, 2008, 1: 35~39.

黄在范, 林桂玉, 郑成淑等. 菊花扦插过程中超微弱发光及抗氧化酶活性的动态变化. 西北植物学报, 2009, 29(12): 2508~2512.