

基于叶绿素荧光成像的玉米苗期叶片光合特性垂直分布

肖天璞, 杨 丽, 张东兴, 王粮局*, 张天亮, 杜兆辉, 李鸿盛, 夏徐隆

(1. 中国农业大学工学院, 北京 100083; 2. 农业农村部土壤-机器-植物系统技术重点实验室, 北京 100083)

摘 要: 作物的综合光合作用能力直接决定粮食产量, 探明作物光合特性分布机制是开发新品种、研发新农艺的一个关键科学问题。为探究玉米植株光合特性的垂直分布规律, 该研究利用荧光成像技术对不同品种和不同氮、水处理的 5 叶期样本进行图像采集, 对植株不同叶片的荧光淬灭特性及荧光参数进行分析。荧光淬灭特性分析表明, 叶片光量子产量随垂直高度的增加呈上升趋势; 由非加权组平均法聚类产生的四类淬灭特性中, 郑单 958 在不同环境中的荧光淬灭垂直分布异质性小于先玉 335 和浚单 20。关键荧光参数分析结果表明, 叶片最大光能转换效率、实际光能转换效率、光反应电子传递活性随垂直高度的增加呈上升趋势, 除衰老叶片外的非光化学能量耗散差异性不显著。光合特性垂直分布分析表明, 不同土壤氮含量下样本的最大光量子效率 (F_v/F_m) 有较为显著的二次函数分布特征, 随着土壤氮含量的降低, 垂直分布的异质性增大; 不同品种间的稳态光适应光化学淬灭 (q_L L_{ss}) 有较为显著的一次函数分布特征, 郑单 958 表现出较强的抗逆性。基于机器学习方法, 以荧光参数垂直分布数据分类植株组别的结果表明, 郑单 958 样本的最大光量子效率 (F_v/F_m)、微量土壤氮含量下样本的最大光量子效率 (F_v/F_m) 和干旱环境下样本的稳态非光化荧光淬灭 (NPQ L_{ss}) 判别准确率分别达 0.82、0.94 和 0.88, 与其他处理及荧光参数相比, 垂直分布规律更显著; 其他荧光参数的分布特征并不能有效判别样本组别。将叶片按植株形态学自下而上排序, 由植株叶片光合垂直异质性关键叶片分析, 第 2 片叶片可以作为垂直分布的“特征叶片”评估玉米品种和土壤氮含量, 第 1 片叶片可以作为垂直分布的“特征叶片”评估植株土壤水含量。

关键词: 叶绿素荧光; 光合作用; 玉米; 垂直分布

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.16.018

中图分类号: S126

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2022)-16-0162-10

肖天璞, 杨丽, 张东兴, 等. 基于叶绿素荧光成像的玉米苗期叶片光合特性垂直分布[J]. 农业工程学报, 2022, 38(16): 162-171. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.16.018 http://www.tcsae.org

Xiao Tianpu, Yang Li, Zhang Dongxing, Wang Liangju, et al. Vertical distribution of photosynthetic characteristics of maize leaves at the seedling stage using chlorophyll fluorescence imaging[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2022, 38(16): 162-171. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.16.018 http://www.tcsae.org

0 引 言

光合作用贯穿植物生长发育的整个过程, 是植物生长发育的基础^[1]。作为一种高光效的 C_4 植物, 玉米的光合作用特性对其生物量的积累影响更为显著, 直接决定了玉米的产量^[2]。目前工程领域的植株光合特性研究以叶片光合关联性分析和胁迫分析为主, 研究光合作用与叶片成分含量之间的关联^[3-4], 或通过分析生物胁迫^[5-6]或非生物胁迫^[7-9]下的叶片光合特性, 实现逆境下植物生长状态的快速获取。然而, 植物体是一个具有复杂生理环境的整体, 单一的叶片光合特征测量具有随机性与片面性, 不能精准全面地表征整个植株的生长状态, 难以探明复杂植物体的光合作用机制, 而目前叶片光合作用在整个植株上的研究相对较少。

目前植物整株光合作用的相关研究主要分为两种,

一是研究叶片特征的垂直分布规律, 另一种是垂直分布特性对光合作用影响的研究。Moulin 等^[10]研究了玉米植株垂直高度上叶面积、叶绿素含量的变化, 并利用反射光谱对叶绿素含量进行分层评估; Fan 等^[11]通过测量玉米叶面积的垂直分布, 开发了一种更适用于现代玉米生长的叶面积垂直分布方程; Lindquist 等^[12]通过测量与光合作用竞争密切相关的叶面积指数, 研究其垂直分布规律, 分析不同玉米品种的耐密机制; Li 等^[13]通过研究不同水分条件下玉米叶片叶绿素和氮含量的垂直分布二次曲线规律, 验证玉米叶片光合特性与水分含量的显著相关性。以上研究内容多采用破坏性的测量方法或分层单点测量方法, 这些方法通常测量复杂, 易受到环境因素的影响。

随着高通量表型检测技术的发展, 光谱技术、高光谱成像技术也越来越多地应用到光合作用分析中。相关研究表明高光谱成像可作为一种有效的技术手段, 实现作物冠层对叶片特征垂直分布的预测。Wu 等^[14]采用多角度高光谱装置对小麦进行遥感, 并评估了小麦冠层叶绿素含量的垂直分布; He 等^[15]基于高光谱遥感建立了水稻叶片氮含量的垂直分布预测模型。但基于光谱反射率反演叶片垂直分布特征的准确率通常不够稳定, 易受到外

收稿日期: 2022-03-25 修订日期: 2022-08-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32071915)

作者简介: 肖天璞, 博士生, 研究方向为数字农业信息获取。

Email: xtianpu@163.com

*通信作者: 王粮局, 博士, 副教授, 研究方向为植物表型、畜禽信息智能感知。Email: wanglj@cau.edu.cn

界反射信号的影响，并且不能够很好地表达和监测植株的生理状态^[16]。叶绿素荧光成像技术是目前国际最流行的光合作用检测技术之一，具有高通量、无损伤的优点，并已成为作物育种中表型检测的基本工具之一。同时，叶绿素荧光还可阐明损伤机理和调节机制，在光合作用、植物胁迫的研究上得到了广泛应用。张佳菲等^[17]通过快速叶绿素荧光技术，探究出不同氮素处理水平下油菜苗期冠层内生化学参数及光合性能的垂直分布变化特性；Feng 等^[18]利用冬小麦上层叶片叶绿素荧光参数评估了植株氮素状况。目前，叶绿素荧光技术在整个植株水平的光合作用分布研究较少，多为单点测量荧光参数在垂直方向上的分布，不能全面获得叶片表型数据，而在整个植株水平上以叶绿素荧光成像为方法对叶片光合作用特性的研究却鲜有报道。

本研究设计了一组析因试验，以 3 个典型玉米杂交品种的不同土壤氮元素、水分处理的玉米 5 叶期（V5）植株为研究对象，采用叶绿素荧光成像的方法，无损高通量成像整株荧光状况，通过对植株不同叶片的荧光淬灭特性及荧光参数进行分析，研究玉米植株叶片的光合特性垂直分布，以期为探明植株内光合特性分布机制提供一种研究方法和思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料准备

育苗时间为 2021 年 11 月，地点为中国农业大学水利与土木工程学院日光温室（东经 116°21′，北纬 40°）。选取市场上广泛被应用的 3 个玉米品种：郑单 958（ZD958）、先玉 335（XY335）、浚单 20（JD20）。

试验前期在植物工厂内放置育苗盘进行育苗催芽（温度 25℃），两叶期选取长势良好且相近的、与试验需求同样数量的玉米苗移栽至温室（温度 20~25℃，湿度 50%），考虑到冬季光照时间较短，每天 17:00—19:00 补光 2 h，补光灯光照通量约 500 μmol/(m²·s)。栽培介质选择草炭、珍珠岩、椰糠按质量比 2：1：1 配比混合的土壤基质^[19]，育苗前肥料作基肥施加至土壤基质。育苗盆使用内径 16 cm 的圆柱形育苗盆，每盆装土壤基质体积 3 L，质量约 1 kg。

根据玉米盆栽种植的肥量需求，盆栽施肥量一般为田间施肥量的 2~3 倍^[20]，考虑到土壤基质质量较轻，按比例调高施肥量。正常施肥量为纯氮 0.75 g/kg 土、P₂O₅ 0.50 g/kg 土、钾 K₂O 0.60 g/kg 土，即每个盆栽的正常施肥量为过磷酸钙 3.12 g、氯化钾 1.00 g；尿素 1.63 g。试验中，设置微量氮肥（N0）、少量氮肥（N1）、正常氮肥（N2）3 个梯度。每盆施加尿素分别为 0、66%、100% 正常量，即每盆施加氮肥的质量分别为 0、1.09、1.63 g。试验采用郑单 958（ZD958）、先玉 335（XY335）、浚单 20（JD20）3 个玉米品种，微量氮肥（N0）、少量氮肥（N1）、正常氮肥（N2）3 个施肥量进行全因素试验，进行 6 组重复，共计 54 盆，具体试验设计见表 1。玉米温室生长期间，每 7 d 灌水 200 mL，并进行位置随机化排布。数据采集时间为玉米植株 5 叶期，数据采集的前

一周，只对 6 组重复中的 3 组（尾号 1~3）进行灌水处理（W），其他 3 组进行干旱胁迫（D）。

表 1 不同品种与施肥水平下玉米种植试验设计
Table 1 Experimental design of maize planting under different varieties and fertilization

品种 Varieties	施肥处理 Fertilization treatment	水分处理 Moisture treatment	编号 Number
郑单 958 (ZD958)	微量氮肥 (N0)	灌水处理 (W)	ZD958-1-1~ZD958-1-3
		干旱胁迫 (D)	ZD958-1-4~ZD958-1-6
	少量氮肥 (N1)	灌水处理 (W)	ZD958-2-1~ZD958-2-3
		干旱胁迫 (D)	ZD958-2-4~ZD958-2-6
	正常氮肥 (N2)	灌水处理 (W)	ZD958-3-1~ZD958-3-3
		干旱胁迫 (D)	ZD958-3-4~ZD958-3-6
先玉 335 (XY335)	微量氮肥 (N0)	灌水处理 (W)	XY335-1-1~XY335-1-3
		干旱胁迫 (D)	XY335-1-4~XY335-1-6
	少量氮肥 (N1)	灌水处理 (W)	XY335-2-1~XY335-2-3
		干旱胁迫 (D)	XY335-2-4~XY335-2-6
	正常氮肥 (N2)	灌水处理 (W)	XY335-3-1~XY335-3-3
		干旱胁迫 (D)	XY335-3-4~XY335-3-6
浚单 20 (JD20)	微量氮肥 (N0)	灌水处理 (W)	JD20-1-1~JD20-1-3
		干旱胁迫 (D)	JD20-1-4~JD20-1-6
	少量氮肥 (N1)	灌水处理 (W)	JD20-2-1~JD20-2-3
		干旱胁迫 (D)	JD20-2-4~JD20-2-6
	正常氮肥 (N2)	灌水处理 (W)	JD20-3-1~JD20-3-3
		干旱胁迫 (D)	JD20-3-4~JD20-3-6

1.2 数据采集

本试验所采用的叶绿素荧光成像系统为 FluorCam 大型叶绿素荧光成像平台（FC800-D/8080，Photon Systems Instruments, Czech Republic）。荧光成像平台使用带有定焦镜头的 CCD 相机，分辨率为 720×560 像素，帧率为 50 帧/s。光源由 5 组发光二极管组成，包括测量光（620 nm 红光）、红外光（735 nm）、光化光 Actinic1（620 nm 红光）、光化光 Actinic2（冷白光）、饱和光（冷白光）5 种光源，可实现最大光量子效率测量和叶绿素荧光淬灭分析。其中，本试验中使用的光源有测量光、光化光 Actinic2 和饱和光源。图像采集系统组成如图 1 所示。

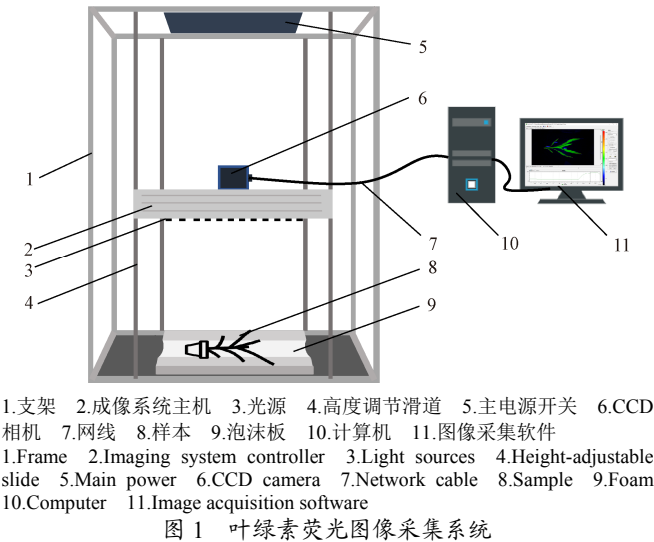


Fig.1 Chlorophyll fluorescence image acquisition system

图像采集全程在黑暗状态条件下进行,成像空间内无风,避免叶片晃动;试验前将待测植株在日光下充分光照 20 min,光照强度 $350\sim 400\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,之后充分暗适应 30 min,以获得最佳荧光状态。植株横向放置于图像采集区,位置位于成像平台的正中央,使用泡沫板固定位置以确保成像稳定性;通过高度调节滑道进行成像高度控制,成像平面距离镜头 60 cm,保证每株成像面积不超过相机成像窗口面积的 2/3;植株叶片的位置在镜头下的成像互不干扰且尽可能保持水平,确保成像的清晰有效。首先以 5% 的梯度进行 10 组预试验成像,结果表明在最大饱和光强的 30% ($1\ 346.0\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) 及以上的脉冲作用下,样本最大光量子效率 F_v/F_m 稳定在 0.78 左右,已达到饱和点^[21],由此确定正式试验的饱和光强为 30%。由玉米实际生长环境下的光照^[22]确定光化光 (Actinic2) 的强度为其最大光强的 70% ($382.9\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$)。叶绿素荧光成像的正式试验采用淬灭分析 (Quenching Analysis)^[23],试验进行之前,将植株重新进行 20 min 暗适应,按随机顺序分别对每盆植株进行成像试验,单次成像一盆植株。淬灭分析中,第一次暗适应阶段初始荧光 F_o 的持续时间 5 s,饱和脉冲持续时间 0.96 s,最大荧光 F_m 测量后的暂停时间为 15 s;光适应阶段光化光的作用时间为 70 s,脉冲数量 6 次,脉冲持续时间 0.96 s,脉冲间隔分别为 9、9、9、19、19 s;第二次暗适应阶段中脉冲数量为 3 次,脉冲持续时间 0.96 s,脉冲间隔 29 s。本试验中激发光作用时间点、作用环境及荧光淬灭动力学曲线示意图如图 2 所示。

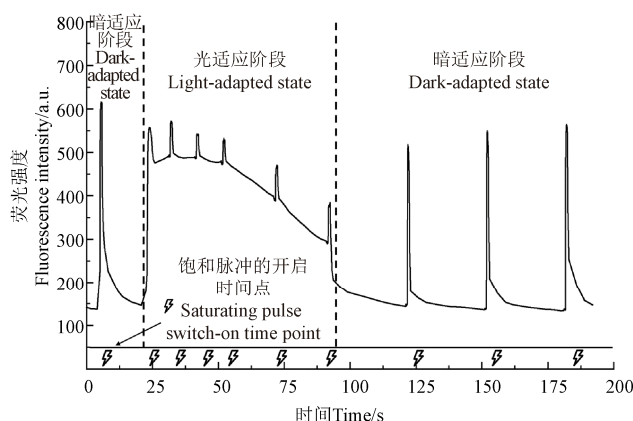


图 2 叶绿素荧光淬灭分析示意图

Fig.2 Schematic of chlorophyll fluorescence quenching analysis

图像采集时期为玉米植株 5 叶期 (V5)。由于植株可能出现下层叶片衰老脱落的现象,每盆植株共获取 4~5 个叶片的荧光图像,由植株形态学由下至上的顺序标记叶片,分别记录为“叶片 1”~“叶片 5”(若叶片 1 脱落,则只记录“叶片 2”~“叶片 5”),试验共获得 245 个荧光图像样本。

1.3 数据分析

通过感兴趣区域 (Region Of Interest, ROI) 的选择对玉米植株进行图像划分,获取每株玉米不同位置叶片的荧光淬灭动力学曲线、荧光参数、荧光参数图像。本

研究中使用到的主要荧光参数符号、计算式及其概念描述如表 2 所示。采用一维卷积移动平均对荧光淬灭动力学曲线进行降噪,并去除边界效应,以消除环境噪声的干扰;采用基于层次化聚类方法的非加权组平均法 (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Means, UPGMA) 对荧光淬灭中的荧光参数进行聚类分析^[24],以度量样本间的相似度;采用曼-惠特尼 U 检验 (Mann-Whitney U test) 进行叶片间的显著性分析^[25],以更好地分析复杂环境中的样本;使用多元回归拟合的方法进行单个荧光参数的特征拟合;对于以多个叶片为特征的单个荧光参数以及以多个荧光参数为特征的单个叶片,采用支持向量机 (Support Vector Machines, SVM)、随机森林 (Random Forest, RF)、偏最小二乘 (Partial Least Squares, PLS) 判别分析 3 个分类算法来进行玉米品种、土壤氮含量、土壤水含量的判别建模^[26-28],并进行了十折交叉验证,验证特征的规律性强弱;使用偏最小二乘变量重要性预测 (Partial Least Squares-Variable Important in Projection, PLS-VIP) 对荧光参数中的特征进行评分^[29],筛选具有较高权重的特征叶片。

表 2 本研究中使用的关键荧光参数、计算式及其概念

Table 2 Key fluorescence parameters, calculation formula and their description used in this study

荧光参数 Fluorescence parameters	计算式 Calculation formula	概念描述 Description
F_v/F_m	$(F_m - F_o)/F_m$	PS II 最大光量子效率,反映 PS II 反应中心内禀光能转换效率,可有效表征植株的胁迫状况 ^[30]
$\Delta F/F_m'$	$(F_m_Lss - F_t_Lss)/F_m_Lss$	PS II 实际光量子效率,反映 PS II 反应中心在有部分关闭情况下的实际光能转换效率 ^[30]
q_L_Lss	$(F_q_Lss/F_v_Lss)/(F_o/F_t_Lss)$	PS II 稳态光适应光化学淬灭,反映 PS II 反应中心的开放程度及其电子传递活性的高低 ^[31]
NPQ_Lss	$(F_m - F_m_Lss)/F_m_Lss$	PS II 稳态非光化学荧光淬灭,反映光系统对过量的光能热耗散的能力,对光合机构起一定的自我保护性 ^[31]
Rfd_Lss	$(F_p - F_t_Lss)/F_t_Lss$	PS II 光适应稳态荧光衰减率,常被用作高等植物光合活性的评估,用于估算叶片中的 CO_2 同化速率和叶绿素含量 ^[32]

注: F_o : 初始荧光; F_m : 最大荧光; F_m_Lss : 光适应后的稳态最大荧光; F_p : Kautsky 诱导效应最大荧光; F_t_Lss : 光适应稳态荧光; F_v_Lss : 稳态可变荧光; F_q_Lss : 稳态淬灭荧光。

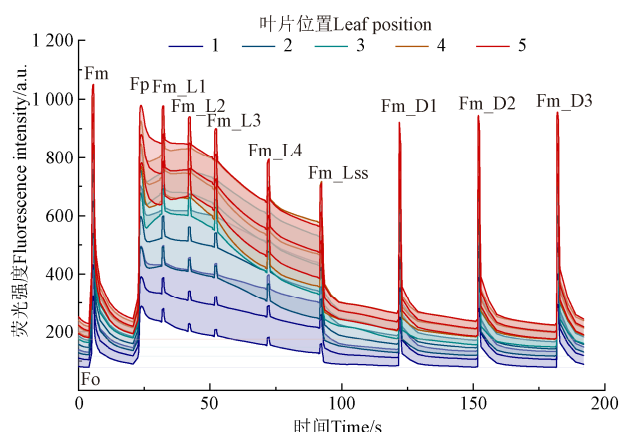
Note: F_o : initial fluorescence; F_m : maximum fluorescence; F_m_Lss : steady-state maximum fluorescence after light adaptation; F_p : Kautsky induced effect maximal fluorescence; F_t_Lss : light-adapted steady-state fluorescence; F_v_Lss : steady-state variable fluorescence; F_q_Lss : steady-state quenched fluorescence.

2 结果与分析

2.1 叶片荧光淬灭特性垂直分布异质性分析

荧光淬灭动力学曲线表达了淬灭过程中不同时间的实际荧光产量,可通过反映 PS II 的电子传递情况,表达叶片实际的光合作用强度,进而表征植物的光合性能。如图 3 为 2 种玉米品种、2 种土壤氮含量、2 种土壤水含量的综合处理下,植株不同位置的叶片的荧光动力学曲线分布图,由荧光淬灭动力学曲线的整体分布图得出,

叶片 1 的总体荧光强度最低, 最大荧光 F_m 在 300~550 (a.u.) 之间; 叶片 2 次之, 最大荧光 F_m 在 500~750 (a.u.) 之间; 叶片 3 的最大荧光 F_m 在 700~900 (a.u.) 之间; 叶片 4、叶片 5 的最大荧光 F_m 相近, 在 800~1 100 (a.u.) 之间。随着叶片高度的增加, 总体荧光强度呈逐渐增大趋势, 其中, 叶片 1~叶片 3 的光合作用能力具有较高的区分度; 叶片 3~叶片 5 的曲线仍呈递增趋势, 但差别不明显。受到多种处理相互作用的影响, 每个位置的叶片都具有较宽的误差带, 误差带最宽的部分位于 F_m — F_m_Lss 阶段, 表明光适应部分的荧光参数更易受到品种、氮、水因素的影响。此外, 随着叶片高度的增加, 植株叶片从 F_m_L3 到 F_m_Lss 的曲线斜率显著增加, 表明光适应过程中较高位置的叶片产生了较快的荧光淬灭。



注: 图中叶片位置编号顺序为植株形态学由下至上, 各叶片类别中心的加粗线为其动力学曲线的均值, 两侧为曲线误差带。曲线上方标记为荧光淬灭过程的关键节点, 其中, 后缀 L_n 为第 n 次脉冲的光适应荧光, D_n 为第 n 次脉冲的暗弛豫荧光, 下同。

Note: Leaf numbering order is plant morphology from bottom to top, and the bolded line for each leaf category is the mean value of its kinetic curve, flanked by curve error bands. The markers above the curve are the key nodes of the fluorescence quenching process, the suffix L_n is the light-adapted fluorescence of the n th pulse, and D_n is the dark relaxation fluorescence of the n th pulse, the same below.

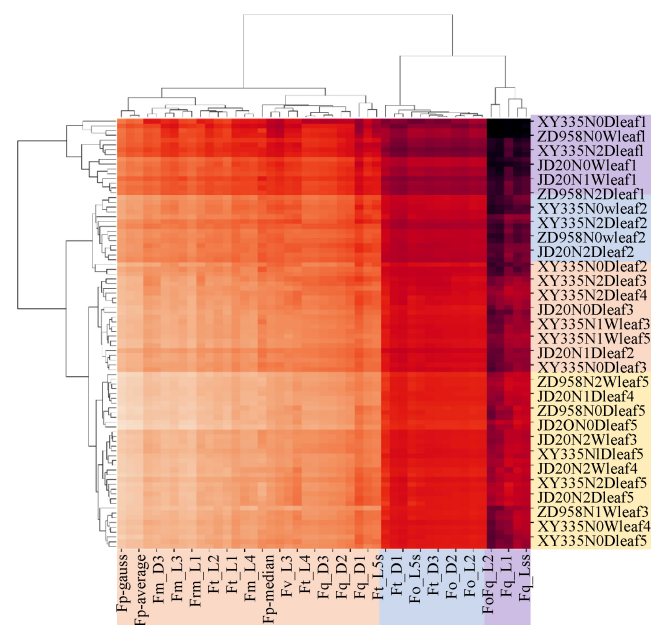
图 3 不同高度的叶片荧光动力学曲线分布

Fig.3 Distribution of leaves fluorescence kinetic curves at different heights

不同的试验样本按照不同试验处理可分为 18 组, 每种处理的样本按垂直高度上叶片的位置进一步划分为 90 类样本。在叶绿素荧光成像系统获得的 101 个荧光参数中, 31 个为基础荧光参数, 即直接由叶绿素荧光成像系统采集获得的参数, 70 个为间接荧光参数。基于上述荧光动力学曲线分布的分析, 基础荧光参数不足以表达不同样本间的荧光淬灭特性, 因此选取上述 90 种样本及其对应的 31 个与荧光强度直接相关的参数 (包含基础荧光参数 31 个, 间接荧光参数 16 个), 其中, 基础荧光参数分别为叶绿素荧光淬灭分析多次脉冲过程中初始荧光 F_o 、Kautsky 诱导效应最大荧光 F_p 、最大荧光 F_m 、光适应即时荧光 F_t 的系列参数 (F_p 包含 3 种计算方式, 其他参数包含其光适应参数和暗弛豫参数), 间接荧光参数分别为叶绿素荧光淬灭分析中可变荧光 F_v 、淬灭荧光 F_q 的系列参数 (包含其光适应参数和暗弛豫参数)。对荧光参数值进行对数处理后进行了非加权组平均法聚类分析, 得到垂直高度上 5 片叶片的荧光参数的聚类热图如图 4 所示。受图片尺寸限制, 对显示结果进行等距采样,

其中样本仅显示 30 类, 荧光参数仅显示 24 个。

根据聚类结果, 样本聚类可分为四大类。其中, 第一大类以叶片 1 的样本为主, 且显著区别于其他类; 第二大类以叶片 2 为主; 第三大类以叶片 3 的样本为主, 但较高土壤氮含量处理下先玉 335 的较高位叶片以及较低土壤氮含量处理下浚单 20 的较低位叶片也有少量样本分布在此类; 第四大类以叶片 5 为主, 且各品种的叶片 3、叶片 4 均有出现。综上分析, 在 5 片叶片的垂直分布中, 叶片 1 与叶片 2 不受品种、土壤氮含量、土壤水含量的影响, 其荧光淬灭过程中的荧光参数均有较为显著的区分特征。多数样本的叶片 3 具有相同的荧光特性, 但浚单 20 和先玉 335 的部分叶片样本受到环境因素的影响, 垂直分布特性发生了变化。多数样本的叶片 5 具有相同的荧光特性, 部分较高土壤氮含量中的样本的叶片 3、叶片 4 也与此类样本有类似的荧光淬灭特征。对比上述结果可进一步得出结论, 郑单 958 在不同土壤氮含量的条件下, 垂直分布异质性较其他两个品种变化较小, 拥有更强的耐低氮能力, 这与齐红志等^[33]的研究结论相符。此外, 土壤水含量并未对聚类结果产生显著的影响。



注: 热图中荧光参数值的大小以热图颜色表示, 颜色越深, 参数值越大。样本聚类结果中, “leaf n ” 代表植株形态学由下至上的第 n 片叶片, 其他标记释义见表 1。Ft 为光适应即时荧光; Fv 为可变荧光; Fq 为淬灭荧光, 其他标记释义见表 2。

Note: The magnitude of the fluorescence parameter values in the heat map is indicated by the heat map color, the deeper the color, the larger the parameter value. In the sample clustering results, the “leaf n ” represents the n th leaf from the bottom to the top of the plant morphology, and the other markers are interpreted in Table 1. Ft is the light-adapted immediate fluorescence; Fv is the variable fluorescence; Fq is the quenched fluorescence, and the other markers are explained in Table 2.

图 4 不同处理叶片的荧光淬灭参数聚类热图

Fig.4 Clustering heat map of fluorescence quenching parameters of leaves with different treatments

由荧光动力学曲线表征的 47 个荧光参数聚类为三大类, 包含了不同类型信息, 但同时具有一定共线性, 需要利用数据挖掘产生的具有更为明确意义和普遍性的指标进行表达。

2.2 叶片荧光参数的垂直分布异质性分析

2.2.1 叶绿素荧光参数图像分析

通过不同处理下各荧光参数成像结果的对比, 筛选出了不同处理下荧光参数峰值差异显著, 且不同重复中空间分布一致性较强的 3 个参数: F_v/F_m 、 qL_Lss 和 Rfd_Lss 。将上述 3 个参数的典型图像进行了可视化对比, 结果如图 5 所示。

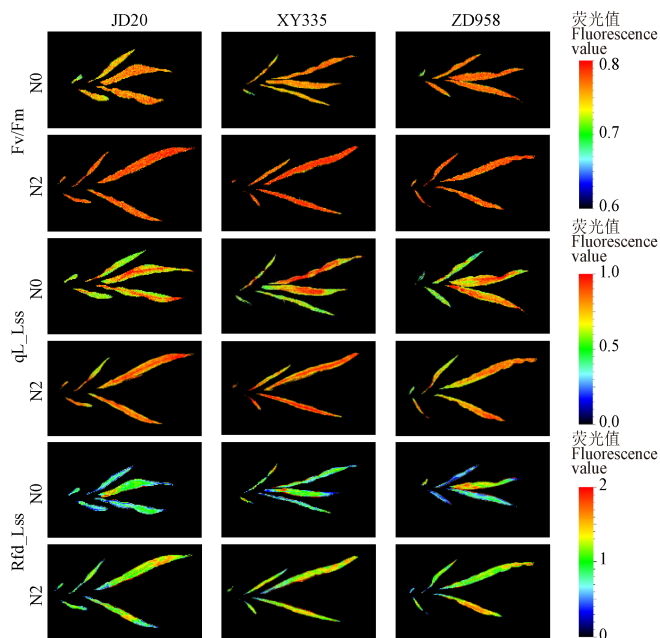


图 5 不同品种、氮环境下的叶绿素荧光成像图

Fig.5 Chlorophyll fluorescence imaging under different varieties and nitrogen environment

最大光量子效率 F_v/F_m 的分布范围主要在 0.6~0.8, 且正常土壤氮含量下的 F_v/F_m 参数值明显高于微量土壤氮含量, 表明土壤氮含量会显著影响叶片光合反应中心内的最大光能转换效率。由于叶片衰老的影响, 叶片 1 与其他叶片相比在整体上表现出了显著的差异, 但参数在各叶片内部各点的分布上差异不明显, 表明正常生长的叶片最大光能转换效率在垂直高度上的差异性较小。

稳态光化学淬灭系数 qL_Lss 的分布范围主要在 0.5~1.0 之间, 且正常土壤氮含量下的 qL_Lss 参数值明显高于微量土壤氮含量, 表明土壤氮含量会显著影响叶片光合反应中心内的光化学反应比例^[34]。在垂直高度的分布上, 叶片的光化学淬灭呈上升趋势, 表明较高位置的叶片具有较高的电子传递活性; 在叶片内分布上, 荧光参数较大值主要分布在叶片中部, 而在叶片边缘、叶片尖部和生长点的值较小, 表明此部位在光合作用中具有较高的电子传递活性。

稳态荧光衰减率 Rfd_Lss 的分布范围主要在 0~2 之间, 荧光参数值的分布随土壤氮含量的不同产生了显著的差异。垂直分布上, 微量土壤氮含量的叶片 4、叶片 5 与较低位叶片显著不同, 而正常土壤氮含量的叶片 3 及其以上的叶片没有明显的变化, 表明土壤氮含量的降低会显著降低植株整体的叶片活性。参数在叶片内各点的分布上与参数 qL_Lss 类似, 荧光参数较大值主要分布在

叶片中部, 说明此叶片部位的叶片活性较强。

综合叶片荧光参数成像结果可知, 叶片 3 及以上的叶片荧光参数异质性明显降低, 且显著受到不同土壤氮含量的影响; 不同玉米品种的荧光特征没有产生显著的成像差异, 因此需要进一步研究其分布规律, 探究品种间光合作用特性的显著性差异。

2.2.2 荧光参数垂直分布异质性分析

为探究不同位置叶片荧光参数分布特性, 选取了多因素综合作用下各叶片的典型荧光参数进行分析, 图 6 展示了不同位置叶片关键荧光参数的分布差异。其中, 图 6a 为各叶片的 F_v/F_m 分布, 结果表明随着垂直高度的增加, 其最大光量子效率 F_v/F_m 呈明显的上升趋势, 且叶片 1 与叶片 2 ($P<0.001$)、叶片 4 与叶片 5 ($P<0.05$) 之间具有显著性差异。这表明随着垂直高度的增加, 叶片的 PS II 最大光能转化效率增大, 临近衰老的叶片 (叶片 1) 与正常生长的叶片相比, PS II 最大光能转化效率显著降低, 新生叶片 (叶片 5) 与正常生长的叶片相比, PS II 最大光能转化效率显著增大。图 6b 为各叶片的 $\Delta F/F_m'$ 分布, 结果表明随着垂直高度的增加, 其实际光量子效率均值呈上升趋势, 这表明随着垂直高度的增加, 叶片的 PS II 实际光能转换效率增大。叶片 1 与叶片 2 之间、叶片 2 与叶片 3 之间、叶片 4 与叶片 5 之间的差异不明显 ($P\leq 1.00$); 叶片 1、叶片 2、叶片 3 与叶片 4、叶片 5 之间具有显著性差异 ($P<0.001$)。这表明叶片 4 和叶片 5 在实际的光合作用中具有更大优势。图 6c 为各叶片的 qL_Lss 分布, 结果表明随着垂直高度的增加, 光化学淬灭分 3 个层次显著增加, 叶片 1 为第一层, 叶片 2、叶片 3 为第二层, 叶片 4、叶片 5 为第三层, 表明植株的光反应电子传递活性逐级增高, 叶片 4、叶片 5 的反应中心电子传递活性最强。张子山等^[35]的研究表明了随着叶片的衰老, 最大光能转换效率和电子传递活性均有降低趋势, 与本文上述研究结果相符。图 6d 为各叶片的 NPQ_Lss 分布, 结果表明随着垂直高度的增加, 叶片 2 及其以上叶片稳态非光化学淬灭 NPQ_Lss 差异并不显著, 初步判断叶片 1 的非光化学淬灭相对较高的主要原因是其本身光合机构的老化。

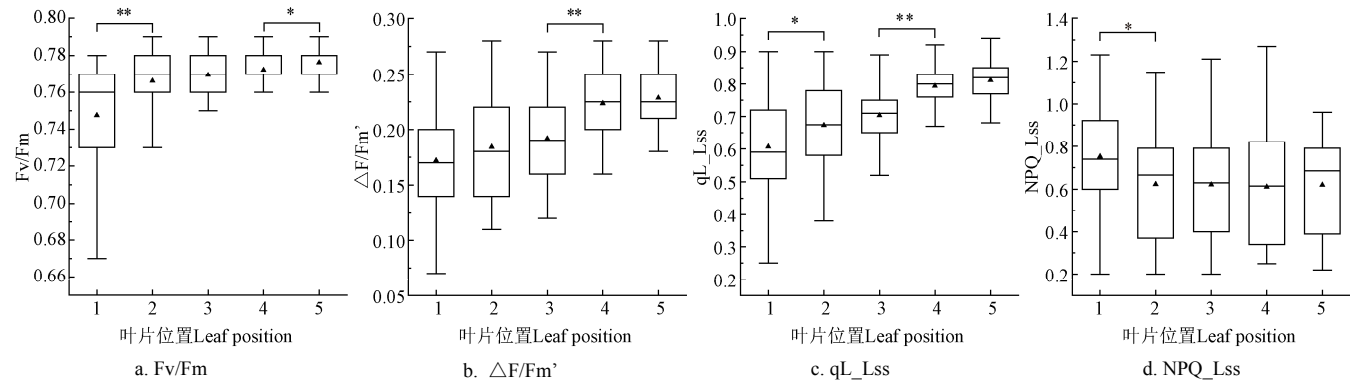
2.3 叶片光合特性的垂直分布规律探究

2.3.1 不同处理下叶片光合特性垂直分布规律研究

为了探究不同处理下植株叶片光合特性的垂直分布规律, 对上述处理的叶片关键荧光参数在垂直方向的分布进行了拟合, 如图 7 所示。由图 7a 可知, 不同土壤氮含量处理样本的 F_v/F_m 参数在 95% 水平下有显著的二次函数分布特征, 随着叶片高度的增加, PS II 反应中心内的最大光能转换效率呈增大趋势, 且增幅越来越小, 表明新生叶片的最大光合作用效率高于较早生长的低位叶片, 且随叶片高度的增加, 叶片间的最大光能转换效率差距逐渐缩小。此外, 对植株不同氮含量处理会显著影响荧光参数的垂直分布特性, 随着土壤氮含量的增加, 垂直分布曲线的二次项系数和截距均呈增大趋势, 整体曲线的高度增加, 且微量土壤氮含量条件对垂直分布产生了更大的影响, 其叶片 4 的 F_v/F_m 到达了曲线最高点, 这是因为土壤氮含量

会显著影响叶片蛋白质生成，进而影响其叶绿素含量，导致低位叶片的较早衰老，高位叶片养分不足^[36]。由图 7b 可知，不同品种间的 qL_Lss 参数分布近似于一次函数，随着垂直高度的增加，样本的光化学淬灭呈增加的趋势，3 个品种的斜率从大到小依次为郑单 958、先玉 335、浚单

20，说明其光反应电子传递活性垂直分布差异依次减小；郑单 958 的曲线拟合 F 值显著大于其他两个品种，表明该品种叶片 qL_Lss 参数线性分布规律更强，进而说明不同氮含量处理对该品种叶片光化学淬灭的差异影响较小，验证了该品种对土壤氮含量有较强的抗逆性^[37]。



注：相邻叶片的曼-惠特尼 U 检验结果在图中标出，其中 “*” 代表 $P \leq 0.05$ ；“**” 代表 $P \leq 0.01$ ；“***” 代表 $P \leq 0.001$ 。
Note: The results of the Mann-Whitney U test for adjacent leaves have been marked in the figure, where “*” represents $P \leq 0.05$; “**” represents $P \leq 0.01$; “***” represents $P \leq 0.001$.
图 6 多因素影响下各叶片荧光参数分布差异

Fig.6 Differences in the distribution of fluorescence parameters of leaves under the influence of multiple factors

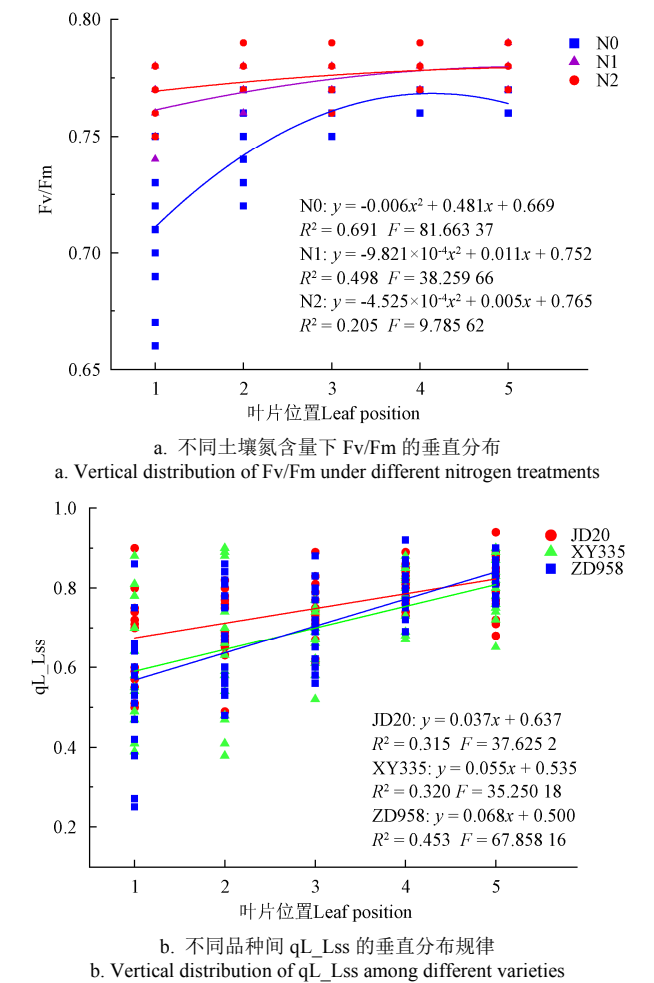


图 7 部分荧光参数在不同处理条件下的垂直分布规律
Fig.7 Vertical distribution of fluorescence parameters under different treatment conditions

为了进一步探究玉米植株在多种处理条件下的垂直分布规律，以叶片荧光参数分类植株组别的能力来量化

叶片垂直分布规律性强弱。本试验以同一植株 5 叶片的荧光参数为特征，选择典型机器学习分类算法建立玉米品种、土壤氮含量、土壤水含量的判别模型。模型建立时采用十折交叉验证的方法进行数据集划分以保证数据分布的一致性，并避免过拟合的产生。关键荧光参数在 3 种分类器下的判别准确性结果如表 3 所示。

表 3 关键荧光参数在 3 种分类器下的样本类型判别准确率
Table 3 Accuracy of sample type discrimination of key fluorescence parameters under 3 classifiers %

荧光参数 Fluorescence parameters	玉米品种 Maize variety			土壤氮含量 Soil nitrogen content			土壤水含量 Soil water content		
	SVM	RF	PLS	SVM	RF	PLS	SVM	RF	PLS
NPQ_Lss	56	56	46	58	58	58	70	66	64
qL_Lss	66	44	40	64	48	56	52	46	64
$\Delta F/Fm'$	66	50	52	54	60	46	64	60	56
Fv/Fm	58	60	62	70	72	72	60	54	50
Rfd_Lss	56	52	44	54	60	52	72	60	66

注：SVM、RF、PLS 分别为支持向量机、随机森林和偏最小二乘算法。
Note: SVM, RF, PLS are support vector machines, random forest, partial least squares, respectively.

为充分表达整体判别效果，将 3 种分类器判别结果的平均值作为荧光参数的评估标准。由判别结果分析，对玉米品种、土壤氮含量、土壤水含量判别的最佳荧光参数分别为 Fv/Fm 、 Fv/Fm 和 NPQ_Lss ，其平均判别准确率分别为 60.00%、71.33%和 66.67%，均高于随机判别准确率 33.33%、33.33%和 50.00%。选择判别准确率最高的分类器模型，并分别绘制上述特征荧光参数的交叉验证混淆矩阵，如图 8 所示。

玉米品种的判别分析中， Fv/Fm 的准确率相对较高，表明不同玉米品种 PS II 最大光能转换效率的垂直分布规律性最强，其中，以郑单 958 的最大光量子效率垂直分布规律性最为显著，如图 8a 所示。在土壤氮含量的判别分析中， Fv/Fm 的判别准确率最高，表明不同土壤氮含量下 PS II 最大光能转换效率的垂直分布规律性最强，进一

步说明土壤氮含量会对叶片光能转换效率产生影响。如图 8b 所示, 由交叉验证混淆矩阵可知, 微量氮含量的判别准确率达 0.94, 远超其他两个水平, 可知玉米植株在环境严重缺少氮元素的情况下其生长发育有极高的概率会受到影响, 在环境少氮的情况下, 有 50%以上的概率

其生长发育会受到影响。在土壤水含量作用下, 3 种判别方法的效果均不够理想, 其中非光化学淬灭 NPQ_Lss 的判别准确率相对较高, 由图 8c NPQ_Lss 的交叉验证混淆矩阵可知, 植株有 0.88 的概率在干旱胁迫后, 垂直分布规律产生变化。

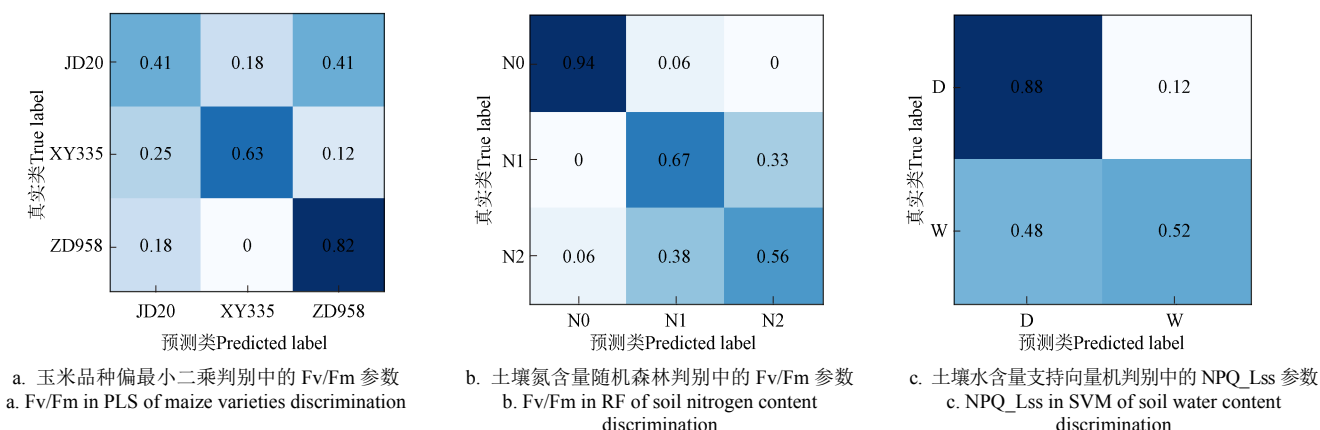


图 8 特征荧光参数垂直分布规律性判别的交叉验证混淆矩阵

Fig.8 Cross-validation confusion matrix for the discrimination of regularity of vertical distribution of important fluorescence parameters

由于试验样本是在多个胁迫因素综合作用下培育, 可能加剧了不同样本间的差异, 导致在叶片光合特性的垂直分布规律研究中, 样本的规律性没有得到很好地体现。具体表现在: 不同土壤氮含量条件下的曲线拟合 F 值不稳定, 不同土壤水含量条件下的特征拟合结果 R^2 较低, 土壤水含量分类判别准确率较低等。拟在后续研究中适当增加水分胁迫组别和程度, 进一步揭示水胁迫对光合特性垂直分布规律的影响; 针对作物生长期对垂直分布规律具有显著影响, 延长作物的生长至 10 叶期, 探究不同生长阶段光合特性垂直分布的变化; 扩大样本数量, 减小微气候或个体差异产生的影响。

2.3.2 植株叶片垂直光合异质性关键叶片研究

为了探究叶片垂直分布中影响样本类型判别的关键叶片, 基于上述分类结果, 选取了品种、土壤氮含量、土壤水含量判别分析中的最优荧光参数进行偏最小二乘变量重要性预测 (PLS-VIP), 以进一步进行特征变量筛选。同时, 以每片叶片的 5 个关键荧光参数 (见表 2) 为特征, 使用支持向量机、随机森林、偏最小二乘判别分析 3 种判别方法来进行玉米品种、土壤氮含量、土壤水含量的建模及预测。将各位置叶片的平均判别结果按叶片位置绘制成趋势图, 各位置叶片的变量 VIP 得分和平均判别准确率结果如图 9 所示。

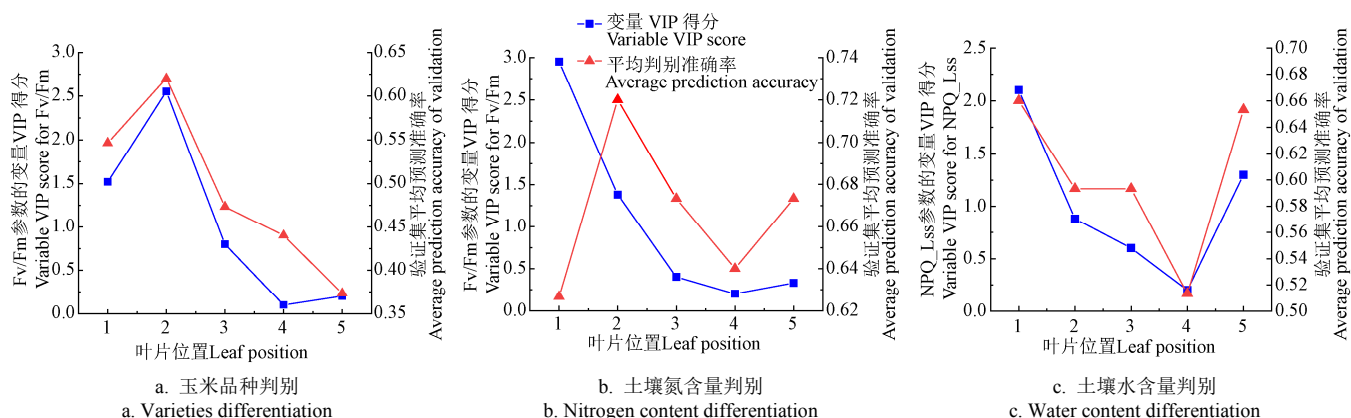


图 9 3 种判别分析中叶片的 PLS-VIP 得分与平均判别准确率

Fig.9 PLS-VIP (Partial Least Squares-Variable Important In Projection) scores and average discriminant accuracy of leaves in three discriminant analyses

如图 9a 所示, 在玉米品种判别分析中, 基于单个荧光参数 (Fv/Fm)、多个叶片为特征的特征变量选择和基于多个荧光参数、单个叶片为特征的判别分析表现出相同的趋势, 且均在叶片 2 上展现出较高的判别性能。这表明叶片 2 可以作为玉米品种判别的“特征叶片”。如

图 9b 所示, 在土壤氮含量判别分析中, 在以单个荧光参数 (Fv/Fm)、多个叶片为特征的特征变量选择中, 叶片 1、叶片 2 判别均产生了有效贡献 (VIP 得分大于 1), 且叶片 1 的得分较高; 在以多个荧光参数、单个叶片为特征的判别分析中, 叶片 2 具有最高的平均判别准确率。

因此, 叶片 2 可以作为土壤氮含量判别的“特征叶片”。如图 9c 所示, 在土壤水含量判别分析中, 基于单个荧光参数 (NPQ_Lss)、多个叶片为特征的特征变量选择和基于多个荧光参数、单个叶片为特征的判别分析表现出相同的趋势, 且在叶片 1、叶片 5 上展现出较高的判别性能, 但叶片 1 的特征评分和判别准确率均略高于叶片 5, 表明叶片 1 可以作为土壤水含量判别的“特征叶片”。

3 结 论

本研究以 3 种玉米品种在 3 种氮含量和 2 种水含量环境下的苗期植株为研究对象, 利用叶绿素荧光成像技术, 从叶绿素荧光淬灭特性、叶绿素荧光参数特征、叶绿素荧光参数垂直分布规律、垂直分布异质性关键叶片 4 个方面进行了植株叶片光合特性的垂直分布研究。主要有以下结论:

1) 在叶绿素荧光淬灭特性上, 植株形态学由下至上的第 1 和第 2 片叶片 (叶片 1 和叶片 2) 不受品种、土壤氮含量的影响, 其淬灭特性均有较为显著差异。郑单 958 在不同土壤氮环境下的荧光淬灭异质性小于先玉 335 和浚单 20, 拥有更强的耐低氮能力。

2) 在叶绿素关键荧光参数垂直分布上, 参数 F_v/F_m 表明衰老、正常、新生叶片的光合作用最大光能转换效率依次显著增大, 该特征在叶片内部各点的分布上差异性较小; 参数 $\Delta F/F_m$ 表明植株形态学由下至上的第 4 和第 5 片叶片 (叶片 4 和叶片 5) 的实际光能转换效率具有显著优势; 参数 qL_Lss 表明光反应电子传递活性随垂直高度的增加分 3 个等级逐级增大; 参数 NPQ_Lss 表明叶片的非光化学能量耗散在正常叶片中差异性较小, 在衰老叶片中显著增大。

3) 叶绿素荧光参数垂直分布规律上, 不同荧光参数的垂直分布拟合效果均不够理想。其中, 参数 F_v/F_m 在不同的土壤氮含量下的垂直分布与二次曲线有较高的拟合特征, 随着土壤氮含量的降低, 垂直分布的异质性增大; qL_Lss 在不同品种间的垂直分布与一次曲线有较高的拟合特征, 垂直分布异质性表现由大到小依次为郑单 958、先玉 335、浚单 20, 郑单 958 的抗逆性较强。支持向量机、随机森林、偏最小二乘判别分析的判别结果表明, F_v/F_m 对不同玉米品种的判别准确率最高, 郑单 958 样本的判别准确率达 0.82, 垂直分布规律更显著; F_v/F_m 对不同土壤氮含量的判别准确率最高, 微量土壤氮含量下的样本判别准确率达 0.94, 垂直分布规律更显著; NPQ_Lss 对不同土壤水含量的判别准确率较高, 干旱环境下的样本判别准确率达 0.88, 垂直分布规律性更显著。

4) 在玉米品种和土壤氮含量的分析中, 叶片 2 可以作为区分玉米品种的“特征叶片”; 在土壤水含量的分析中, 叶片 1 可以作为土壤水含量评估的“特征叶片”。

【参 考 文 献】

- [1] Orr D J, Pereira A M, Pereira P, et al. Engineering photosynthesis: Progress and perspectives[J]. *F1000Research*, 2017, 6:1891.
- [2] Zelitch I. The close relationship between net photosynthesis and crop yield[J]. *Bioscience*, 1982, 32(10): 796-802.
- [3] Annabi K, Laaribi I, Gouta H, et al. Protein content, antioxidant activity, carbohydrates and photosynthesis in leaves of girdled stems of Four olive cultivars[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 256: 108551.
- [4] 魏永霞, 曹晓强, 冀俊超, 等. 不同灌溉方式下旱直播水稻光合特性与干物质积累动态[J]. *农业机械学报*, 2021, 52(10): 358-368.
- [5] Wei Yongxia, Cao Xiaoqiang, Ji Junchao, et al. Effects of different irrigation methods on photosynthetic characteristics and dry matter accumulation dynamics of dry direct seeding rice[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2021, 52(10): 358-368. (in Chinese with English abstract)
- [6] Rossato Jr José A S, Madaleno L L, Mutton Márcia J R, et al. Photosynthesis, yield and raw material quality of sugarcane injured by multiple pests[J]. *PeerJ (San Francisco, CA)*, 2019, 7:e6166.
- [7] Hu H, Sheng L, Zhang G, et al. Influence of bacterial leaf blight on the photosynthetic characteristics of resistant and susceptible rice[J]. *Journal of Phytopathology*, 2018, 166(7/8): 547-554.
- [8] Liang G, Liu J, Zhang J, et al. Effects of drought stress on photosynthetic and physiological parameters of tomato[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2020, 145(1): 12-17.
- [9] Hou W, Tränkner M, Lu J, et al. Interactive effects of nitrogen and potassium on photosynthesis and photosynthetic nitrogen allocation of rice leaves[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 1-13.
- [10] Sun J, Xie D, Zhang E, et al. QTL mapping of photosynthetic-related traits in rice under salt and alkali stresses[J]. *Euphytica*, 2019, 215(9): 1-14.
- [11] Moulin S, Baret F, Bruguier N, et al. Assessing the vertical distribution of leaf chlorophyll content in a maize crop[C]//IGARS. 2003 IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium. Proceedings. Toulouse, France: IEEE, 2003: 3284-3286.
- [12] Fan P P, Li Y Y, Evers J B, et al. A new empirical equation to describe the vertical leaf distribution profile of maize[J]. *The Journal of Agricultural Science*, 2020, 158(8/9): 676-686.
- [13] Lindquist J L, Mortensen D A, Johnson B E. Mechanisms of corn tolerance and velvetleaf suppressive ability[J]. *Agronomy Journal*, 1998, 90(6): 787-792.
- [14] Li Y, Song H, Zhou L, et al. Vertical distributions of chlorophyll and nitrogen and their associations with photosynthesis under drought and rewatering regimes in a maize field[J]. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2019, 272: 40-54.
- [15] Wu B, Huang W, Ye H, et al. Using multi-angular hyperspectral data to estimate the vertical distribution of leaf chlorophyll content in wheat[J]. *Remote Sensing*, 2021, 13(8): 1501.
- [16] He J Y, Zhang X B, Guo W T, et al. Estimation of vertical leaf nitrogen distribution within a rice canopy based on hyperspectral data[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:1802.

- [16] Zhang Q, Chen J M, Ju W, et al. Improving the ability of the photochemical reflectance index to track canopy light use efficiency through differentiating sunlit and shaded leaves[J]. *Remote Sensing of Environment*, 2017, 194: 1-15.
- [17] 张佳菲, 万亮, 何勇, 等. 基于快速叶绿素荧光技术的油菜冠层生化参数垂直异质性分析[J]. *智慧农业(中英文)*, 2021, 3(1): 40-50.
Zhang Jiafei, Wan Liang, He Yong, et al. Vertical heterogeneity analysis of biochemical parameters in oilseed rape canopy based on fast chlorophyll fluorescence technology[J]. *Smart Agriculture*, 2021, 3(1): 40-50. (in Chinese with English abstract)
- [18] Feng W, He L, Zhang H Y, et al. Assessment of plant nitrogen status using chlorophyll fluorescence parameters of the upper leaves in winter wheat[J]. *European Journal of Agronomy*, 2015, 64: 78-87.
- [19] 李强, 罗延宏, 余东海, 等. 低氮胁迫对耐低氮玉米品种苗期光合及叶绿素荧光特性的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2015, 21(5): 1132-1141.
Li Qiang, Luo Yanhong, Yu Donghai, et al. Effects of low nitrogen stress on photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence parameters of maize cultivars tolerant to low nitrogen stress at the seedling stage[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2015, 21(5): 1132-1141. (in Chinese with English abstract)
- [20] 张文英, 李承道, 等. 作物表型研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 2017.
- [21] Pfundel E. Estimating the contribution of photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence[J]. *Photosynthesis Research*, 1998, 56(2): 185-195.
- [22] 史建国. 不同光照对夏玉米产量及其根系生理特性的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
Shi Jianguo. Effects of Different Light Treatments on Grain Yield and the Root Physiological Characteristics of Summer Maize in the Field[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2015. (in Chinese with English abstract)
- [23] Baker N R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 89.
- [24] Ashraf M, Al-qurainy F, Ahmad M S A, et al. Morpho-physiological diversity of barley (*Hordeum vulgare* L.) germplasm for heat tolerance[J]. *Turkish Journal of Botany*, 2022, 46(1): 37-49.
- [25] Udovicki B, Djekic I, Stankovic S, et al. Impact of climatic conditions on fumonisins in maize grown in Serbia[J]. *World Mycotoxin Journal*, 2019, 12(2): 183-190.
- [26] 王迎旭, 孙晔, 李玉花, 等. 基于叶绿素荧光成像的温室黄瓜植株病害分类与病情监测[J]. *南京农业大学学报*, 2020, 43(4): 770-780.
Wang Yingxu, Sun Ye, Li Yuhua, et al. Classification and monitoring of disease cucumber plants in greenhouse based on chlorophyll fluorescence imaging technology[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2020, 43(4): 770-780. (in Chinese with English abstract)
- [27] 方秀琴, 郭晓萌, 袁玲, 等. 随机森林算法在全球干旱评估中的应用[J]. *地球信息科学学报*, 2021, 23(6): 1040-1049.
- [28] Fang Xiuqin, Guo Xiaomeng, Yuan Ling, et al. Application of random forest algorithm in global drought Assessment[J]. *Journal of Geo-information Science*, 2021, 23(6): 1040-1049. (in Chinese with English abstract)
- [29] El Orche A, Bouatia M, Mbarki M. Rapid analytical method to characterize the freshness of olive oils using fluorescence spectroscopy and chemometric algorithms[J]. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2020, 2020(4): 1-9.
- [30] Mehmood T. PLS modeling the starch contents of corn data measured through different NIR spectrometers[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2019, 5: 132-135.
- [31] 张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论[J]. *植物学通报*, 1999(4): 444-448.
Zhang Shouren. A discussion on chlorophyll fluorescence kinetics parameters and their significance[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 1999(4): 444-448. (in Chinese with English abstract)
- [32] Murchie E H, Lawson T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(13): 3983-3998.
- [33] Roháček K. Chlorophyll fluorescence parameters: The definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships[J]. *Photosynthetica*, 2002, 40(1): 13-29.
- [34] 齐红志, 刘天学, 杜成凤, 等. 玉米苗期对氮、磷、钾亏缺的响应及基因型差异[J]. *河南农业大学学报*, 2011, 45(2): 142-148.
Qi Hongzhi, Liu Tianxue, Du Chengfeng, et al. Responses of maize to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency at seedling stage and differences among cultivars[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2011, 45(2): 142-148. (in Chinese with English abstract)
- [35] 龙燕, 马敏娟, 王英允, 等. 利用叶绿素荧光动力学参数识别苗期番茄干旱胁迫状态[J]. *农业工程学报*, 2021, 37(11): 172-179.
Long Yan, Ma Minjuan, Wang Yingyun, et al. Identification of drought stress state of tomato seedling using kinetic parameters of chlorophyll fluorescence[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2021, 37(11): 172-179. (in Chinese with English abstract)
- [36] 张子山, 杨程, 高辉远, 等. 保绿玉米与早衰玉米叶片衰老过程中叶绿素降解与光合作用光化学活性的关系[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(23): 4794-4800.
Zhang Zishan, Yang Cheng, Gao Huiyuan, et al. Relationship between photochemistry activity and decrease in chlorophyll content during senescence in leaves of stay green and quick-leaf-senescence inbred line of maize[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(23): 4794-4800. (in Chinese with English abstract)
- [37] 卢霖, 董志强, 董学瑞, 等. 乙矮合剂对不同密度夏玉米花粒期叶片氮素同化与早衰的影响[J]. *作物学报*, 2015,

41(12): 1870-1879.

Lu Lin, Dong Zhiqiang, Dong Xuerui, et al. Effects of ethylene-chlormequat-potassium on leaf nitrogen assimilation after anthesis and early senescence under different planting densities[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2015, 41(12):

1870-1879. (in Chinese with English abstract)

[37] Han J, Wang L, Zheng H, et al. ZD958 is a low-nitrogen-efficient maize hybrid at the seedling stage among five maize and two teosinte lines[J]. *Planta*, 2015, 242(4): 935-949.

Vertical distribution of photosynthetic characteristics of maize leaves at the seedling stage using chlorophyll fluorescence imaging

Xiao Tianpu, Yang Li, Zhang Dongxing, Wang Liangju^{*}, Zhang Tianliang, Du Zhaohui, Li Hongsheng, Xia Xulong

(1. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. Key Laboratory of Soil-Machine-Plant System Technology of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100083, China)

Abstract: Leaf photosynthetic characteristics of maize seedlings can greatly contribute to the accuracy of phenotype detection. This study aims to determine the vertical distribution of leaf photosynthesis in three maize varieties at the seedling stage (five-leaf stage). The chlorophyll fluorescence imaging was also utilized to clarify the combined influence of different environmental nitrogen and water content. The results were as follows. 1) The leaf 1 and leaf 2 were not affected by the species, nitrogen, and water treatment, in terms of the chlorophyll fluorescence quenching, indicating the more significantly different fluorescence intensities. The unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) cluster analysis was conducted to produce the four levels of differentiation with the leaf position as the dominant factor. The clustering of ZD 958 was less heterogeneous than XY 335 and JD 20 under different environmental factors. There were no outstanding clustering characteristics for the nitrogen and water content. 2) In the vertical distribution of key chlorophyll fluorescence parameters, the parameter F_v/F_m indicated that there was a significant increase in the maximum photosynthetic light energy conversion efficiency of senescent, normal, and neonatal leaves in sequence. There was no variation in the feature within the leaves. The parameter $\Delta F/F_m'$ indicated that the high morphological positions were greatly contributed to the actual light energy conversion efficiency of the two leaves. The parameter qL_{Lss} indicated that the photoreactive electron transfer activity increased in the three steps with the increase of vertical height. The parameter NPQ_{Lss} indicated that the less variable non-photochemical energy dissipation was found in the normal leaves, but the significant increase in the senescent leaves. 3) A high fitting characteristics with the quadratic function were found in the vertical distribution of the maximal PS II efficiency (F_v/F_m) at the different ambient nitrogen levels. The heterogeneity of the vertical distribution increased, as the ambient nitrogen level decreased. A high fitting characteristics with the primary function were also found in the vertical distribution of the steady-state light-adapted quenching (qL_{Lss}) at the different varieties. The heterogeneity of the vertical distribution was ranked in the order of the ZD 958 > XY 335 > JD 20. Among them, the ZD 958 was more resistant to the stress. A comparison was made on the Support Vector Machines (SVM), Random Forest (RF), and Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA). The maximal PS II efficiency (F_v/F_m) of ZD 958, the samples under the trace ambient nitrogen content, and the steady-state non-photochemical quenching (NPQ_{Lss}) of samples under the drought environment were detected with 0.82, 0.94, and 0.88 accuracy, respectively. There was much more significant pattern of vertical distribution compared to other treatments and fluorescence parameters. 4) The plant leaves were numbered from the bottom to the top in the “key leaf” analysis of leaf photosynthetic heterogeneity. The “key leaf” was then selected as the second leaf, second leaf and first leaf for the identification of maize varieties, the environmental nitrogen, and water content assessment in the discriminant analysis of varieties, water, and nitrogen content treatment, respectively.

Keywords: chlorophyll fluorescence; photosynthesis; maize; vertical distribution