

引用:徐柏洋,全晓艳. 原位荧光探针技术在作物逆境中的应用进展[J]. 聊城大学学报(自然科学版),2026,39(4):583-590.

Citation: XU Boyang, QUAN Xiaoyan. Progress in the application of in situ fluorescence probe technology in crop adversity[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition), 2026,39(4): 583-590.

文章编号 1672-6634(2026)04-0583-08

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2025090006

原位荧光探针技术在作物逆境中的应用进展

徐柏洋,全晓艳

(济南大学 生物科学与技术学院,山东 济南 250022)

摘要 以非侵入性方式在细胞尺度上研究作物逆境行为对于了解作物对非生物胁迫的应激反应和逆境调控的分子机制至关重要。荧光探针技术因其高灵敏度、独特的时空分辨率、实时原位成像和非侵入性等优势而被广泛应用于作物逆境标志性物质的原位成像。在本篇综述中,详细描述了原位荧光探针在作物逆境/胁迫研究的应用进展。最后,展望了荧光探针在该领域中的发展趋势。

关键词 作物逆境;荧光探针;逆境标志物质;非生物胁迫;浓度水平

中图分类号 Q946

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Progress in the application of in situ fluorescence probe technology in crop adversity

XU Boyang, QUAN Xiaoyan

(School of Biological Science and Technology, University of Jinan, Jinan 250022, China)

Abstract Studying crop stress behavior at the cellular scale in a non-invasive manner is crucial for understanding the molecular mechanisms of crop stress responses and adversity regulation to abiotic stress. Fluorescent probe technology is widely used for in situ imaging of characteristic substances in crop stress due to its high sensitivity, unique spatiotemporal resolution, real-time imaging, and non-invasive advantages. This review outlines the application progress of in situ fluorescent probes in crop stress/stress research in detail. Finally, the development trends of fluorescent probes in this field are anticipated.

Keywords crop stress; fluorescent probe; adversity marks substance; abiotic stress; concentration level

0 引言

作物在生长发育过程中会不断受到周围不利环境的刺激和影响,这些不利于作物生长发育的环境因素统称为逆境或胁迫^[1]。病原体感染和食草动物攻击等不利环境因素称为生物胁迫;干旱、炎热、寒冷、营养缺乏和土壤中过量的盐或有毒金属等不利环境条件称为非生物胁迫。相比较而言,非生物胁迫是限制作物分布、改变作物生长发育、降低作物产量的主要环境因素^[2-3]。在非生物逆境的条件下,作物体内包括活性氧(如:过氧化氢 H_2O_2 、一氧化氮 NO 、单线态氧 1O_2 等)、活性硫(如二氧化硫 SO_2 、硫化氢 H_2S 等)以及特征酶(如 4-羟基苯基丙酮酸双加氧酶,4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPPD 等)等逆境标志性物质的浓度水平会发生相应变化^[4]。通过检测这些物质的浓度变化,可以反映出作物所受的胁迫状况。因此,利用

收稿日期:2025-09-18

基金项目:国家自然科学基金青年项目(31901437);山东省自然科学基金项目(ZR2023MC114)资助

通信作者:全晓艳,女,汉族,博士,讲师,研究方向:作物逆境分子生理与调控,E-mail:bio_quanxy@ujn.edu.cn。

标志性物质的浓度水平变化进行作物逆境分子生物学研究,可以快速了解非生物胁迫对作物的损伤程度。

在生物学研究过程中,许多逆境标志物浓度水平的检测需要在对作物无损伤的情况下实现^[5]。以非侵入性方式在细胞尺度上研究作物在逆境中相关标志物的浓度变化,对于了解作物对非生物胁迫的应激反应和逆境调控的分子机制至关重要。前期,微电极离子流技术扫描离子选择性电极技术、和自参比离子选择性电极技术等非损伤性检测技术在作物逆境研究中已有应用,但这些技术对于极低浓度的小分子物质的检测灵敏度较低^[6]。研究表明,相关小分子浓度水平与分布是深入研究作物对非生物胁迫的应激反应和逆境调控的分子机制的关键。幸运的是,原位荧光检测技术因其高灵敏度、独特的时空分辨率、实时原位成像和非侵入性等优势已广泛应用于作物逆境研究中^[7-9],因此,本文主要描述原位荧光检测技术在作物逆境研究中的应用进展。

1 原位荧光探针技术在检测 H_2O_2 方面的应用进展

作为固着生物,作物暴露于不利环境时会依赖于信号分子来交流、传递信息并引发应激反应^[10-11]。 H_2O_2 作为一种活性氧(reactive oxygen species, ROS)参与氧化损伤、细胞信号转导和防御反应等多种生理过程。研究表明, H_2O_2 的积累是作物对胁迫反应的标志^[12-14]。作物细胞中 H_2O_2 浓度水平通常会在生成和消除之间呈现动态平衡。然而当作物处在逆境中,其 H_2O_2 浓度水平作为应激反应的信号分子会出现浓度升高的现象;当应激反应消失时, H_2O_2 浓度水平会下降,重新构建新的动态平衡。因此, H_2O_2 浓度水平的变化在一定程度上可以反应作物的健康状况。但是 H_2O_2 浓度水平的动态变化通常处于低浓度水平,常规的检测方法难以准确检测这种浓度变化。现如今已有多数研究证实利用荧光探针检测可以很好的解决此类问题。

Li 等基于苯硼酸频哪醇酯构建了一个分子内电荷转移型近红外 H_2O_2 有机小分子荧光探针 DRP-B^[15]。探针 DRP-B 对 H_2O_2 表现出了较高的选择性和灵敏度($\text{LOD} = 0.12 \mu\text{mol/L}$),且能够对 $0.2 \sim 42 \mu\text{mol/L}$ 浓度范围内的 H_2O_2 进行准确定量分析。探针 DRP-B 不仅能够分析细胞 HeLa 中基底和内生性 H_2O_2 ,还能够测定作物根系中的外源性 H_2O_2 。鉴于作物在生长发育过程中持续受到包括高盐、高/低温、金属暴露、洪水和干旱等各种非生物胁迫,作者运用探针 DRP-B 研究了作物在不同逆境中的氧化应激反应。研究表明,卷心菜根系分别暴露在 $50 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$ 、 $100 \mu\text{mol/L Al}^{3+}$ 、 $50 \mu\text{mol/L Hg}^{2+}$ 和 $100 \mu\text{mol/L Cu}^{2+}$ 的等重金属胁迫的环境中时,随着暴露时间的延长,共聚焦显微成像原位分析显示卷心菜根系中的 H_2O_2 浓度水平逐渐升高,这一结果表明重金属胁迫诱导卷心菜氧化应激,进而导致其 H_2O_2 浓度水平的升高。除此之外,作者还借助探针 DRP-B 研究了洪涝和干旱胁迫条件下 H_2O_2 浓度水平的变化。探针 DRP-B 为评估非生物胁迫下作物的氧化应激风险提供了一种新的方法,并有望为开发新的抗氧化防御策略以提高作物抗性和作物产量提供指导。

针对作物原位氧化应激监测中可见光和近红外一区(NIR-I)易受作物内生性色素干扰的问题^[16], Wu 等围绕分子内电荷转移(intramolecular charge transfer, ICT)机制,相继设计并构建了多种具有优异光谱性能的近红外二区(NIR-II) H_2O_2 荧光探针^[16]。其中,以二苯胺修饰的咕吨基团为电子供体、双(亚甲基丙二腈)茚为电子受体,分别构建了可激活型有机小分子荧光探针 CT-XA- H_2O_2 和纳米荧光探针 IXD-B@DSPE-PEG2000^[17]。荧光探针 CT-XA- H_2O_2 在更长的发射波长 1036 nm 处对 H_2O_2 表现出灵敏选择性识别,有效降低了背景信号,为作物原位高分辨成像奠定了基础;而纳米荧光探针 IXD-B@DSPE-PEG2000 显著提升了探针在水相体系中的稳定性和生物相容性,为其在作物体系中的长期、原位成像应用奠定了基础。重金属离子或高浓度盐污染会诱导作物芽内发生氧化应激反应,并显著促进其活性氧(如 H_2O_2)的积累^[18]。目前,作物芽中的 H_2O_2 已成为生物标志物来监测作物芽的氧化应激反应^[19]。荧光探针 CT-XA- H_2O_2 在检测重金属 Cd^{2+} 和高浓度盐(NaCl)胁迫下大豆芽和花生芽中 H_2O_2 的浓度水平变化时,具有良好的分辨性。该探针在检测重金属离子污染(Cd^{2+})或高盐诱导作物芽中氧化应激产生的内生性生物标志物 H_2O_2 方面有广阔的应用前景。作者为了建立长期暴露于 Cd^{2+} 诱导的氧化应激模型,通过纳米探针 IXD-B@DSPE-PEG2000 对绿豆和秋葵在不同浓度的 Cd^{2+} 中发芽时的 H_2O_2 浓度水平进行监测。结果表明,纳米探

针能够原位高分辨灵敏示踪 Cd^{2+} 诱导绿豆芽和秋葵芽氧化应激造成的 H_2O_2 浓度水平的变化。此外,其监测结果还可作为水/土壤中镉离子污染的预警。该纳米探针可作为一种通过 NIR-II 荧光成像监测可食用作物氧化应激的实用工具。总体而言,该系列探针通过“NIR-II 光学窗口+ ICT 分子设计+可激活型响应机制+纳米化策略”的协同创新,有效突破了作物原位荧光成像中长期存在的色素干扰和成像深度受限问题,为作物氧化应激的高分辨动态监测提供了新的技术路径。

You 等基于聚集诱导荧光发射 (aggregation-induced emission, AIE) 策略^[20-22],成功设计合成了一系列绿色荧光探针^[23]。将对 H_2O_2 敏感的三烷基胺与四苯乙烯骨架结合,通过荧光来跟踪体内的 H_2O_2 。当作物受到机械损伤、高盐、强光和干旱等多种胁迫时, H_2O_2 浓度会产生明显变化,这为作物健康状况提供了有价值的信息。在各种非生物胁迫的反应中,将这种 H_2O_2 探针简单注射到幼苗叶片中后,在市售紫外线的照射下,作物体内 H_2O_2 浓度波动的显著荧光变化是肉眼可见的。这种方法在没有熟练操作和专业设备的帮助下也很容易进行,为监测作物健康状况提供了一种简单的方法。

Zhou 等基于双氰基吡喃酮作为比色荧光信号团,苯硼酸作为识别受体,成功构建了一例水溶性超灵敏 H_2O_2 近红外荧光探针^[24]。该探针具有高的选择性和灵敏度(检出限 26.4 nmol/L),能够快速识别 H_2O_2 ,便于 H_2O_2 的原位实时示踪分析。此外,它还具有 181 nm 的斯托克斯位移,便于准确生物成像分析应用。利用新构建的近红外荧光探针,可视化证实了重金属 Cd^{2+} 胁迫下水稻根系中 H_2O_2 浓度水平的升高,这一结果表明该探针为作物中原位检测 H_2O_2 浓度水平提供了一种新型可视化工具。

2 原位荧光探针技术在检测 SO_2 方面的应用进展

硫是作物的第四大必需元素,它在作物的生长发育以及对胁迫的抵抗中发挥着重要作用^[25]。二氧化硫 (SO_2) 已被公认为作物中硫营养物质的重要来源^[26]。 SO_2 被叶片吸收同化后,立即与作物细胞中的水反应,生成亚硫酸氢盐 (HSO_3^-) 和亚硫酸盐 (SO_3^{2-}),再进一步还原为硫化物,然后转化为各种有机硫营养素的重要前体半胱氨酸 (cysteine, Cys)^[27-30]。 SO_2 浓度高于 12.2 ppm 时,会导致作物生长缓慢、光合作用抑制、植株产量下降、黄化甚至死亡^[31-32]。因此,开发能够高效准确检测 SO_2 浓度变化的工具,对于预防作物 SO_2 中毒具有重要作用。目前,相关研究已经有了初步进展。

Wang 等构建了一种新型近红外比率荧光探针 Q-1。与传统探针相比,该探针对 SO_2 表现出了较高的选择性和灵敏度,能够用于作物线粒体内 SO_2 衍生物的灵敏选择性原位成像分析^[33]。诸葛菜 (*Orychophragmus violaceus*) 对 SO_2 等大气污染胁迫具有较高的敏感性,易诱导氧化应激反应,在环境胁迫与生态毒理学研究中具有重要应用价值^[33]。以诸葛菜作为研究对象,在正常生长条件下共聚焦荧光显微成像系统下观察诸葛菜叶片组织没有荧光信号。但是经不同浓度 SO_2 衍生物 HSO_3^- 处理后,诸葛菜叶片均由绿变黄,且随着浓度的升高,黄化度越高。通过探针 Q-1 的原位荧光成像检测,进一步明确了诸葛菜线粒体中 SO_2 衍生物的浓度水平与其对作物毒害程度密切相关。因此,可利用探针 Q-1 检测 SO_2 的浓度变化,预防 SO_2 对作物产生的毒性。

由于缺乏有效的监测工具,目前对作物内源性 SO_2 的产生机制及其在作物响应非生物胁迫中的生理作用知之甚少。因此,开发监测作物内源性 SO_2 的方法对于揭示 SO_2 在作物生长、发育和对环境胁迫反应中的响应机制至关重要^[7]。针对这一问题, Ji 等设计合成了一种分子内电荷转移型 SO_2 比率荧光探针^[34]。该探针对 SO_2 表现出了高的选择性和灵敏度以及快速响应等优异光谱特性。研究人员先后利用洋葱表皮细胞和烟草幼苗的根系评价了探针对外源性和内源性 SO_2 的成像能力。随后,利用该探针观察到了 Cd^{2+} 胁迫下 SO_2 浓度水平升高的现象,这可能是因为 Cd^{2+} 胁迫会增加作物的氧化应激水平,为了抵消高浓度的 ROS,作物可能通过还原硫醇化合物(如 Cys)进一步参与抗氧化过程,并导致内源性信号分子 SO_2 的产生。这为研究作物中不同胁迫途径的相互联系以及胁迫反应的分子机制提供了新的理论基础。同时,相关结果对制定提高镉污染环境中作物抗逆性和食品安全的策略具有重要意义。

3 原位荧光探针技术在检测 HPPD 方面的应用进展

研究表明,高温和 Cd^{2+} 胁迫下的拟南芥出现了 4-羟基苯基丙酮酸双加氧酶 (HPPD) 的过表达现象^[35]。

HPPD 是一种广泛存在于作物中的功能酶,可以催化氧和 4-羟基苯基丙酮酸盐(4-hydroxyphenylpyruvate, HPP)合成代谢产物 2,5-二羧苯乙酸(homogentisic acid, HGA)^[36]。产生的 HGA 对抗氧化化合物生育酚的生物合成至关重要^[37]。尽管 HPPD 涉及非生物胁迫的机制尚不明确,但 HPPD 表达的上调可以减轻非生物胁迫对作物中的影响^[38]。

针对传统探针在 HPPD 检测中存在的背景干扰大、信噪比低等问题,荧光探针通过红移发射波长等光学优化策略,结合分子印迹修饰技术,在作物活体模型中实现了 HPPD 浓度的实时原位成像,检测精度可达亚细胞级别。这有利于评估作物的胁迫程度,还有助于探索作物胁迫抗性机制,提高作物在非生物胁迫下的抗逆性。目前,研究人员已对构建荧光探针对 HPPD 浓度水平进行动态检测进行了初步探索。例如, Yang 等采用喹草酮作为 HPPD 识别基团,构建了一例新型荧光增强型探针^[39]。通过“聚集-解聚”的 HPPD 响应探针传感机制:探针在聚集状态下呈现荧光淬灭,而在加入 HPPD 后,其识别基团与 HPPD 发生特异性相互作用,导致聚集体解离并触发明亮荧光信号。该研究证实此探针对拟南芥 HPPD 有良好监测能力,并实现了对高温和 Cd^{2+} 胁迫下拟南芥 HPPD 水平的动态监测。这项工作为获得无创 HPPD 荧光探针提供了一种有效的设计策略,该探针可以有效评估作物的胁迫程度,并可进一步用于探索作物的胁迫抗性机制。

4 原位荧光探针技术在检测 NO 方面的应用进展

一氧化氮(Nitric oxide, NO)在作物中的产生通常发生在叶绿体、线粒体和质膜中,它可以充当分子信使,在调节作物生长、增强营养吸收和作物免疫反应等的各种生理过程中起着重要作用^[40]。在环境胁迫条件下,作物会通过提高 NO 含量等响应方式,触发各种作物抗病和抗逆性机制的能力。NO 被证实是介导激素调控、与活性氧相互作用以及调节基因表达和蛋白质活性的关键成分,它可以直接或间接地与多种靶点互作,导致蛋白质功能的调节和基因表达的重编程^[40]。因此,通过作物体内 NO 的浓度变化可以快速了解作物生长状态以及抗逆情况。基于此,开发一款可以快速高效准确地检测 NO 的方法意义重大。目前,检测 NO 主要有电子顺磁共振(EPR)、基因编码荧光传感器、格林试剂法等方法。这些检测方法存在着易受干扰、特异性差、操作步骤复杂测量仪器成本高、等局限性。相比之下,荧光技术具有易于操作、高灵敏度和高特异性等特点。

基于荧光探针的各项优点, Sahoo 等以脘作为识别受体,成功构建了一例用于 NO 直接分析检测用的增强型荧光分子探针^[40]。利用该探针观察硝酸钠(NO 来源)处理后的鹰嘴豆幼苗,发现实验组幼苗的茎的维管束和根的木质部组织中表现出更强的蓝色荧光,表明 NO 浓度水平的升高。相比较而言,未经处理的幼苗的根和茎部分没有观察到明显的荧光信号,表明 NO 浓度水平较低。结合处理过的树苗的生长速度比对照组快得多的结果,进一步证实 NO 可以促作物生长。该探针实现了作物细胞内内源性 NO 浓度水平变化的原位示踪,为进一步阐明作物中 NO 的产生过程和具体作用机制提供了新的原位可视化成像方法。

5 原位荧光探针技术在检测 $^1\text{O}_2$ 方面的应用进展

单线态氧($^1\text{O}_2$)可以作为作物中的信号分子,引发程序性细胞死亡(PCD)反应的激活、吞噬和修复机制。 $^1\text{O}_2$ 被认为是作物中固有的活性氧(ROS),可以通过叶绿体中的呼吸作用和光合作用等多种途径产生,它在作物的各种生物或非生物胁迫中起着至关重要的作用^[41]。例如,当作物遭受创伤时, $^1\text{O}_2$ 在受伤部位周围释放,并加速愈合过程;如果作物细胞受到胁迫诱导,也会产生大量的 $^1\text{O}_2$,这对细胞功能和代谢有害,并可能导致细胞损伤甚至作物死亡。由于作物中的 $^1\text{O}_2$ 水平与作物的逆境适应密切相关,可以通过其浓度变化快速判断作物在逆境中的状态。因此,原位荧光探针这种能够快速精准地原位可视化分析 $^1\text{O}_2$ 浓度变化的方法对于监测作物逆境响应具有重要意义。

在作物叶片中,光合作用过程中三重态激发的叶绿素可以产生 $^1\text{O}_2$ ^[41]。作物叶片中过量表达的 $^1\text{O}_2$ 经常通过氧化作物细胞中的脂质和蛋白质等成分来诱导细胞损伤。为了研究光照射诱导的作物叶片中产生 $^1\text{O}_2$ 的现象, Long 等采用 2,3-二苯基咪唑作为识别受体,成功构建了两例高选择性比率型 $^1\text{O}_2$ 荧光探针(SX-1 和 SX-2)^[41]。探针 SX-2 不仅具有高的选择性和灵敏度,还在识别 $^1\text{O}_2$ 后表现出了 115 nm 的红移,便

于准确的比率定量分析 $^1\text{O}_2$ 。因此,利用探针 SX-2 对代表性作物落葵(*Basella rubra*)叶片中的 $^1\text{O}_2$ 浓度水平进行原位成像,实现了光照胁迫下落葵叶片中 $^1\text{O}_2$ 的可视化准确定量分析。

6 原位荧光探针技术在检测 Cys 方面的应用进展

半胱氨酸(Cys)是蛋白质的重要组成部分,与甲硫氨酸(Met)、谷胱甘肽(GSH)、维生素、辅因子和硫化物等重要化合物的生物合成有关^[42]。它在调节细胞氧化应激、信号转导和肝细胞保护方面发挥着重要作用,维持生物体的正常生物活动^[42-43]。在作物中,多种胁迫诱导都可以通过形成 ROS 引起机体氧化损伤,这一过程可能会导致 Cys 积累及代谢紊乱。因此研究作物中重金属胁迫下 Cys 浓度水平的变化具有重要意义。

已有研究通过近红外荧光母核连接到识别基团-硫代苯甲酸酯部分来检测 Cys,但该方法主要用于细胞和动物的成像研究。Fu 等采用硫代碳酸酯作为识别受体成功构建了一例高选择性超灵敏 Cys 近红外荧光探针^[42]。该探针最大发射波长在 720 nm,便于作物原位成像分析应用,还能够准确定量检测 0~20 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cys,检出限为 74 nmol/L。该探针能够实现对 Cys 的快速(15 min)选择性识别,有利于作物中 Cys 的原位实时成像分析。此外,该探针首次原位示踪了重金属(Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cd^{2+})胁迫下 Cys 浓度水平的升高变化。该探针有望用于作物中 Cys 在逆境环境下的具体生物功能研究。

Wang 等基于苯硫醚成功构建了一例比率型近红外 Cys 荧光探针,两个发射波长几乎没有重叠,为高分辨率比率成像奠定了良好基础^[43]。该探针能够实现对 Cys 的快速(18 min)、高选择和灵敏测定。利用该探针成功实现了不同重金属(Hg^{2+} 、 Cd^{2+})胁迫下 Cys 浓度水平升高的比率成像分析。该探针为深入探究 Cys 在重金属胁迫下的分子作用机制提供了新的成像手段。

7 原位荧光探针技术在检测 H_2S 方面的应用进展

硫化氢(H_2S)作为一种重要的气体传递物质,对多种作物生理和病理过程具有非常重要的调节作用^[44]。 H_2S 作为作物生长发育的多功能气体调节剂,在其发芽、根器官发生、细胞衰老和自噬等生命周期的许多方面发挥着不可替代的作用。此外,在作物中遭受干旱、盐、高温和 Al^{3+} 等重金属引起的非生物胁迫下, H_2S 会内源性过量产生以对抗胁迫。例如,用 H_2S 供体 NaHS 处理可以显著减少水稻叶片中超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(H_2O_2)的积累,从而减轻铝离子(Al^{3+})胁迫的损伤,改善干旱胁迫下水稻种子的发芽^[44-55]。因此, H_2S 作为作物抵抗多种环境胁迫的信号分子,其内源性含量的多少可用于评估作物受各类非生物胁迫程度。而开发一种能够原位灵敏检测低浓度范围的内源性 H_2S 浓度变化的方法,可实现对胁迫水平的快速评估。

Chen 等采用分子内质子转移机制,成功构建了一例近红外 H_2S 荧光探针^[44]。该探针的最大发射波长在 650 nm,在 50 min 内对 H_2S 表现了高的选择性和灵敏度(定量范围:0~90 $\mu\text{mol/L}$,检出限:0.21 $\mu\text{mol/L}$)。目前,已利用红外 H_2S 荧光探针实现了水稻根系中 H_2S 浓度水平的原位成像分析,为后续其他作物 H_2S 浓度的检测提供了有效工具。Fu 等采用苯并噻唑盐半花菁染料,开发了一例新的近红外 H_2S 荧光探针^[45]。该探针的最大发射波长在 720 nm,更利于作物中 H_2S 的原位成像分析。该探针具有相对较快的响应速度(20 min 内),能够对 0~140 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2S 进行准确定量分析,检出限为 0.104 $\mu\text{mol/L}$ 。利用新构建的近红外荧光探针成功实现了盐和干旱胁迫下水稻根系中 H_2S 的浓度水平变化。

上述已开发的 H_2S 荧光探针仍存在问题,如检测时需要高水平的有机溶剂、抗干扰性差、发射波长较短和使用不便^[46]。针对这些挑战,Wu 等采用 2,4-二硝基苯醚作为识别受体,咪唑盐半花菁染料作为信号功能团,成功构建了一例高选择超灵敏 H_2S 近红外荧光探针^[46]。该探针能够对 0~20 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2S 进行准确定量分析,检出限为 0.75 $\mu\text{mol/L}$ 。邻位醛基的引入加速了其响应速度,便于作物中原位实时可视化分析。新构建的近红外荧光探针能够灵敏原位可视化分析 Al^{3+} 胁迫下作物中 H_2S 浓度水平的变化。该探针为深入研究重金属胁迫下 H_2S 的具体生物功能提供了新的分析手段。

此外,Wang 等基于 2,4-二硝基苯醚成功构建了一例具有较大 Stokes 位移的近红外硫化氢荧光探

针^[47]。该探针能够高选择性灵敏检测 H₂S(检出限 27 nmol/L),且最大发射波长达到了 670 nm,便于活体深层成像分析。该探针实现了拟南芥根系中盐(氯化钠)胁迫下,H₂S 浓度水平升高的原位可视化成像分析。该探针有望为深入研究作物中盐胁迫下 H₂S 的分子作用机制提供新的原位成像技术。

表 1 不同类型荧光探针在生物活性小分子检测中的应用与特点

Tab. 1 Applications and characteristics of different types of fluorescent probes in the detection of bioactive small molecules

探针类别 / 设计策略	主要检测物质	代表性技术特点	关键优势与应用价值
分子内电荷转移(ICT)型近红外有机小分子探针	H ₂ O ₂	通过 ICT 机制放大信号变化	可同时检测内源和外源 H ₂ O ₂ ,灵敏度高,适用于氧化应激研究
可激活型 NIR-II 有机小分子探针	H ₂ O ₂	反应前荧光“关闭”,反应后信号显著增强	显著降低背景信号,提高选择性和检测灵敏度,适合复杂生物体系
NIR-II 纳米荧光探针(PEG 修饰)	H ₂ O ₂	纳米化与表面修饰提高水溶性与稳定性	水相和生物体系中稳定性与生物相容性显著提升,适于原位成像
可见光/绿色荧光探针	H ₂ O ₂	操作流程简化,对仪器要求低	操作便捷成本低,适合快速筛查和常规检测
水溶性超灵敏近红外探针	H ₂ O ₂	增强水溶性与信噪比	可将 H ₂ O ₂ 浓度变化直观可视化,提高定量分析能力
比率型近红外荧光探针	SO ₂	双通道比率信号输出	高选择性和高灵敏度,抗环境干扰能力强
ICT 型 SO ₂ 比率探针	SO ₂	快速反应与优异光谱响应	实现 SO ₂ 的快速、准确检测
荧光增强型探针	HPPD	目标分子触发荧光增强	提高 HPPD 识别信号,增强检测可靠性
高选择性增强型探针	NO	专一性识别反应位点	对 NO 具有高选择性和特异性,适合信号分子研究
高选择性比率型探针	¹ O ₂	比率成像与可视化分析	高特异性识别 ¹ O ₂ ,可实时成像氧化应激
超灵敏近红外探针	Cys	反应型识别机制	实现 Cys 的原位示踪与可视化,灵敏度高
比率型近红外探针	Cys	双信号通道输出	可进行高分辨率比率成像,提高定量准确性
近红外荧光探针	H ₂ S	高亲和识别基团设计	对 H ₂ S 具有高选择性和高灵敏度
快速响应型近红外探针	H ₂ S	反应动力学优化	响应速度快(~20 min),适于动态监测
高选择超灵敏近红外探针	H ₂ S	低检测限与高信噪比	可检测极低浓度 H ₂ S,并实现浓度变化可视化
深层成像型近红外探针	H ₂ S	NIR 波段组织穿透能力强	支持活体深层成像分析,拓展生物医学和环境应用

8 结论与展望

荧光探针技术凭借非侵入性、高时空分辨率和实时动态成像等优势,广泛应用于作物逆境标志物的浓度检测。其中,荧光探针的原位检测技术在深入研究作物逆境响应及其响应机制方面起着重要作用,对我们进一步了解作物的生命活动过程,进而帮助作物更好的适应外界不断变化的环境具有重要意义。为了在细胞水平上系统研究不同类型非生物胁迫下作物逆境行为,研究者们开发了一系列用于 H₂O₂、SO₂、HPPD、NO、¹O₂、Cys 和 H₂S 等相关逆境标志物检测的荧光探针,成功实现了重金属、高盐等胁迫下作物氧化应激过程中产生的这些物质的原位可视化(表 1)。这些技术为揭示逆境标志物的动态调控规律、阐明胁迫信号通路互作机制提供了重要工具。

尽管目前相关荧光探针技术取得了较大进展,但由于多数高性能荧光探针具有较强的疏水性,其在水相体系中易发生聚集并导致荧光淬灭,从而限制了其在原位生物成像中的应用。除此之外合成复杂、色素感染干扰和泛用性不高等诸多问题。我们认为将来应该在以下几方面进一步开展相关研究。(1) 积极开发用于作物逆境行为中其他相关分子检测的有机小分子荧光探针,这样更利于作物逆境行为的深入研究;(2) 构建灵敏度高、结构简单且便于可视化分析的有机小分子荧光探针,构建智能响应探针,结合刺激响应材料(如金属有机框架、纳米载体),发展环境因子(pH、温度)触发型探针,实现胁迫微环境的精准感知。这样便于推广应用于实时掌握作物生长的健康状况;(3) 针对作物体内固有色素自发荧光和组织散射的影响,同时兼顾探针水溶性、稳定性与成像性等问题。NIR-II(1 000~1 700 nm)荧光探针未来可通过分子结构优化并结合滤光等成像策略,实现复杂田间环境下逆境标志物的高信噪比、深层可视化成像;(4) 鉴于不同胁迫途径的相互联系,采取多靶标联用探针,设计合成多元分析型荧光探针,开发可同步监测多种逆境标志物的多元探针,

对于探究胁迫信号网络的交叉调控机制至关重要;(5) 开发便携式成像设备与探针联用系统。针对设备成本高、体积大及复杂田间环境干扰等瓶颈,通过结合滤光技术、小型化成像模块、无线数据传输及智能图像分析等技术手段,构建低成本、高稳定性的便携式探针-成像联用系统。推动荧光探针技术从实验室向田间应用的转化,向田间适配性技术集成,助力作物抗逆表型高通量筛选。

通过跨学科融合与技术创新,荧光探针技术有望在作物抗逆机制解析、逆境预警及精准育种中发挥更大作用,为全球粮食安全保障提供技术支撑。

参 考 文 献

- [1] 吴鹏. 白菜类作物逆境相关基因的进化模式及低温春化下的 LncRNA 分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- [2] HIPSCH M, LAMPL N, ZELINGER E, et al. Sensing stress responses in potato with whole-plant redox imaging[J]. *Plant Physiology*, 2021,187(2): 618-631.
- [3] LEW T T S, KOMAN V B, SILMORE K S, et al. Real-time detection of wound-induced H₂O₂ signalling waves in plants with optical nanosensors[J]. *Nature Plant*, 2020, 6(4):404-415.
- [4] ZHANG H M, ZHU J H, GONG Z Z, et al. Abiotic stress responses in plants[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2022, 23(2):104-119.
- [5] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. *Cell*, 2016, 167(2):313-324.
- [6] 刘科,张丙林,张文英,等. 非损伤离子流检测技术在作物逆境研究中的应用[J]. *应用生态学报*, 2018, 29(2):678-686.
- [7] YANG X P, ZHANG Q Q, ZHANG S Y, et al. Molecule fluorescent probes for sensing and imaging analytes in plants: developments and challenges[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2023,487:215154.
- [8] CHEN Y L, HE B, HU M X, et al. Fluorescent probes for imaging and detection of plant hormones and their receptors[J]. *Advanced Agrochem*, 2024, 3(1):83-98.
- [9] ZHAO Y Y, MAN Y, WEN J L, et al. Advances in imaging plant cell walls[J]. *Trends in Plant Science*, 2019, 24(9):867-878.
- [10] XIAO Y, LI X, CUI Y Q, et al. Hydrogen peroxide inhibits proliferation and endothelial differentiation of bone marrow stem cells partially via reactive oxygen species generation[J]. *Life Sciences*, 2014,112(1/2): 33-40.
- [11] VEAL E, DAY A. Hydrogen peroxide as a signaling molecule[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011,15(1): 147-151.
- [12] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species; metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004,55: 373-399.
- [13] CHOUDHURY F K, RIVERO R M, BLUMWALD E, et al. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination[J]. *The Plant Journal*, 2017,90(5): 856-867.
- [14] FICHMAN Y, MILLER G, MITTLER R. Whole-plant live imaging of reactive oxygen species[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(9):1203-1210.
- [15] ZHAO K C, XIE R H, ZHOU Z L, et al. A turn-on NIR fluorescent probe for risk-assessing oxidative stress in cabbage roots under abiotic stress[J]. *Talanta*, 2023, 258:124402.
- [16] LONG Y, CHEN J J, ZENG F, et al. An activatable NIR-II fluorescent probe for tracking heavy-metal ion and high-level salt-induced oxidative stress in plant sprouts[J]. *Aggregate*, 2023, 4(2):e288.
- [17] ZENG C, LONG Y, TAN Y Y, et al. Water-dispersible activatable nanoprobe for detecting cadmium-ion-induced oxidative stress in edible crops via near-infrared second-window fluorescence imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(40):14021-14028.
- [18] CASTRO B, CITTERICO M, KIMURA S, et al. Stress-induced reactive oxygen species compartmentalization, perception and signalling[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(4):403-412.
- [19] WANG N, FAN X, HE M Y, et al. Transcriptional repression of TaNOX10 by TaWRKY19 compromises ROS generation and enhances wheat susceptibility to stripe rust[J]. *The Plant Cell*, 2022,34(5): 1784-1803.
- [20] HU R R, LEUNG N L C, TANG B Z. AIE macromolecules: syntheses, structures and functionalities[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(13):4494-4562.
- [21] HUANG X L, ZHANG R Y, CHEN C, et al. Wash-free detection and bioimaging by AIEgens[J]. *Materials Chemistry Frontiers*, 2021, 5(2):723-743.
- [22] LI J, WANG J X, LI H X, et al. Supramolecular materials based on AIE luminogens (AIEgens): construction and applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2020, 49(4):1144-1172.
- [23] YIN Y, WANG G Z, LIU Y K, et al. Simple phenotypic sensor for visibly tracking H₂O₂ fluctuation to detect plant health status[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(32): 10058-10064.
- [24] ZHOU Y Q, LIU T, LIN P X, et al. Fluorescence probes evaluated the hydrogen peroxide level in rice roots under cadmium ion stress[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2023, 303:123178.

- [25] KOPRIVA S, MALAGOLI M, TAKAHASHI H. Sulfur nutrition: impacts on plant development, metabolism, and stress responses [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(16): 4069-4073.
- [26] BRYCHKOVA G, YARMOLINSKY D, FLUHR R, et al. The determination of sulfite levels and its oxidation in plant leaves[J]. *Plant Science*, 2012, 190:123-130.
- [27] LEE H K, KHAINE I, KWAK M J, et al. The relationship between SO₂ exposure and plant physiology: a mini review[J]. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 2017, 58(6):523-529.
- [28] LI N, WANG Z, ZHANG Z C. Influence of plant structure and flow path interactions on the plant purification system: dynamic evolution of the SO₂ pollution[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(35):35099-35108.
- [29] KOMARNISKY L A, CHRISTOPHERSON R J, BASU T K. Sulfur: its clinical and toxicologic aspects[J]. *Nutrition*, 2003, 19(1): 54-61.
- [30] CAPE J N, FOWLER D, DAVISON A. Ecological effects of sulfur dioxide, fluorides, and minor air pollutants: recent trends and research needs[J]. *Environment International*, 2003, 29(2/3): 201-211.
- [31] VAN DER KOOIJ T A W, DE KOK L J, HANEKLAUS S, et al. Uptake and metabolism of sulphur dioxide by *Arabidopsis thaliana* [J]. *The New Phytologist*, 1997, 135(1): 101-107.
- [32] COTROZZI L. Leaf demography and growth analysis to assess the impact of air pollution on plants: a case study on alfalfa exposed to a gradient of sulphur dioxide concentrations[J]. *Atmospheric Pollution Research*, 2020, 11(1):186-192.
- [33] CHEN X, CHEN Q, HE D, et al. Mitochondria targeted and immobilized ratiometric NIR fluorescent probe for investigating SO₂ phytotoxicity in plant mitochondria[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 370: 132433.
- [34] ZHANG S Y, LAI M, GAO Z T, et al. An ICT-based ratiometric fluorescent probe for tracking and imaging SO₂ during Cd-induced stress in plants[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 395:134499.
- [35] COLLIN V C, EYMERY F, GENTY B, et al. Vitamin E is essential for the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to metal-induced oxidative stress[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2008, 31(2): 244-257.
- [36] WANG X N, LIN H Y, LIU J J, et al. The structure of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase complexed with 4-hydroxyphenylpyruvic acid reveals an unexpected inhibition mechanism[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2021, 32(6):1920-1924.
- [37] ZHANG C Y, CAHOON R E, HUNTER S C, et al. Genetic and biochemical basis for alternative routes of tocotrienol biosynthesis for enhanced vitamin E antioxidant production[J]. *The Plant Journal*, 2013, 73(4): 628-639.
- [38] REN W W, ZHAO L X, ZHANG L D, et al. Molecular cloning and characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene from *Lactuca sativa*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(10):1076-1083.
- [39] ZENG X Y, HUANG Y R, DONG J, et al. Design of an HPPD fluorescent probe and visualization of plant responses to abiotic stress [J]. *Advanced Agrochem*, 2022, 1(1):73-84.
- [40] GHOSH P, SAHA S, MUKHERJEE S, et al. Direct fluorescence labelling of NO inside plant cells[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2023, 21(46): 9270-9274.
- [41] YANG S X, LIU W G, SHENTU J, et al. On-site quantitative visualization of singlet oxygen in crops via an organic small molecule-based ratiometric fluorescent probe and a mobile fluorescence analysis device[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(22): 9192-9199.
- [42] LIN Y M, WANG X Y, LIU X Y, et al. Near-infrared fluorescent probe to track Cys in plant roots under heavy metal hazards and its application in cells and zebrafish[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2024, 320:124601.
- [43] LIU C Y, LIN Y F, CHEN Z X, et al. Novel colorimetric and near-infrared ratiometric fluorescent probe for sensing cysteine in food samples, plants, and living cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(42): 23580-23591.
- [44] WANG J, XIE H, LI H Y, et al. NIR fluorescent probe for in situ bioimaging of endogenous H₂S in rice roots under Al³⁺ and flooding stresses[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(47):14330-14339.
- [45] LIN Y M, HE Q, WANG X Y, et al. Near-infrared fluorescent probe for imaging upregulated hydrogen sulfide levels in rice under salt and drought stress[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(13):5154-5161.
- [46] LIANG K L, LI Y, ZENG F, et al. A near-infrared fluorescent probe for detection of H₂S and its application in monitoring meat freshness and plant growth under aluminium-induced stress[J]. *New Journal of Chemistry*, 2023, 47(5):2643-2650.
- [47] GONG S, GU Y, TIAN J X, et al. A near-infrared fluorescent probe with a large stokes shift for detecting hydrogen sulfide in environmental waters, wine samples, and living systems[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(8): 4594-4604.

(责任编辑:刘庆松)