

文章编号: 1005-0906(2007)04-0093-03

浸提法测定玉米叶绿素含量的改进

明 华^{1,2}, 胡春胜¹, 张玉铭¹, 程一松¹

(1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心, 石家庄 050021; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 以玉米叶片为试材, 研究了 8 种不同有机溶剂浸提液提取叶绿素的效率及低温冷冻对叶绿素提取的影响。试验中采用叶绿素仪先预叶片; 冷冻—高温快速浸提试验, 采用先称取样品, 后冷冻方式。结果表明: 室温 (25℃) 下, 浸提法要优于研磨法, 混合液浸提叶绿素比单独用丙酮或乙醇浸提快, 其中丙酮: 乙醇 = 2:1 的浸提液浸提速度快而稳, 是试验中最佳的叶绿素提取方法。最佳浸提时间在浸提 16 h 时。叶片冷冻处理后, 快速浸提能够缩短叶绿素浸提时间。由于受光照、高温的影响, 测定值普遍较低。

关键词: 玉米; 叶绿素; 浸提; 有机溶剂**中图分类号:** S513**文献标识码:** A

Improved Extraction Methods of Chlorophyll from Maize

MING Hua^{1,2}, HU Chun-sheng¹, ZHANG Yu-ming¹, CHENG Yi-song¹

(1. Center for Agricultural Resources Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, CAS, Shijiazhuang 050021;

2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The extraction efficiencies of chlorophyll from maize leaves after frozen treatment were compared on eight determined methods using different organic solvents. We used SPAD-502 before sampling, weighed up the leaves before freezing. The result showed that soaking methods were better than Arnon method at 25℃. It was better to measure the efficiencies of chlorophyll using mixture solution than using acetone or ethanol lonely. We got the collusion that methods of acetone mixed with ethanol (2:1) was the best of all, and the best time at 16h after soaking. The methods of frozen treatment before soaking could advance the speed of chlorophyll, but the number decreased because of the light or high temperature.

Key words: Maize; Chlorophyll; Extraction; Organic solvents

对叶绿素的研究一直是人们极其关注的课题。叶绿素含量测定方法主要有分光光度法和活体叶绿素仪法两大类, 后来又发展了光声光谱法。但是, 用手持叶绿素仪或光谱分析仪测得的是色素相对含量指标, 并且不同种类植物叶片中的色素指标与实际叶绿素含量之间的关系方程式不同, 即不能用一种关系来转换不同植物的色素含量。在日常实验中普遍采用分光光度法, 用的较多的是 Arnon 法。Arnon 法需要把植物材料研磨, 经过过滤或离心, 在操

除渣、移液、定容、比色等过程, 工作量大, 提取时间作过程中误差较大, 且易受光氧化的破坏, 不适于对田间大量样品的测定和大量叶绿素的提取, 并且也不适合大批量样本的应急检测。

80 年代初张宪政提出了丙酮乙醇混合液浸提法, 证明利用混合液进行叶绿素浸提的可行性。进一步研究后发现, 混合液法比传统 Arnon 法提取叶绿素效率高, 稳定性好。洪法水等发现, 丙酮与乙醇在等浓度混合时提取效果最好。但也有研究者认为丙酮与乙醇 (2:1) 混合液浸提叶绿素效果较好。吴志旭、张雅燕对丙酮萃取分光光度法进行了改进, 提取时间由原来的 8 ~ 20 h 缩短为 1.5 ~ 2.5 h。

本试验在前人的基础上, 以常规的 Arnon 法作为对照, 对研磨法和混合液浸提法进行了研究, 探讨叶绿素含量测定方法的优劣及快速、大批量测定叶

收稿日期: 2007-01-04; **修回日期:** 2007-04-02**基金项目:** 中国科学院知识创新项目 (KSCXZ-YW-N-037)**作者简介:** 明 华 (1981-), 男, 在读硕士, 研究方向: 养分循环及其环境效应。Tel: 0311-85814769 13473776475

E-mail: minghua05@mails.gucas.ac.cn

绿素含量的步骤,为大田玉米大批量叶绿素含量测定提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料、仪器、试剂

玉米叶片;带有刻度的 50 mL 容量瓶;日本 SPAD-502 型叶绿素仪;上海第三分析仪器厂生产的 721 型分光光度计;丙酮、甲醇、乙醇都为分析纯,95%乙醇直接采购。

按体积比配制浸提液:80%丙酮;95%乙醇;丙酮:乙醇=1:1;丙酮:乙醇=2:1;丙酮:乙醇:水=4.5:4.5:1;丙酮:甲醇=1:1;丙酮:甲醇=2:1;丙酮:甲醇:水=4.5:4.5:1,分别用:A、B、C、D、E、F、G、H表示。

1.2 试验方法

2006年9月,在中科院栾城生态试验站试验田中取长至12~13片叶期玉米植株顶部展开叶,剪取叶片,洗净后弃除叶柄和中脉,然后用纱布或吸水纸将叶片表面的水分吸干。为了试验的精确度更高,我们在取样时仅取每片叶的中间部位,并用SPAD-502测定其叶绿素相对含量值,使其偏差保持在(-5,+5)之间,超出范围者弃掉。把挑选的叶片剪成小于2 mm碎条,混匀。分两份,一份在室温(25℃)下,立即用研磨法(80%丙酮,95%乙醇)和直接浸提法(8种提取液)提取叶绿素;另一份每次用千分之一天平精准称取(200 mg,称取24份;1 g,称取6份),分别装袋,密封好,储放到冰箱中备用。为增加不同测定方法之间可比性,样品在冷冻前称量分装好。

浸提法:分别于容量瓶中加入15 mL提取液,把叶片剪成宽度小于2 mm的细丝或小块,混匀,分别准确称取200 mg放入盛有提取液的容量瓶中,封口,置于黑暗条件下直接浸提。研磨法每个处理重复3次。

室温试验时,按8种提取液分8组,每组12个50 mL的容量瓶,分别按照上述方法加入叶片和各浸提液,并计时,在室温黑暗条件下直接浸提叶绿素,并不时摇动。分别于10 h、13 h、16 h和48 h时,每组各取出3个容量瓶,定容至50 mL后在645 nm和663 nm波长下测定吸光度值。

取出冷冻20 h的叶片按照如上方法和程序或研磨或浸提。每个处理3个重复,浸提在50℃水浴中进行,用肉眼观察叶组织完全变白,即说明浸提完全,取出冷却后定容,在645 nm和663 nm波长下测定吸光度值。

1.3 数据处理

研究证明,各参比浸提液的吸收光谱基本相似,即所有浸提液的叶绿素溶液的化学性质基本相同,叶绿素含量采用Arnon法的修正公式。用SPSS13.0统计软件及Microsoft Office Excel 2003处理数据。

2 结果与分析

2.1 室温条件下不同浸提液浸提效果及稳定性的比较

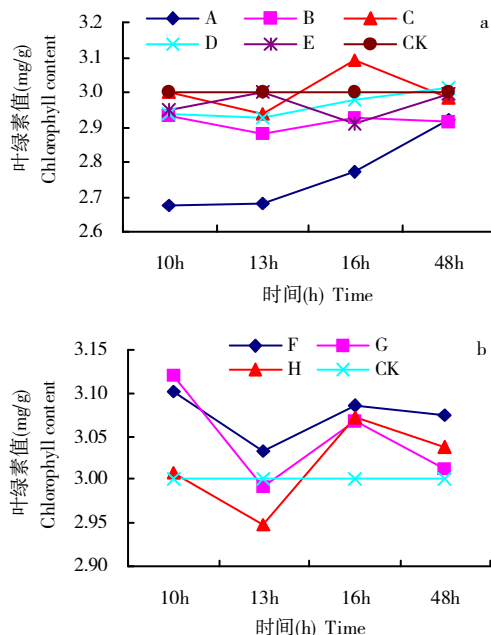


图1 室温下不同浸提液提取叶绿素的变化

Fig.1 Changes of chlorophyll content in leaves under different extraction methods

室温条件下,80%丙酮研磨的叶绿素值作为对照(CK)。从图1可明显看到:在室温情况下,用95%乙醇浸提效果优于80%丙酮,与李得孝等结论相反。单独用丙酮或者乙醇浸提液浸提,效果都不如混合浸提液效果好,普遍测定值偏低,这可能和丙酮与乙醇(甲醇)间存在协同萃取效应有关。含甲醇的混合浸提液叶绿素测定值较高,含乙醇的混合浸提液叶绿素测定值相对含甲醇的混合浸提液较低,但是含甲醇的混合浸提液叶绿素测定值不稳定,而含乙醇浸提液较稳定,不同时段之间变化率较小。

随着丙酮与乙(甲)醇混合浸提液中含水量的提高,叶绿素浸提液的稳定性下降。

2.2 最优浸提时间

用SPSS13.0进行统计分析,从两个主效应的F检验结果的P值看,均有 $P < 0.05$ (表1),由此得出浸提液种类和不同时间段对因变量叶绿素值在0.05水平上有显著性差异,即在同一时刻,不同浸提液浸

提叶绿素的效果明显不同;对同一种浸提液而言,在不同时刻浸提出的叶绿素量变化差异显著。

表 1 叶绿素含量的方差分析
Table 1 Variance analysis of chlorophyll content

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	Sig.
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	
处理	0.852	7	0.122	44.93	0.000
时间	0.043	3	0.014	5.28	0.002
误差	0.230	85	0.003		
总变异	1.125	95			

表 2 不同时刻浸提效果比较
Table 2 Extracting efficiency of cholorophyll by soaking method with different solvents on different time

处 理	时 间	均方差	Std. Error	Sig. ^a
Treatment	Time	Mean square		
10 h	13 h	0.024	0.015	0.109
	16 h	-0.023	0.015	0.125
	48 h	-0.029	0.015	0.056
13 h	10 h	-0.024	0.015	0.109
	16 h	-0.048*	0.015	0.002
	48 h	-0.053*	0.015	6E-04
16 h	10 h	0.023	0.015	0.125
	13 h	0.048*	0.015	0.002
	48 h	-0.006	0.015	0.697
48 h	10 h	0.029	0.015	0.056
	13 h	0.053*	0.015	6E-04
	16 h	0.006	0.015	0.697

注:* 表示 0.05 水平显著。
Note: * The mean difference is significant at the 0.05 level.

由表 2 可见,在室温条件下,玉米叶片经不同浸提液处理后,在 13 h 时浸提的叶绿素值与 16 h 及

48 h 的叶绿素值间有显著性差异,而 16 h 时的值与 48 h 的值间没有显著差异。说明在室温条件下,玉米叶片经浸提液浸提 16 h 后,时间上最优。

2.3 叶片冻融处理后叶绿素浸提效果比较

冷冻后用研磨法,80%丙酮总叶绿素测定值为 2.806 mg/g,95%乙醇为 2.829 mg/g,与室温条件下相比较低,可能是在冻融过程中,由于样品中水分散失,致使低温对叶片的组织结构造成一定的伤害,从而影响了叶绿素的浸出,故叶绿素测定值较低。

从浸提叶绿素所用时间上来看,冻融处理明显缩短叶绿素浸提时间,这可能是由于温度的聚变加速细胞膜的破裂,从而加速了叶绿素的浸提。从表 3 中可见,经过冻融处理后,浸提法效果不如研磨法(丙酮与乙或甲醇 2:1 除外),普遍比研磨法测得的叶绿素值低,这可能主要是由于在快速浸提过程中,浸提液受光、高温的影响,致使叶绿素分解的缘故。

与室温条件下的对照相比较,冻融处理后,所有浸提叶绿素浸提量都比对照(3.000 4 mg/g)低。这与李得孝等的研究略有差异,主要是由于他们在冷冻试验操作过程中先对叶片进行冷冻处理,后称取叶片浸泡处理。本试验中采取冷冻前先称量好各样品,分装好,密封后再冷冻处理,从而减少了冷冻前后称取样品时存在的误差,进而有利于增加不同测定方法间的可比性。从表 3 可见,丙酮与甲醇 2:1 浸提液浸提叶绿素效果相对较佳(比对照小 3.61%),其次为丙酮与乙醇 2:1(比对照小 5.07%)。但是由于甲醇对神经系统有麻醉作用,且易引起视网膜代谢障碍,所以在选用快速浸提试验时,最好选择丙酮与乙醇 2:1 配比的混合浸提液。

表 3 玉米叶片冷冻后快速浸提效果比较
Table 3 comparison of the effect of fast soaks methods with different frozen treatments

									mg/g 鲜重
处理	Treatment	A	B	C	D	E	F	G	H
冷冻后	Chla	1.598	1.67	1.775	1.7295	1.7337	1.7993	1.7685	1.6836
	Chlb	0.8272	0.8775	0.9321	1.1188	0.9336	0.9725	1.1237	0.8917
	Chla+b	2.4253	2.5475	2.7071	2.8483	2.6673	2.7719	2.8922	2.5753

3 结论与讨论

室温下,混合液浸提法要优于研磨法。浸提法中混合液提取叶绿素,比单独用丙酮或乙醇提取效果好,该结论与洪法水等、李得孝等的结论相似,这可能主要是由于丙酮与乙醇或甲醇间存在协萃作用。丙酮甲醇(水)混合浸提液比含乙醇的叶绿素提取量多,但其不稳定,故室温下丙酮与乙醇的混合浸提液

是较佳的选择。考虑试验误差、安全问题及经济效益,就本试验所用方法中丙酮与乙醇(2:1)效果最佳,且最优的浸提效果出现在 16 h 左右。

冷冻处理可以缩短叶绿素浸提时间,但测定值普遍较低,为此在应用中要尽可能避免在操作过程中光、高温的破坏。

参考文献:

(下转第 99 页)

(上接第 95 页)

- [1] C. И. 列别捷夫著. 杨汉金, 卫新中译. 植物生理学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1991.
- [2] Filella I, Serrano L, Serra J, et al. Evaluating wheat nitrogen status with canopy reflectance indices and discriminant analysis[J]. Crop Sci., 1995, 35: 1400-1405.
- [3] Moran J A, Mitchell A K, Goodmanson G, et al. Differentiation among effects of nitrogen fertilization treatments on conifer seedlings by foliar reflectance: a comparison of methods[J]. Tree Physiol, 2000, 20: 1113-1120.
- [4] 彭运生, 刘恩. 关于提取叶绿素方法的比较研究[J]. 北京农业大学学报, 1992, 18(3): 47-250.
- [5] 苏正淑, 张宪政. 几种测定植物叶绿素含量的方法比较[J]. 植物生理学通讯, 1989, 5: 77-78.
- [6] 陈秉初, 方健文, 杜浩. 光光谱法测定植物叶片中的叶绿素含量[J]. 植物生理学通讯, 1993, 4: 276-278.
- [7] 卢东昱, 崔新图, 黄镜荣, 等. 叶绿素吸收光谱的观测[J]. 大学物理, 2006, 25(1): 50-53.
- [8] 彭涛, 李鹏民, 贾裕娇, 等. 介绍两种无损伤测定植物活体叶片色素含量的方法[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(1): 83-86.
- [9] 钟爱国. 原子吸收光谱法间接测定绿茶叶中叶绿素总量[J]. 理化检验—化学分册, 2005, 41: 892-893.
- [10] 唐尧基, 基文玮, 陈莹, 等. 同步荧光法测定海水中叶绿素 a 的含量[J]. 分析仪器, 2004, 3: 24-26.

- [11] 杨振德. 分光光度法测定叶绿素含量的探讨[J]. 广西农业大学学报, 1996, 15(2): 145-150.
- [12] Hiscox J D, Israelstam G F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without Maceration[J]. Can J Bot, 1979, 57: 1332-1334.
- [13] 张宪政. 植物叶绿素含量的测定—丙酮乙醇混合法[J]. 辽宁农业科学, 1986, 3: 26-28.
- [14] 陈福明, 陈顺伟. 混合液法测定叶绿素含量的研究[J]. 林业科技通讯, 1984, 2: 4-8.
- [15] 沈伟其. 测定水稻叶片叶绿素含量的混合液提取法[J]. 植物生理学通讯, 1988, 3: 62-64.
- [16] 洪法水, 魏正贵, 赵贵文. 菠菜叶绿素的浸提和协同萃取反应[J]. 应用化学, 2001, 18(7): 532-535.
- [17] 刘霞霞, 董振生, 刘创社, 等. 油菜叶绿素提取方法研究[J]. 中国农学通报, 2004, 20(4): 62-63.
- [18] 吴志旭, 张雅燕. 叶绿素 a 测定方法的改进及最优提取时间探讨[J]. 甘肃环境研究与检测, 2003, 16(2): 150-152.
- [19] 侯光良等译, [(日)加藤荣等编]. 光合作用研究方法[M]. 北京: 能源出版社, 1985.
- [20] 李得孝, 郭月霞, 员海燕, 等. 玉米叶绿素含量测定方法研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(6): 153-155.
- [21] 李得孝, 员海燕, 郭月霞, 等. 混合液浸提法测定玉米叶绿素含量的研究[J]. 玉米科学, 2006, 14(1): 117-119.

(责任编辑: 李万良)