

叶绿素含量测定的简化

舒展, 张晓素, 陈娟, 陈根云, 许大全*

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032

摘要: 本文介绍一种避免称重、研磨、冲洗和过滤等繁琐步骤, 仅将确定面积的叶片细丝用少量80%丙酮浸泡提取后便可比色计算的简便的测定叶绿素含量的方法。此法省时间、省溶剂, 不受叶片含水量变化的干扰, 适合于大批量叶片样品的测定, 而且便于与以单位叶面积表示的光合速率联系起来分析实验结果。同时, 指出一些可能影响测定结果的因素。

关键词: 叶绿素含量; 叶绿素a/b; 叶片鲜重; 叶面积

The Simplification of Chlorophyll Content Measurement

SHU Zhan, ZHANG Xiao-Su, CHEN Juan, CHEN Gen-Yun, XU Da-Quan*

Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: A simple method of chlorophyll content measurement is introduced in the present paper. Namely, leaf filaments with known area are soaked in 80% (V/V) acetone until color of the filaments changed from green to white, and then the supernatant of extract is taken for light absorption measurement. This method elides some time-consuming steps such as determining of leaf fresh weight, grinding, washing, filtering and so on. It not only can save time and solvent, and avoid interference by changes in leaf water content, but also is more convenient to measurement of large amount samples, and analysis of measurement results with photosynthetic rate on the basis of leaf area. Moreover, some factors that may influence the result of chlorophyll content measurement are pointed out.

Key words: chlorophyll content; chlorophyll a/b; leaf fresh weight; leaf area

叶绿素含量是反映植物特别是光合机构生理状况的一个基本指标, 植物生理研究中经常涉及叶绿素含量的测定。但如何测定叶绿素含量, 迄今尚未见到一篇简便方法的介绍。不少研究论文和实验教材(中国科学院上海植物生理研究所和上海市植物生理学会 1999; 侯福林 2004; 藤利荣和孟庆繁 2008; 李玲 1999, 2009)中提到或介绍的测定方法一般都包括叶片称重、研磨、冲洗、过滤和定容(25 mL或更多)及稀释等繁琐步骤, 既费时间, 又费溶剂, 不适于科学研究中大批量样品的测定, 特别是以叶片鲜重表示的叶绿素含量, 不仅容易受叶片含水量变化的干扰, 给测定结果带来偏差, 而且也不便于同以单位叶面积表示的光合速率联系起来分析两者的关系。

针对叶绿素含量测定中比较普遍存在的问题(许大全 2009), 我们感到很有必要把自己多年来使用(例如, 许大全和薛德林 1985; Xu 等 1993; Chen 等 2005; Chen 和 Xu 2006)的简便方法介绍出来, 以供参考。

材料与方法

1 植物材料

除特别指出的以外, 本文报告的叶绿素测定结果全部来自田间生长的菠菜(*Spinacia oleracea* L.) 叶片。小麦(*Triticum aestivum* L.) 不同叶位叶片来自中国科学院山东禹城试验站小麦田(灌浆期)。

文内数据资料用 Sigmaplot 9.0 进行差异显著水平分析。

2 基本步骤

(1) 取样: 用知道确切面积的模板或打孔器切取 1 cm² 左右叶片(注意避开比较粗大的叶脉), 切成长约 5 mm、宽约 1 mm 的细丝。

(2) 浸提: 将叶片细丝投入含 5 mL 80% 丙酮的刻度试管中, 封管口后于暗中提取至细丝完全变为白色为止(过夜即可)。如果中间轻轻摇晃试管几

收稿 2009-12-22 修定 2010-01-22

资助 国家重点基础研究发展规划项目(2005cb121106)。

* 通讯作者(E-mail: dqxu@sippe.ac.cn; Tel: 021-54924231)。

次, 则可以缩短提取时间。

(3) 比色: 为弥补可能由于溶剂挥发带来的损失, 可用 80% 丙酮将上述提取液重新定容至 5 mL, 然后将管内溶液轻轻倒入比色杯中, 按照 Arnon (1949) 方法用光波长分辨率较高的分光光度计(本文用 UV-120 型分光光度计, 日本 Shimadzu 公司制造)分别于 663 nm 和 645 nm 处读光密度(OD)。

(4) 计算: 首先按 Arnon (1949) 的公式计算提取液的叶绿素浓度($C_V, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。Chl a = $12.7 \text{ OD}_{663} - 2.69 \text{ OD}_{645}$; Chl b = $22.9 \text{ OD}_{645} - 4.86 \text{ OD}_{663}$; $C_V = \text{Chl a} + \text{Chl b}$ 。然后, 按下式计算以单位叶面积表示的叶绿素含量($\text{mg}\cdot\text{dm}^{-2}$): $C_A = C_V / 1000 \times 5 \times 100 / S = 0.5 C_V / S$ 。这里, C_A 和 C_V 的下标 A 和 V 分别代表面积和体积, S 为用于提取叶绿素的叶片面积(cm^2)。

结果与讨论

用不少实验教材中介绍的研磨过滤方法提取叶绿素, 不仅费时间, 从称重到定容结束, 1 个样品至少需要 10 min, 而且由于不可避免的损失, 所得到的结果一般会低一些; 而用本文中的叶丝浸提法, 不算浸提的等待时间, 从取样、切细到投入 80% 丙酮浸提的操作时间一般不超过 1~2 min, 而且可以避免过滤造成的损失(图 1)。从用两种方法测定的结果可以看到, 用叶丝浸提法得到的叶绿素提取液可以直接用于比色测定光密度, 不需要过滤或离心(图 2)。虽然在用叶片细丝的浸提液中含有少量

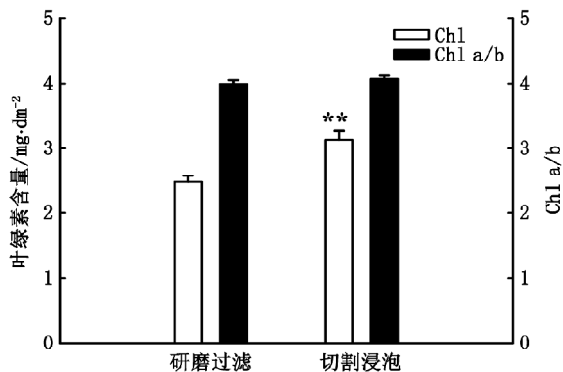


图 1 用不同提取方法(切割浸泡与研磨过滤)获得的测定结果的比较

Fig.1 A comparison of measurement results obtained by different extraction methods (cutting and soaking; grinding and filtering)

** : 不同提取方法的叶绿素含量差异极显著。

浸出物的杂质, 但由于其对比色波长的光没有明显的吸收, 所以测定的结果受到的影响并不明显。

众所周知, 由于自然条件下光强、气温和土壤水分状况及叶片蒸腾作用的变化, 叶片的含水量在一天内的不同时刻会明显不同, 特别是在遭遇干旱或水分胁迫处理时, 处理和对照叶片的含水量会明显不同。在这种情况下, 以单位叶片鲜重表示叶绿素含量会造成导致错误结论的假象。图 3 结果清楚地说明了这个问题: 虽然以单位叶面积表示的叶绿素含量是一样的, 可是在以单位叶片鲜重表示时, 那些含水量高的叶片叶绿素含量明显降低。

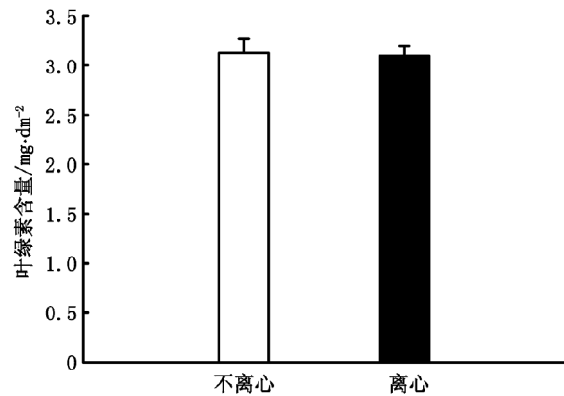


图 2 叶绿素提取液离心对测定结果的影响
Fig.2 The effect of centrifugation of chlorophyll extraction solution on measurement results

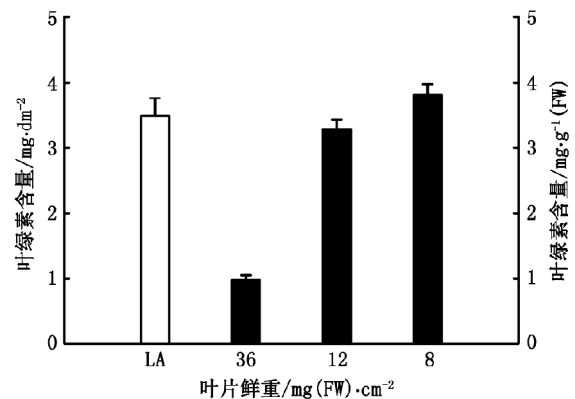


图 3 以单位叶片鲜重表示的叶绿素含量随着叶片含水量变化

Fig.3 Change in chlorophyll contents expressed in unit leaf fresh weight with leaf water contents

LA: 以单位叶面积计算的叶绿素含量; FW: 以单位叶片鲜重计算的叶绿素含量; 36 mg (FW)·cm⁻²: 对照, 未经干燥处理的叶片; 12 mg (FW)·cm⁻²: 30 °C 烘箱中干燥处理约 40 min; 8 mg (FW)·cm⁻²: 30 °C 烘箱中干燥处理约 80 min。

研究表明, 叶绿素a/b比值的高低与用于比色的叶绿素提取液浓度有密切的关系: 叶绿素提取液浓度在 $3.5\sim 6.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间, 这个比值变化不大; 但是在这个范围之外, 比值随提取液浓度的增大而降低, 随提取液浓度的降低而增高(图4)。本实验中按切割浸泡法操作($1\ \text{cm}^2$ 叶片, $5\ \text{mL}$ 提取液)叶绿素提取液浓度基本在上述合适范围之内; 但按研磨过滤法($0.5\ \text{g}$ 叶片, $25\ \text{mL}$ 提取液), 其叶绿素提取液浓度约为 $17.9\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。如果不进行稀释直接测定, 会导致测得的叶绿素a/b明显偏低。因此, 在测定叶绿素a/b比值时需要注意这个问题, 提取液浓度过高或过低都会导致不可靠的结果。

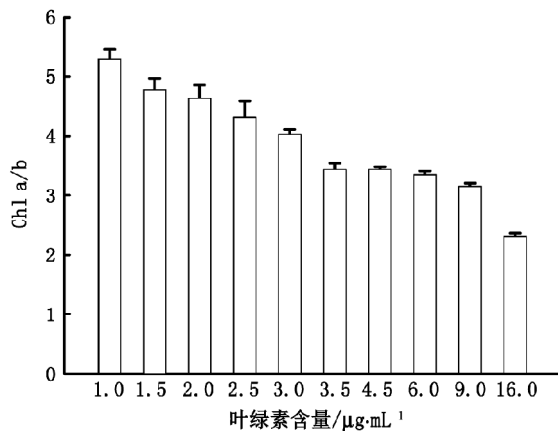


图4 叶绿素a/b比值随叶绿素提取液浓度的变化

Fig.4 Change in chlorophyll a/b ratio with the concentration of chlorophyll extraction solution

从图5可以看出, 在测定叶绿素提取液的光密度时, 即使所用光的波长的微小变化, 比如比标准波长(663 和 $645\ \text{nm}$)短 $3\ \text{nm}$ (660 和 $642\ \text{nm}$)或长 $2\ \text{nm}$ (665 和 $647\ \text{nm}$), 也会导致测定的叶绿素含量与a/b比值的较大变化。因此, 在比色测定时应当尽量选用对测定光波长分辨率高的分光光度计。

另外, 在测定叶片的叶绿素含量时, 特别是在比较作物不同品种或不同处理之间的叶绿素含量时, 取材叶片的代表性、均一性很重要, 不仅不同叶位(图6)、不同叶龄或植物不同生育期(许大全和薛德林 1985)的叶片之间, 而且同一较大叶片的不同部位之间, 都有明显的差别。因此, 叶片取材环节不能粗心。否则, 测定的差别也许不是不同品

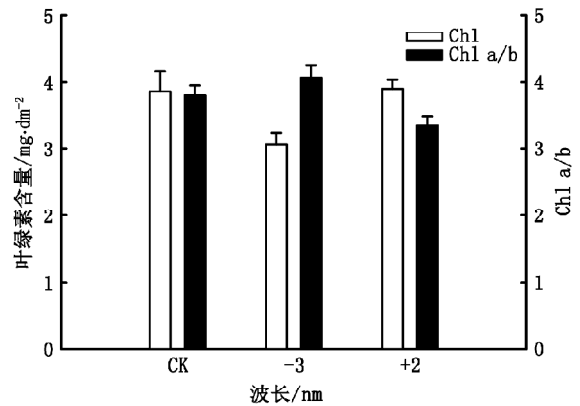


图5 比色光波长变化对叶绿素含量与a/b比值的影响
Fig.5 Effects of changes in light wavelength used in light absorption measurements on the obtained chlorophyll content and Chl a/b ratio

CK: 标准波长(663 和 $645\ \text{nm}$); -3: 波长前移 $3\ \text{nm}$ (660 和 $642\ \text{nm}$); +2: 波长后移 $2\ \text{nm}$ (665 和 $647\ \text{nm}$)。

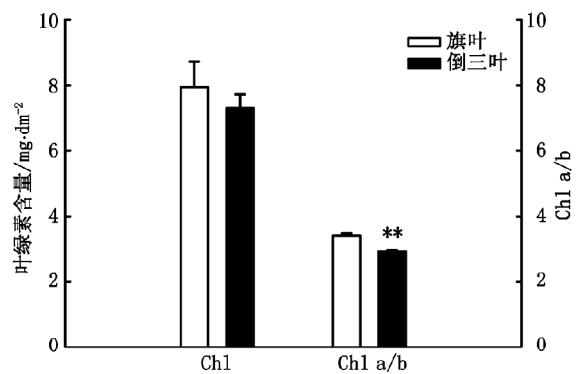


图6 小麦不同叶位叶片叶绿素含量与a/b比值的差异
Fig.6 Differences in chlorophyll content and Chl a/b ratio in different leaf position in wheat

用中国科学院禹城试验站灌浆期小麦测定。**: 旗叶和倒三叶的Chl a/b差异极显著。

种或不同处理之间的差异, 而是取样不当的结果。

总之, 叶绿素含量测定虽然是植物生理特别是光合作用研究中一个最基本、最简单的测定, 但是其中需要注意的问题却不少, 诸如取材叶片的叶位、叶龄, 分光光度计的分辨率和用于比色的叶绿素提取液浓度等。这里介绍的叶绿素含量测定方法的主要优点, 是步骤简单, 操作方便, 省略称重、研磨、冲洗、离心或过滤等步骤, 节省时间和溶剂, 便于大批量样品的测定, 不仅不受叶片含水量变化的干扰, 而且所得结果便于用于分析叶绿素含量与光合速率的关系。

参考文献

- 侯福林主编(2004). 植物生理学模块实验指导. 北京: 科学出版社, 57~58
- 李玲主编(1999). 植物生理学实验教程. 北京: 科学出版社, 37~38
- 李玲主编(2009). 植物生理学模块实验指导. 北京: 科学出版社, 35~38
- 滕利荣, 孟庆繁主编(2008). 生物学基础实验教程(第三版). 北京: 科学出版社, 22
- 许大全(2009). 叶绿素含量的测定及其应用中的几个问题. 植物生理学通讯, 45 (9): 896~898
- 许大全, 薛德林(1985). 大豆叶片的一些光合特性. 植物生理学通讯, (6): 34~37
- 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会编(1999). 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 95
- Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 24: 1~15
- Chen Y, Xu D-Q (2006). Two patterns of leaf photosynthetic responses to irradiance transition from saturating to limiting one in some plant species. *New Phytol*, 169: 789~798
- Chen G-Y, Yong Z-H, Liao Y, Zhang D-Y, Chen Y, Zhang H-B, Chen J, Zhu J-G, Xu D-Q (2005). Photosynthetic acclimation in rice leaves to free-air CO₂ enrichment related to both ribulose-1,5-bisphosphate carboxylation limitation and ribulose-1,5-bisphosphate regeneration limitation. *Plant Cell Physiol*, 46: 1036~1045
- Xu D-Q, Chen X-M, Zhang L-X, Wang R-F, Hesketh JD (1993). Leaf photosynthesis and chlorophyll fluorescence in a chlorophyll-deficient soybean mutant. *Photosynthetica*, 29: 103~112