

技术与方法 Techniques and Methods

叶绿素含量的测定及其应用中的几个问题

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

Several Problems in Measurement and Application of Chlorophyll Content

XU Da-Quan*

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

提要: 本文讨论了叶绿素含量测定及应用中比较普遍存在的几个问题, 指出按叶片鲜重计量叶绿素含量的弊端和按叶面积计量的好处。

关键词: 叶绿素含量; 光合速率; 叶片鲜重; 叶面积

叶绿素是绿色植物体内的基本色素, 在光合作用的光能吸收、传递和转化中起不可或缺的作用。因此, 在植物生理学特别是光合作用研究中, 经常涉及叶绿素含量的测定。虽然这只是相关研究中一个最基本、最简单的测定, 但其中需要注意的问题却不少。从大量已经发表的文章和未发表的文稿中发现, 这些问题相当普遍, 很有必要提出来讨论, 以便引起有关测定者的注意。

1 按叶片鲜重计量叶绿素含量

除了藻类细胞和针叶植物以外, 在文献中常见的叶绿素含量单位有两种: 一是以单位叶面积表示的, 二是以单位叶片鲜重表示的。比较起来, 还是以单位叶面积表示的较为合理、适用, 因为它不受叶片含水量变化的干扰, 而且也便于与以单位叶面积表示的光合速率联系起来分析两者关系。以单位叶片鲜重表示的叶绿素含量尤其不适用于不同生长光强、不同供水条件下生长的植物材料。在以单位叶面积表示的叶绿素含量相同时, 如果以单位叶片鲜重表示, 含水量高的叶片叶绿素含量值会低于那些含水量低的叶片。在水分胁迫条件下, 这种偏差尤其大。遗憾的是, 许多人没有意识到这个问题, 总是通过称鲜重取样提取和测定叶绿素含量。也许他们以为这样做简便。其实, 准确称量一定重量的叶片绝对不比取一定面积的叶片来得快。

同样道理, 叶片内其他物质例如淀粉、氨基酸和蛋白质等的含量也以单位面积表示为好。如果以单位叶片鲜重表示, 不仅会受叶片含水量不同

的干扰, 而且会缩小该物质含量变化的幅度, 因为计算时分母(叶片鲜重)内包含该物质的重量。以单位叶片干重表示, 虽然避免了叶片含水量变化的干扰, 可是在其他组分含量不变的情况下也因为计算时分母(叶片干重)内包含该物质重量而缩小该物质含量变化的幅度。

2 提取步骤繁琐

不少实验教材(例如, 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; 滕利荣和孟庆繁 2008; 李玲 1999, 2009)介绍的方法都包括叶片称重、研磨、冲洗、过滤和定容及稀释等繁琐步骤。定容的体积至少 10 mL, 既费时间, 又浪费溶剂, 也不适于科学研究中大批量样品的测定。

其实, 用确知面积的模板或打孔器切取 1 cm² 左右叶片, 切成细丝(大约 5 mm × 1 mm)后投入含 5 mL 80% 丙酮的试管中(避光、密封)过夜, 即可完全提取(叶片细丝变成白色), 从而避免上述那些繁琐步骤。

当然, 如果希望大大缩短提取时间, 也可以用小型的试管匀浆器研磨总面积为 1 cm² 的叶片细丝。不过, 这样就要增加研磨、冲洗和离心(用滤

收稿 2009-07-27 修定 2009-08-24

资助 国家重点基础研究发展计划项目(2005CB121106)。

致谢 沈允钢老师和陈根云博士及其研究组内同事、研究生关于本文的批评、建议和讨论。

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

纸过滤会损失一些色素, 导致偏低的测定结果, 因此最好以离心代替过滤)等步骤。

3 结果远离正常范围

除了氮肥缺乏、缺少叶绿素的突变体、患失绿症或叶片衰老等特殊情况下, 绝大多数叶片的叶绿素含量都在 $4\sim 6 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-2}$ 或 $400\sim 600 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ 的范围内(Berry和Downton 1982; 许大全和薛德林1985; Chen等 2005)。如果测定结果远离这个范围, 就要核查是否在测定或计算中出现了错误。

健康而尚未衰老的阳生植物叶片的叶绿素a/b 比值通常为3左右, 阴生植物叶片的该比值会低一些, 而缺乏叶绿素b的突变体的该比值可能会大于10(Xu等 1993)。最近有人报告, 10种树木叶片的叶绿素a/b 比值在1.6~2.3之间(任芳菲等 2009), 明显偏低。与此相类似的是, 对钾利用能力不同的2个基因型水稻在钾缺乏和正常供钾条件下叶片的叶绿素a/b 比都为0.5左右(Jia等 2008), 太低, 不可信。可能是分光光度计精度不够, 或者测定或计算方法有问题。所以, 在对样品的叶绿素提取液进行比色测定时, 应该选用对测定光波长分辨率高的分光光度计, 这对于叶绿素a/b 比值的测定至为重要。另外, 用于比色测定的叶绿素提取液的浓度过高, 也会导致叶绿素a/b 比值的明显降低(陈根云等, 未发表资料)。

在这里还需顺便指出, 有人报告水曲柳和樟子松的表观光合量子效率分别高达0.83和0.26(任芳菲等 2009), 是理论值0.125(许大全 2007)的几倍, 令人难以置信。除非改写人们早已熟知的光合作用机制, 否则光合效率不可能那么高。看来, 如果缺乏必要的基础知识, 就不会知道所测结果是否正确, 也难以对结果作出恰当的分析。

4 在叶绿素含量不同的情况下仍按单位叶绿素计量光合活性和仍按等量叶绿素确定样品用量

在细胞、原生质体、叶绿体及类囊体等的光合功能研究中, 常常用单位叶绿素或单位时间的氧释放量表示光合活性; 在通过电泳分析有关蛋白的种类与数量变化时, 也常常用叶绿素计量上样量。在一般情况下, 这样做无可非议。但是, 如果在相互比较的样品中涉及叶绿素含量的变化, 例如涉及叶绿素含量明显降低的突变体或涉及因某种(或某些)处理引起叶绿素含量减少的情况, 这样做就会造成叶绿素含量少的样品光合活性高于叶绿素含量高

的样品的假象; 若按等量叶绿素上样, 会掩盖叶绿素含量少的突变体某些蛋白含量比野生型少的真相, 甚至造成比野生型多的假象。在这种情况下, 用来自同样叶面积的样品上样是合理的选择(Chen和Xu 2006)。当然, 藻类细胞和松类植物的针叶例外, 需要另想合适的方法。

5 片面理解叶绿素含量与光合速率的关系

有些人根据叶绿素是光合作用必不可少的色素的常识, 想当然地认为叶片光合速率与叶绿素含量总是呈正相关, 于是作出叶绿素含量高(或低)导致高(或低)光合速率或叶绿素含量高时光合速率就高的结论。其实, 仅仅在弱光下, 光合速率会随叶绿素含量的增加而增高, 存在良好的线性关系, 而在饱和光下光合速率往往与叶绿素含量的多少无关。例如, 在有限光下, 叶绿素含量仅为野生型三分之一左右的水稻黄绿叶突变体叶片的光合速率明显低于其野生型, 而在饱和光下, 两者的光合速率一样(Chen和Xu 2006)。这是因为过量的光可以补偿叶绿素不足对光合作用的不利影响。另外, 在饱和光下, 那些叶绿素含量低的阳生叶片光合速率往往明显高于叶绿素含量高的阴生叶片, 这是因为阳生叶片单位面积内光合机构的关键组分反应中心、电子传递体和碳同化酶等含量高(Anderson等 1988)的缘故。

6 文献引用不当

绝大多数叶绿素含量测定所依据的都是Arnon(1949)的方法。虽然后来陆陆续续有了一些改进, 但是基本原理和步骤还是大同小异的。因此在引用文献时大多数人还是引用Arnon的那篇文章, 以示对他创造性劳动的承认与尊重。可是, 有不少初学者不是引用该方法的创造者或重要改进者及其原始研究论文, 而是引用一些教科书的编写者及有关介绍或者一些现成的测定叶绿素方法的沿用者及其研究论文。这样做有失公平, 因为后者对叶绿素含量测定方法没有实质性的贡献。

参考文献

- 侯福林(2004). 植物生理学模块实验指导. 北京: 科学出版社, 57~58
李玲(1999). 植物生理学实验教程. 北京: 科学出版社, 37~38
李玲(2009). 植物生理学模块实验指导. 北京: 科学出版社, 35~38
任芳菲, 孙广玉, 胡彦波, 樊传辉, 蔡淑燕(2009). 几种树木的树皮中绿色组织的光合特性初探. 植物生理学通讯, 45 (3): 249~252

- 滕利荣, 孟庆繁(2008). 生物学基础实验教程(第三版), 北京: 科学出版社, 22
- 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
- 许大全(2007). 光合作用效率及其调节. 见: 陈晓亚和汤章城主编. 植物生理与分子生物学(第三版). 北京: 高等教育出版社, 206~222
- 中国科学院上海植物生理研究所和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
- Anderson JM, Chow WS, Goodchild DJ (1988). Thylakoid membrane organization in sun/shade acclimation. *Aust J Plant Physiol*, 15: 11~26
- Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 24: 1~15
- Berry JA, Downton WJS (1982). Environmental regulation of photosynthesis. In: Govindjee (ed). *Photosynthesis, Vol II: Development, Carbon Metabolism, and Plant Productivity*. New York: Academic Press, 263~343
- 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
- Chen Y, Xu D-Q (2006). Two patterns of leaf photosynthetic response to irradiance transition from saturating to limiting one in some plant species. *New Phytol*, 169: 789~798
- Jia Y-B, Yang X-E, Islam E, Feng Y (2008). Effects of potassium deficiency on chloroplast ultrastructure and chlorophyll fluorescence in inefficient and efficient genotype of rice. *J Plant Nutr*, 31: 2105~2118
- 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

编者附言

在许大全先生的这一篇文章中谈到的许多问题(其中不乏常识性问题), 虽然是针对叶绿素含量测定而言, 但与此相类似的问题或多或少地在其他的植物生理和生化指标的测定、计算、表示和相关问题研究中普遍存在。常见问题如下: 除叶绿素之外的其他物质含量和酶活性用鲜重而不是以干重或酶蛋白量为单位进行计算; 光照强度不是用量子辐照($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)而是用勒克斯(Lux)表示; 比较不同光质光的生理效应只注意光的波长(nm)不同或光的颜色不同而不考虑不同光质光之间的生理辐射能是否一样或相近, 等等。多年来, 我们在审定稿件过程中曾一再向投稿人指出(对此, 我们在征稿简约中还特地增订了一些有关这一方面要求的条文), 但始终未得到一些投稿人的重视。为此, 借刊出许大全先生的这篇文章之机会, 特此指出, 希望大家本着严肃、严谨和严格的精神重视这些问题。