

玉米光合色素含量快速测定

白宝璋 朱广发 陈颖 董贵华 白崧

(吉林农业大学农学系, 长春 130118)

Rapid Assay of Photosynthetic Pigment Content in Corn Leaves

Bai Baozhang Zhu Guangfa Chen Ying Dong Guihua Bai Song

(Agronomy Department, Jilin Agricultural University, Changchun, 130118)

Abstract: Photosynthetic pigment content in leaf is an important index in plant researches of photosynthetic physiology and ecology. The aim of this article is to introduce: (1) a method of rapid assay of photosynthetic pigment content in corn; (2) the computing formulae of the contents of chl. a, chl. b and carotenoid in leaf.

Key Words: Corn; Photosynthetic pigment; Chlorophyll; Carotenoid; Assay method.

提要 叶片中光合色素的含量是植物光合生理生态研究中的一项重要指标。本文旨在介绍: (1) 玉米叶片光合色素含量的快速测定方法; (2) 叶片中叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量的计算公式。

关键词 玉米 光合色素 叶绿素 类胡萝卜素 测定方法

目前已知, 高等绿色植物的叶片中含有两类色素: 叶绿素(a 和 b) 与类胡萝卜素(叶黄素和胡萝卜素) 是植物进行光合作用的主要色素。在测定叶片中色素(主要是叶绿素) 含量时基本上分为两步: 一是选取适宜有机溶剂提取色素, 二是选定适宜波长在分光光度计上比色, 并按有关公式计算出含量。

关于叶绿体内色素的提取有多种方法(基本上可分为研磨法和浸泡法)。其中, 1949 年 Arnon 提出用 80% 丙酮研磨过滤的方法, 并提出了计算叶绿素含量的经验公式^[1], 这种方法得到了世界各国的广泛应用; 1979 年 Hiscox 提出了二甲基亚砷(DMSO) 浸泡法^[2], 因而简化了提取色素的程序, 但由于二甲基亚砷气味难闻, 价格较贵, 并因 19℃ 以下结晶析出而未被采用; 80 年代, 国内有些研究者先后提出用乙醇、丙酮或其混合浸泡法, 各有优缺点。

纵观国内已发表的玉米文献可以看出, 在研究玉米的光合生理生态时, 只关注叶绿

素的含量, 却忽略了类胡萝卜素(Carotenoid) 的含量。事实上, 类胡萝卜素在使叶绿体保持高光合水平过程中起着重要作用。在含量上, 类胡萝卜素占叶绿体内光合色素的比重较大, 在正常叶片中类胡萝卜素与叶绿素的分子之比为 1:3^[3]; 在功能上, 不仅作为重要的聚光色素(亦称天线色素) 而进行光能的吸收与传递^[4], 而且作为自由基——单线态氧(¹O₂) 的清除剂能够保护叶绿素和光合膜免遭破坏^[5]。由此可见, 在研究玉米的光合生理生态时, 测定叶绿体内的类胡萝卜素含量则是十分必要的。

1 材料与方法

1.1 材料

供试玉米品种为四单 8、本育 9、丹育 13, 于籽粒灌浆期采取旗叶用于测定。

* 朱广发现在四平市教育学院工作, 陈颖现在梨树县种子分公司工作, 董贵华现在白城市吉林省畜牧业学校工作。

1.2 方法

在待测叶片主脉两侧相同部位用打孔器($\phi=1.15\text{cm}$)打取叶圆片,每份 5 片,剪成 2~3mm 细丝,然后按照下述 4 种方法提取叶绿体内的光合色素:

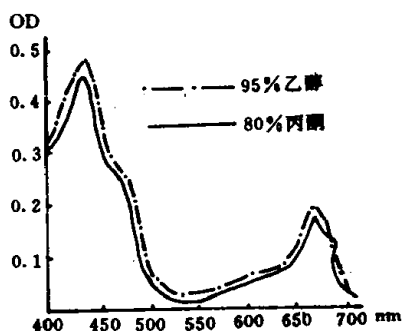
- (1)80%丙酮研磨(标准方法);
- (2)95%乙醇浸泡;
- (3)无水乙醇与丙酮(1:1,v/v)混合液浸泡;
- (4)无水乙醇、丙酮与蒸馏水(4.5:4.5:1,v/v)混合液浸泡。

研磨法,将叶片剪碎充分研磨成匀浆,过滤,滤液用 80%丙酮定容至 20ml;浸泡法,将叶片细丝装入具塞试管,加入 20ml 试剂浸泡,加塞,经常摇动,直至叶丝完全变白为止。同一品种玉米,每种提取方法重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 光合色素提取液的吸收光谱

以玉米四单 8 叶片为材料,用上述 4 种方法提取的光合色素溶液,于 400~700nm 的光波范围内,每隔 10nm 测定一次 OD 值(光密度),并绘制成吸收光谱曲线(图)。从图可以看出,以丙酮和乙醇作为提取剂的各种方法提取光合色素的吸收光谱几乎完全一致。因此,可以采用分光光度法进行定量测定。



光合色素提取液的吸收光谱图

关于采用分光光度法计算光合色素含量

的问题,Arnon 于 1949 年提出了计算公式,但只能计算叶绿素 a 与叶绿素 b⁽¹⁾,未考虑类胡萝卜素。1957 年 Holm 与 Wetstein 根据上述 3 种色素的吸光谱,将叶绿素 a 的吸收峰定于 662nm,叶绿素 b 的吸收峰定于 644nm,类胡萝卜素以 C 表示的吸收峰定于 440nm,并提出如下计算公式⁽⁶⁾:

$$C_a = 9.784 \times D_{662} - 0.990 \times D_{644}$$

$$C_b = 21.426 \times D_{644} - 4.650 \times D_{662}$$

$$C_{a+b} = 5.134 \times D_{662} + 20.436 \times D_{644}$$

$$C_c = 4.695 \times D_{440} - 0.268(C_a + C_b)$$

式中: C_a 、 C_b 、 C_c ——分别为提取液中叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素的浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);

D_{662} 、 D_{644} 、 D_{440} ——分别为相应波长(nm)下的 OD 值。然后,将 3 种色素的浓度分别代入下式,即可计算出各种色素的含量:

$$\text{光合色素含量}(\text{mg} \cdot \text{dm}^{-2}) = \frac{C(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) \times \text{提取液总量}(\text{ml}) \times 10^{-3}}{\text{叶片面积}(\text{dm}^2)}$$

2.2 提取方法对光合色素含量的影响

根据 Holm 和 Wetstein 的计算公式,将利用 4 种提取方法测得的玉米旗叶中各种光合色素的含量列于附表。

从表中所列数据可以看出,在所采用的 4 种提取叶绿体内光合色素的方法中,浸泡法好于研磨法;而在浸泡法中,尤以乙醇—丙酮混合液(1:1,v/v)浸泡法提取的效果最佳。

2.3 提取温度对光合色素含量的影响

温度的影响主要表现在两个方面:一是影响被浸泡叶片的脱色时间,即随着温度的升高而叶片完全脱色的时间逐渐缩短。例如,用 95%乙醇浸泡玉米旗叶,当温度在 30~35℃时,需经 8~10 小时才能使叶片完全脱色,而在 85~90℃时则只需 20~30 分钟。如果用乙醇—丙酮混合液或者乙醇—丙酮—水混合液浸泡时,在 30~35℃下经 3~5 小时即可使叶片完全变白。二是影响浸提液中叶绿素的含量。相比之下,叶绿素比类胡萝卜素

对高温更为敏感,即在高温下易被破坏。虽然高温提取时间缩短,但由于超过 65℃ 时叶绿素易被破坏而使含量降低,所以,不宜采用高温提取。如提取温度在 30℃ 以下叶绿素还是

很稳定的,比如将玉米叶片色素提取液分别放在 30℃ 的温箱和 4℃ 的冰箱中暗保存一周,类胡萝卜素含量几乎没有变化,而叶绿素含量前者仅比后者降低 3%~5%。

附表 不同方法提取的玉米旗叶中光合色素的含量 (mg · dm⁻²)^{*}

提 取 方 法	四 单 8			本 育 9			丹 育 13		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
80%丙酮研磨	1.837	0.569	0.767	2.056	0.649	0.818	1.856	0.606	0.777
95%乙醇浸泡	1.948	0.590	0.794	2.162	0.693	0.845	1.899	0.611	0.786
乙醇丙酮混合液浸泡	2.124	0.637	0.858	2.348	0.738	0.913	1.901	0.640	0.808
乙醇丙酮水混合液浸泡	2.016	0.619	0.823	2.201	0.739	0.909	1.902	0.628	0.804

* 表中 a——叶绿素 a, b——叶绿素 b, c——类胡萝卜素(carotenoid)。

3 小 结

3.1 由于研磨法提取色素既易产生误差又费工费时,因此最好采用浸泡法,即把待测叶片剪成 2~3mm 细丝用试剂浸泡一段时间。此法尤其适用于被测样品较多的情况。

3.2 如需在较短的时间测出光合色素含量,可采用 60~65℃ 下 95%乙醇浸泡法,约经 30~50 分钟即可提取完全。

3.3 如不急等结果,可于头天晚上用乙醇—丙酮混合液(1:1,v/v)或者乙醇—丙酮—水混合液(4.5:4.5:1,v/v)浸泡,置于 30℃

温箱中过夜,第二天上午测定 OD 值,这样既提取完全又不破坏叶绿素,还省工省时。

参 考 文 献

- (1) D. Arnon, 1949. Plant Physiol. 24: 1—15
- (2) 中科院昆明植物所,《植物研究动态》,1981. 2, 33—35
- (3) 潘瑞炽等,《植物生理学》(上册),人民教育出版社,1979. 90
- (4) 高煜珠等,《植物生理学》,农业出版社,1986, 35—38
- (5) 白宝璋等,《植物生理学》,中国科学技术出版社,1992, 218—221
- (6) M. Saric et al., 1986. Praktikum iz fiziologije biljaka. Naucna Rnjiga, PP. 53—55