

大田作物叶绿素提取方法的比较

白宝璋 田文勋 赵景阳

(吉林农业大学农学系)

摘 要

在研究大田作物的光合性能时,常常需要测定其叶绿素的含量。本文介绍了以玉米、高粱、小麦、水稻、大豆和向日葵的叶片为材料,对7种提取叶绿素的方法进行分析比较。结果表明,无水乙醇和丙酮(1:1)混合液直接浸泡提取法的效果最好,既准确又简便。

叶绿素是叶绿体的重要组成部分,是植物进行光合作用的主要色素。所以,测定叶绿素含量是研究植物光合作用性能的常用方法,也是农业科研与农业生产经常遇到的问题。

关于叶绿素的提取有很多种方法。1949年,Arnon提出了丙酮法^[1],即用80%丙酮研磨过滤,并提出了计算叶绿素含量的经验公式,这种方法得到了广泛的应用。在国内出版的《植物生理学实验指导》书中介绍了95%乙醇研磨法^[2],采用本法的提取效果更好。1979年,Hiscox对高等植物提出了二甲基亚砜法^[3],本法的优点在于把被测材料直接用二甲基亚砜($\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_3$, DMSO)于65℃下浸泡而无需研磨过滤,因而简化



了提取手续。1981年,古川昭雄提出了无水乙醇浸泡法^[4],但由于工作时间长,提取不完全而未被采用。1984年,陈福明提出无水乙醇、丙酮、蒸馏水(4.5:4.5:1)混合液浸泡法^[5]。1985年,冯瑞云提出热醇浸泡法^[6]。1986年,张宪政提出了无水乙醇、丙酮(1:1)混合液浸泡法^[5],等等。但是,不管采用哪一种方法提取叶绿素,最后都用分光光度计比色,并按Arnon公式计算出含量。

从所报道的数据看,上述方法各有优点,但同一种方法对不同的作物表现出差异性。我们试图通过对比试验,找出提取大田作物叶绿素的最佳方法。

材 料 和 方 法

一、材料 玉米(旗叶)、高粱(旗叶)、小麦(旗叶)、水稻(旗叶)、大豆(同一节位)、向日葵(同一层次)的叶片。

二、方法 在待测叶片主脉两侧相同部位用打孔器($\phi=1.15\text{cm}$)取样,剪成2—3mm的细丝,混合均匀后,每个作物分别称取22份叶样,每份重200mg,按下述7种方法提取叶绿素:

1. 80%丙酮+石英砂(少许)+碳酸钙粉末(少许)研磨;
2. 80%丙酮浸泡;
3. 95%乙醇+石英砂(少许)+碳酸钙粉末(少许)研磨;
4. 95%乙醇浸泡;
5. 二甲基亚砜浸泡;

6. 无水乙醇与丙酮(1:1)混合液浸泡;

7. 无水乙醇、丙酮与蒸馏水(4.5:4.5:1)混合液浸泡。

研磨法,将叶片充分研碎成匀浆,过滤,滤液定容至20ml。浸泡法,将叶片细丝装入三角瓶,加入20ml试剂浸泡,加塞。置于60—65℃的温箱中保温30—60分钟(每隔5—10分钟摇动一次),叶丝完全变白。同一种作物,每一种提取方法重复3次。此外,再取200mg鲜叶一份放在干燥箱中于80℃下烘干至恒重,用于叶绿素含量的计算。

结果与分析

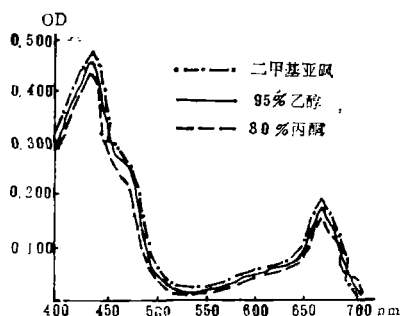
一、叶绿素提取液的吸收光谱 以向日葵叶片为材料,用上述7种方法提取叶绿素,在400—700nm的光波范围内,每隔10nm测定光密度,绘制成吸收光谱曲线(图1)。从图1可以看出,各种方法所提取叶绿素的吸收光谱几乎完全一致,这与张宪政^[5]、冯瑞云^[6]的测定结果相同。因此,可以采用分光光度法进行测定,并按Arnon公式计算叶绿素含量:

$$Ca = 12.7D_{663} - 2.69D_{645}$$

$$Cb = 22.9D_{645} - 4.68D_{663}$$

$$Ct = 20.2D_{645} + 8.02D_{663}$$

$$\text{或 } Ct = \frac{D_{652} \times 1000}{34.5}$$



叶绿素含量(占干重%)

图1 叶绿素提取液的吸收光谱

$$= \frac{C \text{ (mg/l)} \times \text{提取液总量 (ml)} \times 10^{-3}}{\text{样品干重 (mg)}} \times 100\%$$

式中, Ca、Cb、Ct—提取液中叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素的浓度(mg/l);

D_{645} 、 D_{652} 、 D_{663} —分别为相应波长下的光密度(OD)值;

10^{-3} —将毫升换算成升。

二、叶绿素含量比较 按Arnon公式,玉米、高粱、小麦、水稻、大豆和向日葵等大田作物利用上述7种方法的叶绿素含量列于表1。从表1可以看出:

表1 不同方法提取的大田作物叶绿素的含量 (占干重的%)

提取方法	玉米	高粱	小麦	水稻	大豆	向日葵
80%丙酮研磨	0.435	0.389	0.395	0.494	0.441	0.489
80%丙酮浸泡	0.433	0.395	0.421	0.532	0.408	0.491
95%乙醇研磨	0.483	0.462	0.438	0.525	0.419	0.555
95%乙醇浸泡	0.496	0.458	0.451	0.551	0.444	0.560
二甲基亚砷浸泡	0.435	0.391	0.414	0.489	0.412	0.494
乙醇丙酮混合液浸泡	0.446	0.477	0.449	0.542	0.429	0.564
乙醇丙酮水混合液浸泡	0.469	0.468	0.461	0.527	0.416	0.558

1. 就同一种作物而言,不同的提取方法,叶绿素的含量差异明显。如以Arnon的丙酮研磨法为标准(定为100%),那么最佳的提取方法均超过该法10%以上。尤其是高

梁, 利用乙醇丙酮混合液浸泡和乙醇丙酮水混合液浸泡竟超过20%以上。

2. 对不同作物而论, 有些提取方法同时对几种作物获得很好的结果, 叶绿素的含量高于其他方法。例如, 用95%乙醇浸泡法提取玉米、小麦、大豆、水稻的叶绿素, 其含量超过80%丙酮研磨法为10—14%, 而用乙醇丙酮混合液浸泡法提取高粱和向日葵的叶绿素, 其含量超过80%丙酮研磨法达15—20%。但是, 上述两种方法对所测定的大田作物来说差异性不大。

3. 从提取方法来说, 在试验设计中只是80%丙酮和95%乙醇既有研磨法又有浸泡法, 利用同一种试剂而采用两种方法提取的叶绿素含量十分接近。但是, 从提取叶绿素的效果看, 还是浸泡法优于研磨法(图2, 此柱状图解系以80%丙酮研磨法提取的叶绿素含量为100%, 其他提取方法与此法相比较绘制而成)。这是为什么呢? 究其原因, 主要是在提取过程(包括提取液)中叶绿素易受光氧化破坏⁽⁷⁾以及过滤时滤纸吸附等均能造成误差而使测定值偏低, 在白菜的试验中也得到类似的结果⁽⁵⁾。此外, 研磨法提取叶绿素的过程麻烦, 工作量大, 特别是在待测样品多的情况下显得尤为突出。

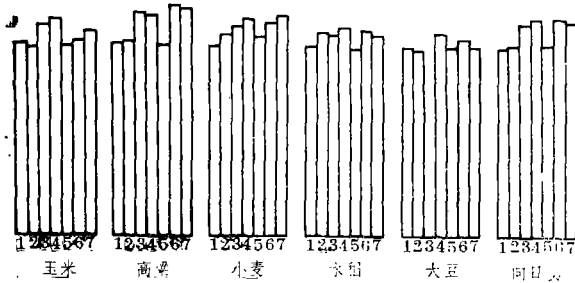


图2 七种提取叶绿素方法的比较

(图中的数字参看“材料与方法”部分)

很高。相比之下, 采用95%乙醇, 无水乙醇与丙酮(1:1)混合液、无水乙醇、丙酮与蒸馏水(4.5:4.5:1)混合液提取叶绿素的效果很好, 通常比用80%丙酮和二甲基亚砜提取的叶绿素含量高10—15%, 最高达22%。值得提出的是, 采用上述试剂以浸泡法提取叶绿素, 操作简便, 省工省时, 特别是对大量样品尤为适用。

三、温度对叶绿素提取的影响 在这里, 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, 二是影响浸提液中叶绿素的含量。对于前一种情况, 随着温度的升高而叶片完全脱色的时间在缩短, 同时也与所用试剂有关。例如, 用95%乙醇浸泡向日葵叶片, 当温度在30—35℃时, 经过8—10小时才能使叶片完全脱色, 而在85—90℃时只需15—20分钟即可。虽然高温提取时间缩短, 但超过65℃时叶绿素易被破坏。如果改用无水乙醇与丙酮混合液浸泡时, 在30—35℃下2—4小时即可使叶片完全变白。对于后一种情况, 随着温度的升高而叶绿素的破坏速度加快。如在30℃以下, 除二甲基亚砜以外, 其他方法提取的叶绿素都比较稳定。例如, 玉米叶绿素提取液, 分别在冰箱(4℃)和温箱(30℃)暗保存一周, 后者仅比前者降低3—5%。

4. 从提取试剂来看, 由图2的柱状图解可见, 80%丙酮与二甲基亚砜提取叶绿素的结果彼此很接近, 含量低于其他方法。而且, 这两种试剂均有难闻的气味, 有损于健康。尤其是二甲基亚砜, 高温(65℃)提取时叶绿素易被破坏(这在实验中已观察到, 叶绿素提取液呈黄褐色), 但温度低于19℃时便产生结晶而不能使用, 同时这种试剂的价格

小 结

一、由于丙酮和二甲基亚砷具有难闻的气味，不利于健康，最好不利用这两种试剂提取叶绿素。

二、由于研磨法麻烦，费工费时，在有温箱设备的条件下，最好采用浸泡法，即将待测叶片剪成2—3 mm细丝用试剂浸泡一段时间。此法尤其适用于样品多的情况。

三、如需在较短的时间内测得叶绿素的含量，最好采用于60—65℃下的95%乙醇浸泡法，大约经过0.5—1.0小时即可使叶片细丝完全变白。

四、如不急等结果，可在头一天的晚上用无水乙醇与丙酮（1：1）混合液于25—30℃的温箱中浸泡（一夜），第二天上午再测定光密度，这既节省时间又提取完全。

参 考 文 献

- (1) D. Arnon: *Plant Physiol.*, 1949, 24, 1—15.
- (2) 山东农学院、西北农学院: 《植物生理学实验指导》，山东科技出版社，1980, 51—52.
- (3) 中国科学院昆明植物研究所情报资料室: 《植物研究动态》，1981, 2, 33—35.
- (4) 牛岛忠広等: 《植物生产过程测定法》，共立出版株式会社，1981, 7—9.
- (5) 张宪政: 《辽宁农业科学》，1986, 3, 26—28.
- (6) 冯瑞云: 《江苏农学院学报》，1985, 3, 53—54.
- (7) 潘瑞桢、董恩得: 《植物生理学》(上册)，人民教育出版社，1979, 86.

THE COMPARISON OF EXTRACTION METHODS OF CHLOROPHYLL IN THE FIELD CROPS

Bai Baozhang, Tian Wenxun, Zhao Jingyang

(*Agronomy Department, Agricultural University of Jilin*)

ABSTRACT

It is often in need of the determination of chlorophyll content in the field crops when their photosynthetic functions are researched. The comparison among 7 extraction methods of chlorophyll in corn, sorghum, wheat, rice, soybean and sunflower have been described in this article. The result shows that the direct sopping extraction method with mixing solution of alcohol and acetone (1 : 1 in volume) is most exact and simplest.