

小白菜叶绿素含量的测定方法比较

徐 芬 芬, 叶 利 民, 徐 卫 红, 郑 静 萍

(上饶师范学院 生命科学学院 江西 上饶 334001)

摘 要:以小白菜为试材,研究了5种提取方法对小白菜叶片叶绿素提取效果的影响,并测定叶绿素在5种不同提取液中的稳定性。结果表明:小白菜叶绿素提取效果最好的是混合液(乙醇:丙酮=1:1)浸提法,其次为混合液(乙醇:丙酮:水=4.5:4.5:1)浸提法和混合液(乙醇:丙酮=2:1)浸提法,丙酮研磨法和乙醇浸提法效果较差。

关键词:小白菜;叶绿素;提取方法;稳定性

中图分类号:S 634.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)23-0032-03

叶绿素是光合作用最重要的产物,同时叶绿素含量也是植物重要的生理指标之一。因此,研究叶绿素的提取方法意义重大。叶绿素含量测定方法一般有分光光度法、活体叶绿素仪法和光声光谱法,以分光光度法应用最广泛。因所用提取叶绿素的溶剂不同又有多种测定方法,早期叶绿素测定广泛采用 Aron 法^[1],但该方法由于先研磨后除渣,工作量大、步骤多,且容易受光氧化而引起偏差,不适宜田间大量样品的提取和测定^[2]。徐邦发等^[3]通过比较几种不同混合提取液的提取,提出测定棉花叶片叶绿素含量的最佳方法为丙酮浸提法。陈福明等^[4]和刘绚霞等^[5]分别对不同配比的丙酮、乙醇和水的混合液的浸提效果进行了研究,证明利用混合液进行叶绿素浸提的可行性。洪法水等^[6]研究表明,丙酮与乙醇混合液提取叶绿素存在协同效应,且二者在等摩尔混合时提取效果最好,而彭运生等^[7]研究认为,丙酮乙醇(2:1)混合液浸提叶绿素效果较好。该试验在前人研究的基础上进一步探讨叶绿素含量测定各方法的优劣及快速测定的步骤,为小白菜田间大样本叶绿素含量测定提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

将新鲜小白菜叶片洗净、晾干、去大叶脉后剪碎混匀。试验采用 752S 紫外可见分光光度计,丙酮、95%乙醇等试剂均为分析纯,试验用水为二次水。

1.2 试验方法

1.2.1 不同浸提液提取效果试验

称取 0.5 g 试材于

试管中,剪取叶片成 2 mm 碎条,在室温下立即用丙酮研磨法和直接浸提法(4种提取液:95%乙醇、丙酮、乙醇(1:1)、95%乙醇、丙酮、水(4.5:4.5:1)、丙酮、95%乙醇(2:1))提取叶绿素,3次重复。研磨法参照张志良方法^[8]。浸提在黑暗中进行,每支试管加入浸提液 10 mL,并不时摇动,等叶片变白,约 14 h 后定容 25 mL,测定吸光值。室温下以相应试剂为参比,分别在 645 nm 和 663 nm 处测定吸光度,由 Arnon 公式计算叶绿素 a 与叶绿素 b 的含量。叶绿素 a(chla)含量(mg/g) = $(12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}) \times V / (1000W)$; 叶绿素 b(chb)含量(mg/g) = $(22.7 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}) \times V / (1000W)$; 叶绿素总含量(mg/g) = chla 含量 + chlb 含量。式中 A_{663} 、 A_{645} 分别为相应波长下的吸光度值, V 为提取液体积, W 为所取叶片质量。

1.2.2 不同浸提液提取效果及稳定性试验 光稳定性试验:将样品于测定后见光放置,分别于放置 1、3、5 h 后再次测定提取液中叶绿素的变化,比较叶绿素在不同提取液中的稳定性。热稳定性试验:用浸提法进行叶绿素提取试验,取提取液 10 mL 于有塞试管中,水浴中加热,分别在 30、50、70℃条件下保温 10 min,冷却到室温后,测定叶绿素含量。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法的提取效果及光稳定性比较

由表 1~5 可知,5 种不同提取方法以混合液(乙醇:丙酮=1:1)浸提法所得总叶绿素含量最高(为 0.438);乙醇浸提法最低(仅 0.305);其它 3 种提取方法相差不大。降解值以丙酮研磨法最快(为 0.263);混合液(乙醇:丙酮:水=4.5:4.5:1)浸提法其次(为 0.208);混合液(乙醇:丙酮=2:1)和混合液(乙醇:丙酮=1:1)浸提法较慢(分别为 0.185 和 0.165)。说明,丙酮研磨法可能因研磨过程破坏了叶绿体,所提取的叶绿素在光下极不稳定。而混合液(乙醇:丙酮=2:1)和

第一作者简介:徐芬芬(1978),女,江西奉新人,硕士,讲师,现主要从事植物生理教学与研究工作。E-mail: xffylm7875@163.com。
基金项目:江西省教育厅 2010 年度青年科学基金资助项目(GJJ10255);上饶师范学院 2010 年教学改革研究资助项目。
收稿日期:2010-09-06

混合液(乙醇∶丙酮=1∶1)浸提法可获得较高的叶绿素含量,同时在光下也有较好的稳定性。

随见光时间的延长,各种提取方法均以叶绿素 a 降解值远远快于叶绿素 b。不同提取方法叶绿素 a 降解值在 0.133~0.288 之间变化,而叶绿素 b 降解值 0.020~0.053 之间变化。另外,每种提取方法的 chl a/ chl b 值均随见光时间的延长表现出逐渐减小的趋势,也可反映出

表 1 丙酮研磨法所得叶绿素含量及光稳定性比较

丙酮研磨	0 h	1 h	3 h	5 h	7 h	降解值
chl a	0.303	0.240	0.123	0.098	0.075	0.228
chl b	0.100	0.088	0.083	0.070	0.065	0.035
chl a+b	0.403	0.328	0.205	0.168	0.140	0.263
chl a/ chl b	3.025	2.743	1.485	1.393	1.154	

注:降解值=各时间点比前一时间点相差之和 下同

表 2 乙醇浸提法所得叶绿素含量及光稳定性比较

乙醇浸提	0 h	1 h	3 h	5 h	7 h	降解值
chl a	0.195	0.140	0.105	0.090	0.055	0.140
chl b	0.110	0.085	0.073	0.063	0.058	0.053
chl a+b	0.305	0.225	0.178	0.153	0.113	0.193
chl a/ chl b	1.770	1.650	1.450	1.440	0.960	

表 3 乙醇∶丙酮=1∶1 浸提法所得叶绿素含量及光稳定性比较

乙醇∶丙酮=1∶1 浸提	0 h	1 h	3 h	5 h	7 h	降解值
chl a	0.308	0.260	0.233	0.205	0.160	0.148
chl b	0.130	0.110	0.100	0.098	0.093	0.038
chl a+b	0.438	0.370	0.333	0.303	0.253	0.185
chl a/ chl b	2.365	2.364	2.325	2.103	1.730	

表 6 不同提取方法的热稳定性比较

浸提液	30				50				70			
	chl a	chl b	Chl a+b	chl a/ chl b	chl a	chl b	Chl a+b	chl a/ chl b	chl a	chl b	Chl a+b	chl a/ chl b
1	0.270	0.093	0.363	2.903	0.220	0.083	0.303	2.651	0.105	0.044	0.149	2.386
2	0.278	0.115	0.393	2.417	0.238	0.103	0.341	2.311	0.146	0.078	0.224	1.872
3	0.250	0.083	0.333	3.012	0.190	0.066	0.256	2.879	0.166	0.048	0.214	2.862
4	0.164	0.085	0.249	1.929	0.096	0.052	0.148	1.846	0.054	0.036	0.090	1.500

注 1, 丙酮∶乙醇(2∶1); 2 丙酮∶乙醇(1∶1); 3 乙醇∶丙酮∶水(4.5∶4.5∶1); 4 乙醇

3 小结与讨论

混合液浸提法不但所得叶绿素含量高于乙醇浸提法,且对光热的稳定性也优于乙醇浸提法。其中以混合液(乙醇∶丙酮=1∶1)浸提所得叶绿素含量最高。试验中单一乙醇浸提所得叶绿素含量较低,且不稳定,当加入丙酮后叶绿素提取更完全,且稳定性较好。结果表明,丙酮与乙醇混合液提取叶绿素存在协同效应,且二者在等摩尔混合时提取效果最好,这与洪法水等^[3]研究结果一致。

试验中丙酮研磨法也可得到较高的叶绿素含量,这与前人^[4,7]研究结果不同,具体原因有待于进一步研究。但因研磨法所提取的叶绿素在光下极不稳定,因而这种方法也不可取。综合分析得出,小白菜叶绿素提取效果最好的是混合液(乙醇∶丙酮=1∶1)浸提法,其次为混合液(乙醇∶丙酮∶水=4.5∶4.5∶1)浸提法和混合液

表 4 乙醇∶丙酮=2∶1 浸提法所得叶绿素含量及光稳定性比较

乙醇∶丙酮=2∶1 浸提	0 h	1 h	3 h	5 h	7 h	降解值
chl a	0.300	0.235	0.203	0.185	0.168	0.133
chl b	0.108	0.098	0.090	0.083	0.075	0.033
chl a+b	0.408	0.333	0.293	0.268	0.243	0.165
chl a/ chl b	2.791	2.410	2.250	2.242	2.233	

表 5 乙醇∶丙酮∶水=4.5∶4.5∶1 浸提法所得叶绿素含量及光稳定性比较

乙醇∶丙酮∶水=4.5∶4.5∶1 浸提	0 h	1 h	3 h	5 h	7 h	降解值
chl a	0.308	0.268	0.215	0.173	0.120	0.188
chl b	0.098	0.095	0.093	0.083	0.078	0.020
chl a+b	0.405	0.363	0.308 2	0.2552	0.198	0.208
chl a/ chl b	3.154	2.816	2.324	2.091	1.548	

叶绿素 a 降解速度快于叶绿素 b。说明在可见光下,叶绿素 a 较叶绿素 b 更易降解。

2.2 不同浸提液提取方法的热稳定性比较

由表 6 可知,各浸提方法所得 chl a、chl b 和 Chl a+b 含量均随温度升高而降低,在 70℃下,乙醇浸提法几乎全变褐色,而其它处理仍可见到绿色,其中以混合液(乙醇∶丙酮=1∶1)浸提法 Chl a+b 含量为最高。说明,单一乙醇浸提所得叶绿素含量较低且不稳定,而加入丙酮后叶绿素含量提高且较稳定。各处理 chl a/ chl b 值也随温度升高而减小,说明在高温下叶绿素 a 较叶绿素 b 更易降解,与在光下的变化一致。

表 6 不同提取方法的热稳定性比较

浸提液	30				50				70			
	chl a	chl b	Chl a+b	chl a/ chl b	chl a	chl b	Chl a+b	chl a/ chl b	chl a	chl b	Chl a+b	chl a/ chl b
1	0.270	0.093	0.363	2.903	0.220	0.083	0.303	2.651	0.105	0.044	0.149	2.386
2	0.278	0.115	0.393	2.417	0.238	0.103	0.341	2.311	0.146	0.078	0.224	1.872
3	0.250	0.083	0.333	3.012	0.190	0.066	0.256	2.879	0.166	0.048	0.214	2.862
4	0.164	0.085	0.249	1.929	0.096	0.052	0.148	1.846	0.054	0.036	0.090	1.500

注 1, 丙酮∶乙醇(2∶1); 2 丙酮∶乙醇(1∶1); 3 乙醇∶丙酮∶水(4.5∶4.5∶1); 4 乙醇

(乙醇∶丙酮=2∶1)浸提法,丙酮研磨法和乙醇浸提法效果最差。

随见光时间的延长和温度的增加,各种提取方法均以叶绿素 a 降解值远远快于叶绿素 b。说明叶绿素 a 降解速度快于叶绿素 b,这与李得孝等^[9]和郭胜伟等^[10]的研究结果一致。结果表明,影响叶绿素提取效率的关键是叶绿素 a 的提取速度及其稳定性保持。

参考文献

[1] Arnon D I. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts Phenoloxi dases in Beta Vulgaris[J] . Plant Physiol. 1949. 24: 1-15.
[2] 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.
[3] 徐邦发, 徐雅丽. 棉花叶片的叶绿素含量测定[J] . 塔里木农垦大学学报. 1995. 7(2): 29-31.
[4] 陈福明, 陈顺伟. 混合液法测定叶绿素含量的研究田[J] . 林业科技通讯. 1984(2): 4-8.

茼蒿品种比较试验

刘乐承, 张洪涛

(长江大学 园艺园林学院, 湖北 荆州 434025)

摘要: 从植物学性状、生物学性状、产量等方面对茼蒿进行品种比较。结果表明: 在荆州及类似地区, 大叶茼蒿(湖南, CK)、大叶茼蒿(湖北)2个品种有推广价值, 2个小叶品种茼蒿(辽宁)、密围(山东)有推广价值, 而且密围(山东)的生长期要短15 d左右。

关键词: 茼蒿; 品种; 比较

中图分类号: S 636.9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)23-0034-03

茼蒿(*Chrysanthemum coronarium*)属菊科1a生或2a生草本, 原产中国及地中海地区, 现在我国各地都有栽培^[1]。茼蒿营养丰富, 除了含有维生素A、C外, 富含钙、铁及挥发性精油、胆碱等物质^[2-3], 具有促进蛋白质代谢、脂肪分解的作用, 还有开胃健脾、降压补脑等功效。对咳嗽痰多、脾胃不和、记忆力减退、习惯性便秘等均大有裨益, 是优良的保健蔬菜^[2-4]。

茼蒿虽然原产我国, 但至今我国仍然是以自给栽培为主, 很少大面积种植, 而且研究和开发也不够深入系统。现比较一些茼蒿品种在荆州秋冬栽培的表现, 以期筛选出更适合荆州及类似地区栽培的品种。

第一作者简介: 刘乐承(1964), 男, 博士, 教授, 现主要从事园艺植物育种的教学与研究工作。E-mail: lchliu18@yangtzeu.edu.cn。

收稿日期: 2010-09-19

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的11个茼蒿品种及来源分别是大叶茼蒿(湖北)、小叶茼蒿(辽宁)、小叶茼蒿(甘肃)、小叶光杆(山东)、密围(山东)、春光(甘肃)、蒿子秆(北京)、花叶茼蒿(广西)、青光一号(日本)、速生光杆茼蒿(韩国)和大叶茼蒿(湖南, 荆州主栽, CK)。

1.2 试验方法

试验在荆州西郊进行。按品种采用随机区组设计, 3次重复, 共33个小区, 小区面积3 m²。2009年9月23日播种, 每小区播种前将8.25 kg菜籽饼腐熟后施入作基肥; 将种子放入30℃温水中浸泡24 h后, 捞出清水淘洗干净后在15~20℃条件下催芽至种子露白时播种, 按每小区15 g用种量均匀撒播, 并覆细土1 cm左右^[5-9]。齐苗后7 d时每小区追施尿素125 g, 按需及时除草、间

[5] 刘绚霞, 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.

[6] 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, 8(7): 532-535.

[7] 彭运生, 刘恩. 关于叶绿素方法的比较研究[J]. 北京农业大学学报, 1992, 18(3): 247-249.

[8] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2003: 67-70.

[9] 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, 25(6): 153-155.

[10] 郭胜伟, 高云东. 比色法测定中华芦荟叶片中叶绿素含量方法的研究[J]. 中医药学刊, 2004, 22(1): 53-76.

Comparison of Methods of Chlorophyll Extraction in Chinese Cabbage

XU Fen-fen, YE Li-min, XU Wei-hong, ZHENG Jing-ping

(Department of Life Science, Shangrao Normal College, Shangrao, Jiangxi 334001)

Abstract: The effects of five kinds of extraction methods on the chlorophyll extraction and extract stability in Chinese cabbage Chlorophyll were studied. The results showed that the best extraction method was the extraction mixture (ethanol : acetone = 1 : 1), followed by waere the mixture (ethanol : acetone : water = 4.5 : 4.5 : 1) and the mixture (ethanol : acetone = 2 : 1) extraction, acetone and ethanol extraction grinding were the worst extraction method.

Key words: Chinese cabbage; chlorophyll; extraction method; stability