

红树植物叶片叶绿素提取 方法比较及其活体测定

何斌源 梁士楚

(广西红树林研究中心 北海 536000)

凌俊文

(广西师范大学生物系 桂林 541004)

摘要 本文采用混合液法测定了五种红树植物叶片的叶绿素含量,并摸索了提取过程中混合液的不同配比和提取的时间。对相同的材料用 Arnon 法和混合液法进行对照测定,结果表明 Arnon 法比混合液法提取红树植物叶片叶绿素效果好。通过 Arnon 法和活体叶绿素仪的平行测定,分别建立了四种红树植物叶片的活体测定值 D 与叶绿素含量 (mg/cm^2) 的回归方程,由此得出快速测定红树植物叶片叶绿素含量的简便方法。

关键词 红树植物 叶绿素 提取方法 活体测定

植物叶绿体与光合作用及氮素营养有密切关系,叶绿素含量的测定对于植物生理、病理等方面研究有着十分重要的意义。长期以来,人们一直应用经典方法 Arnon 研磨法测定高等植物的叶绿素含量^(1,2)。近年来,采用混合液法提取叶绿素陆续有报道^(3,4)。沈其伟(1987)采用混合液法(乙醇、丙酮混合液)测定水稻叶片叶绿素含量。他通过与 Arnon 法对照测定表明:混合液法的提取效果明显优于 Arnon 法(测定值高约 5%)而且叶绿素提取液的稳定性要比 Arnon 法的好⁽³⁾。在红树植物叶绿素提取方面,上述两种方法均有采用^(5,6),但关于混合液配比、提取时间及最适合红树植物叶绿素提取的方法等方面没有专文讨论。目前,我国已有能直接测定活体叶片叶绿素含量的 HYL-1 型活体叶绿素仪(银川产),为叶绿素测定又提供了一种新的研究手段。它利用活体叶片吸收光谱与叶片中叶绿素含量的光学关系制成:活体叶片中的叶绿素在波长 680 μm 附近的吸收呈现一个吸收峰值,在波长 750 μm 附近的吸收最少且超过 750 μm 波长的吸收就不再变动,这样叶片中叶绿素的含量就能从叶片在这两种波长的吸收差值 D 求得。但该方法需要叶绿素含量与吸收差值 D 的标准曲线或回归方程,才可通过 D 值求算叶绿素含量。居于上述认识,我们做了本文的实验,希望能为红树植物叶绿素提取方法提供一些有益的参考。

1 材料与方方法

1.1 材料

测定的材料为 1992 年 3 月下旬采的桐花树 (*Aegiceras corniculatum*),白骨壤 (*Avicennia*)

marina), 秋茄 (*Kandelia candel*), 红海榄 (*Rhizophora stylosa*), 木榄 (*Bruguiera gymnorrhiza*) 五种红树植物的新鲜叶片。其中, 前四种采自大冠沙红树林区, 木榄采自丹兜海红树林区。所采叶片用吸水纸擦拭干净后用冰壶保存马上带回实验室处理。

1.2 实验方法

1.2.1 混合液法试剂配比及提取时间的确定

从采回的叶片中, 每种选 5 张叶片, 每张用打孔器 ($\Phi=0.9\text{cm}$) 打取 6 块小圆片。从每张叶的 6 块小圆片各取 1 块小圆片混合为一组, 这样每个树种就有可视材料相同的 6 个组。各树种的 6 个组分别用 6 种不同配比的提取试剂 10mL 浸提。试剂配比 (乙醇: 丙酮: 水) 分别为: 6: 3: 1, 5: 4: 1, 4.5: 4.5: 1, 4: 5: 1, 3: 6: 1 和 0: 8: 2。浸提中每隔 4 小时用 7230 型分光光度计测定浸提液的 $A_{645\text{nm}}$ 和 $A_{663\text{nm}}$ 。叶绿素含量由下式求出:

$$\text{提取液中叶绿素含量 (mg/L)} = 20.2A_{645\text{nm}} + 8.02A_{663\text{nm}} \quad (1)$$

$$\text{叶片叶绿素含量 (mg/cm}^2\text{)} = \frac{\text{提取液中叶绿素含量 (mg/L)} \times \text{提取液体积 (mL)}}{\text{每组小圆片总面积 (cm}^2\text{)} \times 1000} \quad (2)$$

1.2.2 混合液法与 Arnon 法的对比测定

用打孔器 ($\Phi=0.9\text{cm}$) 在叶片对称打取 40 块小圆片, 形成相同的两组, 每组 20 块小圆片。在避光条件下, 一组材料用 40mL 混合试剂持续浸提 176 小时, 每隔 8 小时用 7230 型分光光度计测定浸提液的 $A_{645\text{nm}}$ 和 $A_{663\text{nm}}$ 。各树种的混合提取试剂配比均为方法 1.2.1 之中提取效果最好的。另一组材料在弱光条件下, 加入 80% 丙酮 40mL 研磨, 提取至材料发白, 去渣, 定容至 40mL, 用 7230 型分光光度计测定浸提液的 $A_{645\text{nm}}$ 和 $A_{663\text{nm}}$ 。用 (1) 式计算出各树种的两组的叶绿素含量 (mg/L)。

1.2.3 HYL-1 型活体叶绿素仪标准曲线的建立

为了获得叶绿素含量梯度变化的测试材料, 将叶片由黄到深绿人为分为 6 组。组内叶片用活体叶绿素仪依次测 D 值, 所有各叶片读数的平均值为该组的活体测定值。活体叶绿素仪测试过的叶片, 用于对称打取小圆片, 所得两组小圆片中一组用于 Arnon 法测定叶绿素含量; 另一组用于测定鲜重和干重。叶绿素含量以 mg/cm^2 , mg/g. dw 和 mg/g. fw 的三种形式给出, 以便比较。

2 结果与讨论

2.1 最佳混合液配比的确定

不同混合液的提取效果见表 1。由表 1 可知, 在相同提取时间内提取率最高的混合液配比 (乙醇: 丙酮: 水) 分别是: 桐花树 4: 5: 1, 秋茄 4.5: 4.5: 1, 白骨壤、红海榄、木榄均为 6: 3: 1。

同时可看出, 用混合液法提取红树植物叶片叶绿素是个缓慢的过程。各树种不同配比的浸提液的叶绿素含量在提取过程中一直呈上升状态。而且各小圆片中央部分仍有不同程度的淡绿色, 说明叶绿素提取未彻底, 提取终止时间也不能确定。

由于红树林生于热带、亚热带海岸潮间带, 受海水周期性浸渍, 其叶片结构和细胞生理性质与陆生植物差异很大。红树植物叶通常为厚革质, 表皮覆盖厚膜且角质化, 胞质渗透压高, 叶肉细胞几乎没有细胞间隙⁽⁷⁾。而且不同的红树种还有不同的适应性结构, 如白骨壤叶下

表皮密生茸毛, 红树属叶细胞具有胶粘性膜等⁽⁷⁾。这些都可能对叶绿素的提取产生影响。

Table 1 Chlorophyll contents (mg/mL) of five mangrove species extracted by varied proportional solutions in different time.

Species	Solutions	Time (hours)			
		8	24	57	92
<i>Aegiceras corniculatum</i>	(1)	1.90	3.75	5.40	6.00
	(2)	2.28	4.13	5.97	6.63
	(3)	2.05	4.42	6.91	7.40
	(4)	3.25	6.22	8.94	9.40
	(5)	2.29	4.29	6.92	8.38
	(6)	3.13	5.75	6.88	7.78
<i>Avicennia marina</i>	(1)	4.59	9.62	13.29	14.23
	(2)	4.22	7.94	11.37	12.10
	(3)	4.15	6.51	9.09	10.72
	(4)	5.56	8.18	10.37	12.01
	(5)	5.39	6.97	8.83	10.46
	(6)	6.89	9.87	10.41	10.32
<i>Kandelia candel</i>	(1)	4.58	9.32	13.90	15.46
	(2)	4.44	9.20	13.88	15.29
	(3)	4.64	8.98	14.15	15.07
	(4)	3.17	5.96	11.52	13.53
	(5)	1.46	2.73	5.33	7.25
	(6)	2.20	4.97	8.73	12.62
<i>Rhizophora stylosa</i>	(1)	2.69	6.55	10.15	11.99
	(2)	2.99	6.23	9.84	11.59
	(3)	2.38	4.83	8.39	10.48
	(4)	2.40	5.01	8.75	10.97
	(5)	2.41	4.94	8.45	11.20
	(6)	1.72	4.91	7.77	9.24
<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	(1)	1.46	3.24	5.51	7.39
	(2)	1.67	3.10	5.64	6.91
	(3)	1.57	3.02	4.98	6.27
	(4)	1.53	2.69	4.76	7.12
	(5)	1.11	1.75	2.91	3.97
	(6)	0.79	2.02	3.41	4.51

Note: Proportions of Solutions (alcohol; acetone; water); (1) 6; 3; 1; (2) 5; 4; 1;
(3) 4.5; 4.5; 1; (4) 4; 5; 1; (5) 3; 6; 1; (6) 0; 8; 2.

2.2 提取方法的优劣比较

以提取相同材料所得溶液的叶绿素含量(mg/l)、提取时间作为两种提取方法评价的指标(表2)。可以得出, 除红海榄外, 其余各树种的 Arnon 法测定值均高于混合液法。用混合液法提取红树植物叶绿素是个缓慢过程, 其最高值出现时间是 Arnon 法的数倍。

Table 2 Comparison of mixed-solution method and Arnon method.

Method	Item	Species				
		<i>Aegieras coniculatum</i>	<i>Avicennia marina</i>	<i>Kandelia candel</i>	<i>Rhizophora stylosa</i>	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>
Mixed-solution method	highest determined value (mg/L)	11.89	14.39	15.70	16.29	11.21
	appearing time of highest value (hours)	136	136	104	160	160
	Ratio of 48 hour— value to highest value (%)	91.08	79.85	80.38	69.24	50.67
Arnon method	Extracting time (hours)	24	24	24	24	24
	Chlorophyll contents (mg/L)	19.99	17.22	18.67	14.72	12.70
Mixed-solution and Arnon method	Ratio of chlorophyll contents	0.595	0.836	0.841	1.107	0.882
	Ratio of time	5.667	5.667	4.333	6.667	6.667

占总叶绿素量绝大多数的离体叶绿素极易光分解^[8],而在实验操作过程中难以避免光的影响。从表2可看出,桐花树、白骨壤、秋茄经过48小时提取已释出较多叶绿素,继续提取则光分解程度较大,而红海榄和木榄提取48小时后仍有较多叶绿素释出,光分解程度较小。因此,用混合液法提取桐花树、白骨壤、秋茄叶绿素的测定值比Arnon的低得多;而红海榄和木榄的两方法测定值则较接近。从总的情况来看,Arnon法较混合液法适合于红树植物叶绿素测定。

2.3 四种红树植物活体测定回归方程

以Arnon法测定的叶绿素含量(mg/cm²)为 y ,活体测定值 D 为 x ,经回归计算得到桐花树、白骨壤、红海榄和木榄四树种的 x 与 y 的回归方程:

$$\text{桐花树: } y = 0.3340e^{0.2990x} (r = 0.9593)$$

$$\text{白骨壤: } y = 0.3741e^{0.2709x} (r = 0.9994)$$

$$\text{红海榄: } y = -1.9617 + 6.6546x (r = 0.8959)$$

$$\text{木 榄: } y = 0.2377e^{0.1375x} (r = 0.9062)$$

经 r 值检验,这四个回归方程可达 $P < 0.05$ 的显著水平,说明这四个回归方程可表达各树种叶绿素含量(mg/cm²)与活体测定值 D 的相关关系。秋茄的叶绿素含量与 D 值没有相关关系,原因有待进一步探讨。

同样用Arnon法测定的秋茄和桐花树的叶绿素平均含量,本实验测定值比厦门(林鹏,1984)的要高,两树种分别高出3.520和1.093倍。两地二种红树植物叶绿素含量差异原因可能有二:(1)纬度位置不同,北海(21°16'N)比厦门(24°31'N)更接近热带,北海红树植物光合系统更适合高光高温条件所致;(2)本文实验提取时间(24小时)较林鹏的(8小

时)长,可能提取较彻底。至于哪一个因子起主要作用,有待进一步研究。

通过本实验,可以知道使用活体叶绿素仪测定红树植物叶绿素含量有下列优点:(1)仪器采用直流供电,体积小,便于野外工作;(2)测量方法简便、迅速、直观,可在短时间内大量测定,增加数据可靠性;(3)可广泛进行现场测定,不损伤植物组织。

参考文献

- 1 Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1~15.
- 2 [英]库姆斯J等主编,生物生产力和光合作用测定技术.戴云玲等译.北京:科学出版社,1986,238~239.
- 3 沈其伟.测定水稻叶片叶绿素含量的混合液提取法.植物生理学通讯,1988,(2):62~64.
- 4 陈福明等.混合液法测定叶绿素含量的研究.林业科技通讯,1984,(2):4~8.
- 5 林鹏等.两种红树叶的几种酶的生理特性和海滩盐度的相关性初探.植物生态学与地植物学丛刊,1984,8(3):222~227.
- 6 郑文教,林鹏,郑逢中等.秋茄幼苗抗盐的生理特性.厦门大学学报,1993,32(4):489~493.
- 7 林鹏.红树林.北京:海洋出版社,1984:26~27.
- 8 涂大正.植物生理学.长春:北京师范大学出版社,1989:343.

Comparison of Extraction Methods Used to Determine Chlorophyll Content in Mangrove Leaves and Alive Leaf Determination

He Binyuan Liang Shichu

(Guangxi Mangrove Research Center, Beihai 536000)

Ling Junwen

(Department of Biology, Guangxi Normal University, Guilin 541004)

Abstract This paper deals with the methods of extracting chlorophyll from mangrove leaves. We apply mixed — solution method to extract chlorophyll of five mangrove species from Dandou and Daguansha, Beihai, and grope for varied solution proportions and extracting time during the extraction process. In comparing the mixed — solution method with Arnon method, We obtain a conclusion that Arnon method is more fit for chlorophyll extraction from mangrove plants. From parallel determination of Arnon method and HYL — 1 chlorophyll instrument, the four mangrove species regression equations about chlorophyll content (mg/cm^2) and value D are given out.

Key words mangrove plant, chlorophyll, extraction method