

文章编号:1001-7380(2019)03-0039-03

红叶石楠叶片色素含量测定方法比较

黄婧¹,徐华东²,周鹏¹,张敏^{1*}

(1.江苏省林业科学研究院,江苏 南京 211153;2.溧阳市尚欣生态农业有限公司,江苏 常州 213000)

摘要:采用分光光度法和激光共聚焦显微术测定不同发育时期的红叶石楠叶片色素含量,并对2种方法进行比较,以期对植物色素测定提供一定参考。

关键词:色素含量测定;分光光度法;激光共聚焦显微术;红叶石楠;叶片

中图分类号:Q945.11;S792.99

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2019.03.009

叶绿素和类胡萝卜素是绿色植物体内参与光合作用的2类色素,涉及光能的吸收、传递和转化过程^[1]。叶绿素含量与植物的光合速率、营养状况等密切相关。此外,植物遭受环境胁迫如低温、高盐、重金属等均会影响叶片色素含量^[2-3]。因此,植物叶片色素含量变化既可以反映其生长和营养状况,也能反映其对环境因子的响应^[4]。在植物生理生态研究中,叶绿素含量是最常用的参数之一。

目前,常用的叶绿素含量测定方法主要有分光光度法、无损光学测定方法(包括手持叶绿素测定仪法、光谱仪测定法)等。其中,分光光度法应用最为广泛。一般实验室采用体积分数为80%丙酮提取叶片色素并用经Arnon推导的公式计算叶绿素和类胡萝卜素含量。Lichtenthaler对各种提取方法及计算公式进行了总结和比较^[5]。无损光学测定方法是根据叶片对光吸收和反射,快速、准确地原位测定植物叶片的色素含量^[4]。可采用手持叶绿素计或光谱仪测定叶绿素的相对含量。

本试验采用常规Arnon法和激光共聚焦显微术,测定红叶石楠叶片色素,并对2种方法进行比较,以期为本植物的叶片色素含量测定提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料为红叶石楠‘红罗宾’(Photinia × fraseri ‘Red Robin’),于江苏省林业科学研究院温

室中培养。

1.2 试验方法

1.2.1 分光光度法 选取萌芽后生长4周和6周的红叶石楠叶片,用剪刀剪成宽度小于2 mm小块,准确称取0.2 g,置于10 mL体积分数为80%丙酮中,于4℃黑暗条件下浸提24 h。每组重复3次。根据文献[5]报道的公式计算叶片色素含量。

$$Chl a (mg/g) = 12.25A_{663.2} - 2.79A_{646.8}$$

$$Chl b (mg/g) = 21.50A_{646.8} - 5.10A_{663.2}$$

$$Total Chl (mg/g) = 7.15A_{663.2} + 18.71A_{646.8}$$

$$Carotenoids (mg/g) = (1000A_{470} - 1.82Chl a - 85.02Chl b)/198$$

1.2.2 激光共聚焦显微术原位测定叶片色素含量

将新鲜叶片切成5 mm × 10 mm小块后用OCT (Sakura Finetek USA, Inc, Torrance, CA, USA)包埋,用Leica CM 1950冷冻切片机切取厚度10 μm的切片。将切片粘于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,用Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany)激光共聚焦显微镜拍摄图像。叶绿素自发荧光用633 nm的氦-氖激光器激发,发射光在650 nm和700 nm处采集^[6];类胡萝卜素自发荧光用氩激光管激发,激发波长488 nm,发射波长500—600 nm^[7]。组织切片用DAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole)负染。荧光强度采用LAS-AF-Lite软件分析。

1.2.3 数据分析 采用SigmaStat统计分析软件和

收稿日期:2019-05-12;修回日期:2019-05-29

基金项目:溧阳市科技计划项目“红叶石楠新品种选育与叶色变色机理研究”(LB2016009)

作者简介:黄婧(1987-),女,江苏镇江人,博士。主要从事植物组织培养技术研究工作。

*通信作者:张敏(1980-),女,内蒙古人,研究员,博士。主要从事植物抗逆机理及林木花卉良种繁育研究。

Excel 对数据结果进行统计分析。

2 结果与分析

如图1所示,生长6周的石楠叶片中各项指标包括叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素和类胡萝卜素均明显高于4周的叶片,说明随着叶片的发育光和色素逐渐积累。

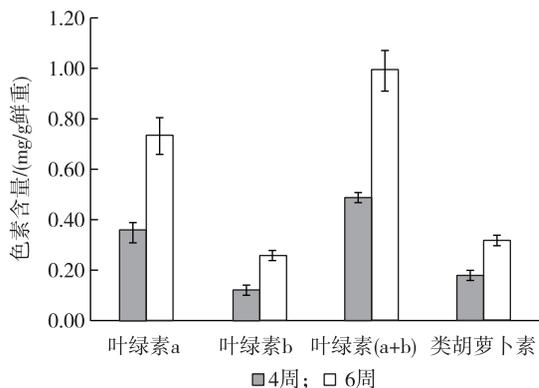


图1 石楠叶片色素含量

进一步采用激光共聚焦显微术,对红叶石楠叶片中的光和色素进行分析,发现栅栏组织中叶绿素荧光强度明显高于海绵组织(见图2),而类胡萝卜素荧光在2类组织中的强度相差不大。此外,2个生长时期的叶片中2类光合色素的分布模式基本一致。对叶片组织中叶绿素和类胡萝卜素荧光强度

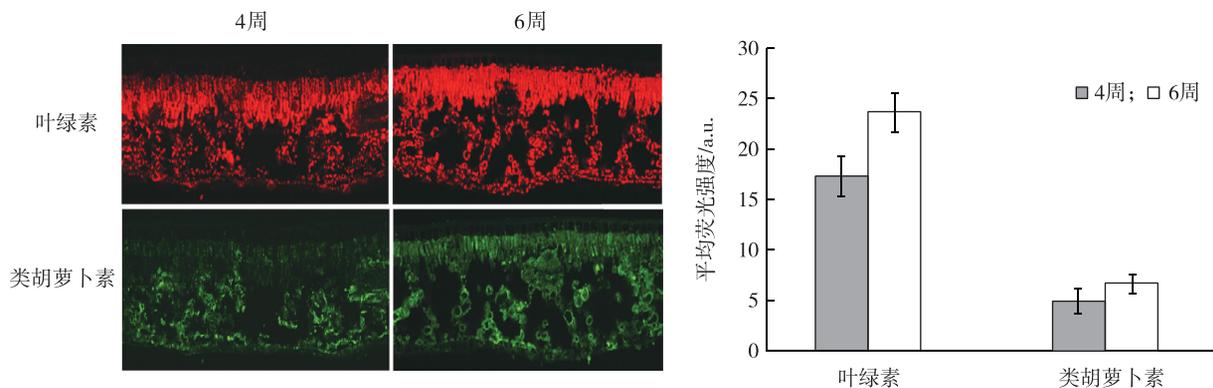


图2 叶绿素和类胡萝卜素在石楠叶片原位分布

本研究采用分光光度法和激光共聚焦显微术测定不同发育时期的红叶石楠叶片色素含量。结果表明,激光共聚焦显微术可以用来测定叶片的色素相对含量,结果与分光光度法测定结果一致,同时还可以清楚地显示色素在叶片原位的分布情况。激光共聚焦显微术测定叶片色素含量也有其缺点。

进行半定量分析,结果显示4周的叶片中叶绿素和类胡萝卜素荧光强度均低于生长6周的叶片,说明后者叶片中的光和色素含量更高,与分光光度法测定结果一致。

3 讨论

植物叶片色素含量测定是植物生理生态研究中经常用到的研究手段。色素含量测定方法也有多种,其中有机溶剂提取结合分光光度计测定应用最为广泛。但分光光度法测定植物叶片色素含量步骤繁琐,也不适于大批量样品的测定^[1]。此外,对应于不同的提取试剂提出了很多方程式计算色素含量。这就造成所用提取溶剂不同,所得结果无法相互比较,特别是 *Chl a/b* 比值差异较大^[5]。尽管分光光度法存在一些缺点和不足,但与其他方法相比其在叶片色素定量测定方面具有明显优势。

近年发展起来的无损测定技术正逐渐得到推广应用。与分光光度法相比,手持叶绿素计和光谱分析仪操作相对简单且适于批量测定。手持叶绿素计仅能测定叶绿素的相对含量,而光谱仪测定可以分析叶片中各种色素成分,应用范围更广^[4]。这2种方法还能用来监测不同生长发育时期的同一叶片中的色素含量变化,这一点是分光光度法无法比拟的。

首先,需要专门的冰冻切片机和激光共聚焦显微镜,机器昂贵,不易推广。其次,需要研究人员具备良好的实验技术水平。总之,将分光光度法和激光共聚焦显微术结合测定叶片色素含量,既能进行定量测定也能观察色素在叶片原位的分布情况。

参考文献:

- [1] 许大全.叶绿素含量的测定及其应用中的几个问题[J].植物生理学通讯,2009,45(9):896-898.
- [2] KAUR N, DHAWAN M, SHARMA I, et al. Interdependency of reactive oxygen species generating and scavenging system in salt sensitive and salt tolerant cultivars of rice[J]. BMC Plant Biology, 2016,16:131.
- [3] SREE K S, KERESZTES Á, MUELLER-ROEBER B, et al. Phytotoxicity of cobalt ions on the duckweed *Lemna minor*-Morphology, ion uptake, and starch accumulation[J]. Chemosphere, 2015, 131: 149-156.
- [4] 彭 涛,李鹏民,贾裕娇,等.介绍两种无损测定植物活体叶片色素含量的方法[J].植物生理学通讯 2006,42(1):83-86.
- [5] LICHTENTHALER H K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes [J]. Methods in Enzymology, 1987, 148: 350-382.
- [6] EGEA I, BIAN W, BARSAN C, et al. Chloroplast to chromoplast transition in tomato fruit: spectral confocal microscopy analyses of carotenoids and chlorophylls in isolated plastids and time-lapse recording on intact live tissue[J]. Annals of Botany, 2011, 108: 291-297.
- [7] GOMEZ C, CONEJERO G, TORREGROSA L, et al. *In vivo* grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST[J]. Plant Journal, 2011,67(6):960-970.

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2019 年度《江苏林业科技》

《江苏林业科技》为国内外公开发行的综合性林业科学技术刊物。1974年创刊。为《中国学术期刊(网络版)》入编期刊、全国优秀期刊、江苏省优秀期刊、全国优秀农业期刊、华东地区优秀期刊。加入“万方数据——数字化期刊群”和中国期刊网等。

《江苏林业科技》主要刊登良种选育、育苗造林、园林绿化、林副特产、森林经营、森林保护、调查设计、野生动物等方面的学术论文、科研报告、经验总结,以及林业新成果、新技术,有较强的指导性、技术性、实用性,是林业科研、教学工作者、管理部门及广大林业生产者不可少的参考资料。欢迎订阅,欢迎投稿,欢迎刊登广告,宣传产品等。

《江苏林业科技》为双月刊,大16开本,国内外公开发行。国内统一刊号:CN 32-1236/S,国际标准刊号:ISSN 1001-7380,每期定价6.00元,全年订费36.00元。全年办理订阅手续,需订阅者请到当地邮局订阅或将订款汇至南京市江宁区东善桥江苏省林业科学研究院本刊编辑部,邮政编码211153。电话(025)52745438,83602820,83602060。由银行或邮局汇寄均可。开户银行:南京市农业银行金鹰支行,户名:江苏省林业科学研究院,帐号:10105101040000010。邮发代号:28-303。