

技术与方法 Techniques and Methods

介绍两种无损伤测定植物活体叶片色素含量的方法

彭涛 李鹏民 贾裕娇 高辉远*

山东农业大学生命科学学院, 山东泰安 271018

Two Noninvasive Methods for Determining Pigment Content in Plant Leaves

PENG Tao, LI Peng-Min, JIA Yu-Jiao, GAO Hui-Yuan*

College of Life Science, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

提要 介绍了两种无损伤光学法测定植物活体叶片色素含量的方法, 并将这两种方法与传统的色素提取测定方法进行了相关性分析。

关键词 光谱仪; 叶绿素计; 叶绿素; 胡萝卜素; 花青素

在光合机构光能转换过程中, 过低的叶绿素含量会限制光合作用; 此外, 植物的生理状况如衰老、感病以及环境胁迫都会影响植物叶片的色素含量; 植物叶片中很大一部分氮是结合在叶绿素中的, 植物缺少 Mg、Fe、S、Cu、Zn 等元素也会影响到叶绿素的合成。所以, 叶绿素含量是反映植物生理功能、受伤害程度和其它矿质营养的重要指标(Filella等1995; Moran 等2000)。作为组成叶黄素循环组分的类胡萝卜素也是光合机构捕光色素复合体的重要组成部分。近些年来, 人们对植物耗散过剩光能保护光合机构免受强光破坏中叶黄素循环的作用做了大量的研究(吴长艾等2001)。至于存在于叶肉中的花青素, 其作用和功能也日益受到人们的重视, 有人认为花青素是最有效的遮光板, 可以防止过剩光能或紫外光对叶片的损伤(Dodd等1998; Mendez等1999)。受低温胁迫或衰老期间, 叶片中的花青素也往往偏高。由此可见, 叶片中色素含量变化不仅反映了植物的生长和营养状况, 而且也反映了植物对环境因子的响应。因此, 植物色素是植物生理生态研究中最常测定的参数之一。

传统的植物叶片色素分析方法需要用溶液提取色素后再分析色素含量。这种方法需要破坏大量的植物叶片, 并不能监测随着时间或生育期而变化的同一叶片中不同色素的动态变化。另外, 传统的色素提取过程和测定过程都比较费时耗力, 尤其是叶黄素循环组分的测定需用高效液相色谱。

近十多年来, 根据完整叶片对光吸收和反射的无损伤光学测定方法得到了广泛的应用。这类方法既不需破坏植物叶片, 又可快速、准确地测定原位植物叶片的色素含量。其方法之一是根据叶片对红光和近红外光两种波长的吸收特征, 在红光区叶绿素有强烈的吸收, 近红外光用于调节不同叶片结构的参比波长。用手持叶绿素计测定叶绿素的相对含量(Markwell等1995)。国际上现有的叶绿素计有 CCM-200、CL-01、SPAD-502 等型号。方法之二是使用光谱仪。光谱仪能够定量测定植物叶片对可见光到近红外光范围(300~1100 nm)内任何一段波长的反射。由于叶片中各种色素对光谱反射特性不同, 因而通过测定叶片对不同光谱的反射特性便能测定多种不同色素的含量。如叶绿素(包括叶绿素 a 和 b)、类胡萝卜素、花青素以及叶黄素循环库的大小等指标(Sims 和 Gamon 2002)。国际上现有的光谱反射仪有 Unispec 光谱分析仪和 MSR-16 多光谱辐射仪等。

从近年来的报道来看, 无损伤光学法测定植物叶片的色素含量的方法日益得到广泛应用。本文介绍以上两种无损伤光学法的同时, 用这两种方法测定了4种不同植物叶片中的色素含量, 并与传统的溶液提取法做了相关性分析。

收稿 2005-07-28 修定 2005-10-31

资助 国家自然科学基金项目(30571125)。

*通讯作者(E-mail: pplab@sdau.edu.cn, Tel: 0538-8241341)。

材料与方法

以大叶黄杨(*Euonymus japonicus* Thunb)、金叶女贞(*Ligustrum quihoui* Carr. cv. Jinyenzhen)、红叶小檗(*Berberis thunbergii* DC. var.)和紫藤(*Wisteria sinensis* Sweet.)叶片为实验材料。各种植物分别选取植株顶端的幼叶、完全展开叶、植株中部的功能叶和植株下部的老叶, 每种植物选取色素浓度跨度尽可能大的4组叶片, 每组取40~70片叶片进行实验。分别用CL-01型手持叶绿素计(英国Hansatech公司)和Unispec光谱仪(英国PP Systems公司)对4组叶片作叶绿素、类胡萝卜素和花青素的无损测定。随后将测定的每组叶片分成10份, 打取叶圆片, 放入10支试管中, 用80%丙酮溶液提取色素。然后用UV-1601分光光度计(日本Shimadzu公司)按照Arnon (1949)的方法测定叶绿素和类胡萝卜素的含量; 按照Gould等人(2000)的方法提取测定花青素含量。用Unispec光谱仪测定叶绿素、类胡萝卜素和花青素含量时, 分别按以下光谱反射指标表示各种色素的相对含量(表1)。

表1 表示色素相对含量的光谱反射指标

色素	光谱反射指标
叶绿素	$mSR705 = (R750 - R445) / (R705 - R445)$ (Sims 和 Gamon 2002)
	$mND705 = (R750 - R705) / (R750 + R705 - 2R445)$ (Sims 和 Gamon 2002)
	R800/R700 (Merzlyak 2003)
	R800/R640 (Merzlyak 2003)
类胡萝卜素	R800 (1/R520-1/R700) (Merzlyak 2003)
花青素	R/G (Sims 和 Gamon 2002)
	R800 (1/R550-1/R700) (Merzlyak 2003)

结果与讨论

用手持叶绿素计测定的大叶黄杨、金叶女贞和红叶小檗3种植物叶片的叶绿素指标与用Arnon (1949)方法测定的叶绿素含量之间呈极显著直线相关; 而紫藤叶片的叶绿素指标与叶绿素含量之间为极显著的一阶二次曲线相关(图1)。同样, 用

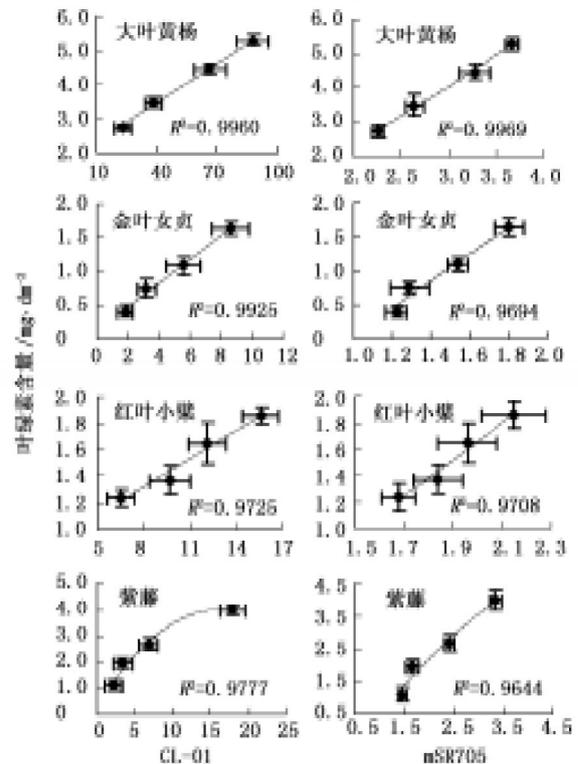


图1 叶绿素指标与叶绿素含量的关系

光谱分析仪测定的各种色素指标与实际色素含量之间也呈现很好的相关性, 当用R800/R640表示叶绿素指标时, 除了大叶黄杨的叶绿素指标与叶绿素含量之间呈直线关系外, 其余的叶绿素指标与叶绿素含量之间均为一阶二次曲线关系, 各种色素指标与色素含量之间均呈现很好的相关性(表2)。可见, 以手持叶绿素计和光谱分析仪替代传统的方法测定植物叶片中的色素含量是可行的。

用手持叶绿素计或光谱分析仪测得的是色素相对含量指标。但通常人们更习惯于使用单位面积或单位组织重量的色素含量(或浓度)来表示植物叶片中实际的色素含量。因此, 有人便直接引用某些文献中的公式, 将所测叶片的色素指标转换为实际的色素含量。我们的测定结果(表2)表明, 不同种类植物叶片中的色素指标与实际叶绿素含量之间的关系方程式是不同的, 因此认为不能用一种关系式来转换不同植物的色素含量。如, 本文中用叶绿素计测得大叶黄杨幼叶片中的叶绿素相对含量为23.7, 以大叶黄杨色素指标与实际叶绿素含量之间的关系式换算成叶绿素含量为2.82 mg·dm⁻²,

表2 各种色素指标与色素含量之间的关系

方法	色素(Y)	植物材料	R ²	回归方程
CL-01	叶绿素	大叶黄杨	0.9960	$y=0.0385x+1.9053$
		金叶女贞	0.9925	$y=0.1747x+0.1270$
		红叶小檗	0.9725	$y=0.0715x+0.7419$
		紫藤	0.9777	$y=-0.0135x^2+0.4428x+0.3658$
mSR705	叶绿素	大叶黄杨	0.9969	$y=0.1301x^2+0.9919x-0.1245$
		金叶女贞	0.9694	$y=-0.1938x^2+2.5514x-2.3428$
		红叶小檗	0.9708	$y=0.2941x^2+0.2542x-0.0324$
		紫藤	0.9644	$y=-0.1619x^2+2.1681x-1.4941$
mND705	叶绿素	大叶黄杨	0.9944	$y=26.76x^2-12.304x+3.5421$
		金叶女贞	0.9517	$y=6.8898x^2+3.2696x+0.1135$
		红叶小檗	0.9559	$y=20.877x^2-6.5595x+1.5501$
		紫藤	0.9999	$y=-23.936x^2+25.698x-2.9168$
R800/R640	叶绿素	大叶黄杨	0.9666	$y=0.0906x+1.462$
		金叶女贞	0.9574	$y=0.01x^2+0.2822x-0.0515$
		红叶小檗	0.9724	$y=0.0561x^2-0.5169x+2.3999$
		紫藤	0.9975	$y=-0.0359x^2+0.8889x-1.3213$
R800/R700	叶绿素	大叶黄杨	0.9964	$y=0.0287x^2+0.5155x+0.7356$
		金叶女贞	0.9536	$y=0.1812x^2+0.7043x-0.7968$
		红叶小檗	0.9563	$y=0.5795x^2-1.9079x+2.6625$
		紫藤	0.9992	$y=-0.8042x^2+5.5979x-5.7159$
R800 (1/R520-1/R700)	类胡萝卜素	大叶黄杨	0.9734	$y=0.0011x^2+0.0129x+0.573$
		金叶女贞	1.0000	$y=-3.0083x^2+6.9494x+0.0164$
		红叶小檗	1.0000	$y=0.0026x^2+0.0366x+2.715$
		紫藤	0.9983	$y=5.0817x^2-16.048x+15.302$
R/G	花青素	金叶女贞	0.9888	$y=-1.1449x^2+5.0245x-2.0058$
		红叶小檗	0.9994	$y=2.0403x^2+6.3006x-3.5654$
		紫藤	0.9949	$y=-13.489x^2+35.324x-17.159$
R800 (1/R550-1/R700)	花青素	金叶女贞	0.8906	$y=-215.52x^2-1.1702x+1.1973$
		红叶小檗	0.9903	$y=0.0611x^2+0.7634x+1.2178$
		紫藤	0.9621	$y=5.1428x^2-7.7724x+3.5467$

与用溶液提取法测定的值 $2.75 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-2}$ 相差 2.5%，如果用金叶女贞的关系式将此相对含量指标换算成叶绿素含量则为 $4.27 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-2}$ ，与溶液提取法的实际测定值相差 55.27%。据此我们认为，引用文献中的关系方程式进行色素指标与实际色素含量之间的转换的做法是不可取的。如果实验要求将色素相对含量指标转换成单位面积或单位组织重量的色素含量，则必须针对不同种类植物叶片分别建立各自的色素指标与色素含量之间的关系方程式，在做这项工作时，每种植物叶片样品的色素浓度跨度范围应尽可能的大，这样关系方程式才适用于该种植物各种色素浓度的叶片。

使用光谱仪测定色素含量时，可以有多种不同的指标表示色素的相对含量，从我们的实验结果可以看出，我们所使用的 4 种不同的叶绿素指标与叶绿素浓度之间均表现出极显著的相关性(表 2)，与只能测定单一叶绿素指标的叶绿素计相比，光谱分析仪可以分析叶片中各种色素成分，适用范围更为广泛。手持叶绿素计和光谱分析仪测定植物叶片的色素含量操作简单，用 CL-01 叶绿素计每测定一个样品只需要 0.5 s 的时间，光谱分析仪对每一个叶片的扫描时间也只需要 1 s。此外，这两种方法不损伤植物叶片，所以适用于研究随着时间或生育期进程以及不同生理条件而变化

的同一叶片中的色素含量变化, 对实验材料较少的研究也很适用(如少量的转基因植株的色素含量)。总之, 根据叶绿素吸收和光谱反射指标测定色素含量的方法是准确可靠、快速和可行的。这些方法在植物科学研究中的应用必定会越来越普及。

参考文献

- 吴长艾, 孟庆伟, 邹琦(2001). 叶黄素循环及其调控. 植物生理学通讯, 37 (1): 1~5
- Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol, 24: 1~15
- Dodd IC, Critchley C, Woodall GS, Stewar GR (1998). Photoinhibition in differently coloured juvenile leaves of *Syzygium* species. J Exp Bot, 49: 1437~1445
- Filella I, Serrano L, Serra J, Peñuelas J (1995). Evaluating wheat nitrogen status with canopy reflectance indices and discriminant analysis. Crop Sci, 35: 1400~1405
- Gould KS, Markham KR, Smith RH, Goris JJ (2000). Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintinia serrata* A. Cunn. J Exp Bot, 51: 1107~1115
- Markwell J, Osterman JC, Mitchell JL (1995). Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. Photosynth Res, 46: 467~472
- Mendez M, Gwynn-Jones D, Manetas Y (1999). Enhanced UV-B radiation under field conditions increases anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. New Phytol, 144: 275~282
- Merzlyak MN, Solovchenko AE, Gitelson AA (2003). Reflectance spectral features and non-destructive estimation of chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content in apple fruit. Post Biol Technol, 27: 197~211
- Moran JA, Mitchell AK, Goodmanson G, Stockburger KA (2000). Differentiation among effects of nitrogen fertilization treatments on conifer seedlings by foliar reflectance: a comparison of methods. Tree Physiol, 20: 1113~1120
- Sims DA, Gamon JA (2002). Relationship between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and development stages. Remote Sens Environ, 81: 337~354