

贺 倩,杨文杰,张旭娟,等. 植物叶绿素快速浸提法的条件优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):97-98,138.

植物叶绿素快速浸提法的条件优化

贺 倩,杨文杰,张旭娟,宋丹丹,周 颖,徐建明

(淮阴师范学院/江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室,江苏淮安 223300)

摘要:以黄瓜叶片为试验材料,以叶绿素提取液中丙酮与乙醇的混合比例、提取温度和提取时间为考察因素,以叶绿素的提取率为考察指标,采用正交试验对叶绿素的浸提条件进行优化。结果表明,在试验影响因素中影响程度从大到小依次为提取液中丙酮与乙醇的混合比例>提取温度>提取时间。其中,在丙酮与乙醇的混合比例为 2:1、浸提温度为 60℃ 的条件下浸提 10 min 时,叶绿素提取效率最佳,而且稳定性较好。

关键词:黄瓜叶片;叶绿素含量;快速浸提法;提取条件;正交试验

中图分类号: Q94-33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0097-02

叶绿素是植物生长发育的重要生理指标之一,它的含量与植物光合速率、营养状况等密切相关。在试验中,研究人员往往通过测定叶绿素含量来研究植物的生长状况。在农业生产中,农民常常把叶片变化作为看苗诊断和肥水管理的重要指标。长期以来,植物叶绿素含量的测定多采用 Arnon 法^[1],由于 Arnon 法中研磨和去渣 2 个程序操作麻烦,工作量大,给大量样品测定带来较大困难。1979 年,Hiscox 等提出了 DMSO 法^[2],DMSO 法虽解决了 Arnon 法的繁琐,但 DMSO 黏性大,气味难闻,对人的眼睛具有一定的刺激作用,而且在低于 19℃ 的环境中极易结晶,受温度影响较大。之后,陈福明等推荐了混合液法^[3],混合液法快速、简便,不但克服了 Arnon 法的研磨、过滤或离心的繁琐步骤,而且浸提出的叶绿素也具有较好的稳定性,其浸提液的叶绿素吸收光谱又与丙酮提取液叶绿素吸收光谱相似,吸收高峰则完全相符,因此,可利用 Arnon 公式来计算叶绿素含量,但易受多酚类化合物的干扰而影响其准确性。张宪政在其基础上进行改良,提出了丙酮、乙醇混合液法^[4],其稳定性高于丙酮、乙醇、水混合液法,但提取时间较长,不利于叶绿素的大批量、快速提取和检测。笔者所在的课题组在张宪政的丙酮乙醇混合液法和冯瑞云的热醇法^[5]的基础上,在实践中摸索出了一种稳定、高效的混合液加热浸提法,同时利用正交设计对丙酮乙醇的混合比例、反应温度和处理时间等提取条件进行了优化。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂与仪器

以黄瓜津研 8 号幼叶为试验材料。主要仪器包括上海精密科学仪器公司生产的 722S 型分光光度计、恒温培养箱、水浴锅、刻度试管架、打孔器等。主要试剂为丙酮、乙醇,均为分

析纯。

浸提液:80% 丙酮、乙醇、丙酮:乙醇=1:1、丙酮:乙醇=2:1、丙酮:乙醇=3:1。

1.2 试验方法

1.2.1 正交试验设计 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,对各组黄瓜叶片进行处理,具体因素水平见表 1。将浸提液的混合比例(A)、温度(B)、时间(C)3 个变量分为 9 组,每组 3 个重复。

表 1 黄瓜叶片叶绿素快速浸提法的 $L_9(3^4)$ 正交试验的因素水平

水平	A:浸提液的混合比例	B:温度(℃)	C:时间(min)
1	1:1	40	5
2	2:1	50	10
3	3:1	60	15

1.2.2 叶绿素的浸提 选取黄瓜苗同一水平层次的叶片,洗净后弃去叶柄和中脉,然后用吸水纸吸干叶片表面的水分。利用面积为 1 cm² 的打孔器在每张叶片左右、中间对称部位各取 2 片,剪成碎条,置于相应的刻度试管中。用不同浓度的浸提液定容至 10 mL,将试验组放入不同温度的水浴锅中处理相应时间后取出,对照组则放入 25℃ 的恒温箱中浸提 16 h。将取出的刻度试管上下摇匀,使溶液中的叶绿素分布均匀,用分光光度计在 645、663 nm 处测定吸光度并记录下来。根据 Arnon 公式计算叶绿素浓度(C_V , μg/mL)。再按下列公式转换为以单位叶面积表示的叶绿素含量(C_A , mg/m²)^[6]: $C_A = C_V \times 10 \times 10\ 000 / (1\ 000S) = C_V \times 100 / S$,其中 C_A 和 C_V 的下标 A 和 V 分别代表面积和体积, S 为用于提取叶绿素的叶片面积(cm²)。计算试验组叶绿素含量与对照组叶绿素含量的比值,并使用 DPS 7.05 分析软件进行统计分析。

1.2.3 叶绿素稳定性检验 为了检验经高温加热条件下浸提出来的叶绿素的稳定性,将上述检测过的叶绿素提取液分别置于 25℃ 生化培养箱中,避光保存。以 25℃ 生化培养箱中浸提 16 h 的叶绿素提取液为对照,分别在 24、48、72 h 后检测其叶绿素含量,每个处理 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 叶绿素的最佳提取条件

由正交试验结果(表 2)看出, A 因素极差最大,其次为

收稿日期:2013-06-07

基金项目:江苏省大学生实践创新训练计划(编号:2012JSSPITP2531);江苏省淮安市科技支撑计划(农业)(编号:SN12031)。

作者简介:贺 倩(1991—),女,江苏盱眙人,从事植物营养与生理方面的研究。Tel:(0517)83525993;E-mail:1205312243@qq.com。

通信作者:杨文杰,博士,讲师,从事植物营养生理及分子生物学方面的研究。Tel:(0517)83525993;E-mail:yangwenjie01@126.com。

B 因素和 C 因素。说明叶绿素提取液中丙酮与乙醇的配比对叶绿素的提取率影响最大,而且最佳配比应为丙酮:乙醇 = 2:1。

表 2 叶绿素快速浸提法的 $L_9(3^4)$ 正交试验的结果

处理号	A	B	C	试验组与对照组 叶绿素含量比值
1	1	1	1	0.341 9
2	1	2	2	0.491 9
3	1	3	3	0.753 9
4	2	1	3	0.786 1
5	2	2	1	0.773 3
6	2	3	2	1.149 0
7	3	1	2	0.771 0
8	3	2	3	0.802 2
9	3	3	1	0.959 5
k_1	0.529 2	0.633 0	0.691 6	
k_2	0.902 8	0.689 1	0.804 0	
k_3	0.844 2	0.954 1	0.780 7	
R	0.373 6	0.321 1	0.112 4	

由表 3 可知,A 因素和 B 因素的不同水平之间差异极显著,C 因素不同水平之间差异显著。表 2 和表 3 表明,3 个因

素对叶绿素的提取效率均有显著影响,而且 3 个因素对叶绿素提取率的影响程度从大到小依次为 $A > B > C$,最佳处理条件为 $A_2B_3C_2$,即浸提液混合比例为 2:1、处理温度为 60℃、处理时间为 10 min,此时叶绿素提取效果最佳,且提取效率高于对照组。

表 3 叶绿素快速浸提法的 $L_9(3^4)$ 正交试验方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
A	0.242 2	2	0.121 1	320.480 6	0.003 1
B	0.176 5	2	0.088 3	233.542 5	0.004 3
C	0.021 1	2	0.010 6	27.950 9	0.034 5
误差	0.000 8	2	0.000 4		
总变异	0.440 6				

2.2 叶绿素稳定性

正交试验结果(表 4)表明,与对照组相比,6 号、9 号的叶绿素提取效率较高,因此分别对其叶绿素的稳定性进行了检测。结果显示,加热条件下浸提的叶绿素含量在 1 周内变化不大,相对稳定,与室温下浸提的对照组相比差异不显著。由此可见,一定温度下的加热处理对叶绿素的稳定性没有太大影响。

表 4 不同处理组叶绿素的稳定性试验结果

处理编号	加热不同时间后的叶绿素含量(mg/m ²)			7 d 后叶绿素 降解率(%)
	1 d	3 d	7 d	
6($A_2B_3C_2$)	460.530 ± 1.405	457.703 ± 1.569	451.553 ± 0.810	1.949a
9($A_3B_3C_1$)	420.407 ± 1.521	415.717 ± 1.321	412.157 ± 1.032	1.962a
CK	438.617 ± 1.704	433.947 ± 1.714	430.083 ± 1.069	1.944a

3 结论与讨论

叶绿素是植物光合作用的重要基础物质,其含量的变化是植物生长发育、营养状况以及生理代谢变化的重要指标之一,并且可作为环境生理研究的参考指标。叶绿素含量的测定方法主要有离体法(如分光光度法)和活体法(如叶绿素仪法)。其中,离体分光光度法准确度较高,是应用最广泛的叶绿素含量的测定方法。该方法一般包括称重、研磨、冲洗、过滤、定容等环节,步骤繁琐,耗时费力,因此寻求一种简便快捷的适合大批量样品的叶绿素测定方法,对于科学研究及教学都具有非常重要的作用。

20 世纪 80 年代初张宪政提出丙酮乙醇混合液浸提叶绿素方法后,近年来,有不少叶绿素提取的改良方法相继推出。吴志旭等对丙酮萃取分光光度法进行了改良,大大缩短了叶绿素的提取时间^[7]。2010 年,舒展等报道了利用 80% 丙酮浸提叶绿素的方法,既省时省力,又可节约试剂^[6]。洪法水等在菠菜的叶绿素提取中发现,丙酮与乙醇等量混合液浸提比丙酮、乙醇液单独浸提的效率略高,认为用丙酮与乙醇混合液提取叶绿素存在协同效应^[8]。明华等对比研究了 8 种有机溶剂提取叶绿素的效率,结果显示,浸提法优于传统的研磨法。其中,以丙酮与乙醇的混合比例为 2:1 的浸提液提取速度最快、效果最好,但其最佳提取时间需 16 h^[9]。然而,张宇斌等对蓝莓的叶绿素提取研究表明,以丙酮与乙醇的混合比例为 1:1 的浸提液浸提 18 h 的提取效果最好^[10]。在前人研究的

基础上,本试验采纳了丙酮与乙醇混合液浸提叶绿素的方法,利用正交设计试验对丙酮与乙醇不同混合比例浸提液的浸提效果进行了对比研究,结果表明,当丙酮乙醇混合液比例为 2:1 时,黄瓜叶片的叶绿素提取效果最佳。

1985 年,冯瑞云曾提出用热醇法浸提叶绿素,该方法是利用乙醇在 60~65℃ 条件下约浸提 30 min,结果显示,叶绿素提取完全,且具有较好的稳定性^[5]。利用丙酮与乙醇混合液在加热条件下提取叶绿素,尚未见报道。本试验为了获得最佳的叶绿素提取条件,在考察不同浸提液浸提效果的同时,对浸提的温度条件和浸提时间均进行了优化和比对。正交试验结果表明,丙酮乙醇混合液比例、提取温度及处理时间对叶绿素的浸提效果均具有显著的影响。其中,提取温度维持在 60℃ 处理 10 min 时,可获得较好的叶绿素浸提效果,与 25℃ 条件下浸提 16 h 的叶绿素提取效果相当。因此,利用丙酮乙醇混合液在 60℃ 条件下只需 10 min 可基本完全提取叶绿素,大大缩短了叶绿素的提取时间,提高了试验效率。稳定性检测结果显示,利用加热浸提法提取的叶绿素,在 25℃ 条件下避光放置 7 d 后,叶绿素的降解率仅为 1.95%,与 25℃ 条件下浸提的叶绿素降解率无显著差异。因此,加热浸提法不失为一种便捷、稳定的叶绿素提取方法,适用于批量样品的叶绿素快速提取。但对于叶绿素提取的具体条件还应根据不同植物种类以及植物的不同组织器官作出相应的调整,方可取得最佳的提取效果。

对二化螟的斜率大于 2,且大于毒死蜱和三唑磷的斜率,说明二化螟种群对氟虫双酰胺的异质性差异小于毒死蜱和三唑磷。卡方检验的 P 值为 0.858 6、0.996 5、0.867 3,均大于

0.05,表明实际 χ^2 累计值小于 $\chi^2_{0.05}$,说明所求得的氟虫双酰胺、毒死蜱和三唑磷毒力回归线是符合实际的。

表 3 氟虫双酰胺对二化螟的毒力

试验药剂	毒力回归方程	χ^2	P 值	LC ₅₀ 及 95% 置信区间 (mg/L)	LC ₉₀ 及 95% 置信区间 (mg/L)
氟虫双酰胺	$y=5.539\ 2+2.300\ 8x$	0.761 6	0.858 6	0.58b(0.48~0.71)	2.10b(1.58~3.22)
毒死蜱	$y=6.527\ 6+1.838\ 7x$	0.055 9	0.996 5	0.15c(0.11~0.19)	0.73c(0.53~1.23)
三唑磷	$y=4.988\ 1+1.811\ 5x$	0.724 8	0.867 3	1.02a(0.78~1.28)	5.18a(3.62~9.02)

2.3 田间防治效果

从田间药效试验结果(表 4)可以看出,20% 氟虫双酰胺水分散粒剂对二化螟具有很好的防治效果,药后 30 d,20% 氟虫双酰胺水分散粒剂有效量为 20~40 g/hm²,防治二化螟的

保苗效果在 89.42%~94.81% 之间,杀虫效果在 90% 以上,除 20% 氟虫双酰胺水分散粒剂有效量 20 g/hm² 的杀虫效果与毒死蜱差异不显著外,其他均显著高于毒死蜱和三唑磷对二化螟的保苗效果和杀虫效果。

表 4 20% 氟虫双酰胺水分散粒剂对二化螟的田间防效

试验药剂	有效量 (g/hm ²)	保苗效果			杀虫效果	
		螟害株(株)	螟害率(%)	防治效果(%)	活虫数(头)	防治效果(%)
20% 氟虫双酰胺水分散粒剂	20	12.75	0.12	89.42b	6.00	92.45ab
20% 氟虫双酰胺水分散粒剂	30	7.75	0.07	93.57a	3.50	95.60a
20% 氟虫双酰胺水分散粒剂	40	6.25	0.06	94.81a	2.75	96.54a
480 g/L 毒死蜱乳油	576	19.75	0.18	83.61c	8.25	89.62b
20% 三唑磷乳油	360	25.25	0.23	79.05d	12.00	84.91c
空白对照	0	120.50	1.11		79.50	

3 结论与讨论

氟虫双酰胺对水稻二化螟 4 日龄幼虫具有很高的活性,LC₅₀ 为 0.58 mg/L,毒力显著高于三唑磷,但低于毒死蜱,在田间对二化螟表现出很好的控制效果,20% 氟虫双酰胺水分散粒剂有效量 20~40 g/hm²,兑水 750 kg/hm²,保苗或保叶效果在 90% 左右,杀虫效果在 92% 以上,且对水稻安全。

氟虫双酰胺是一种作用机理新颖独特的新型杀虫剂品种,具有安全、环保、使用方便的特点,对水稻、蔬菜、水果和棉花等鳞翅目害虫有特效,在有害生物治理中具有广阔的应用前景^[4~5]。但随着氟虫双酰胺的推广应用,潜在的抗性风险也在不断增加。因此,氟虫双酰胺应与其他不同作用机制的杀虫剂进行科学合理地混配或轮换使用,以延长其使用寿命。

参考文献:

[1]秦厚国,罗任华,叶正襄,等. 二化螟大发生原因及控制对策[J].

华东昆虫学报,2005,14(1):91~93.

[2]李海东,吴敏,韩召军. 防治水稻秧田二化螟持效性药剂的筛选[J]. 南京农业大学学报,2011,34(4):43~47.

[3]韩志民,张蕾,潘攀,等. 2010 年仪征市稻纵卷叶螟第三、四代发生动态及虫源性质[J]. 植物保护,2012,38(3):44~49.

[4]李洋,李森,柴宝山,等. 新型杀虫剂氟虫酰胺[J]. 农药,2006,45(10):697~699.

[5]柴宝山,杨吉春,刘长令. 新型邻苯二甲酰胺类杀虫剂的研究进展[J]. 精细化工中间体,2007,37(1):1~8.

[6]韩德梁,张绪校,何胜江,等. 五种杀虫剂对两种草坪草萌发期的安全性研究[J]. 种子,2008,27(9):10~13.

[7]Abbott W S. A method of computing the effectiveness of an insecticide[J]. Journal of Economic Entomology,1925,18(2):265~267.

[8]唐启义,冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京:科学出版社,2002:202~210.

(上接第 98 页)

参考文献:

[1]Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*[J]. Plant physiol,1949,24(1):1~15.

[2]Hiscox J D,Israelstam G F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration[J]. Canadian Journal of Botany, 1979,57(12):1332~1334.

[3]陈福明,陈顺伟. 混合液法测定叶绿素含量的研究[J]. 浙江林业科技,1984(1):19~23,36.

[4]张宪政. 植物叶绿素含量测定——丙酮乙醇混合液法[J]. 辽宁农业科学,1986(3):26~28.

[5]冯瑞云. 叶绿素的热醇快速提取法[J]. 江苏农学院学报,1985, 6(3):53~54.

[6]舒展,张晓素,陈娟,等. 叶绿素含量测定的简化[J]. 植物生理学通讯,2010,46(4):399~402.

[7]吴志旭,张雅燕. 叶绿素 a 测定方法的改进及最优提取时间探讨[J]. 甘肃环境研究与监测,2003,16(2):150~152.

[8]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,2001,18(7):532~535.

[9]明华,胡春胜,张玉铭,等. 浸提法测定玉米叶绿素含量的改进[J]. 玉米科学,2007,15(4):93~95,99.

[10]张宇斌,张永兰,蹇毅,等. 不同提取液对蓝莓叶绿素提取效果的影响[J]. 贵州农业科学,2013,41(2):