

植物生理学



实验分析测定技术

乔富廉 主编

43057

中国农业科学技术出版社

植物生理学实验分析测定技术

乔富廉 主编

中国农业科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

植物生理学实验分析测定技术/乔富廉主编. —北京:
中国农业科学技术出版社, 2002. 8
ISBN 7-80167-412-X

I. 植… II. 乔… III. 植物生理学—实验
IV. Q945-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 057834 号

责任编辑

出版发行

经 销

印 刷

开 本

印 数

版 次

定 价

鲁卫泉

中国农业科学技术出版社

(邮编:100081 电话:(010)62189012)

新华书店北京发行所

山西农业大学印刷厂

787mm×1092mm 1/16 印张:14.5

1~1000 册

字数:353 千字

2002 年 8 月第 1 版

2002 年 8 月第 1 次印刷

21.50 元

植物生理学实验分析测定技术

编 委 会

主 编 乔富廉

编写人员 王丰林 乔富廉 成 平

中国农业科学技术出版社

序

植物生理学是一门实验科学,学习时必须进行实验。所以实验在植物生理教学中占有重要地位,同时植物生理实验方法不仅研究人员需要掌握,在农、林、园艺等实际工作中也十分重要。

乔富廉老师从事植物生理教学工作二、三十年,在实验方面积累了比较丰富的经验,而且有所创新。他所编著的《植物生理学实验分析测定技术》内容充实,有不少是简单易行,实用而又经济的方法和技术。特别是有些适用于体积较大的植物材料的方法,实用性很强,更有意义。

本书不仅可作为本科或专科学生的植物生理教材,也可供有关专业的研究者或研究生参考,也可为成人高考自学者使用。

吴桐钊

2002年8月12日于
北京大学中关园

前 言

植物生理学是研究植物生命活动规律的一门科学。它与农林园艺业生产有着密切的关系。实验是揭示植物生命活动规律的基本手段,因此,实验的目的在于掌握生理学的基本实验技术和方法,以便在实践中,学习总结丰产经验,揭示果树、林木、蔬果、花卉以及农作物的生长规律。为获得优质高产,提供科学依据。同时,通过实验课活动进一步巩固和加深对课堂理论的理解。在实验过程中,实习测定植物各种生命活动的生理指标,从而熟悉进行科学研究的方法,并运用所学习的理论来分析实验结果和作出正确的结论,培养独立工作的能力。树立严肃认真、实事求是的科学态度。

农书是在1982年和1986年山西农业大学园艺系编印的《植物生理学实验指导》,经过多年的使用,又在1992年农学、园艺、林学合编的《植物生理学实验指导》一书,经各专业实验教学多年应用基础上、吐故纳新、筛选后完成的。为反映植物生理学实验技术的新进展,本书编入了几项需要复杂仪器的现代实验项目:如露点微伏压计、恒态气孔计以及近年来已被广泛使用的红外线CO₂气体分析仪、压力室、冰点渗透压计、薄膜氧电极测氧仪和荧光探针技术等仪器。这些仪器虽然不一定都能让学生亲自操作,给学生一些现代仪器和实验方法的概念也是好的。如果,将植物生理学实验技术作为一门课程单独开设,那就更有必要了。为了增强本书在科研中的实用性,除收入少量的验证性项目外,大部分实验为定量性质,均可做出准确、可信的结果。它适用农科生的实验课教材,也可供大中专教师、研究生和科研工作者参考。

随着我国经济建设的不断发展和改革的不断深入,特别是随着我国经济已过渡到社会主义市场经济体制,社会对高校毕业生知识与能力结构的要求发生着深刻的变化,市场要求基础知识扎实、动手能力强、综合素质高的实用型人

才。劳动者终身教育提到议事日程。本书为自学者提供一个平台。为此,把实验的每个方法都制成体系,编入常规仪器的使用方法、必要的试剂性质和浓度配制方法,供自学者查阅。可为此书在手,得心应手。只要按步骤顺序操作逐一进行,就能得到正确的实验结果。可作为自考教材,也可为西部大开发办学条件比较差点的高校使用更佳。

实验课是植物生理学的一种教学方式,也是理论联系实际的重要环节之一。因而实验的内容和课堂理论教学,是相互紧密配合进行的。也是和生产实践密切联系的。使我们所学的理论在实践中加以运用,又在实践中经受检验,从成功中总结经验。如何密切配合专业学习,我们正在摸索经验。由于编者的水平有限,经验和设备不足,编写过程比较仓促,缺点和错误在所难免。恳请批评指正。

本书在编撰过程中得到兄弟院校的参与和协助。采纳了冯志学教授、贺润喜、张建成和李新鹏老师的建议;杨佩芳教授和许大连同志给予极大的支持和鼓励;特别是王玉国教授在百忙中为全书作校正工作,并付出了辛勤的劳动,这里一并谨致谢意。

编者

2000年7月

目 录

一 水分生理	(1)
实验 1 植物细胞的活体染色及死活鉴定	(1)
实验 2 质壁分离形式的观察	(2)
实验 3 植物组织含水量的测定	(3)
实验 4 植物组织水分饱和和亏缺的测定	(4)
实验 5 植物组织中自由水和束缚水含量的测定	(5)
(一)马林契克法	(5)
(二)小液流法	(6)
实验 6 植物组织水势的测定	(8)
(一)小液流法	(8)
(二)折射仪法	(10)
(三)称重法测定植物组织水势	(11)
(四)压力平衡法(压力室法)测定植物组织水势	(13)
实验 7 露点法测定植物叶片水势和渗透势	(14)
实验 8 蒸腾强度的测定	(16)
(一)离体快速称重法	(16)
(二)吸水纸法	(17)
(三)吸水剂法	(18)
实验 9 气孔开闭状况的测定	(19)
(一)渗入法	(19)
(二)印迹法	(20)
(三)气孔密度与孔口总面积的测定	(21)
实验 10 钾离子对气孔开度的影响	(23)
实验 11 气孔保卫细胞钾离子变化的观察	(24)
实验 12 小孔的扩散	(25)
实验 13 用恒态气孔计测定叶片蒸腾速率和气孔扩散阻力	(26)
实验 14 伤流液的收集和伤流量的测定	(30)

实验 15 伤流液中主要化学成分的分析与鉴定	(32)
(一)用纸上层析分析鉴定伤流液中氨基酸和酰胺的种类	(32)
(二)伤流液中氨基酸总量的简易比色测定	(33)
(三)伤流液中无机磷的定量测定	(35)
二 矿质营养	(37)
实验 16 植物的培养和缺乏必需元素时的症状	(37)
(一)植物的溶液培养	(37)
(二)植物的砂基培养	(39)
实验 17 植物组织 N、P、K 含量速测	(41)
实验 18 根系活力的测定	(43)
(一)根系吸收总面积和活跃吸收面积的测定(吸附甲烯蓝法)	(43)
(二)用 α -萘胺法测定根系活力	(45)
实验 19 真核生物钙调素的酶联免疫测定法	(47)
三 光合作用	(52)
实验 20 叶绿体色素的提取、分离和理化性质	(52)
(一)提取与分离	(53)
(二)理化性质	(53)
实验 21 叶绿素的定量测定	(55)
(一)目视比色法	(55)
(二)分光光度法(丙酮提取法和乙醇提取法)	(56)
实验 22 植物光合强度的测定	(59)
(一)用改良半叶法测定果树蔬菜类光合强度	(60)
(二)改良半叶法测定禾谷类光合强度	(61)
实验 23 红外线 CO ₂ 分析仪测定叶片光合呼吸、光呼吸、CO ₂ 补偿点	(63)
(一)光合及呼吸速率的测定	(64)
(二)光呼吸的测定	(66)
(三)CO ₂ 补偿点的测定	(66)
实验 24 叶面积的测定方法	(67)
(一)光电叶面积仪测定法	(67)

(二)印相重量测定法	(68)
(三)打孔测定法	(69)
(四)排水量测定法	(69)
(五)系数测定法	(70)
(六)数格测定法	(70)
实验 25 氧电极法测定植物的光合与呼吸速率	(71)
实验 26 便携式红外线 CO ₂ 气体分析仪测定植物光合与呼吸速率	(77)
(一)密闭系统斜率法	(78)
(二)密闭系统落差法	(82)
(三)开放式气路系统	(83)
四 呼吸作用	(85)
实验 27 植物呼吸强度的测定	(85)
(一)小提篮法	(85)
(二)改良干燥法	(87)
(三)瓦氏呼吸计法	(89)
实验 28 呼吸商的测定	(96)
实验 29 抗坏血酸氧化酶活性的测定	(97)
实验 30 过氧化物酶和多酚氧化酶活性的测定	(98)
实验 31 过氧化氢酶活性的测定	(100)
实验 32 超氧歧化酶(SOD)活性测定	(101)
实验 33 淀粉酶活性的测定	(102)
五 物质代谢	(105)
实验 34 植物组织中可溶性糖及淀粉的测定	(105)
(一)蒽酮比色法	(105)
(二)苯酚法测定可溶性糖	(107)
(三)淀粉的测定	(109)
实验 35 植物组织中可溶性糖的定量测定	(110)
(一)还原糖和蔗糖的测定 砷钼酸比色法	(110)
(二)可溶性糖的测定 蒽酮比色法	(112)

(三)3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖	(113)
实验 36 用折光法快速测定种子的油分	(114)
实验 37 谷类作物种子中赖氨酸含量的测定	(116)
✓ 实验 38 植物组织中氨基酸总量的测定 ✓	(117)
(一)茚三酮比色法之一	(118)
(二)茚三酮比色法之二	(120)
✓ 实验 39 植物体内蛋白质氮和非蛋白质氮的测定	(121)
(一)微量凯氏定氮法	(123)
(二)用凯氏定氮仪自动定氮的方法	(127)
(三)纳氏比色法定氮	(128)
实验 40 植物体内谷氨酰胺合成酶活力的测定	(130)
实验 41 硝酸还原酶的测定	(131)
实验 42 维生素 C 的测定	(133)
实验 43 植物体内有机酸含量的测定	(135)

六 植物激素类

实验 44 用生物鉴定法测定生长素类物质浓度	(137)
(一)燕麦芽鞘伸长法	(137)
(二)生长素促进插枝生根试验	(138)
(三)绿豆根形成法	(139)
实验 45 用生物鉴定法测定赤霉素类物质浓度	(140)
(一)水稻幼苗法	(140)
(二)赤霉素诱导大麦种子 α -淀粉酶的形成	(141)
(三)赤霉素诱导 α -淀粉酶活性的测定	(142)
实验 46 用生物鉴定法测定激动素类物质浓度	(144)
(一)萝卜子叶增重法	(144)
(二)激动素对叶片衰老的保护效应	(145)
实验 47 用植物激素调控作物生长	(146)

七 生长发育

实验 48 种子生活力的测定	(151)
----------------------	-------

(一)氯化三苯基四氮唑(TTC)法	(151)
(二)红墨水染色法	(152)
(三)二硝基苯染色法	(153)
实验 49 种子生活力的快速测定(荧光法)	(154)
实验 50 细胞汁液浓度的测定	(155)
实验 51 植物春化和光周期现象的观察	(156)
(一)植物春化现象的观察	(156)
(二)植物光周期现象的观察	(157)
实验 52 植物激素对愈伤组织形成和分化的影响	(157)
实验 53 冰点降低法测定植物汁液的渗透势	(160)
八 植物抗性生理	(163)
实验 54 植物体内游离脯氨酸的测定	(163)
(一)测定脯氨酸方法之一	(163)
(二)测定脯氨酸方法之二	(164)
实验 55 植物根系分泌物的观察	(166)
实验 56 植物抗逆性的鉴定(电导仪法)	(167)
实验 57 植物组织中丙二醛含量的测定	(168)
九 基本实验分析测定技术	(171)
实验 58 阿贝折射仪的构造和使用法	(171)
实验 59 手持糖量计的使用方法	(173)
实验 60 DDS-11A 型电导率仪使用方法	(174)
实验 61 751G 型分光光度计的使用方法	(175)
实验 62 721 型分光光度计的使用方法	(177)
实验 63 722 型分光光度计的使用方法	(178)
实验 64 723 型分光光度计的使用方法	(180)
实验 65 荧光分光光度计的使用方法	(184)
实验 66 荧光分析的特点及常用方法	(187)
(一)荧光分析的特点	(187)
(二)荧光分析常用的方法	(187)

(三) 荧光辐射谱的测定	189
(四) 蛋白质荧光测定法之一	190
(五) 蛋白质荧光测定法之二	191
(六) 荧光强度与总荧光量	192
实验 67 PHS-2C 型酸度计的使用方法	193
实验 68 分光光度计法的误差及纠正	195
实验 69 分析天平的结构与使用	196
附录一 计量单位	200
附录二 一般化学试剂的分级标准	202
附录三 常用 PH 指示剂	202
附录四 常用氧化还原指示剂	203
附录五 常用酸碱及其主要性质	203
附录六 常用酸碱摩尔浓度的近似配制表	205
附录七 常用有机化合物及其主要性质	205
附录八 常用缓冲溶液的配制	207
附录九 不同质量摩尔浓度下各种盐的等渗系数(i 值)	210
附录十 植物组织和细胞常用培养基的成分	211
附录十一 常见植物生长调节物质及其主要性质	212
附录十二 铬酸洗涤液的配制	213
附录十三 植物激素和生长调节剂在农业上的应用	213
附录十四 试剂、试剂的浓度及配制	215
附录十五 溶液的浓度及浓度的调整	216

一、水分生理

实验 1 植物细胞的活体染色及死活鉴定

活体染色可用来研究活细胞的透性、电荷、氢离子浓度、氧化还原电位等许多生理问题。根据着色情况的不同，还可鉴定细胞死活。本实验练习碱性染料中性红活体染色技术，作为鉴定细胞死活的一种基本方法，并帮助理解活体染色的基本原理。

【原理】

活体染色是利用某种对植物无害的染料稀溶液对活细胞进行染色的技术。中性红是常用的活体染料之一，它是一种弱碱性 pH 指示剂，变色范围在 pH6.4~8.0 之间（由红变黄），在中性或微碱性环境中，植物的活细胞能大量吸收中性红并向液泡中排泄，由于液泡在一般情况下呈酸性反应，因此，进入液泡中的中性红便解离出大量阳离子而呈现櫻桃红色。在这种情况下，原生质和细胞壁一般不着色。死细胞由于原生质的分别透性消失，细胞液不能维持在液泡内，因此，用中性红染色后，不产生液泡着色现象，相反，中性红的阳离子却与带有一定负电荷的原生质及细胞核结合，而使原生质与细胞核染色。

【材料】

洋葱鳞茎（或大葱假茎基部幼嫩部位）

【仪器与用具】

- | | |
|--------------|--------------|
| (1) 显微镜 1 台 | (2) 小培养皿 1 套 |
| (3) 载玻片 2 片 | (4) 盖玻片 2 片 |
| (5) 单面刀片 1 片 | (6) 尖头镊子 1 把 |
| (7) 酒精灯 1 具 | (8) 火柴 1 盒 |

【试剂】

- (1) 0.03% 中性红溶液；(2) 1mol 硝酸钾溶液

【方法步骤】

1. 切下一片较幼嫩的洋葱鳞片，用单面刀片在鳞片内侧纵横划割成 1cm^2 左右的小块，用尖头镊子将内表皮小块轻轻撕下，即可投入中性红溶液染色（表皮内侧向下）。菠菜叶片表皮细胞不易撕取，可以用刮去叶肉的方法制取。将菠菜叶片平放在载玻片上，用水蘸湿后手持单面刀片轻轻刮去上表皮、叶肉和叶脉，只留下一层下表皮细胞。当刮到只剩下少量叶肉细胞时要十分小心，用力太重容易损伤表皮细胞，甚至只剩下一层细胞壁，太轻又会留下过多的叶肉，影响观察，只要反复练习多次即能掌握。除菠菜外，其他果树和蔬菜的叶片均可用此法制取表皮细胞制片。刮好后，用刀片切成 1cm 长的小块。

2. 将切好的制片投入 0.03% 的中性红溶液中染色 10~15min, 取出用蒸馏水稍加冲洗, 在显微镜下观察, 会看到此时主要是细胞壁染色, 而原生质和液泡不染色。

3. 将制片放在自来水 (pH 略高于 7.0) 中浸泡 10~15min, 再放回到载玻片上观察, 将发现细胞壁强烈脱色, 而液泡被染成均匀的樱桃红色, 细胞核和原生质不染色, 因此, 不易观察到。

为了确证中性红染色的部位, 可将上述洋葱内表皮染制片浸于 1mol 的硝酸钾溶液中 10min 左右, 然后取出观察。由于硝酸钾能使原生质强烈膨胀, 发生“帽状质壁分离”, 因而能清楚地区别无色透明的原生质和染成红色的液泡。

4. 将步骤 3 中的活染制片放在酒精灯火焰上微微加热, 以杀死细胞, 再放在显微镜下观察, 会看到原生质凝结成不均匀的凝胶状, 与细胞核一起被染成红色。

5. 在活染制片中仔细寻找, 可能看到个别死细胞, 经中性红染色后其细胞核清晰可辨。

实验 2 质壁分离形式的观察

【原理】

植物细胞质壁分离形式, 有凸形、凹形、帽状形、痉挛形 (特别严重的凹形) 等形式。一般起初往往是凹形, 后来渐渐变为凸形。质壁分离形式的不同往往与原生质的粘性有关。凡是原生质粘度大的, 能维持较长时间的凹形质壁分离, 甚至成为痉挛形。原生质的粘性低时, 较快到达凸形质壁分离, 甚至不经过凹形阶段。本实验观察由于 Ca^{++} 、 K^{+} 离子对原生质粘性不同影响而发生不同形状的质壁分离的现象。 Ca^{++} 离子能降低原生质水合度, 使原生质粘性加大。 K^{+} 离子正好相反, 所以材料经 Ca^{++} 溶液处理后, 发生凹形质壁分离; 而经 K^{+} 溶液处理后, 发生凸形质壁分离, 当用 KNO_3 的高渗溶液进行长时间的处理时, 由于原生质水合度大大增加, 原生质层变厚, 似帽状包围在收缩的液泡两端, 因此称为帽状质壁分离。

【仪器与用具】

- (1) 显微镜 1 台
- (2) 小培养皿 1 套
- (3) 单面刀片 1 个
- (4) 尖头镊子 1 把
- (5) 载玻片和盖玻片各 2 片

【试剂】

- (1) 0.03% 中性红溶液
- (2) 1mol 硝酸钾溶液
- (3) 1mol 氯化钙溶液

【材料】

洋葱鳞茎

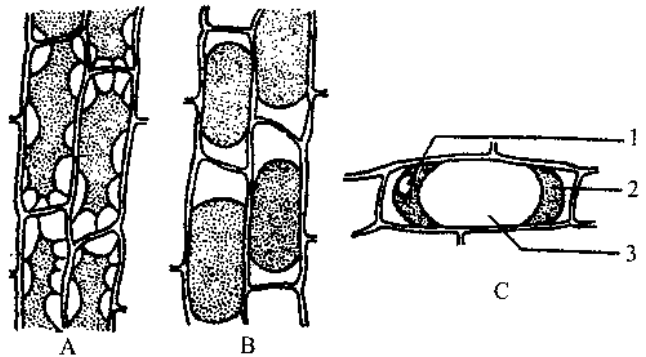


图 2-1 质壁分离的不同形式

A. 凹形质壁分离 B. 凸形质壁分离 C. 帽状质壁分离

1. 细胞核 2. 膨胀的原生质 3. 液泡

【方法步骤】

1. 制取洋葱鳞片表皮活染制片、切取洋葱鲜嫩鳞片一块，用尖头镊子撕一内皮分成两片，分别置于载玻片上，一片滴加 1mol 硝酸钾溶液 1 滴，另一片滴加 1mol 氯化钙溶液 1 滴，盖上盖玻片进行镜检。可见钾盐溶液使细胞发生凸形质壁分离。20~30min 后，由于原生质的膨胀，可变为帽形质壁分离。而钙盐处理的材料则发生凹形或痉挛形质壁分离。较长时间后，可能有部分细胞原生质全部离开细胞壁，而转变为凸形质壁分离，但绝不会表现为帽状，可与 K^+ 处理的相区别（图 2-1）。

2. 将观察到的凹形、凸形、帽形质壁分离的形式各绘一简图，并解释实验结果。

实验 3 植物组织含水量的测定

含水量是植物水分状况的重要指标，植物组织含水量不但直接影响植物的生长，气孔状况、光合功能和作物产量，而且还对果蔬品质以及种子和粮食的安全贮藏具有至关重要的作用。所以，植物组织含水量的测定在植物生理学研究具有重要的理论和实践意义。

【原理】

表示组织含水量的方法有两种：一是以干重为基数表示；二是以鲜重为基数表示。从而分为干重法和鲜重法：

$$\text{组织含水量(占鲜重 \%)} = \frac{W_f - W_d}{W_f} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{组织含水量(占干重 \%)} = \frac{W_f - W_d}{W_d} \times 100 \quad (2)$$

式中： W_f —组织鲜重；

W_d —组织干重。

植物组织相对含水量（RWC）指组织含水量占饱和含水量百分数：

$$\text{RWC} = \frac{W_f - W_d}{W_r - W_d} \times 100 \quad (3)$$

式中： W_r —组织被水充分饱和后重量。

水分饱和亏缺（WSD）指植物组织实际相对含水量距饱和和相对含水量（100%）的差值的大小。常用下式表示：

$$\text{WSD} = 1 - \text{RWC} \quad (4)$$

实际测定时，可用下式计算：

$$\text{WSD} = \frac{W_r - W_f}{W_r - W_d} \times 100 \quad (5)$$

相对含水量和水分饱和亏缺可作为比较植物保水能力及推算需水程度的指标。当植物组织含水量降低到产生不可恢复的永久性伤害时的水分饱和亏缺，称为临界饱和亏缺。

【仪器与用具】

(1) 天平（感量 0.1mg）1 架

(2) 烘箱 1 个

(3) 剪刀 1 把

(4) 烧杯 250ml、500ml 各 3 个

(5) 铝盒 10 个

(6) 吸水纸

【方法步骤】

1. 剪取植物组织，迅速放入已知重量的铝盒中，称出鲜重 (W_f)。

2. 将植物组织连同铝盒放入已升温至 105°C 的烘箱中，杀青 15min，然后于 80°C 下烘至恒重，称出干重 (W_d)。

3. 欲测相对含水量，在称鲜重后，将样品浸入蒸馏水中或包裹在吸饱和水分的湿纱布中 6~8h，取出用吸水纸擦干样品表面水分，称重；再将样品浸入蒸馏水中 1h，取出，擦干，称重，直至样品饱和重量近似，即得样品饱和鲜重 (W_r)；若事先已达到水分饱和和所用的时间，则可一次称重而测得饱和和鲜重，然后烘干，称出干重 (W_d)。

4. 将所得的 W_f 、 W_d 、 W_r 值代入公式 (1)、(2)、(3)、(4) 或 (5)，算出样品含水量、相对含水量及水分饱和亏缺。

【问题】

试比较①以鲜重为基数的含水量②以干重为基数的含水量③相对含水量几种表示植物组织含水量的方法各有何优缺点？

实验 4 植物组织水分饱和和亏缺的测定

【原理】

根据生理意义可将植物组织内的水分状况用自然含水量，饱和含水量和临界含水量 3 种不同方式表示。

1. 自然含水量：植物在自然生长状态下组织中的水分含量称为自然含水量，或简单地称为植物的含水量。

2. 饱和含水量：即植物组织吸收水分达到饱和状态时的含水量。

3. 临界含水量：当植物体内的水分减少到临近发生伤害的最低含水量水平，低于这一水平时即引起植物伤害，组织中这一最低含水量即称为临界含水量。

利用上述 3 种含水量的数值即可以计算出更能表明植物体内水分状况的另两种表示方法，即自然饱和亏缺和临界饱和亏缺。

自然饱和亏缺是指植物组织的自然含水量与饱和含水量两值之差。常以差值占饱和含水量的百分数表示之，差值越大，表示植物体内水分亏缺越严重。

临界饱和亏缺，是指植物的饱和含水量与临界含水量两值之差，常以该差值占饱和含水量的百分数表示之。此值越大，表示植物抗脱水能力越强。

【仪器与用具】

(1) 分析天平 (感量 0.1mg) 1 台

(2) 烘箱 (或红外灯) 1 台

(3) 干燥器 1 台

(4) 称量纸若干

(5) 坩埚钳 1 个

(6) 吸水纸

【方法步骤】

1. 测定自然饱和亏缺

按相对含水量法 (参阅实验 3-3) 求得植物组织的自然鲜重 (W_f)、干重 (W_d) 及