

韩雅珊 编

1-35

水稻生理实验方法

农业出版社

水稻生理实验方法

韩雅珊 编

水稻生理实验方法

韩雅珊 编

农业出版社出版 新华书店北京发行所发行

农业出版社印刷厂印刷

787×1092 毫米 32 开本 1.625 印张 32 千字
1979 年 8 月第 1 版 1979 年 8 月北京第 1 次印刷
印数 1—21,500 册

统一书号 16144·1915 定价 0.16 元

内 容 简 介

本书对水稻生理及生化实验的一些测定方法作了具体介绍。实验仅需具有一般的分光光度计或比色计、烘箱及温箱等设备即能进行，故可在我国农村四级农科网现有的条件下推广应用。本书可供农业科学研究机关、农村四级农科网和高等农业院校等参考用。

本书承蒙浙江农业大学孙羲教授审阅，特此感谢。

北京农业大学农学系韩雅珊

1978年12月10日

目 录

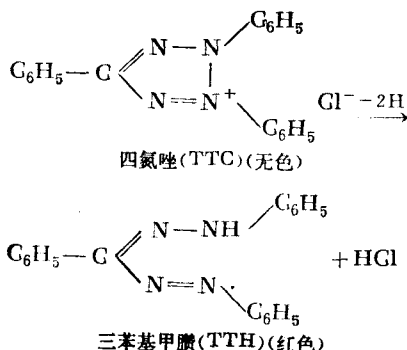
实验一	稻麦种子生活力的测定	1
实验二	水稻植株内氨基态氮的测定 (水稻氮素营养诊断之一)	4
实验三	水稻植株内淀粉的速测—碘试法 (水稻氮素营养诊断之二)	8
实验四	水稻植株内无机磷的测定	10
实验五	水稻叶片中叶绿素含量的测定	12
实验六	水稻叶片中天门冬酰胺的测定(纸上层析法)	15
实验七	谷物蛋白质含量的测定(双缩脲法)	20
实验八	糖的定量测定(蒽酮法)	22
实验九	水稻植株干、鲜重的测定	25
实验十	叶面积、叶面积系数和叶片厚度的测定 (重量法)	27
实验十一	光合强度与呼吸强度的测定(比色法)	29
实验十二	水稻根系伤流液的测定	36
实验十三	水稻根系氧化力的测定(α -萘胺法)	38
实验十四	水稻根系中脱氢酶活性的测定	42
实验十五	水稻根系中过氧化物酶的测定	45

实验一 稻麦种子生活力的测定

种子发芽率是确定种子质量好坏的重要依据，并可以此确定作物的播种量。种子发芽率是在适宜的条件下，在一定的天数内全部发芽种子数占试验种子的百分数。因为一般测定种子发芽率的方法需要的时间较长，所以根据种子的生理功能快速测定其生活力在生产实践上是很需要的。测定种子生活力的方法有多种，这里仅介绍红四氮唑法和红墨水染色法。

(一) 红四氮唑法 (简称 TTG 法)

1. 原理：四氮唑的化学名称是 2,3,5-三苯基四氮唑氯化物 (简称 TTC)，是一种氧化还原染料，能被氢还原成红色的三苯基甲臍。



有生命的组织能进行呼吸作用，故存在脱氢酶的活性，它可以放出氢。当溶液进入种子时，四氮唑接受氢后被还原成红色，使种子活组织被染色（种胚被染成桃红色）。失去生活力种子的胚就不显红色反应。

此法快速，精确，国际上交换种子时一般都采用此法。

2. 试剂配制：0.1%四氮唑溶液：在小台秤上称取 0.1 克四氮唑，将其溶于 100 毫升蒸馏水中（或凉开水），放在棕色瓶中。在冰箱中可保存半年。一般可随用随配。

3. 测定步骤：取具有代表性纯净的小麦或水稻种子 100 粒，为了便于切种，可事先将种子浸泡 2—3 小时（干种子也可以）。用双面刀片将麦粒沿种子腹沟纵切为两半。水稻种子，先要将其颖壳剥去，沿胚部将种子切为两半。注意测定的一半种子一定要带胚。每粒种子取其一半，放入试管中。在管壁上标上号码再加入 0.1% 红四氮唑溶液，溶液要没过种子。为了加速反应速度，将试管放在 50℃ 恒温水浴中约 20 分钟左右。可见种子胚部逐渐出现不同程度的红色反应。根据这一反应，就可判断其生活力。

4. 检验和计算：将试管中的溶液小心倒净后，再将麦（稻）粒放置在玻璃板或培养皿上，逐个检查胚（检查种子的胚根、胚芽及胚芽鞘）被染成红色和没有被染色的情况及数目。记录并计算种子生活力的百分率。

（二）红墨水染色法

1. 原理：植物生活细胞的原生质膜具有选择透性，对正常生活不需要的物质不吸收或很少吸收，所以种胚不染色。而

死亡的种子，因为其原生质膜丧失了选择能力，所以染料便进入细胞内使种胚染上颜色。因此，根据种胚的染色与否可以判断种子生活力。

2. 测定步骤：

(1) 浸种。将小麦或水稻种子用水浸泡 3—5 小时（温度为 28—30℃），夏天在室温下，冬天可放在炉灶旁，使其充分吸水膨胀。

(2) 切取种子。如红四氮唑法。

(3) 染色。配制 5% 的红墨水溶液，即在一份红墨水中加 19 份自来水（如在 5 毫升红墨水中加入 95 毫升自来水），混匀后倒入培养皿中。然后，将切好的种子均匀摊入培养皿中。溶液量以浸没种子为宜。

(4) 冲洗种子。染色 5—10 分钟后，倒出红色溶液，用自来水冲洗多次，直到冲洗的溶液不呈颜色为止。

(5) 观察胚部染色的情况。凡种胚不着色或略带浅红色者，即为具有生活力的种子。胚和胚乳着色相同者，可以认为是丧失生活力的种子。

(6) 计算。统计具有生活力种子的数目，计算出百分数。

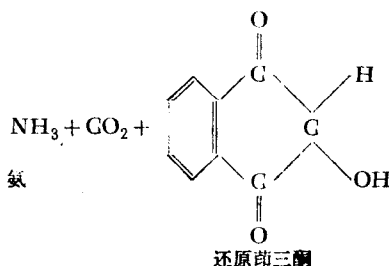
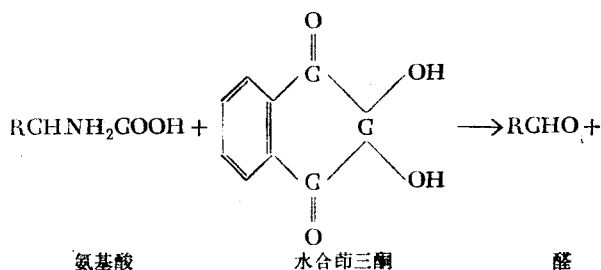
注：采用上述两种方法，对其它作物如玉米、棉花种子，结果也很明显。

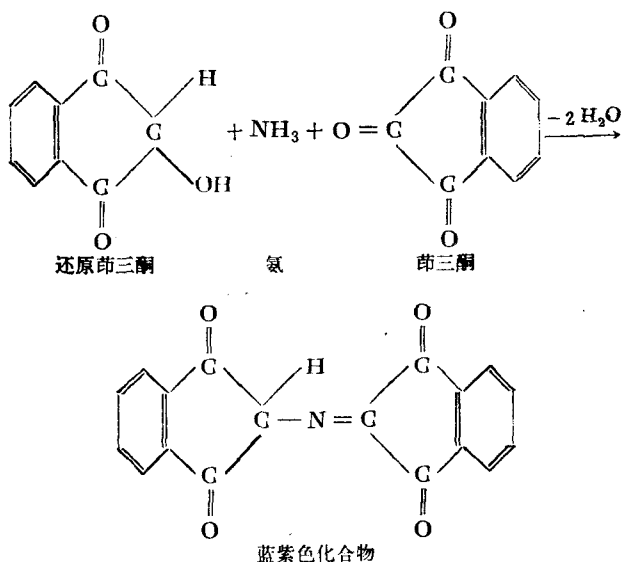
实验二 水稻植株内氨基态氮的测定

(水稻氮素营养诊断之一)

(一) 目的与原理

水稻吸收的铵态氮在体内合成蛋白质以前，均以游离的氨基酸和酰胺的形式存在。它们在植株体内的含量与当时土壤的氮素水平、水稻植株内的营养水平以及稻株的生育期密切相关。游离的氨基酸与水合茚三酮能产生蓝紫色反应。根据生成





颜色的深浅可进行定量测定。

由于水稻在不同生育期及不同的组织部位的氮素合成能力不同，因此测定时必须注意选择一定的生育期和测试部位。据试验，在缓秧后期到分蘖期，可取植株的全部叶片或叶鞘进行测定，而在水稻穗分化期则取心叶下第三至四叶的叶片或叶鞘进行测定。因为这部分叶片或叶鞘对诊断测定比较灵敏。而心叶则最差。在叶片和叶鞘两者之间，叶鞘能更显著地表现出植株氮素水平的变化，能对蘖肥或穗肥的需要作出较准确的判断。

(二) 试剂配制

1. pH 5.0 柠檬酸缓冲液：称柠檬酸· H_2O 4.31 克及 $\text{Na}_3\text{-柠檬酸}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8.68 克，将其溶于 500 毫升蒸馏水中（此液易霉，

须现用现配)。

2. 1% 茚三酮乙醇溶液：称 1.0 克茚三酮，将其溶于 100 毫升 95% 乙醇中。此溶液容易失效，用时临时配制。

3. 标准色阶的配制：

(1) 亮氨酸标准溶液。将亮氨酸在 80°C 烘箱中烘干，准确称取 0.1172 克，溶于 25 毫升 pH 5.0 的柠檬酸缓冲液中。亮氨酸分子中的含氮量为 10.7%，所以这一标准溶液的含氮浓度为 500 微克/毫升。

(2) 谷氨酸钠标准溶液。在农村四级农科网的条件下也可以用食用味精（即 80% 的谷氨酸钠）作标准曲线。谷氨酸钠分子中的含氮量为 8.3%，故可准确称取食用味精 0.1883 克，将其溶于 25 毫升蒸馏水中。此标准溶液的含氮浓度为 500 微克/毫升，待用。

(3) 系列标准色阶的制备。取上述标准溶液和柠檬酸缓冲液按下表的比例稀释成含氮浓度为 0、5、10、15、30、50 及 100 微克/毫升的系列标准溶液。

含氮浓度 微克/毫升	0	5	10	15	30	50	100
吸取 500 微克/毫升亮氨酸或谷氨酸钠溶液毫升数	0	0.1	0.2	0.3	0.6	1.0	2.0
pH 5.0 柠檬酸缓冲液毫升数	10.0	9.9	9.8	9.7	9.4	9.0	8.0

吸取上述溶液各 1 毫升，按下面所介绍的测定方法制成系列标准色阶。有条件时可用 72 型分光光度计比色，作标准曲线备用。

(三) 测定步骤

选择良好的晴天，时间最好是上午 9 时到下午 4 时，在田间采取有代表性的植株 5—10 株。为了防止蒸腾失水，最好将植株用塑料布包住。取回后，用剪刀剪去根部，将植株洗净，选择主茎或较大的分蘖将心叶下第三至四叶片和叶鞘取下，用蒸馏水重新洗净擦干。沿叶枕处将叶片和叶鞘分开。取其叶鞘部分剪碎成 1 毫米左右长的碎屑，混匀，迅速用小台秤称取 0.5 克样本，置于一试管中，加入 10 毫升蒸馏水，在酒精灯上加热至沸腾(测样较多时可以在水浴中加热煮沸)。冷却后过滤到另一试管中，准确吸取此清液 1 毫升(或 20 滴)，加入 1 毫升 1%茚三酮乙醇溶液，充分混匀。将试管放入 105℃ 烘箱中 25—30 分钟，即呈蓝紫色反应。取出冷却后，加蒸馏水稀释到 10 毫升，混匀。用 72 型分光光度计在 570 毫微米 (nm) 波长处，读取其消光度，重复一次。从标准曲线上查出氨基态氮的含量，乘以样本的稀释倍数 (20 倍)，计算 1 克鲜重样本中含氨基态氮的微克数 (微克/克)。此法准确度较高。在没有分光光度计时，也可用亮氨酸 (或 80% 谷氨酸钠) 标准溶液与测样同时制成系列标准色阶，估测植株中氨基态氮的含量。

参 考 指 标

氨基态氮浓度 微克/克	100	150—200	250
氮素水平	低	中	高

实验三 水稻植株内淀粉的 速测—碘试法

(水稻氮素营养诊断之二)

(一) 目的与原理

水稻的氮素营养诊断和旱作物不同，比较麻烦，因为水稻植株内很少有硝态氮存在，所以不能用硝酸试粉的方法来诊断。但是，水稻的叶鞘组织中含有丰富的淀粉。已知水稻分蘖期叶鞘中淀粉的含量为 0—5%，到幼穗分化期，叶鞘中淀粉开始大量累积，其含量可达 5—20%，抽穗后又下降到 0—5%。而且叶鞘中淀粉的累积量与氮的含量呈明显的负相关。如果水稻氮素营养丰富，则光合作用形成的糖类立即与氮合成氨基酸，进一步合成蛋白质，因而植株内很少有淀粉的累积。反之，若氮素缺乏时，光合作用形成的糖类就以淀粉的形式累积下来。所以测定叶鞘中淀粉含量的多少，可以大致判断水稻植株内的氮素水平。用碘试法使淀粉与碘生成蓝紫色的显色反应来测定叶鞘内淀粉的含量，其呈色的深浅在一定范围内与淀粉的含量成正比。用此法诊断水稻穗肥和粒肥的施用，效果显著，而且无需特殊的仪器设备与试剂，故此法易于推广。

(二) 试剂配制

1. 1% 碘试剂：称 5 克碘化钾 (KI)，将其溶于 100 毫升

蒸馏水中，再称 1 克碘溶于其中，置棕色瓶中保存。用时临时稀释。也可以用医用碘酒代替，其浓度一般也是 2—4% 左右。

2. 0.1% 碘试剂：将 1% 碘溶液加水稀释 10 倍即可。

(三) 测定步骤

1. 在田间选取有代表性的植株 10—20 株，采样须在晴天上午 9 时到下午 4 时以前。阴雨天，清晨或傍晚所采样品，其叶鞘内的淀粉含量和氮素营养之间的关系不明显。在分蘖期用从上端数起第二张完全展开叶的叶鞘，在幼穗形成期则用上部第一片完全展开叶的叶鞘。

2. 选定植株后，用剪刀将所需测定的叶剪下。然后，沿叶枕处剪去叶片，取叶鞘 10 片，用水冲洗并擦干。将每张叶鞘按自身的长度等分成 6 段，10 株样品共 60 段，置于培养皿（或白色小碟）中，加入适量的 0.1% 碘液，用玻棒使样段全部浸没。静置 1—2 小时，取出观察染色情况，凡整段叶鞘或叶鞘两端，或其长度的 1/2 以上染成灰蓝色或蓝紫色的都作为有淀粉反应的叶鞘段来统计(A)，其染色长度不足 1/2 或完全不染色的作为无淀粉反应的叶鞘来统计(B)。最后，根据下列公式计算氮素营养诊断指标：

$$\text{氮素营养指标} = \frac{\text{无淀粉反应的叶鞘总段数(B)}}{\text{有淀粉反应的叶鞘总段数(A)}}$$

参 考 指 标

染色后 B/A 值	>2.0	0.5	<0.2
稻株氮素营养水平	氮素过高	缺 氮	严重缺氮

除了根据样本染色的数目来检查外，也可以由其染色的深浅来判断。

染 色 程 度	对 氮 素 的 需 要 程 度
不呈显色反应，不明显的蓝紫色	氮素养分充足
明显的蓝紫色	氮素不足
非常明显的蓝紫色	氮素严重不足

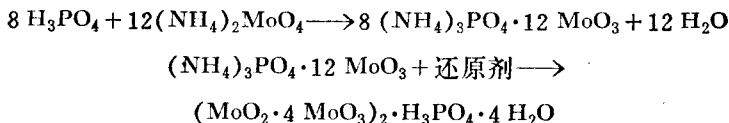
实验四 水稻植株内无机磷的测定

(一) 目的与原理

土壤中的有效磷通过作物根系进入作物体内后，立即参加体内进行的各种代谢过程，所以大部分磷迅速转化为有机磷。其多余部分以无机磷的形态主要存在于输导组织中。这部分磷的含量可以大致反映作物磷的营养水平。因此，作物组织液中无机磷的测定对作物磷的营养诊断有很重要的意义。

本试验用钼蓝比色法测定磷含量。在一定的酸度和其它试剂浓度下，浸出液的磷酸与钼酸铵反应生成黄色的磷钼酸，再用适量的氯化亚锡将磷钼酸中的一部分钼原子(Mo^6)还原形成磷钼蓝^①，其蓝色的深浅与浸出液中的磷的含量成正比。必须

指出：测定时要严格控制酸度以及钼酸铵和还原剂的用量，以免造成差错。



(二) 试剂配制

1. 1.5% 钼酸铵-3.6 N 盐酸：称取钼酸铵 $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}]$ 1.5 克，溶于约 30 毫升温水中，冷却后缓缓加入浓盐酸 30 毫升，边加边搅，用水定容至 100 毫升，贮于棕色瓶中。

2. 2.5% 氯化亚锡甘油溶液：称取氯化亚锡结晶 $(\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O})$ 2.5 克，加浓盐酸 10 毫升，略加热促溶，再加甘油 90 毫升，混匀，贮于棕色瓶中，塞紧，存放于阴暗处。此液一般可存半年左右。

3. 磷酸标准溶液的配制：用分析天平准确称取分析纯磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) (预先在 80°C 烘箱中干燥) 0.4390 克，将其置于 250 毫升烧杯中，用少量蒸馏水溶解，然后转移到 1000 毫升容量瓶中定容到刻度。此即为含磷(P)100 微克/毫升标准溶液。

4. 二级标准溶液的配制：分别吸取上述原液 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16 毫升。将其各置于 100 毫升容量瓶中，用蒸馏水定容至刻度，即分别为每毫升含 0、2、4、6、8、12、16 微克的各级标准溶

① 关于钼蓝的组成尚未完全确定，说法不一。近代公认钼蓝是一种杂多酸，有的资料提出磷钼酸的组成为： $\text{H}_7[\text{P}(\text{Mo}_2\text{O}_7)_6]$ ，其中 $\text{P}:\text{Mo}=1:12$ 。经还原后形成钼蓝的组成为 $\text{H}_7[\text{P} \begin{smallmatrix} \text{Mo}_2\text{O}_7 \\ \text{Mo}_2\text{O}_6 \end{smallmatrix}]$ 。

液。然后以下列操作步骤测定其消光值，制成标准曲线。

(三) 测定步骤

样本选择与处理同实验二，水稻植株内氨基态氮的测定中(三)测定步骤。用移液管吸取上清液 1.0 毫升，加 8 毫升蒸馏水，混匀后，再加入 1.5% 钼酸铵-3.6 N 盐酸溶液 1 毫升，振荡混匀，加一滴 2.5% 氯化亚锡甘油溶液，摇匀。5 分钟后，用 72 型分光光度计在 620 毫微米处比色，读取其消光值，从标准曲线中查出磷的微克数，再乘以样本的稀释倍数(20 倍)，即为每克鲜重样本中含无机磷的微克数。

实验五 水稻叶片中叶绿素含量的测定

(一) 目的与原理

植物叶片的叶绿素与光合作用的关系极为密切，在不同栽培措施、营养条件和病虫害的影响下，叶绿素的含量发生很大变化，所以叶绿素的多少是判断植株壮弱和施肥的一个重要的丰产指标，因此有必要对其进行测定。

在分光光度计波长 663 毫微米和 645 毫微米处分别测定叶绿素的消光值，并可按下列公式计算叶片中叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量：