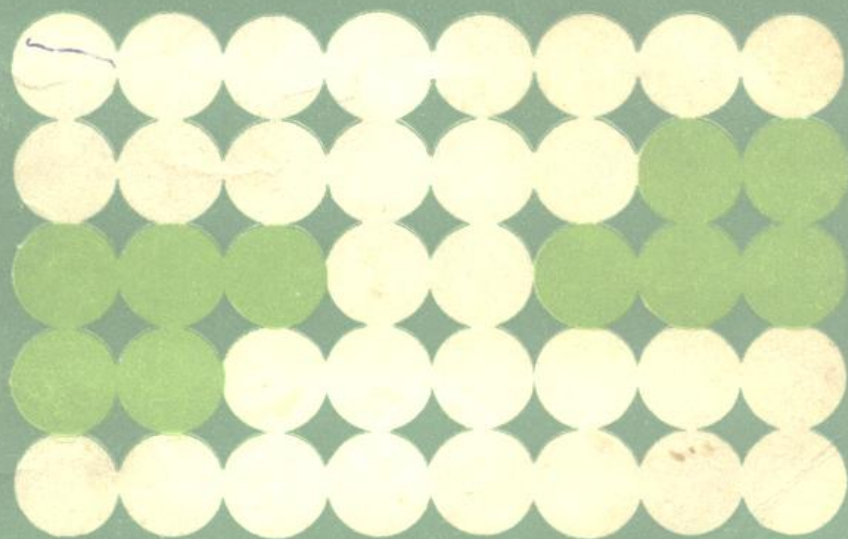


种子生理实验手册

黄学林 陈润政 等编



农业出版社

种子生理实验手册

黄学林 陈润政 等编

农业出版社

406596

种子生理实验手册

黄学林 陈润政 等编

• • •
责任编辑 徐建华

农业出版社出版 (北京朝阳区东营路)

新华书店北京发行所发行 通县向阳印刷厂印刷

787×1092mm32开本 6.5印张 140千字

1990年5月第1版 1990年5月北京第1次印刷

印数: 1—1,440册 定价 3.45元

ISBN 7-109-01385-5/S·979

406596

实验执笔人员

黄学林	实验 3, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 16, 17, 18
陈润政	实验 11, 24, 25, 26, 29, 30, 34
张北壮	实验 1, 2, 4, 13, 14, 27, 33
李卓杰	实验 37, 38, 39, 40, 42, 43
陈光仪	实验 28, 32, 35, 36, 44
蔡东燕	实验 19, 20, 21, 22, 23
刘振声	实验 45, 46, 47, 48
黄上志	实验 12, 31
孙景欣	实验 41
吕小红	实验 5



前 言

这本实验手册的编写目的，是为了介绍有关种子生理的实验方法和一些常用的基本知识，希望能向从事种子工作的同志提供一些有用的参考资料。

国际上很重视种子工作与研究。我国亦已先后建立全国的、各省市、县的种子公司，农、林业方面的种子研究工作开展活跃。近年，在各地分别举办了多期全国性的种子生理学习班。从种子生理的发展形势看，编写一本种子生理的实验手册，便利种子工作者应用与查阅，实是当前迫切之需。

本书内容包括4个部分：一、种子化学组分测定。了解种子成分是进行种子生理生化工作的基础，尤其是有关蛋白质和核酸等的测定工作。二、种子活力测定。种子活力关系到播种质量与作物田间生产性能，这个问题已愈来愈引起种子工作者的重视。三、种子代谢与酶活性测定。新陈代谢是生物体的基本特征，通过呼吸及酶的一些测定，可从分子水平与细胞水平上对种子品质与状况有所了解，并预测种子变化趋势。四、在种子生理中应用的一些新技术。其中有同位素和同工酶的应用，种胚的离体培养，组织化学法以及内源激素的测定等。在附录中，我们介绍了一些生理生化实验的基本知识，和一些有关种子生理的数据和措施，便于读者查阅与使用。手册中的实验方法，多数是我们过去在科研中曾

做过的，力求所选出的能适合我国实际，也适当介绍一些新技术。实验用的仪器、药品只能针对性地介绍，因仪器的型号规格不同，无法对仪器本身作详细讨论。也由于篇幅有限，估计读者已能掌握的一些基本操作，不在此赘述。

本书的编写侧重于实践应用，在深度与广度上均局限在一定范围。再加上我们缺乏编写的经验，以及受到水平所限，书中不足之处甚至出现错误亦在所难免，敬请读者不吝指正，以便改正。

编 者

1985年11月

目 录

第一部分 种子的化学组分测定

实验 1	种子含水量的测定	1
实验 2	种子中磷素的测定 (比色法)	3
实验 3	种子中肌醇六磷酸 (Phytate) 的测定	6
实验 4	种子中钾素的测定 (滴定法)	10
实验 5	种子钾素的火焰光度计测定法	13
实验 6	种子含氮量的测定 (微量凯氏法)	16
实验 7	种子蛋白质的提取及分组测定法	21
实验 8	种子蛋白质的测定	25
I.	总氮测定法 (微量凯氏法)	25
I.	蛋白氮测定法	26
实验 9	谷物蛋白质含量快速测定	28
实验 10	福林-酚试剂法 (Lowry 法)	30
实验 11	种子氨基酸含量的测定 (茚三酮比色法)	33
实验 12	种子游离有机酸含量的测定	36
实验 13	种子可溶性糖含量的测定 (蒽酮法)	40
实验 14	种子淀粉含量的测定	44
实验 15	种子粗脂肪的测定 (索氏法)	46
实验 16	种子类脂的测定 (薄层层析法)	49
实验 17	常用脂肪化学常数的测定	56
I.	皂化值测定	56

I. 碘值的测定	58
II. 酸值的测定	60
实验18 种子核苷酸、核酸的测定	61
I. 核苷酸、核酸的提取分离	61
II. 酸溶性核苷酸的分离和测定(离子交换树脂柱层析法)	64
III. RNA含量测定(苔黑酚法)	67
IV. DNA含量测定(二苯胺法)	69

第二部分 种子活力的测定

实验19 种子发芽率和发芽势测定	73
实验20 种子发芽率的快速测定法	78
I. 紫外线荧光法	78
II. 纸上荧光圈法	79
III. 溴麝香草酚蓝法	80
IV. 其它染色法	82
实验21 种子活力指数的测定	83
实验22 应用人工加速老化法测定种子活力	85
实验23 软X-射线测定种子的活力	87
实验24 氯化三苯基四氮唑(TTC)法	89
I. TTC定位图形法	89
II. TTC定量法	90
实验25 电导法测定种子活力	93
实验26 ATP含量的测定	95

第三部分 种子代谢与酶活性测定

实验27 呼吸强度的测定(小篮子法)	93
实验28 呼吸强度和呼吸系数的测定(瓦氏微量法)	101

实验29	酸性磷酸(酯)酶活性测定	107
实验30	淀粉酶活性测定	110
实验31	蛋白酶活性测定	112
实验32	L-谷氨酸脱羧酶(GADA)活性测定	116
实验33	异柠檬酸裂解酶活性测定	119
实验34	过氧化氢酶活性测定	122
实验35	过氧化物酶活性测定	125
实验36	超氧歧化酶(SOD)活性测定	127

第四部分 在种子生理中的一些新技术应用

实验37	赤霉素(GA)的提取和生物测定	131
实验38	生长素(IAA)和脱落酸(ABA)的提取、 分离和生物测定	137
实验39	细胞分裂素的提取和生物测定	142
实验40	乙烯的气相色谱测定	146
实验41	种胚的离体培养	149
实验42	种子同工酶的测定	154
实验43	凝胶等电聚焦电泳测种子蛋白质和同工酶	158
实验44	种子匀浆液耗氧量的测定(氧电极法)	161
实验45	应用放射自显影术测定水分渗入种子的速率 和方式	166
实验46	种子胚根中DNA、RNA和蛋白质合成定位、 定量测定的显微放射自显影术	169
实验47	利用放射性磷(^{32}P)测定种子胚轴中的核酸 合成	172
实验48	利用 ^{35}S -蛋氨酸测定种子萌发过程中蛋白质的 代谢	174

附录:

一、常用缓冲溶液的配制	177
二、常用酸碱当量浓度的近似配制法	181
三、摩尔数与摩尔浓度	182
四、离心力(g)与离心机转速测算表	183
五、不同温度不同干燥剂盐类饱和溶液的相对湿度	185
六、不同温度不同浓度无机酸造成的相对湿度	188
七、表1, 贮藏温度与种子最大安全含水量关系	190
表2, 在25°C和不同相对湿度下的种子的含水量	191
八、种子湿润低温解除休眠的有效温度与所需天数	193
九、种子、果实中的发芽抑制物	197

第一部分 种子的化学组分测定

实验1 种子含水量的测定

一、原理

种子含水量是影响种子寿命的主要因素之一，干燥的种子（低于安全含水量的种子）在贮藏中能较好地保存活力。如果种子含水量过高，则种子劣变速度加快，导致活力下降与贮藏寿命缩短。通过测定种子含水量，能及时了解种子是否达到安全含水量，对种子贮藏具有重要意义。本实验是利用水遇热可蒸发为水蒸气的原理，用加热烘干法测定种子含水量。

二、材料与设备

1. 材料 小麦（或花生、大豆等）种子。
2. 设备 分析天平 称量瓶 恒温干燥箱（或红外灯） 培养皿 坩埚钳 干燥器 单面刀片

三、实验步骤

1. 称量瓶的恒重 将干燥的称量瓶放在 105℃ 恒温干燥箱中烘 2 小时左右，用坩埚钳取出，放入干燥器中冷却至室温后，在分析天平上称重，再置于干燥箱中烘 2 小时，同样放

入干燥器中冷却称重，如此重复两次（两次称得重量相差不超过0.002g），求得平均值为 W_1 。将称量瓶存放在干燥器中备用。

2. 样品的恒重 将待测的种子放在培养皿中，用单面刀片迅速切成小块碎片，装入已知重量的称量瓶中，加盖，在分析天平上准确称取重量，得瓶和样品总重量为 W_2 ，然后稍揭开瓶盖，置105℃干燥箱中烘4—6小时（亦可以用红外灯照射代替干燥箱，使水分蒸发）。关掉干燥箱电源，待其温度降至60—70℃后，用坩埚钳盖上称量瓶盖，取出放在干燥器中冷却至室温，用分析天平称重，然后再放入80—105℃干燥箱中烘2小时，在干燥器中冷却至室温，再称重，如此重复几次，直到恒重为止。称得的称量瓶和干样品总重量为 W_3 。

3. 将结果记入下表：

编 号	称量瓶重 (g) W_1	瓶重 + 样品重 (g) W_2	瓶重 + 干样品重 (g) W_3

4. 计算 设： W_f 为原始的样品重量 (g)；

W_d 为烘至恒重的干样品重量 (g)；

则得计算式：

$$W_f = W_2 - W_1$$

$$W_d = W_3 - W_1$$

$$\text{含水量 (\%)} (\text{占样品鲜重 \%}) = \frac{W_f - W_d}{W_f} \times 100$$

四、注意事项

1. 种子含水量是以鲜重(原始重量)为基础的。
2. 对油菜、萝卜等小颗粒籽粒,不必切碎,直接烘干便可。

参 考 文 献

华东师范大学生物系植物生理教研组主编, 1980, 植物生理学实验指导, p1—3, 人民教育出版社。

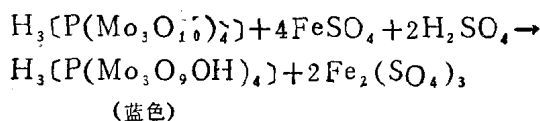
(张北壮)

实验 2 种子中磷素的测定(比色法)

一、原理

磷素是植物代谢活动中不可缺少的物质,同时又是细胞质和细胞核的主要成分。通过测定种子的磷素含量,能了解种子中的磷素营养与代谢的状况。在实验中,为了容易灰化起见,在种子材料中加入硝酸锌进行燃烧。灰化后,大部分有机物质被锌盐中的 NO_3^- 氧化,而磷酸盐离子则与锌离子形成稳定的化合物留在灰分中。在酸性条件下,从灰分中溶解出磷酸,磷酸与钼酸铵形成磷钼酸,并为还原剂还原成蓝色的络合物,其蓝色的深浅与含磷量成正比,故可用比色法测定。

反应式:



二、材料与设备

1. 材料 小麦(或稻谷)粉末。

2. 设备 72-1型分光光度计 滤纸 电炉 漏斗 坩埚(30ml) 试管(10mm×150mm) 容量瓶(100ml) 移液管(1, 2, 5 ml各1支) 石棉罩 试管架

3. 药品 H_2SO_4 (1:9) 1N H_2SO_4 HNO_3 (1:1)

5 N硝酸锌溶液: 在100ml HNO_3 (1:1)中, 加入21g氧化锌, 搅拌至溶解。必要时, 过滤。

铁-钼酸试剂: 称取12.0g无水硫酸钠, 放入烧杯中, 加2.0g钼酸铵和100ml 1N H_2SO_4 , 搅拌至完全溶解, 然后加16.0g硫酸亚铁铵 $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, 溶解后, 注入瓶中, 保存不超过15天。

标准磷液: 准确称取经105℃烘至恒重的 KH_2PO_4 0.2195g, 定容至1000ml, 即得每毫升溶液含50μg磷的标准溶液。

三、实验步骤

1. 标准曲线的制作 用每毫升含50μg磷的标准溶液, 配成每毫升溶液含0(作空白), 10, 20, 30, 40, 50μg的梯级浓度磷溶液。吸取不同浓度标准溶液2ml, 分别注入不同试管中, 然后每管加入5ml 1N H_2SO_4 和2ml铁-钼酸试剂, 摇匀, 经15分钟后, 以空白作对照, 应用72-1型分光光度计, 在波长660nm下比色, 读取光密度, 以磷浓度(μg/ml)为横坐标, 光密度为纵坐标绘制标准曲线。

2. 灰分溶液的制备 称取小麦粉末0.5g, 置30ml坩埚

中，加1 ml 5N $Zn(NO_3)_2$ ，搅拌均匀后，放在通风橱里的电炉上加热消化，直至白烟(氮化物)放完，再套上石棉罩煅烧10—15分钟。待坩埚冷却后，在残留物中加入2 ml HNO_3 (1 : 1)，继续消化到排尽白烟为止，此时灰分呈白色。吸取12 ml H_2SO_4 (1 : 9) 放入坩埚中，以溶解磷素，用玻棒搅动10分钟，然后倒入100毫升容量瓶中，用蒸馏水洗涤坩埚两次，洗得液收集于容量瓶中，再用蒸馏水定容至刻度，充分摇匀后，过滤，取其滤液。

3. 测定 吸取2 ml 上述滤液，注入干燥试管中，另取一支试管注入2 ml 蒸馏水作空白，向各试管加入5 ml 1N H_2SO_4 和2 ml 铁-钼酸试剂，摇匀，经15分钟后，以空白作对照，在72-1型分光光度计，波长660nm下比色，读取光密度，在标准曲线上查得相应磷含量。

4. 计算 设：A为标准曲线上查得的磷含量($\mu g/ml$)；

C为样品稀释后的体积(ml)；

W为样品重量(g)。

则得计算式如下：

$$\text{磷含量}(\%) = \frac{A \cdot C}{W \times 10} \times 100$$

四、注意事项

1. 反应在酸性条件下进行， H_2SO_4 的浓度以0.5—1.0 N为宜，因为在这个范围内被还原的钼的颜色(蓝色)最深，若 H_2SO_4 浓度低于0.4N，或高于1.2N，颜色的深度便大大下降。

2. 磷钼酸最适宜的还原剂是二价铁离子，在几小时内

406596

它只与磷钼酸反应，而不与钼酸起反应，也不与磷酸结合。至于其它的还原剂(如氯化锡, 苯二酚, 抗坏血酸等), 因未与磷酸结合的钼被还原, 结果使颜色不断加深, 故不宜使用。

参 考 文 献

〔苏〕X.H.波钦诺克著, 1981, 植物生物化学分析方法, p31—35, 科学出版社。

(张北壮)

实验3 种子中肌醇六磷酸(Phytate)的测定

一、原理

肌醇六磷酸(phytate, myo-inositol hexaphosphate)是种子中主要的含磷贮藏物。它常与钾、钙、镁等金属元素结合而形成磷酸盐——植酸盐, 因此它也是种子矿质元素的主要来源。

本实验是依据在稀酸溶液中铁离子能与肌醇六磷酸形成稳定的复合物而发生沉淀, 定量收集这些沉淀, 用浓酸消化, 将它转化成无机磷酸。在酸性条件下无机磷酸与钼酸根形成磷钼酸复合离子, 在还原剂(抗坏血酸)作用下, 磷钼酸复合离子被还原成深蓝色的钼蓝(最大吸收峰在650—660nm处, 其溶液的蓝色深度与磷的含量成正比的原理。用比色法测定其磷含量, 再换算成肌醇六磷酸的含量。

二、材料与设备

1. 材料 豆类、谷物种子粉末(60—100目)1—2g。

2. 设备 100—150ml具塞三角瓶 25ml凯氏烧瓶
50—100ml容量瓶 离心机 离心管 恒温水浴箱 脂肪抽
提器

3. 药品 1.2%盐酸(内含10% Na_2SO_4 , W/V)。

0.6%盐酸(内含4% Na_2SO_4 , W/V)。

三氯化铁溶液(约4 mg三氯化铁溶解于0.6%盐酸溶液
中)。

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)分析纯。

10N浓硫酸。

65%高氯酸。

定磷试剂: 6N硫酸: 水: 2.5%钼酸铵: 10%抗坏血
酸=1: 2: 1: 1(V/V)。配制时按上述顺序加试剂,
现配现用。配好时试剂应呈黄绿色或黄色, 如呈棕色或深绿
色应弃去。

三、实验步骤

1. 脱脂 含油脂较多种子, 必须用脂肪提取器。分别
以5倍, 2倍, 1倍于材料的乙醚或石油醚(沸程30—60℃)
作溶剂, 在水浴上提取3次进行脱脂。除去材料中残存的溶
剂后, 即可用于肌醇六磷酸的提取。

2. 提取

(1) 上述材料应用1: 20(W/V)1.2%盐酸(内含
10% Na_2SO_4)浸提2次, 不时搅拌, 每次提取时间最少2
小时, 浸提液抽滤或离心, 并准确记录滤液的总体积。

(2) 取50ml上述滤液加等体积的蒸馏水稀释后, 从中
取出25ml, 再加15ml三氯化铁溶液, 混匀转入离心管内, 在
沸水浴上加热15分钟, 使形成的肌醇六磷酸铁沉淀完全, 在