

植物生理学实验指导

北京农业大学
农业生物学院
植物生理教研组

目 录

实验一、植物细胞的观测	1
实验二、植物液泡的观察	3
实验三、用染色法测定原生质的等电点	4
实验四、原生质运动的观察	5
实验五、叶绿体色素及其理化性质	7
实验六、叶绿体色素的分离——纸层析法	10
实验七、离体叶绿体的光还原反应	10
实验八、叶绿素的定量测定	12
实验九、植物光合强度的测定——改良半叶法	13
实验十、红外CO ₂ 法测定植物光合强度	14
实验十一、植物呼吸强度的测定	19
实验十二、呼吸商的测定	21
实验十三、植物呼吸酶的简易鉴定法	22
实验十四、植物组织中几种酶的组化定位	24
实验十五、植物组织水势的测定	26
实验十六、植物伤流液的成分分析	28
实验十七、气孔运动与钾离子迁移	30
实验十八、蒸腾强度的简易测定	31
实验十九、生理酸性盐和生理碱性盐	32
实验二十、植物的溶液培养与矿质元素缺乏症	33
实验二十一、硝酸还原酶活性的测定	35
实验二十二、根系活力的测定	37
实验二十三、种子生活力的快速测定	39
实验二十四、植物生长区域的测定	41
实验二十五、生长素类物质对根芽生长的影响	43
实验二十六、生长素的生理效应及生物鉴定法	44
实验二十七、用水稻幼苗法测定赤霉素类物质的浓度	46
实验二十八、赤霉素对 α -淀粉酶的诱导形成	48
实验二十九、细胞分裂素的保绿与阻止衰老的作用	50
实验三十、细胞分裂素对菜豆叶片生长和衰老的效应	51
实验三十一、用棉花幼苗外植体测定脱落酸的活性	53
实验三十二、用萝卜子叶增重法测定细胞分裂素类物质的浓度或效价	54
实验三十三、乙烯的生物测定—— <u>萘乙酸对幼根的“子事反应”</u>	55

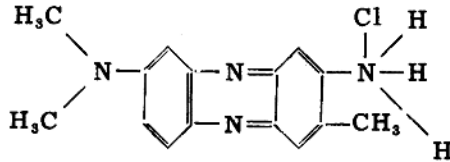
实验三十四、乙烯的催熟作用和对性别分化的影响.....	57
实验三十五、生长素和乙烯对叶片脱落的效应.....	59
实验三十六、开花刺激物在短日植物中通过嫁接的传递.....	60
实验三十七、不良环境对植物的伤害.....	63
实验三十八、植物缺水程度的鉴定.....	64
实验三十九、植物抗逆性的鉴定.....	65
实验四十、水分、有机物和气体运输途径的观察.....	67

实验一 植物细胞的观测

一、植物细胞的活体染色及死活鉴定

原理

活体染色是介于活观察和固定，切片染色之间的一种方法，是选用某些无毒或毒性较小的染色剂，显示出细胞内某些天然构造存在的真实性，而不影响细胞的生命活动和产生任何物理、化学变化以致引起细胞的死亡的方法。中性红是常用的活体染料之一，又是一种pH指示剂，变色范围在pH6.4—8.0之间（由红变黄），中性红分子式为：



在酸性及中性的范围内解离度很强，带色的阳离子现樱桃红色，在pH 7以上，它不解离而以分子态溶解于水呈橙黄色的溶液。生活的植物细胞，其含水分的纤维素细胞壁上往往有羟基，泡液呈酸性。如果用高于泡液pH的缓冲液配制的中性红溶液进行活染时，由于中性红在介质中已成解离态，其带色的阳离子很易被吸附在细胞壁上使壁显红色，而生活原生质和液泡均无色；如果在中性或微碱性的液体环境中，中性红分子便有进入液泡并呈解离形式的趋势，当中性红分子进入偏酸的泡液处，解离出带色的阳离子而呈玫瑰红色，累积在液泡里，这时液泡显色而原生质和细胞壁不着色；如果是死细胞，原生质体凝固并丧失半透性，桔红色中性红分子被吸附在原生质表面，表现为细胞核和细胞质着色，而液泡不着色；可根据这些现象鉴定细胞死活。

材料与设备

洋葱鳞茎、大葱叶基部分、小麦叶片等

显微镜一台、小培养皿一套、载玻片和盖玻片各2片、刀片1片、尖头镊子、粗滤纸和火柴（以一组为单位）

药品

0.03%中性红溶液：0.3g中性红溶于1000ml蒸馏水中。

实验步骤

1.取洋葱的内层幼嫩鳞片，用刀片在鳞片内侧纵横切割成 0.5cm^2 的小块，用尖头镊子将内表皮小块轻轻撕下，置于载玻片上，滴加清水后盖上盖玻片，在较暗的视野下进行镜检。仔细辨认成熟细胞的各个部分：①透明而界限清晰的细胞壁。②有颗粒状结构的原生质。③含有泡液的液泡。若用小麦叶片为材料时，可采1片叶片，将叶背面朝上平铺在载玻片上，再将此载玻片放入盛有少量清水的培养皿内，用左手将叶片按平，右手用刀片从一个

方向轻轻刮去下表皮和叶肉部分，只留下透明的一层上表皮细胞，然而将其切成约 1 cm^2 的小块。

2. 将制成的表皮小块放入盛有 0.03% 中性红溶液的小培养皿中染色 $5-10$ 分钟，然后取出浸入自来水中冲洗 5 分钟，选其中染色均匀的材料小块进行镜检，仔细观察经活体染色后的细胞各部分：①液泡部分（稍有收缩）被中性红染成均匀的玫瑰红色。②原生质及细胞壁仍为透明无色。这是由于自来水呈中偏碱性。

3. 将用中性红染色后的材料小块取出用蒸馏水冲洗后，在显微镜下观察，这时由于蒸馏水偏酸性，当进行染色后的活细胞用蒸馏水冲洗时，解离的中性红带色阳离子便吸附在细胞壁的一 OH 上，因此细胞壁现红色而原生质体和液泡均不着色。

4. 在上述制片中寻找个别死细胞，可见原生质体被染色成不均匀的橙黄色，另取制片放在载玻片上在酒精灯火焰上微微加热使细胞致死，在显微镜下观察可见死细胞内原生质体凝结成不均匀的凝胶状，它与细胞核均被染成桔红色。

二、质壁分离及质壁分离复原

原理

生活细胞的原生质体及质膜具有半透性，细胞内部还包含着一个大液泡，它具有一定的渗透势。当细胞与外界高渗溶液接触时，细胞内的水分外渗，原生质体随液泡一起收缩而脱离了细胞壁发生质壁分离现象；当细胞与低渗溶液接触时，细胞吸水发生质壁分离复原。死细胞没有这种现象，因此，可利用质壁分离及质壁分离复原现象来鉴定细胞死活。

植物细胞的质壁分离可有多种形式，如凸形、帽形等，如图 1 所示：

各种离子对原生质胶体的作用不同， K^+ 能提高原生质胶体的水合程度，因此凡经 K^+ 液作处理的细胞，再使其发生壁分离，开始原生质表面表现不规则地收缩，但逐渐由于 K^+ 的作用，原生质便缓慢地膨胀而成“帽”状凸出，这种形式的质壁分离称“帽”状质壁分离。

Ca^{++} 对原生质胶体的作用恰之与 K^+ 的作用相反，它能降低原生质胶体的水合程度，使之趋于凝胶状态，由于原生质的粘度增高，所以在发生质壁分离时，原生质的表面表现出凹凸不平，常称为凹形质壁分离。

材料与设备

同实验一，增加 1M 蔗糖溶液； 0.7M CaCl_2 溶液； 0.25M KCl 溶液。

实验步骤

1. 同上实验制取活染制片，在显微镜下确定活细胞的欲测视野后，在载玻片的一端轻轻滴加

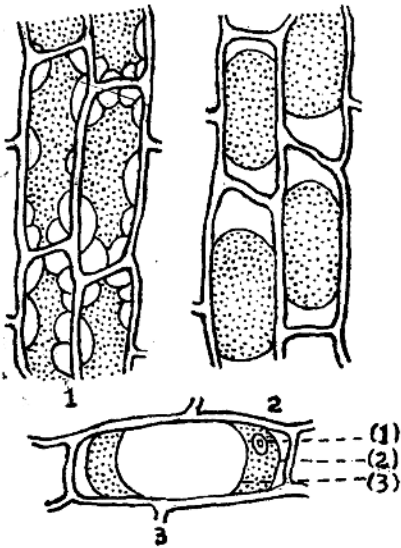


图1. 不同形式的质壁分离

1. 凹形质壁分离
2. 凸形质壁分离
3. 帽形质壁分离：(1) 细胞核；(2) 膨胀的原生质；(3) 液泡

一滴1 M蔗糖溶液，在载玻片的另一端用滤纸条吸引以使糖液引浸到全部制片上。处理的同时在镜下注意观察生活细胞发生质壁分离时其内部的变化：整个细胞首先发生轻微均匀地收缩，随着胞壁松弛，原生质逐渐自细胞角隅处脱离壁发生“初始质壁分离”现象。注意在原生质收缩的同时，有很多被撕扯的原生质丝（称Hecht线）仍将“质”与“壁”联系着，这表明生活原生体本是紧贴着细胞壁的，由于细胞脱水，原生质也随着发生不均匀的收缩，使原生质细丝残留下来。

2. 在制片一端滴加清水，在另一端用滤纸将水吸引到全部制片上，仔细观察质壁分离复原现象。

3. 取实验一制备活染制片，然后将制片分别浸入0.7M的CaCl₂与0.25M的KCl溶液内，浸泡半小时后，取出置于载玻片上，盖上盖片，再滴加1 M的蔗糖溶液使之发生质壁分离，仔细观察质壁分离的不同形式。

若轻轻挤压已发生质壁分离的细胞，由于液泡破裂，有中性红着色的泡液流出，中性红遇K⁺或Ca⁺⁺后立即形成暗红色小颗粒，布满整个细胞腔。生活无损的细胞则无此现象。

思考题

1. 根据实验结果，说明活细胞与死细胞原生质性质有哪些不同？如何加以区别？
2. 在用中性红活染时，用自来水（pH 7 以上）冲洗浸泡与用蒸馏水（pH 7 以下）效果有何不同？为什么？
3. 死细胞为什么不能发生质壁分离及质壁分离复原？

实验二 植物液泡的观察

一、小麦幼根中液泡的形成

材料和设备

萌发的小麦胚根、显微镜、载片、盖片、镊子、滴管、刀片、0.3%中性红溶液、小培养皿

实验步骤

切取萌发小麦胚根尖端（约距尖端1 cm左右），浸入中性红溶液中进行活染10—15分钟，然后取出用自来水冲洗5—10分钟，撕取表皮（或作断根纵剖面于显微镜下进行镜检。可见：在分生区胚性细胞里有少量零星的小红点，表示液泡已开始形成；进入伸长期的细胞内有红色网状交错的液泡结构；在成熟段的细胞里，则有一个很完整的大型液泡，一般位于细胞的中央。

二、液泡的分离

材料与设备

紫洋葱、紫萝卜叶、0.5M蔗糖溶液、小镊子

实验步骤

撕取紫色洋葱或萝卜叶片表皮，置于载玻片上，稍滴加清水后盖上盖玻片，于显微镜下观

察制片中的细胞，若细胞其中有一个完整无缺的、含花青素的玫瑰紫色液泡，则用滤纸条吸引液体的方法连续滴加0.5M蔗糖溶液，使细胞发生强烈的质壁分离，随后用锋利刀片在与细胞纵轴垂直的面上截断，在显微镜下选择已剖开但原生质未受损伤的细胞处，再滴加少许蔗糖液，用小镊子轻轻压盖玻片，可见原生质破裂或脱离，而含有花青素的液泡被完整地游离出来。

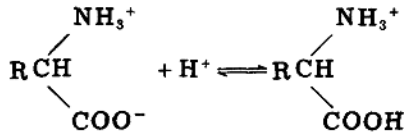
思考题

1. 试述植物液泡的结构与功能。

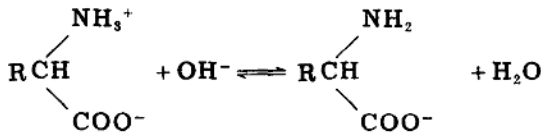
实验三 用染色法测定原生质的等电点

原理

原生质的主要组成物质——蛋白质为两性化合物，它在不同pH的介质中，其解离情况不同：（1）在酸性介质中：



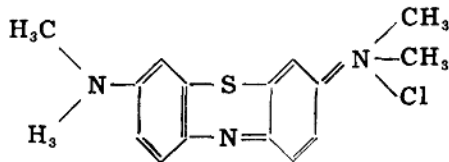
（2）在碱性介质中：



当介质的pH值愈小时，此物质的解离就趋向于（1）式，反之则趋向于（2）式，若在某一pH值下，此物质的离解程度达到平衡，这些外界介质的pH即为此物的等电点。

不同的植物组织，由于它们原生质组成不尽相同，所以具有不同的等电点。欲测植物细胞或组织的等电点，可采用染色法进行。

一般采用酸碱性不同的染料作为指示剂，常用的酸性染料有苯胺红、曙红等，这些染料的可色部分为阴离子；碱性染料有亚甲兰，靛兰等，亚甲兰（Methylene blue）分子式为：



它的有色部分为阳离子。

将待测的植物组织放入苯胺红和亚甲兰的混合溶液中，当介质的pH值低于组织的等电点时，带正电荷的原生质便吸附酸性染料的可色部分而现玫瑰红色；当介质的pH值高于组织的等电点时，带负电荷的原生质便吸附碱性染料的可色部分而呈兰色；当介质的pH值与

组织的等电点相等时，原生质的着色反应为红与兰的混合色——紫色。

植物组织的等电点并不固定在一个数值上，而是具有一定范围，常把这个范围称为植物组织的“等电区”。本实验则是根据上述原理测定植物组织的等电点。

材料与设备

四季豆黄化幼苗、蚕豆幼苗

5ml及1ml移液管、刀片、小培养皿、小烧杯、毛笔、镊子、粗滤纸

0.1M柠檬酸溶液、0.2M Na_2HPO_4 溶液、0.1%苯胺红溶液、0.1%亚甲兰溶液

实验步骤

1. 依下表配制不同pH的缓冲液，用不同pH的缓冲液按以下比例配制5ml混合染料，4ml缓冲液+0.5ml 0.1%苯胺红+0.5ml 0.1%亚甲兰溶液，分别盛在小培养皿中。

pH	0.2M Na_2HPO_4 (ml数)	0.1M柠檬酸 (ml数)
2.2	0.20	9.80
3.0	2.05	7.95
3.6	3.22	6.78
5.0	5.15	4.85
6.0	6.31	3.69
7.0	8.23	1.77

2. 取四季豆幼苗胚茎小段，作徒手切片36片用70%酒精固定5分钟，然后分别取出6片放入各个缓冲化的混合染料中染色20—30分钟。倾去染料，立即加入相应pH的缓冲液5ml，浸泡（以浸没组织为限），一小时后，观察各个缓冲液中的制片颜色的变化。取在等电区附近的制片，在光镜下观察，精确地比较植物组织的等电点。

〔附〕

本实验中的酸性染料亦可采用曙红，若用曙红进行染色时，不必配制不同pH值的缓冲化的混合染料，可直接取染色液（浓度有0.01M）等量混合，进行染色20—30分钟，然后将染片取出分别浸入相应pH的缓冲液内浸泡，半小时后，便可以取出染片鉴别组织的等电区。

思考题

1. 用染色法测定原生质的等电点的基本依据是什么？
2. 要获得比较准确的结果，在实验中应注意哪些问题？

实验四 原生质运动的观察

原理

在生活细胞内，原生质的活跃运动现象统称为原生质运动。原生质运动是生活细胞的重要标志之一。原生质可以在细胞内流动，也可以通过胞间连丝穿流于细胞与组织之间；有时

并非全部原生质都参与运动而仅限于局部细胞质,往往原生质表面的透明层(Hyaloplasm)处于静止状态。

原生质运动在所有生活细胞中均可见,但往往在某些特定材料中表现得特别明显。有时由于在制片时对材料的机械损伤,也会引起原生质发生强烈的运动。

原生质运动是生活体消耗能量而作功的生理过程,它与植物体内的物质运输及分配以及多种酶促反应密切联系。原生质运动有各种形式,一般将原生质运动归为两类:凡并非因外界环境的改变而引起的原生质运动,称为自发性的原生质运动;由于某种外界原因而引起的原生质运动称为诱发性的原生质运动。

本实验使用光学显微镜观察几种植物细胞原生质的运动现象;测定原生质运动的速度及观察呼吸抑制剂2,4-二硝基酚(DNP)对原生质运动的影响。

材料和设备

黑藻、轮藻、小麦幼苗(种子萌发2—3天根长1—2Cm)、紫鸭趾草(正在开花的)、洋葱鳞茎(未萌发的紫皮鳞茎)、南瓜叶片表皮毛或茎部表皮毛、粘菌的原生质团显微镜、载玻片、盖玻片、解剖针、镊子剪刀、沙布、擦镜纸、目镜测微尺、台尺、停表、滤纸

$5 \times 10^{-4}M$ 的2,4-二硝基苯酚溶液

实验步骤

1.观察几种植物细胞的原生质运动现象。

① 黑藻叶片的观察:用镊子取下黑藻幼嫩叶片放于载玻片上,滴加清水并盖上盖玻片,在显微镜下观察,寻找沿叶片中脉的部分;细胞中叶绿体随原生质沿胞壁移动(若室温低于 $20^{\circ}C$ 或阴天看不见原生质运动现象时,可用强光照射15—20分钟后再观察)。注意整个叶片中哪些部分原生质流动得最快,相邻两细胞中流动方向有何不同。

② 轮藻节间细胞的观察,取一致粘藻(含有两个以上的节),节间用水洗净后置于载玻片上,加盖玻片于显微镜下观察,由于轮藻节间外面常有沉积物附着不易看清,因此可先在低倍物镜下移动载片,找到合适的部分后再换高倍物镜观察,细胞中排列整齐的叶绿体并不移动,而原生质透明部分夹带着大小颗粒一起流动,小心地调动细螺旋仔細观察。

③ 小麦根毛的观察:将小麦根剪下放在载玻片上,加盖玻片在低倍镜下找到根尖以上的根毛区,然后在高倍镜下进行镜检,可以看到透明原生质夹带一些颗粒沿根毛细胞壁流动,注意根毛尖端和基部原生质流动方向的变化。

④ 紫鸭跖草雄蕊毛的观察:将正在开放或即将要开的紫鸭跖草的花剥开,用镊子取下几根雄蕊毛细胞,在显微镜下观察,可见细胞内的原生质以不固定的方向流动。

⑤ 洋葱鳞茎内表皮的观察:用镊子撕取洋葱鳞茎内表皮,在显微镜下观察,可看到细胞中原生质的运动。

⑥ 轻轻取下南瓜叶片表皮毛或茎部表皮毛,置于载玻片上,滴上清水后盖上盖玻片,于镜下进行镜检,可见原生质丝纵横交错地包在表面,原生质的运动可以其中小颗粒的位移作为指标。仔细观察原生质的运动方向及其通过胞间连丝穿流于细胞的情况。

⑦ 观察萌发的花粉管,可见原生质在花粉管中的环流现象。

2. 测定原生质运动的速度

可以原生质中某些颗粒的移动速度作指标来测定原生质的运动速度。但原生质颗粒大小不一，它的移动速度亦异，因此应尽量选用较小的颗粒，进行多次测定，求出平均值。

先将目镜测微尺装入目镜，将台尺一小格相当于 0.1mm 即 $10\mu\text{m}$ 置于载物台上，求出目镜测微尺每格相当于多少毫米（或微米），移去台尺。将植物材料放在显微镜下用同一物镜观察。转动目镜，使其中的测微尺与原生质的流动方向平行，用停表求出每走若干格（视植物材料而定）所需的时间，测10—20次求出平均值。

3. 呼吸抑制剂DNP（2,4-二硝基酚）对原生质运动的影响。

DNP能抑制呼吸过程中磷酸化过程，因而也就抑制了原生质的运动。由于原生质运动需要消耗能量，这要靠呼吸作用来提供。

反复将 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 的DNP滴加在载玻片的一端，在另一端用滤纸片吸引，10—20分钟后，可见原生质流动减缓甚至停止。

实验结果

1. 绘制几种植物细胞原生质运动的简图，并做简要说明。

2. 原生质运动速度的测定：

目镜测微尺____格台尺上____格等长。

目镜测微尺每一格有____微米。

思考题

1. DNP对原生质运动有何影响？有什么？

2. 原生质运动的动力是什么？

3. 常见的原生质运动方式有哪些？试描述其特点。

实验五 叶绿体色素及其理化性质

原理

叶绿体色素是参与光合作用的主要内在条件，普遍存在绿藻及高等植物的绿色细胞内，有数十种之多，包括三大类：叶绿素类，类胡萝卜素和藻色素类。

一、叶绿体色素的提取

原理

叶绿素在叶绿体内以其亲水部分（叶绿酸部分）与蛋白质结合，亲脂部分（叶绿醇部分）与类脂结合，纯碎的有机溶剂不能打破色素与蛋白质的联系，所以必须用能与水混溶的有机溶剂并有少量水存在时，才能将叶绿体色素提取出来。常用的有机溶剂是酒精，丙酮等。

材料与设备

干菠菜粉末、研钵、乙醇

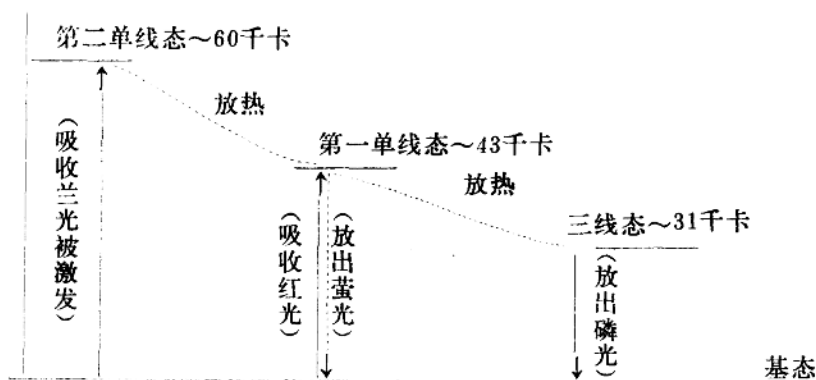
实验步骤

称取 3 g 干菠菜粉，放在研钵中加入 20ml 95% 酒精研碎，将研磨液用粗滤纸过滤，滤液即为叶绿体色素粗提液，为深绿色，内含叶绿素 a，叶绿素 b，胡萝卜素，叶黄素及其它脂溶性物质。保存此液备用。

二、叶绿素的荧光现象

原理

物质具有不同的能态，物质中的某些电子吸收了光量子的能量后，物质从原来稳定状态的能级跳跃到一个较高的能级。这种稳定状态被称为基态；电子从基态跳跃到较高能级的现象称为激发；激发状态的电子称为激发态电子。叶绿体色素分子吸收光量子后，使其分子内的电子跃迁而变为激发态，由于激发能未被适当的受体接受，被激发的电子便迅速回复到原来的能量水平，释放的能量除一部分转变为热能而损失，通常就释放出比原来吸收光的波长更长的荧光或磷光，如下图所示：



因此我们看到反射光（荧光）为暗红色，这种现象就称为荧光现象。当光透过叶绿体色素溶液时，被色素吸收了红光，剩下互补色绿光，所以透射光为绿色。

材料与设备

叶绿体色素提取液、光源（阳光或灯光）、试管数支

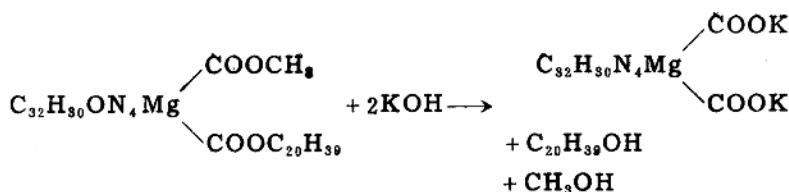
实验步骤

取叶绿体色素提取液少量，如果太浓可加少量 95% 酒精进行稀释，观察：透射光为绿色，反射光为暗红色，说明叶绿素具荧光现象。

三、叶绿素的皂化作用

原理

叶绿素是一种双羧酸的酯类物质，能与碱发生皂化反应而生成叶绿酸的碱性盐，其化学反应如下：



形成盐后，叶绿素的亲水性大大加强，可溶于稀酒精中。

材料与设备

叶绿体色素提取液、试管、移液管，
20% KOH—甲醇溶液、苯

实验步骤

取 3 ml 叶绿体色素提取液，加入 1 ml 20% KOH—甲醇溶液，充分摇匀。放置片刻后，加入 3 ml 苯和 1 ml 蒸馏水，混合后，得到二层溶液，上层有苯溶液，其中溶有胡萝卜素及叶黄素；下层有酒精溶液，其中溶有已皂化的叶绿素 a，b 及少量叶黄素。

另取 3 ml 叶绿体色素提取液，直接加入 3 ml 苯和 1 ml 蒸馏水，因叶绿素未经皂化，较易溶于上层的苯溶液层中；与皂化过的不同，在下层酒精溶液中，只溶有一部分叶黄素。

四、叶绿素与类胡萝卜素的吸收光谱

原理

由于叶绿素与类胡萝卜素的分子结构不同，它们具有不同的吸收光谱。类胡萝卜素吸收光收兰光，叶绿素吸收红光和兰光。

材料与设备

叶绿素和类胡萝卜素提取液、分光镜、光源、有色铅笔

实验步骤

首先调节分光镜，使能清晰地观察到光源的连续光谱，然后分别观察叶绿素和类胡萝卜素提取液的吸收光谱。

将观察所得到结果用有色铅笔绘图表示，并说明这两类色素在光谱中吸收区域有何不同。

五、氢和铜对叶绿素中镁的代替作用

原理

叶绿素分子具有卟啉环，它的镁离子位于卟啉环的中央，叶绿素分子较不稳定，遇酸后，中央的镁易被氢取代，在有其它重金属离子存在时，氢又易被其它重金属元素所取代。

材料和设备

叶绿体色素提取液、试管、烧杯、酒精灯、浓盐酸、醋酸铜结晶

实验步骤

取 5 ml 叶绿素提取液，加入一滴浓盐酸，搅动后可见溶液渐渐由绿色变为褐色，此时盐酸中的氢已经代替了叶绿素中的镁，形成了去镁叶绿素。

取一半去镁叶绿素溶液，加入少许醋酸铜结晶，徐徐加热，此时去镁叶绿素中的氢又被铜所取代，变为翠绿色。

思考题

1. 在用新鲜叶片提取叶绿体色素时，有什么要加入一定量的 CaCO_3 ？
2. 对着光源和背着光源观察时，叶绿素提取液的颜色为何不同？

实验六 叶绿体色素的分离——纸层析法

原理

叶绿体色素中的各种色素化学结构不同，因而它们的物理化学性质如极性，吸收光谱，溶解度等也不同。叶绿素和类胡萝卜素是酯类化合物，不溶于水仅溶于已烷、石油醚等非极性溶剂中，可利用不同色素在各种有机溶剂中的分配系数以及在吸附剂上被吸附程度的不同而将叶绿体色素分离开。

材料与设备

色层分析用滤纸、10cm直径的培养皿（底和盖的直径要求相同）；直径1cm的短玻璃管（长1.5cm）、汽油、苯

浓叶绿体色素提取液（提取方法同前实验）

实验步骤

取一张色层分析滤纸，剪成方形，其边长略大于培养皿的直径。另取1小条分析滤纸，搓成二公分的纸捻作为“灯心”。将浓叶绿体色素提取液滴在纸捻的一端，使之风干；连续滴二三次，待风干后将纸捻的点样端插入方形滤纸的中心，作为“灯心”。

另取大型培养皿一个，其中放一短玻璃管，管内盛有少量汽油约占玻璃管体积的1/2至1/3，加入一、二滴苯。将上法制备的“灯心”插入小玻璃管中，把培养皿盖好。

用滤纸制成的“灯心”借毛细管作用吸收溶剂，溶于溶剂中的色素随之向四周扩散，10—20分钟后可得到不同颜色的色素同心环；叶绿素a为兰绿色，叶绿素b为黄绿色，叶黄素呈鲜黄色，胡萝卜素则为橙黄色。

在作好的色环滤纸片上注明色素种类，附在实验报告内。

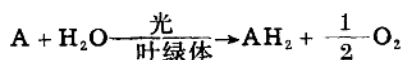
思考题

1. 指出纸层析上色素环各是什么色素？并说明为什么会出现这样的顺序。

实验七 离体叶绿体的光还原反应

原理

植物在照光条件下，由水和 NADP 产生 NADPH_2 ，还原力的产生是光合作用的重要步骤。如果给予适宜条件，离体的叶绿体也能产生这种辅助因子。本试验用离体的完整叶绿体，在照光条件下，还原某一氧化剂，放出 O_2 ，以证明叶绿体的光还原能力。



本试验用2,6-二氯酚吡嗪酚(DCIP)作氧化剂。它是一种蓝色染料,还原后变为无色,用分光光度计测定光密度的变化,可以表示叶绿体的还原能力。

材料与设备

新鲜菠菜叶。

纱布、研钵、离心机、三角瓶、烧杯、量筒、移液管、试管、玻棒、容量瓶、台灯(100W灯泡)、水浴、温度计、分光光度计、冰

药品:

0.35M NaCl、HCl、0.01M三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液pH 7.8、(10ml 0.2M Tris溶液+6.5ml 0.2M HCl、稀释至200ml)、(24.2克 $C_4H_{11}NO_3$ 定容至1000ml即得0.2M Tris溶液)、2,6-二氯酚吡嗪酚溶液(用提取用缓冲液配制成0.003%的DCIP溶液)

实验步骤

1.选健康的菠菜叶洗净,擦干剪去叶柄及粗脉,称10g鲜叶在冰浴中研磨。研磨时加入20ml 0.35M NaCl和2ml 0.01M Tris缓冲液及少量石英砂。(提取液应预先制冷)。

2.研磨成匀浆后,用四层纱布过滤于烧杯中。

3.取滤液在1000 rpm的速度下离心3—5分钟,弃去沉淀(未破碎细胞及组织残渣)。

4.上清液3000 rpm下离心7—8分钟,弃去清液(破碎的叶绿体及其它小颗粒部分)。将含有完整叶绿体的沉淀悬浮于20ml提取液中,于721分光光度计660nm处测定其光密度,调节光密度在1左右(用提取液调)。

5.取三支试管,分别编号,二号管包以锡纸(或黑纸,不能透光)各加入4.5ml提取用缓冲液及0.5ml叶绿体悬浮液,搅拌均匀。将1号管在沸水上煮沸15分钟,冷却至室温。分别向三支试管各加入5ml DCIP溶液,搅匀,三支试管同时在721分光光度计上620nm处测定光密度(以蒸馏水为空白)。

取1000ml的大烧杯,盛满水,保持温度在20℃左右,距离台灯1尺左右,使其与100瓦灯泡成一直线,把三支试管放入烧杯中,开灯,分别照1、3、5、7、10、15分钟,每次照光后进行比色测定。以后每隔10分钟比色一次。每次比色前均要用玻棒搅匀,使叶绿体充分悬浮。

结果

以光密度有纵坐标,时间(分)为横坐标作图,分析三种处理的结果。

叶绿体的还原能力的真实值以二号管的光密度减去三号管的光密度表示。

思考题

1.解释实验结果,其结果与光合磷酸化、光合作用关系如何?

2.为什么制备叶绿体时,提取液要预冷?

实验八 叶绿素的定量测定

原理

根据叶绿素的吸收光谱，通过测定特征波长下叶绿素溶液的光密度就可以测定叶绿素的含量，且能在未分离叶绿素a、b的情况下，分别测定叶绿素a、b的含量。

根据Lambert—Beer定律， $D = KLC$

L为液层厚度；K为该物质的吸收系数；C为百分浓度。

叶绿素a、b在红光区的最大吸收峰分别在663nm和645nm。在663nm时，叶绿素a、b的80%丙酮溶液的比吸收系数分别为82.0和9.27。在波长645nm下，分别为16.75和45.6，由此得出下列关系：

$$D_{663} = 82.04C_a + 9.27C_b \quad (1)$$

$$D_{645} = 16.74C_a + 45.6C_b \quad (2)$$

解方程(1)(2)得：

$$C_a = 12.7D_{663} - 2.69D_{645} \quad (3)$$

$$C_b = 22.9D_{645} - 4.68D_{663} \quad (4)$$

$$\text{叶绿素总量 } C_r = C_a + C_b = 20.2D_{645} + 8.02D_{663} \quad (5)$$

另外，由于叶绿素a、b在652nm处有相同的比吸收系数（均为34.5），也可在此波长下测定一次光密度（ D_{652} ）而求出叶绿素总量。

$$C_r = \frac{D_{652}}{34.5} \times 1000 \times \frac{1}{1000} \times \frac{\text{稀释倍数}}{\text{样品鲜重}} \quad (\text{mg/g}) \quad (6)$$

注：∵ $\frac{D_{652}}{34.5} \times 1000$ 单位为mg/升，乘以 $\frac{1}{1000}$ 可使式中的单位从mg/l变为mg/g。

材料与设备

菠菜叶或其它植物的新鲜叶片

丙酮、研钵、漏斗、天平、剪刀、烧杯、滤纸、量筒、分光光度计、500ml容量瓶

实验步骤

1. 称取鲜叶0.5克，剪碎置研钵中，加少量碳酸钙和石英砂，加入4.5ml蒸馏水，研成匀浆，再加入20ml 80%的丙酮，继续研磨至组织变白无绿色。将提取液倒入小烧杯，加少量丙酮冲洗研钵，静置数分钟，用一层加丙酮湿润过的滤纸过滤，再用丙酮将纸上色素冲洗干净，定容至50ml，摇匀。

吸取叶绿素丙酮提取液2ml，加80%丙酮2ml稀释后，倒入1cm比色杯中，以80%丙酮作对照，分别在645nm，663nm和652nm下测定光密度。代入(1)，(2)，(3)，(4)，(5)，(6)求出叶绿素的含量。

思考题

植物叶绿素的含量与其它生理过程特别是与光合强度有何关系？

实验九 植物光合强度的测定——改良半叶法

原理

根据叶中脉两侧结构及生理功能的相似性，可以先剪下半叶置于暗中，剩下的半叶待进行一定时间的光合作用后，有干物质积累，在隔断光合产物往外运输的情况下（即杀死韧皮部又不损伤木质部使水分等供应正常进行），再测定半叶的干重，二者之差为被测叶片在该时间内光合作用产物的积累量。

材料与设备

棉花、大豆

剪刀、打孔器、烧杯、天平、脱脂棉、纸牌、玻棒、称量瓶（铝盒）

药品

5%三氯乙酸

实验步骤

1. 选材：在田间选取生长状况较一致的棉花四株，在每株上选取部位对称性良好、厚薄均匀的无病虫害的功能叶片，依次编号挂牌。

2. 处理：在选定的叶片基部进行处理，以破坏韧皮部而保留木质部，使叶片依靠木质部得到足够的水分，同时光合产物又运不出去。

（1）环剥法：用刀片将叶柄的外皮环剥半厘米左右（适于韧皮部较厚且易剥离的植物）。

（2）抑制法：用棉球浸上5%三氯乙酸在叶柄基部涂一圈。

（3）烫伤法：用棉花球在90℃以上的开水中浸一浸，然后在叶柄基部烫一分钟，如果有明显的水浸状表示烫伤完全。对于韧皮部较薄，木质部不坚硬的植物用烫伤法好。但烫伤程度不易掌握，因此以蛋白沉淀剂三氯乙酸处理为宜。为了不改变叶片角度还可以用锡纸或塑料管包围之。

3. 剪取样品：叶片基部处理完毕后，即可剪取样品，记录时间，按顺序依次剪下半叶（主脉不剪下），按编号顺序夹于湿润的纱布中，贮于暗处。过四、五小时后，再依次剪下另半叶，同样按编号夹于湿润纱布中，两次剪叶的顺序一致，使各叶片经历相等的照光时数。

4. 称重比较：将各同位叶片的两半对应部位选在一起，在无粗叶脉处放入已知面积的模板，用刀片沿边切下两个叶块，分别置于照光及暗中的两个称量瓶中，或用打孔器（已知直径），在叶片上钻取20—40片园片（尽量少带叶脉），分别置于照光和暗中的两个称量盒中，在105℃下烘10分钟以杀死细胞，然后降到70—80℃烘3—4小时，至恒重为止。拿出铝合在干燥器中冷却后，方可称重。（准确到1mg）。

结果

设上午取的暗中的叶片重a克，经历光合作用后为b克，取样面积为 $A\text{cm}^2$ ，照光时间

间为 t ，则净光合速率为：
$$\frac{(b-a) \times 100}{A \times t} \text{ (mg/dm}^2 \cdot \text{hr)}。$$

思考题

1. 你认为哪一种处理叶片的方法较好？
2. 分析本法的优缺点。

实验十 红外CO₂法测定植物光合强度

原理

植物在单位时间单位面积上吸收的CO₂的毫克数称为光合强度。CO₂浓度可从通过红外线技术精确测量。CO₂对红外线有吸收作用，不同浓度的CO₂对红外线吸收程度不同，红外线通过CO₂吸收后能量发生损耗，其能量损耗量与CO₂的浓度成正比。红外线通过CO₂后的能量变化，经过电容器接收后，可转变为可以反映出CO₂浓度的电信号。知道实验前后CO₂的浓度差即可得到植物的光合强度。

材料与设备

盆栽或大田生长的植物叶片。

红外CO₂分析仪、调压变压器、无油空压机、照度计、温度计、电磁阀、定时闹钟、三通活塞、气体缓冲瓶、优质橡皮管（内径12—15mm）、止水夹、电风扇、叶室、水槽、调温仪、气体流量计、半导体点温计、碘钨灯、干燥管、全套装置如图2，洗耳球、橡皮泥、碱石棉、硅胶

1. 叶室：叶室是放置待测植株或叶片的装置，可以用有机玻璃制作而成。叶室大小和形状根据材料的大小和形状而定。如测定水稻，叶室需做成长50Cm、宽30Cm的长方形叶室。其中又分10个小室，每室中放一片叶子。为了防止叶室外气体干扰，叶室需要封闭。封闭用胶泥或气封均可。胶泥封是利用橡皮泥堵塞叶片插入口。这种方法操作不便，又易损伤待测材料。气封是使叶室不断有部分气流从叶片插入口吹出，使外界空气难于进入。采用气封法更换材料方便，且不易损伤叶面，是一种较理想的方法。气封式叶室是由4片约2mm厚的有机玻璃板制作而成的三层叶室。叶室中又由纵隔板隔成若干个小室。三层叶室的中间一层放置叶片，连有出气管，上下两层与进气管相通，作为进气流通的通道。由鼓风机送来的气流经上、下两层到叶片插入口，由于在插入口处夹层的收缩变窄，中层有机玻璃较窄，中间有机玻璃较短，在无油气体压缩机抽气时，气流分成二路。一部分从插入口排出叶室外形成气封；另一部分气流动经装有叶层的中层，从叶室尾端被抽出。为了防止叶片贴壁影响气体交换，可在装叶片的中层玻璃上贴一锯齿状有机玻璃支架。

2. 光合环境的条件控制系统：为了使测定条件尽量接近自然条件，对影响光合作用的各个因素如光强、温度、湿度、CO₂浓度等都要加以控制。

(1) 光源和光调节装置：室内测定使用的光源常为碘钨灯或氙气灯。碘钨灯价格较低，来源广，应用较多，但光谱中红外成分较多。氙灯的成分更接近太阳光谱，是较理想的