

植物生理学

实验技术

Zhiwu Shengli Xue
Shiyan Jishu



孔祥生 易现峰◎主编

 中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

植物生理学实验技术/孔祥生, 易现峰主编. —北京:
中国农业出版社, 2008. 2
ISBN 978-7-109-12482-0

I. 植… II. ①孔…②易… III. 植物生理学—实验—高
等学校—教材 IV. Q945-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 005229 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

责任编辑 蒋雨菲

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行
2008 年 2 月第 1 版 2008 年 2 月北京第 1 次印刷

开本: 720mm×960mm 1/16 印张: 22.75

字数: 405 千字

定价: 30.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

前 言

植物生理学是研究和揭示植物生命活动本质的一门理论性和实践性都很强的学科，它的发展与现代实验手段和实验技术的进步密切相关。因此，植物生理学实验是植物生理学课程的重要组成部分，是帮助学生把植物生理学课堂讲解的理论与实际结合起来，通过实践使学生掌握植物生理学基本实验技术及操作技能，验证、巩固、加深学生对基础理论的理解和认识，并在一定程度上扩充学生的理论知识，培养学生的动手能力，加强基本技能的训练，培养学生严格的科学态度，提高分析问题和解决问题的能力，促进学生创新意识的形成与综合素质的提高。

本书由河南科技大学多位长期从事植物生理学理论和实验教学的教师共同编写，在总结多年实践和研究经验以及参阅大量文献的基础上，历经两年时间编写完成。本书全面地介绍了植物生理学实验原理及其技术。全书分十二章，共设 107 个实验项目，着重介绍了植物细胞生理、水分生理、矿质营养、光合作用、呼吸作用、物质代谢、植物激素、生长发育、逆境生理、植物组织培养技术、电泳技术和层析技术等。涉及植物生理学的基本原理、基础知识和基本实验技能，以培养学生分析问题和解决问题的能力。附录部分包括各种常用数据表和常用试剂的配制方法等。本书第一章由易现峰编写，第二章、第九章、第十二章和附录由高双成和王世华编写，第三章和第十一章由黄华编写，第四章由戴凌峰和胥华伟编写，第六章由王征宏编写，第七章由杨月琴编写，第十章由孔祥生编写，最后由孔祥生教授和易现峰副教授组稿成书。

本书可以作为高等院校生命科学类专业实验教材，也可供学生毕业论文实践及农林院校与植物生理学相关的师生和科研人员参考。由于现代植

物生理学的内容广泛，又与多门学科交叉，加之编者的能力和水平有限，书中难免有不当和错误之处，敬请读者批评指正。

编者

2008年1月

目 录

前言

第一章 细胞生理	1
实验一 细胞生长的计量方法.....	1
实验二 植物细胞的质壁分离及死活鉴定.....	3
实验三 植物细胞的质壁分离与质壁分离复原.....	5
实验四 植物细胞质壁分离的不同形式.....	6
实验五 植物组织汁液 pH 的测定.....	8
实验六 植物组织等电点与耐酸力的测定.....	9
实验七 植物组织汁液缓冲性的测定.....	11
第二章 水分生理	14
实验一 植物组织汁液浓度的测定.....	14
附 1: 阿贝折射仪使用方法.....	15
附 2: 手持糖量计使用方法.....	17
实验二 植物细胞渗透势的测定.....	19
一、质壁分离法测定植物细胞的渗透势.....	19
二、冰点下降法测定植物汁液的渗透势.....	21
实验三 露点法测定植物叶片水势和渗透势.....	24
附: 露点微伏压计操作方法.....	26
实验四 植物组织中自由水和束缚水含量的测定.....	27
实验五 植物组织水势的测定.....	29
一、液体交换法测定植物组织水势.....	29
二、压力室法测定植物组织水势.....	32
实验六 蒸腾速率与保水力的测定.....	34
一、称重法测定植物叶片的蒸腾速率.....	34
二、保水力的测定.....	36
实验七 用恒态气孔计测定叶片蒸腾速率和气孔扩散阻力.....	37

实验八 气孔运动及其影响因素	42
一、显微镜下观察气孔运动	43
二、光诱导气孔的开启	44
三、钾离子对气孔开度的影响	44
四、保卫细胞内钾离子变化的观察	45
五、ABA 对气孔关闭的作用	46
实验九 植物组织含水量的测定	48
第三章 矿质营养	50
实验一 植物的无土培养和缺素症状	50
实验二 植物体内蛋白质氮和非蛋白质氮的测定	52
一、吲哚酚比色法	54
二、凯氏定氮法	55
三、纳氏比色法	58
实验三 植物体内硝态氮含量的测定	60
实验四 植物体内硝酸还原酶活力的测定	62
一、活体法	63
二、离体法	64
实验五 植物体内无机磷含量的测定	66
附：伤流液的收集	67
实验六 植物根系活力的测定	67
一、根系总吸收面积和活跃吸收面积的测定	68
二、氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法测定根系活力	70
附：甲醇浸泡法提取 TTC	72
第四章 光合作用	73
实验一 叶绿体色素的提取分离和理化性质	73
一、叶绿体色素的提取与分离	73
二、叶绿体色素的理化性质	74
实验二 叶绿体色素的定量测定	77
附：光合色素简便提取方法	80
实验三 叶绿素荧光和延迟荧光的测定与分析	80
一、叶绿体的分离	83
二、叶绿体被膜完整度的测定	84

三、叶绿体希尔反应活力测定	86
实验四 RuBP 羧化酶与 PEP 羧化酶的活性测定	88
一、RuBP 羧化酶活性的测定	88
二、PEP 羧化酶活性的测定	90
实验五 光合速率的测定	92
一、红外 CO ₂ 分析仪法	92
附：TPS-1 光合作用测定系统操作方法	100
二、氧电极法	103
实验六 光补偿点与光饱和点的测定	107
实验七 CO ₂ 补偿点的测定	109
实验八 光呼吸的测定	109
一、叶片光呼吸的测定	109
二、乙醇酸氧化酶活性的测定	111
实验九 植物净同化率的测定	113
第五章 呼吸作用	114
实验一 植物呼吸速率的测定	114
一、瓦氏测压法	114
附：瓦氏呼吸计的清洗与反应瓶体积的测定	116
二、红外仪法	118
三、氧电极法	119
四、酸碱中和法	120
实验二 植物细胞色素氧化酶活性的测定	122
实验三 抗坏血酸过氧化物酶活性的测定	124
实验四 多酚氧化酶活性的测定	124
一、氧电极法	125
二、比色法	125
实验五 植物组织中过氧化氢含量及过氧化氢酶活性测定	126
一、过氧化氢含量的测定	126
二、过氧化氢酶的活性测定	128
第六章 物质代谢	132
实验一 植物组织中可溶性糖含量的测定	132
一、还原糖的测定——3,5-二硝基水杨酸法	132

二、可溶性总糖的测定	134
实验二 植物组织中淀粉与纤维素含量的测定	137
一、淀粉含量的测定	137
二、纤维素含量的测定	139
实验三 植物组织中转化酶活性的测定	142
一、砷钼酸比色法	142
二、邻联苯胺比色法	144
实验四 谷物种子萌发时淀粉酶活性的测定	145
实验五 粗脂肪的定量测定	148
实验六 油料种子萌发时脂肪酶活性与脂肪酸含量的变化	150
实验七 脂肪氧化酶活性的测定	152
实验八 植物组织中游离氨基酸总量的测定	154
实验九 酰胺氮（谷酰胺、天冬酰胺和酰胺总量）的测定	157
实验十 植物体内谷氨酰胺合成酶活力的测定	158
实验十一 植物体内可溶性蛋白质含量的测定	160
一、考马斯亮蓝 G-250 染色法	160
二、斐林-酚试剂法	162
三、紫外吸收法	164
实验十二 谷物籽粒蛋白质的提取与分离	165
实验十三 谷物籽粒蛋白质含量的快速测定	166
一、改良双缩脲法	167
二、Folin-酚法	168
实验十四 植物组织中核酸含量的测定	170
一、戊糖比色法	170
二、定磷法	173
三、紫外分光光度法	175
实验十五 酚类物质含量的测定	176
实验十六 果蔬有机酸总量的测定	177
实验十七 烟叶中烟碱含量的测定	178
实验十八 高粱籽粒单宁含量的测定	180
实验十九 花色素含量的测定	182
第七章 植物激素	183
实验一 植物内源激素的提取、分离与纯化	183

实验二	生长素的生物鉴定——芽鞘伸长法	185
实验三	生长素对绿豆苗发根的影响	187
实验四	赤霉素对水稻幼苗生长的影响	188
实验五	赤霉素的生物鉴定——水稻幼苗法	190
实验六	细胞分裂素的生物鉴定——萝卜子叶增重法	191
实验七	ABA 对气孔关闭的作用	192
实验八	脱落酸对植物叶柄的脱落效应	194
实验九	乙烯的生物鉴定——豌豆黄化幼苗法	195
实验十	乙烯利对果实的催熟作用	197
实验十一	乙烯利对雌花的诱导作用	198
实验十二	植物生长延缓剂多效唑的壮苗效应	199
	一、浸种法	200
	二、喷施法	201
实验十三	吲哚乙酸含量的测定	202
实验十四	吲哚乙酸氧化酶活性的测定	203
实验十五	生长素类物质对根和芽生长的影响	205
实验十六	细胞分裂素对离体子叶的保绿效应	206
实验十七	作物生长的化学控制	209
实验十八	毛细管气相色谱测定脱落酸	214
实验十九	反相高效液相色谱法测定植物组织中的脱落酸	215
实验二十	气相色谱法测定乙烯含量	216
实验二十一	气相色谱法测定 ACC 和 MACC 的含量	218
实验二十二	气质联用 (GC-MS) 法测定内源赤霉素	220
实验二十三	高压液相色谱法测定内源细胞分裂素	224
实验二十四	荧光分光光度法测定吲哚乙酸	226
实验二十五	植物激素的免疫定量分析	229
第八章	生长发育	233
实验一	种子生活力的快速测定	233
	一、红墨水染色法	233
	二、BTB 变色法	234
	三、TTC 显色法	235
	四、荧光法	237
	五、碘-碘化钾反应法	238

实验二 光质对莴苣种子萌发的影响	238
实验三 花粉活力与花粉管生长的测定	240
一、花粉生活力的测定	240
二、花粉管生长的测定	242
实验四 植物根系过氧化物酶活性的测定	243
实验五 植物春化和光周期现象的观察	245
一、植物春化现象的观察	245
二、植物光周期现象的观察	246
第九章 逆境生理	248
实验一 植物细胞差别透性的测定	248
实验二 植物组织过冷点的测定	250
实验三 植物体内游离脯氨酸含量的测定	252
实验四 甜菜碱含量的测定	254
实验五 植物体内氧自由基的测定和清除	255
实验六 植物组织中丙二醛含量的测定	257
实验七 植物组织中超氧化物歧化酶活力的测定	259
一、氮蓝四唑 (NBT) 光化还原法	259
二、肾上腺素自动氧化法	261
实验八 抗坏血酸含量及抗坏血酸过氧化物酶活性的测定	263
一、抗坏血酸含量的测定	263
二、抗坏血酸过氧化物酶 (AsA-POD) 活性的测定	264
实验九 植物组织中脂肪氧化酶活力的测定	265
第十章 植物组织培养技术	267
实验一 根尖培养技术	267
实验二 茎尖培养技术	269
实验三 胚培养技术	272
实验四 子房培养技术	274
实验五 胚珠培养技术	276
实验六 花药培养技术	278
实验七 花粉粒培养技术	280
实验八 细胞悬浮培养技术	282
实验九 原生质体培养技术	284

实验十 植物激素对愈伤组织形成和分化的影响	287
第十一章 电泳技术	291
实验一 纸上电泳	294
实验二 聚丙烯酰胺凝胶电泳	299
附 1: 小麦幼苗中可溶性材料蛋白的分离与过氧化物酶、 酯酶和淀粉酶的同工酶的鉴定	304
附 2: 用 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定植物蛋白质 的分子量	307
第十二章 层析技术	313
实验一 纸层析技术	314
附 1: 植物组织中游离氨基酸组分的纸层析法鉴定	317
附 2: 菜籽油脂肪酸组分的纸层析法鉴定	318
实验二 吸附柱层析技术	320
实验三 薄层层析技术	323
附: 植物组织中糖类组分的薄层层析法鉴定	326
附 录	328
附录一 植物组织培养常用的几种基本培养基	328
附录二 不同质量摩尔浓度下各种盐的等渗系数 (i 值)	329
附录三 一些常用的缓冲溶液	330
附录四 一般化学试剂的分级	337
附录五 实验中常见化合物的分子量	337
附录六 常用酸、碱和其他化合物的浓度	340
附录七 摩尔数与摩尔浓度	341
附录八 植物生理学中常用计量单位及其换算表	341
(一) 中华人民共和国法定计量单位 (部分内容) (1991. 1. 1 起执行)	341
(二) 常见非法定计量单位与法定计量单位的换算	342
(三) 基本常数	343
附录九 几种蛋白质的物理性质	343
附录十 用于生物研究的放射性同位素	344
附录十一 易变质及需要特殊方法保存的试剂	345

附录十二	各种冷却剂的组成及冷却效果表	346
附录十三	酸碱指示剂	347
附录十四	离心力和离心机转速测算公式	347
附录十五	光的能量单位之间的关系	347
附录十六	常见植物生长调节物质及主要性质	348
附录十七	植物激素和生长调节剂在农业生产中的应用	349
参考文献	351

第一章 细胞生理

实验一 细胞生长的计量方法

在进行植物组织培养和细胞培养研究中，常常需要对细胞数目、体积、大小、植板率，以及细胞的鲜重和干重进行计量，以便进行评价。

【原理】

借助于悬浮培养和显微测微尺等手段，可以定量叶肉细胞、原生质体、悬浮培养细胞及愈伤组织的生长速度。

【仪器与用具】

离心机；显微镜，镜台测微尺；目镜测微尺；烘箱；抽提瓶；计数器；血球计数板；分析天平；尼龙丝网。

【材料与方法】

1. 材料：烟草（或其他植物）的叶肉细胞、原生质体、悬浮培养细胞及愈伤组织。

(1) 摇匀细胞（或原生质体）悬浮液。

(2) 吸 1 滴细胞悬浮液滴至计数板上，将盖玻片由一边向另一边轻轻盖下，再用双手拇指紧压盖玻片两边，使盖玻片与计数板紧密结合，以防形成气泡。

(3) 经过 2~3min 后待细胞完全下沉至载玻片表面时即可用计数器在显微镜下计数，并换算成每毫升的细胞数。

2. 细胞体积：

(1) 取 15ml 悬浮培养细胞液，放入有刻度的离心管中。

(2) 在 $2000 \times g$ 下离心 5min。

(3) 以每毫升培养液中细胞体积的毫升数表示。

3. 细胞大小：一般以长度来表示，通常用目镜测微尺（装在目镜内的一种标尺，为一块直径 20~21mm 的圆形玻璃片，其上刻有直线标尺，长 5mm，分成 5 个大格，每个大格又分成若干个小格，计 50 个小格）和镜台测微尺

(一种特制的载玻片, 其中央为有刻度的标尺, 全长为 1cm, 共分 10 个大格, 每个大格又分成 10 个小格, 共 100 个小格, 每个小格长 $10\mu\text{m}$; 在标尺外围有一圆环, 便于找到标尺位置) 配合使用。

(1) 先将镜台测微尺放在载物台上, 调准焦距, 将标尺上的分度看清楚。

(2) 移动标本推动器使两个测微尺重叠在一起。

(3) 计算: 例如目镜测微尺上的 50 格等于镜台测微尺 68 格, 即等于 0.68mm ; 则目镜测微尺每格长为 $13.6\mu\text{m}$ 。

(4) 将镜台测微尺移去, 换上载有悬浮细胞(或原生质体)的玻璃片, 即可以目镜测微尺的实测格数乘以 $13.6\mu\text{m}$ 细胞的实际长度。

4. 细胞鲜重与干重: 常以每 10^6 个细胞或每毫升悬浮培养的重量来表示。

(1) 鲜重: 在琼脂培养基上培养的材料, 一般可直接取出称鲜重, 但要尽量少带培养基; 悬浮培养材料可放在预先称重的尼龙丝网上, 用水冲去培养基, 抽滤以除去细胞粘附的过多水分, 然后称重。

(2) 干重: 通常在 60°C 烘箱内烘 12h, 冷却后称重。

5. 植板率: 用平板法培养单细胞或原生质体时, 常用植板率表示能长出细胞团的细胞占接种细胞总数的百分率。根据铺平板时加入细胞培养液的毫升数乘以每毫升培养液中的细胞数来计算每个平板上接种的细胞数和计算每个平板上形成的细胞团数; 并将上述两个数值代入公式即可求出植板率。

【结果处理】

细胞体积:

细胞大小:

细胞鲜重:

细胞干重:

$$\text{植板率}(\%) = \frac{\text{每个平板上形成细胞团的数目}}{\text{每个平板上接种细胞的数目}} \times 100$$

【注意事项】

1. 细胞计数时, 血球计数板的凹槽深度应大于所测细胞的直径, 最好能深达 1.2mm , 比最大细胞的直径还大, 并能加快计量速度。

2. 通常, 当鲜重在 500mg 以内时, 培养细胞的鲜重与干重保持线性关系。

3. 在愈伤组织生长的早期阶段和活跃分裂的悬浮培养中进行分裂指数的测定是有意义的, 对于成熟的愈伤组织来说则意义不大。

【思考题】

如何标定和正确使用显微测微尺？

实验二 植物细胞的质壁分离及死活鉴定

死细胞和活细胞原生质的理化性质存在差别，如活细胞原生质的膜系统具有半透性，可与外界溶液构成渗透系统；活细胞可以主动积累某些溶质等，而死细胞的原生质则丧失了这些特征。在植物生理学研究中，经常需要鉴定细胞的死活。本实验介绍两种鉴定方法：活体染色法及质壁分离法，还可以通过对活体染色及质壁分离结果的观察，了解原生质的某些特性，如黏滞性、荷电性等，以加深对理论知识的理解。

【原理】

活体染色是利用某种对植物无害的染料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（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，进入液泡的中性红便解离出大量阳离子而呈现樱桃红色，在这种情况下，原生质和细胞壁一般不着色；死细胞由于原生质变性凝固，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。

【仪器与用具】

显微镜；小培养皿；载玻片；盖玻片；单面刀片；尖头镊子；酒精灯；火柴；擦镜纸；吸水纸。

【试剂】

0.03%中性红溶液；1mol/L 硝酸钾溶液。

【材料与方法】

1. 材料：选用洋葱鳞茎（或大葱假茎基部）及小麦叶片作材料。
2. 方法：

(1) 切下一片较幼嫩的洋葱鳞片，用单面刀片在鳞片内侧割划成 0.5cm^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（注意应将表皮内侧向下）。若用小麦叶片为材料，可将叶片背面朝上平放在载玻片上，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，只留下透明的上表皮细胞。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细胞，影响观察。除小麦外的其他禾本科植物也可用此法制备表皮细胞，将刮好的材料切成约 0.5cm^2 小块。

(2) 将制好的洋葱鳞茎内表皮或小麦叶片上表皮小块投入 0.03% 的中性红溶液中染色 $5\sim 10\text{min}$ ，取出 $1\sim 2$ 片，在蒸馏水中稍加冲洗，在载玻片上滴一滴蒸馏水，小心地将制片平展到载玻片上，加盖玻片，在显微镜下观察，可看到细胞壁被染成红色，而原生质和液泡均不染色，这是因为蒸馏水偏酸，在弱酸性条件下细胞壁带负电荷和染料阳离子发生吸附的结果。

(3) 将步骤 (2) 中的活体制片取出几片放入 pH 略高于 7.0 的自来水中浸泡 $10\sim 15\text{min}$ ，再置于载玻片上镜检，将发现细胞壁脱色，而液泡却被染成深红色，这是因为在溶液 pH 高于 7.0 的情况下，中性红分子的解离作用很弱，主要以分子状态存在，不易被细胞壁吸附，但较易透过质膜和液泡膜进入液泡，而植物的细胞液多呈酸性反应，进入液泡的中性红于是发生解离，将液泡染成樱桃红色。此时细胞核和原生质不染色。

为了确保中性红染色部位，可将上述洋葱内表皮染片浸入 1mol/L 的硝酸钾溶液中浸泡 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”，因而能清楚地区别开无色透明的原生质和染成红色的液泡。

(4) 将步骤 (3) 中的活体制片放在酒精灯火焰上微微加热，以杀死细胞，再在显微镜下观察，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) 在活体制片中仔细寻找，可能看到个别死细胞，其细胞核因被中性红染色而呈红色，清晰可辨。

【结果处理】

绘制看到的质壁分离的细胞。

【注意事项】

在获取表皮细胞时，刮去叶肉细胞力度要适宜，用力太重或太轻都会影响

观察结果。

【思考题】

质壁分离为什么可以用来鉴定细胞死活？其生物意义还有哪些？

实验三 植物细胞的质壁分离与质壁分离复原

已液泡化的植物细胞看作是一个渗透系统：原生质层相当于半透膜，液泡内含有一定数量的可溶性物质而具有一定水势。利用细胞的质壁分离与复原现象，可以进行这些生理现象的观察与测定，如：物质透过细胞壁和原生质的难易程度；判断细胞死活；测定细胞的渗透势；测定某种物质透入液泡的速度；测定原生质的黏滞性的大小等。此外，还可以解释施肥过多引起的“烧苗”现象。

【原理】

生长的植物细胞是一个渗透系统，活细胞的原生质及其表层分别具有透性，原生质层内部含有一个大液泡，具有一定的溶质势。当细胞与外界高渗溶液接触时，细胞内的水分外渗，原生质随着液泡一起收缩而发生质壁分离。其后，当与清水（或低渗溶液）接触，或当外面的溶质进入时，具有液泡的原生质体就又吸水而发生质壁分离复原。

【仪器与用具】

显微镜；小培养皿；载玻片；盖玻片；单面刀片；尖头镊子；酒精灯；火柴；擦镜纸；吸水纸适量。

【试剂】

0.03%中性红溶液；1mol/L 硝酸钾溶液；4mol/L (24%) 尿素溶液。

【材料与方法】

1. 取洋葱鳞片或小麦叶片，按本章实验二中的方法进行制片和活体染色。
2. 将染好色的制片置于载玻片上，盖好盖玻片，在显微镜下观察，可以看出明显的液泡染色，无色透明的原生质层则紧贴细胞壁（在细胞的角隅上可以看见）。
3. 从盖玻片的一边滴一滴 1mol/L 硝酸钾溶液，在对边用滤纸吸水，将硝