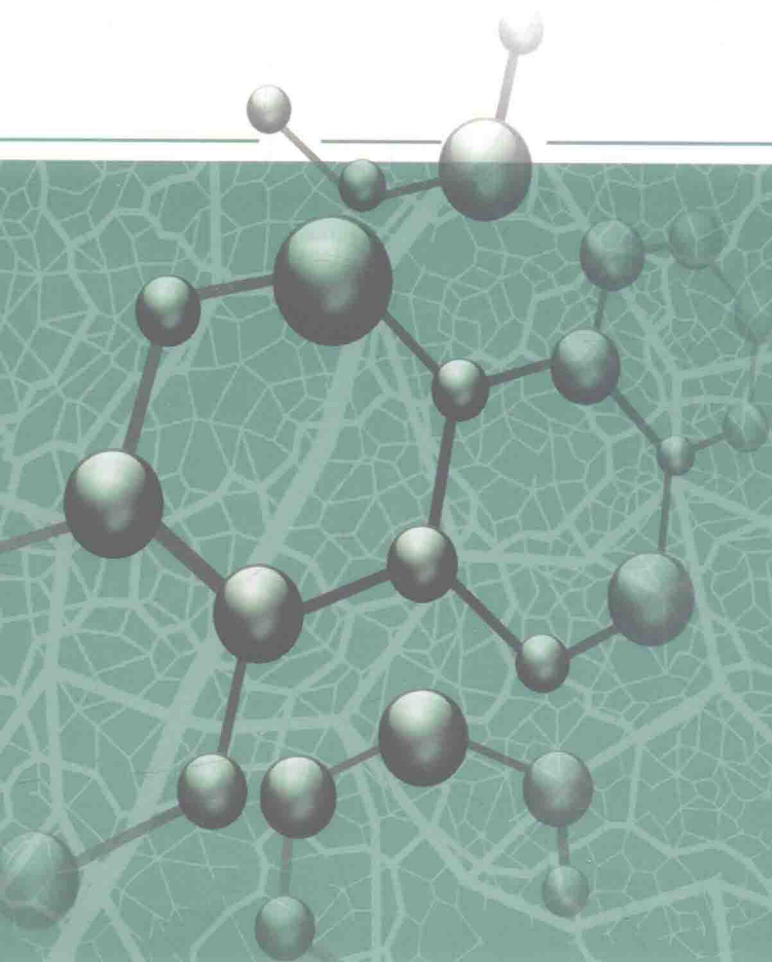


植物生理

与分子技术实验指导

毕玉蓉 何文亮 主 编



兰州大学出版社
LANZHOU UNIVERSITY PRESS

植物生理

分子技术实验指导

藏书

主 编 毕玉蓉 何文亮

副主编 王晓敏 赵志光 张 睿



兰州大学出版社
LANZHOU UNIVERSITY PRESS

图书在版编目 (C I P) 数据

植物生理与分子技术实验指导 / 毕玉蓉, 何文亮主
编. -- 兰州 : 兰州大学出版社, 2016. 9
ISBN 978-7-311-05014-6

I. ①植… II. ①毕… ②何… III. ①植物生理学—
实验—高等学校—教学参考资料②植物学—分子生物学—
实验—高等学校—教学参考资料 IV. ①Q945-33
②Q946-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第222051号

策划编辑 梁建萍
责任编辑 张 萍
封面设计 郇 海

书 名 植物生理与分子技术实验指导
作 者 毕玉蓉 何文亮 主编
出版发行 兰州大学出版社 (地址:兰州市天水南路222号 730000)
电 话 0931-8912613(总编办公室) 0931-8617156(营销中心)
0931-8914298(读者服务部)
网 址 <http://www.onbook.com.cn>
电子信箱 press@lzu.edu.cn
印 刷 白银兴银贵印务有限公司
开 本 787 mm×1092 mm 1/16
印 张 8.5(插页2)
字 数 183千
版 次 2016年9月第1版
印 次 2016年9月第1次印刷
书 号 ISBN 978-7-311-05014-6
定 价 16.00元

(图书若有破损、缺页、掉页可随时与本社联系)

实验 2-2 图

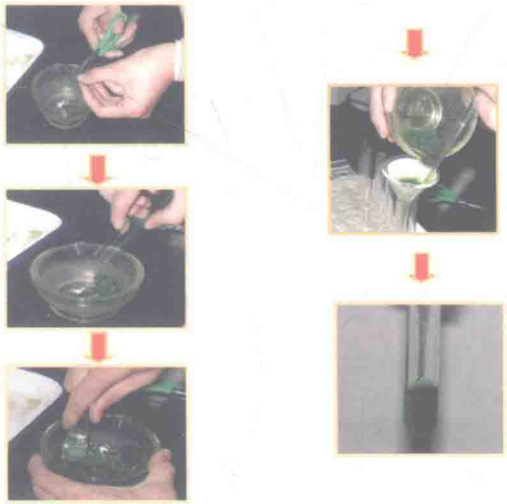


图 2 叶绿体色素的提取步骤



图 3 纸层析分离叶绿体色素



图 4 叶绿素的荧光现象

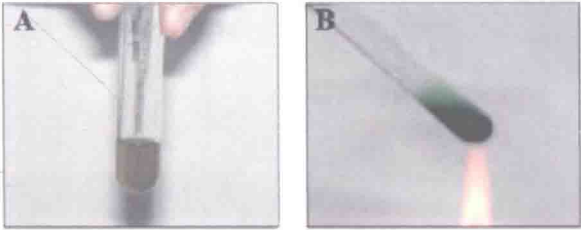
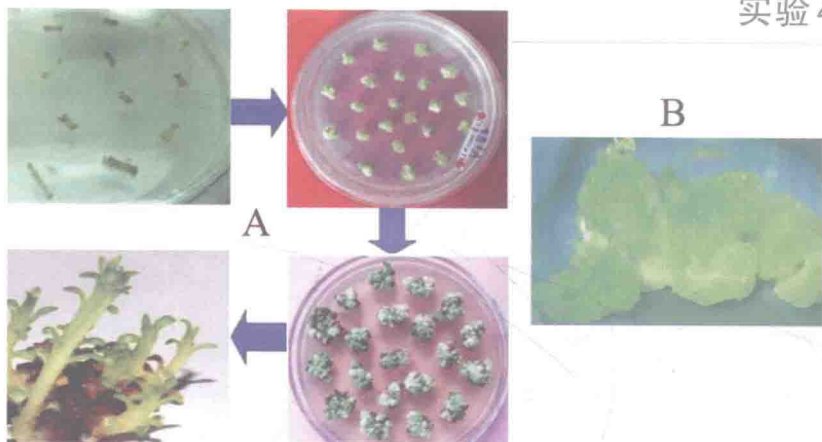


图 5 叶绿素的铜代反应



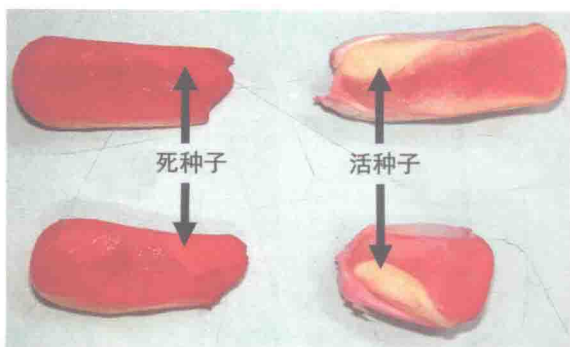
实验 3-1 图

图 1 滴定法测定植物组织的呼吸速率示意图



实验 4-3 图

图 1 植物愈伤组织的诱导及再分化过程及组织的形态



实验 6-2 图

图 2 红墨水法鉴定玉米种子的活力

前 言

植物生理学是高等院校各相关专业的重要基础课程,植物生理学实验技术是进行植物科学研究的重要手段和依据,掌握植物生理学的实验技术、基本原理以及研究过程,对了解植物生理学的基本理论非常重要。

开设植物生理学实验课程,不仅可以加深学生对植物生理学基本原理、基础知识的理解,而且对培养学生分析和解决问题的能力、严谨的科学态度,以及提高科研技能等都具有十分重要的作用。

为适应学校的教学改革,各相关专业人才培养方案中的植物生理学理论课与实验课的教学时数有所缩减。为此,我们从调整教学内容、更新教学手段方面入手,编写了这本《植物生理与分子技术实验指导》。

本书收集了水分生理、矿质营养、光合作用、呼吸代谢、植物激素、光控发育、逆境生理及植物分子生物学实验技术等方面的实验,涵盖了植物生理与植物分子生物学最常用且经典的技术方法,同时注重其与新技术的结合。

为兼顾不同专业对植物生理学知识与实验技能的需求,充分考虑学生的学习能力与兴趣差异,在传统的验证性实验的基础上,适当增加了一定比例的综合性、设计性实验,以便学生直接验证一些植物生理学理论知识,学会如何提出问题、解决问题,从而锻炼他们的协同工作能力和独立工作能力,培养严谨的科研作风和创新能力。实际教学安排可根据各专业要求,从中予以选择和调整。

本书编排合理,层次清晰,内容简练,方法实用。借鉴了一些优秀的教材与资料,参考了一些相关文献的图表。本书的编写与出版由兰州大学教材建设基金资助,并得到国家基础学科人才培养基金(J1210077, J1210033, 1103502)、教育部专业综合改革试点项目(生态学)、兰州大学教学研究项目和通识教育选修课项目的资助,在此一并表示诚挚的谢意!

由于编者的水平有限,不妥和错误之处在所难免,特别是近年来植物生理学实验技术的发展日新月异,使我们深感有必要不断充实和完善本书内容,敬请读者批评指正,以便今后修订。

编者

2016年6月

目 录

一、水分生理	1
实验 1-1 植物组织含水量的测定	1
实验 1-2 植物组织水势的测定(小液流法)	2
实验 1-3 植物的溶液培养及缺素症	4
实验 1-4 植物的单盐毒害及离子拮抗现象	7
实验 1-5 植物叶片蒸腾强度的测定	9
二、光合作用	11
实验 2-1 K^+ 对气孔开闭状态的影响	11
实验 2-2 叶绿体色素的提取、分离、定量及理化性质的鉴定	12
实验 2-3 类囊体膜的分离及希尔反应活性的测定	15
实验 2-4 叶绿体、类囊体膜制备及光合电子传递活性分析	17
实验 2-5 乙醇酸氧化酶活性的测定	22
三、植物呼吸代谢	24
实验 3-1 小篮子法测定呼吸速率	24
实验 3-2 植物完整线粒体的分离及其活性测定	26
实验 3-3 Chlorolab 2 液相氧电极测定植物组织呼吸速率	29
实验 3-4 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)活性的测定	33
四、植物激素	35
实验 4-1 细胞分裂素对萝卜子叶增大和叶绿素合成的影响	35
实验 4-2 赤霉素对 α -淀粉酶诱导合成的影响	37
实验 4-3 生长素与细胞分裂素对烟草愈伤组织根与芽分化的调控	40
实验 4-4 脱落酸与赤霉素对种子萌发的影响	44
实验 4-5 气相色谱法测定乙烯含量	47

五、植物代谢	49
实验 5-1 植物叶片花青素含量的测定	49
实验 5-2 植物组织中生物碱含量的测定	51
实验 5-3 植物组织中淀粉含量的测定	53
六、植物生长发育	55
实验 6-1 光形态建成抑制因子 PIFs 在诱导拟南芥下胚轴伸长中的作用	55
实验 6-2 种子活力的快速测定	59
实验 6-3 光质对种子萌发的影响	61
实验 6-4 花粉萌发和花粉活力的测定	62
七、植物逆境生理	63
实验 7-1 逆境对植物膜系统的影响	63
实验 7-1-1 质膜透性的检测(电导率法)	63
实验 7-1-2 膜脂过氧化程度的检测	64
实验 7-2 逆境对植物细胞活性氧含量的影响	65
实验 7-2-1 过氧化氢含量的检测	65
实验 7-2-2 超氧阴离子含量的检测	66
实验 7-3 逆境对植物细胞渗透调节物质含量的影响	67
实验 7-3-1 游离脯氨酸含量的检测	67
实验 7-3-2 可溶性糖含量的检测	69
实验 7-3-3 甘氨酸甜菜碱含量的检测	71
实验 7-4 逆境对植物细胞抗氧化酶系统的影响	73
实验 7-4-1 超氧化物歧化酶(SOD)活性的检测	74
实验 7-4-2 过氧化物酶(POD)活性的检测	76
实验 7-4-3 过氧化氢酶(CAT)活性的检测	77
实验 7-4-4 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的检测	78
实验 7-4-5 谷胱甘肽还原酶(GR)活性的检测	80
实验 7-4-6 谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性的检测	81
实验 7-4-7 单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)活性的检测	82
实验 7-4-8 双脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性的检测	83
实验 7-5 逆境对植物细胞抗氧化小分子系统的影响	84
实验 7-5-1 抗坏血酸含量与氧化还原状态的检测	84
实验 7-5-2 谷胱甘肽含量与氧化还原状态的检测	86

八、植物分子生物学技术	88
实验 8-1 植物核酸的提取和测定	88
实验 8-1-1 植物基因组 DNA 的提取和测定	88
实验 8-1-2 植物总 RNA 的提取	92
实验 8-2 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳	94
实验 8-3 基因克隆(RT-PCR)	97
实验 8-4 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	100
实验 8-5 质粒 DNA 的提取	103
实验 8-6 DNA 重组	105
实验 8-7 GFP 在大肠杆菌中诱导表达和细菌蛋白超声破碎抽提	107
实验 8-8 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测外源蛋白的表达	109
实验 8-9 拟南芥的遗传转化——浸蘸法	112
附录	114
附录 1 常用缓冲溶液的配制	114
附录 2 常用酸碱指示剂的配制	118
附录 3 基本常数	119
附录 4 常用酸碱试液配制及其相对密度、浓度	120
附录 5 常用有机溶剂及其主要性质	121
附录 6 常见植物生长调节物质及其主要性质	124
附录 7 植物组织培养常用培养基的成分	126

一、水分生理

实验 1-1 植物组织含水量的测定

一、实验目的与原理

含水量是反映植物水分状况的重要指标。植物组织的含水量不但直接影响植物的生长、气孔状况、光合功能直至作物产量,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。

植物组织含水量常以鲜重或干重来表示。在植物抗性生理研究中,植物组织含水量常用相对含水量来表示,该指标更能反映植物的生理状态。

二、实验仪器

天平、烘箱、剪刀、烧杯、称量瓶等。

三、实验材料

校园植物叶片。

四、实验步骤

1. 鲜重含水量测定

称取 0.5~1.0 g 植物组织(m_t),迅速剪成小块,放入已知重量的称量瓶中,先于 105 ℃烘箱中杀青 30 min,然后于 80 ℃烘干至恒重(m_d)。

2. 相对含水量的测定

称取 0.5~1.0 g 植物组织(m_t),将样品浸入蒸馏水中 1~1.5 h,取出后用吸水纸吸干表面水分,称重;再将样品浸入蒸馏水中 0.5 h,取出,擦干,称重,直至样品恒重,即得样品饱和鲜重(m_s);然后按照上一步方法烘干,称出干重(m_d)。

五、结果计算

鲜重含水量= $(m_t - m_d) / m_t \times 100\%$

干重含水量= $(m_t - m_d) / m_d \times 100\%$

相对含水量= $(m_t - m_d) / (m_s - m_d) \times 100\%$

实验 1-2 植物组织水势的测定(小液流法)

一、实验目的与原理

植物组织的水分状况可以用水势来表示。植物细胞之间、组织之间以及植物体与环境之间的水分移动方向都由水势差决定。当植物细胞或组织放在外界溶液中,如果植物组织的水势小于溶液的渗透势(溶质势),则组织吸水而使溶液浓度变大;反之,则植物细胞内水分外流而使溶液浓度变小;若植物组织的水势与溶液的渗透势相等,则二者水分保持动态平衡。

将植物组织分别放在一系列已知浓度的蔗糖溶液中,当找到某一浓度的蔗糖溶液与植物组织之间水分保持动态平衡时,则可认为此植物组织的水势等于该蔗糖溶液的水势。因蔗糖溶液的浓度是已知的,可以根据范德霍夫方程算出其渗透压,即溶液的渗透势(ψ_s),代表植物的水势(ψ_w)。

$$\psi_w = \psi_s = -iRTC_s$$

蔗糖溶液的特点:不易透过细胞膜;黏滞度高,小液滴不易扩散。

二、实验仪器与试剂

1. 实验仪器

打孔器、试管、胶头滴管、分析天平、青霉素小瓶等。

2. 实验试剂

1 mol/L 蔗糖溶液、亚甲基蓝粉末。

三、实验材料

校园植物叶片。

四、实验步骤

1. 将 1 mol/L 的蔗糖溶液分别稀释成 0.1、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.6 mol/L 的一系列蔗糖溶液,每种溶液体积 10 mL。

2. 取 9 个干燥洁净的青霉素小瓶,各瓶中分别加入配好的 0.1 ~ 0.6 mol/L 的蔗糖溶液约 3 mL;另取 9 个干燥洁净的 10 mL 小试管,将剩余的蔗糖溶液分别放入其中,上述各管(瓶)加标签注明浓度。

3. 取新鲜的植物叶片,去除表面水分和灰尘,用打孔器打成均匀的叶圆片,约 150 片左右,将其放入干燥洁净的培养皿中,混合均匀。

4. 每个青霉素小瓶放入 10~15 片叶圆片,并使其完全浸没于蔗糖溶液中,放置 10~15 min,为加速水分平衡,其间不断摇动青霉素小瓶。

5. 取出叶片,向青霉素小瓶中加入少量的亚甲基蓝粉末,摇匀。

6. 用细胶头滴管吸取各青霉素小瓶中蓝色的蔗糖溶液少许,将胶头滴管插入盛有对应

浓度蔗糖溶液的试管中部,小心地放出少量液体,观察蓝色液滴的升降动向。为减小误差,检测应由低浓度向高浓度方向进行。

7. 若蓝色液滴上升,说明浸过叶片的蔗糖溶液浓度变小(植物组织失水),表明叶片组织的水势高于该浓度糖溶液的渗透势;如果蓝色液滴下降,则说明叶片组织的水势低于该糖溶液的渗透势;若蓝色液滴静止不动,则说明叶片组织的水势等于该糖溶液的渗透势,此蔗糖溶液的浓度即为叶片组织的等渗浓度。

五、结果计算

将求得的等渗浓度值代入如下公式:

$$\psi_w = \psi_s = -iRTC_s$$

式中, ψ_s = 溶液的渗透势; C_s = 等渗浓度(mol/L); R = 气体常数[8.314 kPa·L/(mol·K)]; T = 绝对温度(273+t, t 为实验温度,单位℃); i = 解离系数(蔗糖=1)。

实验1-3 植物的溶液培养及缺素症

一、实验目的与原理

植物的正常生长发育,除需要充足的阳光和水分外,还需要矿质元素,否则植物就不能很好地生长发育甚至死亡。但要确定各种矿质元素是否为植物所必需,必须借助无土培养法(溶液培养和砂基培养法)。近年来,无土栽培在蔬菜、花卉生产中开始大规模应用。

用植物必需的矿质元素按一定比例配成培养液来培养植物,可使植物正常生长发育,若缺少某一必需元素,则会表现出缺素症。本实验的目的是学习溶液培养的技术,并证明氮、磷、钾、钙、镁、铁等元素对植物生长发育的重要性,并观察缺素症状。

二、实验仪器与试剂

1. 实验仪器

光照培养箱、分析天平、培养缸(瓷质或塑料)、pH计等。

2. 实验试剂

硝酸钾、硫酸镁、磷酸二氢钾、氯化钾、硫酸钠、磷酸二氢钠、硝酸钠、硝酸钙、氯化钙、硫酸亚铁、硼酸、碘化钾、硫酸锰、硫酸铜、硫酸锌、钼酸钠、氯化钴、乙二胺四乙酸二钠。

三、实验材料

7天龄玉米幼苗。

四、实验步骤

1. 根据表1、2、3配制大量元素、微量元素与铁盐。

2. 根据表4配制缺素培养液。为避免产生沉淀,配制时先加500 mL水,然后依次加入各储备液,调pH至6.0,最后定容至750 mL。

3. 培养:选取大小一致的7天龄玉米幼苗,去掉胚乳,以切断其自身的营养来源,并把切口处用流水冲洗干净。然后用塑料管及脱脂棉包裹茎部,固定于培养缸盖的孔中,每孔一株,光照培养。

4. 观察:培养期间要经常管理与观察,用蒸馏水补充缸中失去的水分,每隔一定时间(1周左右)更换培养液,4周后观察现象,记录叶片颜色、长度等指标,并拍照。

5. 注意事项

(1)溶液培养中,必须保证所用试剂、水、容器等干净,否则,会造成污染,从而影响实验结果的准确性。

(2)本实验溶液培养中,应注意给根系通气。当氧供应不足时,会影响直根系对营养物质的吸收,严重时,根系会腐烂。

(3)1周左右更换溶液,因为在培养过程中,溶液的成分和pH会不断发生变化,从而影响根系对某些营养物质的吸收。

(4)还应注意培养温度的合理控制,温度过高或过低均会影响植物的生长。

五、结果记录

记录指标	完全	缺 N	缺 P	缺 K	缺 Ca	缺 Mg	缺 Fe
整苗							
根							
茎							
叶							
其他							

六、溶液配制

表 1 大量元素

储备液 (100×)	单位 (g/L)	需配体积 (L)
KNO ₃	51	1.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	62	2
KH ₂ PO ₄	27	1.5
KCl	36	0.6
NaH ₂ PO ₄	24	0.3
NaNO ₃	42	0.6
Na ₂ SO ₄	36	0.3
Ca(NO ₃) ₂	82	1.5
CaCl ₂	55.5	0.3

表 2 微量元素

储备液 (200×)	单位 (g/L)
KI	0.166
H ₃ BO ₃	1.24
MnSO ₄ ·4H ₂ O	4.46/2.9143(无水)/3.38(一水)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.72
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.05
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.005

表3 铁盐

储备液 (200×)	单位(g/L)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.56
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.46

注: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 与 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 分别溶解后,再混到一起定容,否则溶解不了。

表4 完全与缺素培养液

母液(mL)	完全	缺N	缺P	缺K	缺Ca	缺Mg	缺Fe
KNO_3	7.5	—	7.5	—	7.5	7.5	7.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	—	7.5
KH_2PO_4	7.5	7.5	—	—	7.5	7.5	7.5
KCl	—	7.5	3	—	—	—	—
NaH_2PO_4	—	—	—	7.5	—	—	—
NaNO_3	—	—	—	7.5	7.5	—	—
Na_2SO_4	—	—	—	—	—	7.5	—
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	7.5	—	7.5	7.5	—	7.5	7.5
CaCl_2	—	7.5	—	—	—	—	—
微量元素贮备液	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
铁盐储备液	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	—

注:配制液最终用蒸馏水定容至 750 mL。

实验 1-4 植物的单盐毒害及离子拮抗现象

一、实验目的与原理

1. 实验目的

- (1) 认识培养液中各种离子及其浓度平衡的重要性;
- (2) 认识单盐毒害对植物生长的影响。

2. 实验原理

离子间拮抗现象的本质是相当复杂的,它可能反映不同离子对原生质亲水胶粒的稳定性、原生质膜的透性,以及对各种酶活性调节等方面的相互制约作用,从而稳定并维持机体的正常生理状态。

当我们在实验中用很纯的盐类配成单盐溶液时,常会破坏植物原生质的正常状态而发生毒害作用。即便是植物必需的营养元素,植物仍然会受到毒害以致死亡。如果在单盐溶液中加入少量的其他盐类,则会产生拮抗作用而消除或减弱这种毒害。

二、实验仪器与试剂

1. 实验仪器

分析天平、光照培养箱、pH计、温度计等。

2. 实验试剂

培养液 1: 0.12 mol/L KCl;

培养液 2: 0.06 mol/L CaCl_2 ;

培养液 3: 0.12 mol/L NaCl。

混合液 1: 0.12 mol/L KCl: 0.06 mol/L CaCl_2 : 0.12 mol/L NaCl = 100: 1: 2.2;

混合液 2: 0.12 mol/L KCl: 0.06 mol/L CaCl_2 : 0.12 mol/L NaCl = 2.2: 1: 100。

三、实验材料

小麦或玉米幼苗。

四、实验步骤

1. 实验前 3~4 d 选择饱满的小麦(或玉米)种子约 800 粒在水中浸泡 4 h 后,置于附有两层湿润纱布的瓷盘中,室温下萌发,待根长至 1~2 cm 时可以做材料。

2. 在 6 个烧杯中分别加入以下培养液: 0.12 mol/L KCl、0.06 mol/L CaCl_2 、0.12 mol/L NaCl、混合液 1、混合液 2、蒸馏水。培养液量应大于烧杯容积的 2/3,但也不能过满。实验重复一组。

3. 每个烧杯中挑选大小相似及根系发育一致的小麦(或玉米)幼苗 6 株,植入塑料泡沫片上的孔中,使根系接触到溶液,室温下培育。注意:培养期间要及时补充或更换培养液。

4. 2 周后,观察实验结果,比较并记录各溶液中小麦(或玉米)苗的根数、根鲜重、叶长、