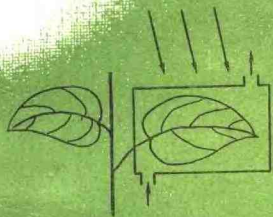


ZHIWUSHENGLIXUESHIYANJIUSHU

植物生理学实验技术

高等农业院校试用教材

张宪政
谭桂茹 主 编
黄元极
宋玉华



内 容 简 介

本书内容较为广泛,涉及到植物生理学各章的内容,所及实验既有目前的常规实验技术,又有一些新的现代实验技术和新的研究方法,以利进行多种实验技术的综合教学,便于读者在不同条件下,根据不同的要求和可能,选择不同的试验研究方法,满足教学和实际工作的需要。本书包括细胞生理、水分生理、矿质营养、光合作用、呼吸作用、植物激素、有机物质运输与转化、生长发育、逆境生理和附录等三个部分,共62个实验。

本书以高等农业院校农、林、园艺、特产、土化、植保等专业的本科生为主对象,可作为植物生理学实验指导书,并兼顾研究生、大专生、函授生和农林科技工作者的需要,可供教学和科研参考。

高等农业院校试用教材
植物生理学实验技术
Zhiwu Shenglixue Shiyan Jishu

张宪政 谭桂芬 黄元权 宋玉华 主编

辽宁科学技术出版社出版发行 (沈阳市南京街6段1里2号)

沈阳农业大学印刷厂印刷

开本: 787×1092 1/32 印张: 12.625 字数: 285,000
1988年6月第1版 1988年6月第1次印刷

责任编辑: 李贵玉 插图: 马云魁
封面设计: 邹君文

印数: 0001-6,000
ISBN7-5381-0724-X/S·102 定价: 4.10元

前 言

植物生理学是一门实验科学，植物生命活动的基本规律和生理过程的作用机理，都必须经过实验来验证，由实验研究所得的一些理性认识，要应用到生产实践中去更需要通过实验来实现。植物生理学实验技术的教学，不仅可以验证理论，加深对理论的理解，而且对培养学生分析问题和解决问题的能力，严谨的科学态度和提高科研技能等都具有十分重要的作用。另外，植物生理学实验技术还是科学研究和指导生产的重要手段。因此，学习和掌握植物生理实验技术，不但对农林院校的广大学生是重要的，而且对从事农林业科研和生产的科技工作者也是非常重要的。

近年来，植物生理实验技术的发展很快，许多农林院校和科研单位以及广大农村对植物生理实验技术的需要都很迫切，加之目前农业院校没有统编的实验课教材，所以我们组织了四所院校十多位有多年教学和科研实践经验的教师编写了这本“植物生理学实验技术”教材，以满足教学和科研的需要。

本书选编了细胞生理、水分生理、矿质营养、光合作用、呼吸作用、植物激素、有机物运输与转化、生长发育和逆境生理等方面的实验共有62个，同时考虑到不同读者的需要，对有些实验又选编了几种不同的方法，实验方法共计128种。在选编实验方法的过程中，我们以高等农业院校的本科生为主要对象，根据目前植物生理学和生物化学多数分别开设，植物生理学实验课也逐渐成为一门独立课程的实际情况，以及高等院校和农林科研单位的设备条件，既选编了

一些利用大型精密仪器的实验方法，也适当选编了一些设备简单、操作方便，适于基层科研单位开展科学研究的方法。力求使本书成为在校师生的一本较全面的植物生理学实验技术指导书，又能成为农林园艺广大科技工作者和函授生从事实际工作的参考书，以满足教学和科研中不同层次的需要。

本书由沈阳农业大学张宪政副教授担任主编，吉林农业大学谭桂茹副教授、延边农学院黄元极讲师、东北农学院宋玉华讲师担任副主编。本书的第一章和第二章由东北农学院宋玉华、徐仲、李文英编写。第三章和第五章由延边农学院黄元极、金锦子编写。其中第五章的§5—3节由沈阳农业大学张立军编写，第四章、第七章和附录由吉林农业大学谭桂茹、曹正菊、徐克章编写。第六章、第八章和第九章由沈阳农业大学张宪政、陈凤玉、邱润泽编写并参加全书校对工作，其中§8—2节由延边农学院黄元极编写。全书由张宪政统稿。

在本书的编写和出版过程中，得到沈阳农业大学基础部主任王学恕副教授的热情指导和帮助，书中插图由沈阳农业大学马云魁同志绘制，在此一并表示谢意。

由于时间仓促和水平有限，书中错误和不妥之处，衷心希望广大读者提出批评指正。

编 者

1989年4月

目 录

第一章 细胞生理	1
§ 1—1 植物细胞死活的鉴定	1
§ 1—2 植物细胞渗透势的测定	5
§ 1—3 植物线粒体的分离制备及其活性测定	11
§ 1—4 植物叶绿体的分离制备和希尔反应活力的测定	15
§ 1—5 植物组织汁液pH的测定	19
§ 1—6 植物组织汁液缓冲性的测定	20
§ 1—7 植物组织等电点的测定	22
第二章 水分生理	26
§ 2—1 鲜重含水量和干重含水量的测定	27
§ 2—2 自由水和束缚水的测定	29
§ 2—3 相对含水量和饱和和欠缺的测定	30
§ 2—4 植物水势的测定	32
§ 2—5 蒸腾强度和保水力的测定	44
§ 2—6 叶片扩散阻力和叶片导度的测定	49
§ 2—7 叶片气孔开度的测定	52
§ 2—8 叶片气孔密度和总面积的测定	55
§ 2—9 小孔扩散现象的观察	57
第三章 矿质营养	59
§ 3—1 植物的溶液培养及缺素观察	59
§ 3—2 植物根系对矿质营养的选择吸收	64
§ 3—3 单盐毒害和混合盐的拮抗作用	65
§ 3—4 植物根系活力的测定	67
§ 3—5 硝酸还原酶活力的测定	77
§ 3—6 植物伤流液的收集和伤流量的测定	82
§ 3—7 伤流液的成分分析	84

第四章 光合作用	97
§ 4-1 叶绿体色素的提取、分离及理化性质	98
§ 4-2 叶绿素a、b吸收光谱的测定	102
§ 4-3 叶绿素含量的测定	103
§ 4-4 植物光合速率的测定	111
§ 4-5 植物光补偿点和光饱和点的测定	132
§ 4-6 植物CO ₂ 补偿点的测定	131
§ 4-7 RuBP羧化酶活性的测定	135
§ 4-8 PEP羧化酶活性的测定	138
第五章 呼吸作用	142
§ 5-1 植物呼吸速率的测定	142
§ 5-2 呼吸商的测定	157
§ 5-3 植物光呼吸的测定	158
§ 5-4 植物呼吸酶活性的测定	163
§ 5-5 乙醇酸氧化酶活性的测定	168
§ 5-6 过氧化物酶活力的测定	171
§ 5-7 过氧化氢酶活力的测定	174
第六章 植物激素	179
§ 6-1 植物内源激素的提取、分离和纯化	180
§ 6-2 植物内源激素的生物鉴定	187
§ 6-3 植物生长调节物质的生理效应及其应用	209
第七章 有机物质运输与转化	212
§ 7-1 应用 ³² P测定磷在植物体内的运输与分布	242
§ 7-2 植物组织中核酸的测定	244
§ 7-3 植物组织中碳水化合物的系统测定	254
§ 7-4 植物组织中可溶性糖含量的测定(蒽酮法)	264
§ 7-5 维生素C含量的测定	267
§ 7-6 谷类作物种子中赖氨酸含量的测定	272
§ 7-7 果实、蔬菜中有机酸含量的测定	278

§ 7—8	谷物中蛋白质含量的快速测定	277
第八章	植物的生长发育	281
§ 8—1	种子生活力的快速测定	281
§ 8—2	光敏素对种子萌发的影响	292
§ 8—3	光周期诱导对植物开花的调节	297
§ 8—4	花粉活力和花粉管生长的测定	301
§ 8—5	植物叶片衰老指标的测定	306
§ 8—6	植物组织培养技术	314
§ 8—7	原生质体的游离和培养	319
第九章	逆境生理	329
§ 9—1	外渗电导法	329
§ 9—2	组织电阻法	339
§ 9—3	游离脯氨酸含量的测定	348
§ 9—4	植物组织过冷却点的测定	352
§ 9—5	植物组织中ATP含量的测定	356
§ 9—6	$N^+ - K^+$ ATP酶活化能的测定	362
	附 录	370

第一章 细胞生理

细胞是植物体结构与功能的基本单位，构成细胞有生命的部分是原生质，所以原生质的理化特性是决定植物生命活动的基础。用制片、染色、显微观察等方法，从宏观来鉴别细胞的死活；通过研究细胞原生质的pH、等电点、缓冲性、膜透性、原生质流动等来了解细胞原生质的理化特性；通过细胞匀浆化、分级离心、生理生化测定分析，来研究细胞内各主要细胞器的活力，从而在不同层次上研究细胞原生质体的理化特性和代谢能力，对于了解植物细胞乃至组织和植物体，在正常和逆境条件下的生命活动具有重要意义。

§ 1—1 植物细胞死活的鉴定

死、活细胞在其理化性质上有许多差别，如活细胞具有一定粘性、弹性和原生质流动的特性，并对外界溶液具有选择透性。

鉴定细胞死活看其是否具有植物所特有的细胞结构和功能，是细胞生理研究的基本内容之一。通过细胞死活的鉴定，有助于研究生长细胞的透性、电性、氢离子浓度等许多生理问题，在农业生产上对于研究冷、冻害对植物所造成的伤害以及薯块、鳞茎是否发芽等生理现象，都是必要的。

通过活体染色、质壁分离及原生质环流等实验，可初步掌握细胞死活的鉴定方法。

一、活体染色法

【原理】

所谓植物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。本实验所用染料中性红是一种弱碱性pH指示剂，pH6.8~8.0是中性红的显色转变界限，在酸性介质中其解离度很强，带色的阳离子呈樱桃红色。在碱性介质中则以分子态溶解为橙黄色。由于生活细胞具有一定的选择和分别透性，在中性或微碱性环境中可大量吸收中性红并向液泡中排泄，并且生活细胞的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的阳离子呈现樱桃红色，而原生质、细胞壁不着色。死细胞则分别透性消失，不产生液泡着色现象，相反表现为原生质与细胞核染色。

【材料、仪器、药品】

1. 材料

(1) 洋葱鳞茎；(2) 小麦或鸭跖草叶片。

2. 仪器

(1) 单面刀片；(2) 显微镜；(3) 钟表、镊子；(4) 凹玻板；(5) 载玻片；(6) 盖玻片；(7) 解剖针。

3. 药品

(1) 0.03% 中性红溶液；(2) $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KNO}_3$ 溶液。

【方法】

1. 制片：选取一片较幼嫩洋葱鳞片，用刀片在其内表皮上划出 0.5cm^2 左右的小块，用镊子将内表皮轻轻撕下，以内表皮向下浸入滴加在凹玻板内的中性红溶液中。

如果实验材料为小麦叶片则需将小麦叶片平置于载玻片

上放在水中，用单面刀片刮去上表皮、叶肉和叶脉。将下表皮浸入中性红溶液中染色。

2. 染色：制片于中性红溶液中染色10分钟取出（此时如果用蒸馏水稍加冲洗，镜检可见主要是细胞壁染色，原生质和液泡不染色）。将上述染色10分钟的制片立即转入自来水中浸10~15分钟，放于载玻片上，轻轻盖上盖玻片（注意排除气泡），在显微镜下可见细胞壁强烈脱色，而液泡被染成樱桃红色。细胞核和原生质则不染色。

3. 由于成熟细胞中液泡占的比例较大，几乎充满整个细胞，很难观察到无色透明的原生质，可在染色制片的盖片一侧滴加2滴 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KNO}_3$ 放置5~10分钟，在显微镜下仔细观察可见原生质强烈膨胀（出现帽状质壁分离）。能清楚地区别无色透明的原生质和染成红色的液泡。

4. 死细胞的观察：将上述活体染色制片放在酒精灯上微微加热杀死细胞。可见原生质凝结成不均匀的凝胶状，与细胞核一起被染成红色。

二、质壁分离复原法

【原理】

在生活细胞与外界溶液构成的渗透系统中，水分总是由高水势向低水势的方向流动。由于细胞原生质具有分别透性且液泡中存在一定溶质势，当细胞与外界高渗溶液接触时（例如放在一定浓度的蔗糖溶液中）细胞内水分外渗，原生质随液泡收缩而发生质壁分离。质壁分离的程度在一定范围内随着外液浓度增高而提高。此时，如果将细胞放入清水（或低渗溶液）中，则液泡吸水发生质壁分离复原。

【材料、仪器、药品】

略（见§1—1、一）。

【方法】

1. 将染色的洋葱内表皮制片（或小麦叶片的制片，见§1—1、一、方法1、2），加入1~2滴 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KNO}_3$ ，在显微镜下仔细观察质壁分离现象。自盖玻片一侧加入一滴清水于对边慢慢吸去水液，反复用滤纸引入清水，洗掉 KNO_3 溶液，观察质壁分离复原的情况。

2. 注意观察死细胞是否有质壁分离及质壁分离复原的现象出现。

三、原生质环流法

【原理】

原生质环流是植物组织中的细胞，特别是幼嫩细胞由于生理代谢和物质运转较为旺盛所引起的原生质活跃流动的现象。

原生质环流是一种复杂的生理现象，不同的植物细胞流动方式不同，速度也不同。最简单运动方式是：细胞质沿细胞壁不停的转动。有时在同一细胞中可能发现不同的细胞器沿相反方向运动。原生质环流，在不同环境条件的影响下反应不同。由于原生质环流所需要的能量来自呼吸作用，所以通过抑制呼吸作用，原生质环流的程度也相应受到抑制。并且不同的温度对原生质环流也有较大的影响。

【材料、仪器、药品】

1. 材料

(1) 新鲜的紫鸭跖草雄蕊花丝；(2) 发芽后1~2天的水稻或小麦根毛。

2. 仪器

(1) 显微镜；(2) 镊子；(3) 载玻片、盖玻片；(4) 台灯；(5) 剪刀；(6) 60~100瓦光源。

3. 药品： $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-二硝基酚溶液。

【方法】

1. 原生质流动的观察：用镊子取紫鸭跖草雄蕊花丝一根，置于载片上加蒸馏水一滴，盖上盖玻片，置于低倍镜下（显微镜最好以60或100瓦白炽灯为光源）观察原生质环流状况，并逐渐将光圈缩小，光线减弱，可见到细胞器呈发光的颗粒随原生质流动作循环运动。

2. 呼吸抑制剂对原生质环流的影响：在上述观察过原生质流动的载片上加一滴 $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-二硝基酚（解偶联剂）用滤纸在一端吸去蒸馏水，引入2,4-二硝基酚溶液，并反复重复几次，5~10分钟左右镜检。可明显看到原生质流动速度减弱直至完全停止的现象。

3. 低温对原生质流动的影响：将上述1观察过原生质流动的制片置于冰块上5分钟，然后将载片擦干后，置于显微镜下观察，这时看不到原生质的流动。若将载玻片置于恒温箱或白炽灯下，提高温度后再观察，则可看到原生质又恢复流动状态。

§ 1—2 植物细胞渗透势的测定

植物细胞内含有很多亲水物质，这些亲水物质和水发生很强的水合作用，使细胞内水的能量水平降低，从而引起外界高能量的水渗入细胞，这就是渗透作用。水分渗入细胞的一种潜在能量就是渗透势，它是渗透压的负值。渗透势的测定与研究，对于合理灌溉、施肥和植物抗性研究等都有重要意义。

一、质壁分离法

【原理】

当把植物细胞放入不同浓度的外液中时，便发生细胞吸水、失水或吸水与失水处于动态平衡三种情况。当细胞内汁液与某种浓度的外液处于渗透平衡，并发生初始质壁分离时，细胞内的压力势近似等于零，那么植物细胞液的渗透势即等于该溶液的渗透势，该溶液的浓度为等渗浓度。用一系列不同浓度的蔗糖溶液，观察细胞的质壁分离现象，找出产生质壁分离和不产生质壁分离的浓度，确定等渗浓度后，可根据公式计算其渗透势。

【材料、仪器、药品】

1. 材料：红色洋葱鳞茎、紫鸭跖草、红萝卜或其他有色素的植物叶片。

2. 仪器

(1) 显微镜1台；(2) 载玻片、盖玻片若干；(3) 温度计1支；(4) 镊子、刀片各1把；(5) 青霉素瓶若干；(6) 移液管、吸水纸若干；(7) 10ml试管9支。

3. 药品

1mol·L⁻¹蔗糖溶液：称取预先在60~80℃下烘干的蔗糖34.2g，先溶于适量的蒸馏水中，水浴加温溶解冷却后定溶到100ml备用。

【方法】

1. 配制蔗糖系列标准液：取干燥洁净的试管9支编号，并按表1—1配制不同浓度的蔗糖系列标准液各10ml。

2. 制备切片：取干净的青霉素小瓶9个，编号。分别加入不同浓度的蔗糖溶液各3毫升，并用塞子把瓶口塞紧。

用镊子撕取供试材料下表皮（若用其他材料，应先置于

0.01%中性红中染色5分钟，取出用滤纸吸干），迅速分别投入各种浓度蔗糖溶液中，每瓶3~5片，完全浸入5~10分钟；并记录室温。

表1—1 蔗糖系列标准液的配制

蔗糖浓度 (mol · L ⁻¹)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
水 (ml)	9.5	9	8	7	6	5	4	3
1mol · L ⁻¹ 蔗糖 (ml)	0.5	1	2	3	4	5	6	7

3. 镜检制片：从高浓度开始依次取切片材料放在载玻片上，加一滴原瓶内蔗糖溶液，加盖玻片。在显微镜下观察质壁分离情况，按顺序镜检各种浓度材料表皮。确定50%以上细胞原生质刚刚从细胞角隅上分离的浓度和与其相邻尚未发生质壁分离的浓度，平均值为等渗浓度。

4. 确定等渗浓度：在找到上述临界浓度时，用新的溶液和新切取的材料重复观察几次。严格确定初始质壁分离的蔗糖溶液浓度。此溶液为近似细胞的等渗浓度。

5. 计算细胞汁液的渗透势：由所得到的等渗浓度和测定的室温，可用下式计算在常压下，该细胞的渗透势。

$$\psi_s = -iCRT$$

式中

i ——解离系数，蔗糖等于1；

c ——等渗溶液的摩尔浓度（摩尔·升⁻¹）；

R ——气体常数（0.083升·巴·摩尔⁻¹·度⁻¹）；

T ——绝对温度（273+t）。

$\psi_s = -\text{摩尔} \cdot \text{升}^{-1} \times 0.083 \text{升} \cdot \text{巴} \cdot \text{摩尔}^{-1} \cdot \text{度}^{-1} \times \text{度} = \text{巴}$

1巴 = 10⁵pa = 0.1MPa

二、冰点下降法

【原理】

生物体有自动调节体内液体浓度以适应外界环境的能力，如植物处于低温、干旱等逆境条件下，通过酶的作用可将多糖等高分子物质分解成双糖、单糖等小分子的物质，从而提高了体内液体的有效浓度，使渗透势降低，冰点下降，以抵御外界的不良条件。所以由测定植物汁液的冰点下降值可以计算细胞渗透势值。

溶液的冰点下降值和它的浓度成正比。稀溶液的渗透势按 $\psi_s = -iCRT$ 公式，在标准状况下，1摩尔浓度的非电解质溶液所产生的渗透势为：

$$\begin{aligned}\psi_s &= -1 \times 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \times 0.083 \text{ L} \cdot \text{bar} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{k}^{-1} \times 273 \text{ k} \\ &= -22.7 \text{ bar} = -2.27 \text{ MPa}\end{aligned}$$

1摩尔浓度的非电解质稀溶液其冰点下降为 1.86°C ，所以未知浓度的非电解质稀溶液，其渗透势可根据冰点下降值按下式计算：

$$\psi_s = -\frac{2.27 \text{ MPa}}{1.86^\circ\text{C}} \Delta t = 1.22 \Delta t \text{ (MPa)}$$

式中 Δt 值即为所测冰点下降值。

【材料、仪器、药品】

1. 材料：植物叶片、马铃薯块茎等。

2. 仪器

- (1) 冰点降低测定器一套；(2) 贝克曼温度计1支；
(3) 普通温度计1支；(4) 组织捣碎机；(5) 离心机；
(6) 纱布、烧杯等。

3. 药品：粗食盐 (NaCl) 及冰块。

【方法】

1. 贝克曼温度计的调节：在测定冰点降低时，即使很小

的误差，就会引起计算结果很大的误差。所以要用更精密的贝克曼温度计来测量（一般可读到千分之二度）。

贝克曼温度计如图1--1所示。贝克曼温度计有上下两个

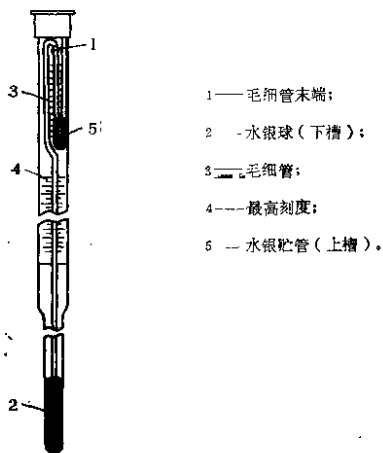


图1-1 贝克曼温度计

水银槽，两槽之间由一根很细的玻璃毛细管连通。毛细管侧面有一根5~6度的标度尺，最小分度为0.01度，因此温度读数准确度为0.02度。下水银槽的水银量，可根据所测温度的需要加以调节，使水银柱升降表示的读数落在标尺刻度范围内。贝氏温度计不能读出真正的温度值，只能测定温度差。

如测定以水为溶剂的冰点下降时，应调节下水银槽的水银量，使表示 0°C （纯水的冰点）的读数能落在标尺的 1.5° 附

近，表示溶液冰点的读数恰好落在标尺刻度范围内。

调正 0°C 位置的方法是把贝氏温度计放入冰水混合液中 (0°C) 使水银柱下降，如果水银柱不能达到 1.5° 位置，即表示水银量太少。若水银柱在 1.5° 以上，则表示水银太多。具体调节方法如下：

(1) 当水银太少时，可将温度计上端水银倒在上部毛细管上，用手握住下水银球，使水银柱上升与上部水银汇合。

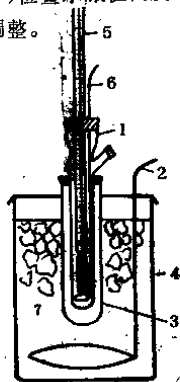
(2) 把温度计插入 2°C 左右的水中，水银开始收缩，当不再收缩时，取出温度计，右手握住温度计中部，左手轻轻敲打温度计上部，使水银从毛细管口断开，上方水银落在上水银槽中。

(3) 再将温度计插入 0°C 冰水中，检查水银柱高度读数是否落在合适的刻度上，否则要从头调整。

(4) 如水银太多，则直接将贝氏温度计放入 2°C 左右的水中，使柱内水银溢入上槽中，一分钟左右后轻轻敲断水银柱，放入冰水混合液中检查位置是否在 1.5° 附近。

2. 冰点下降测定仪装置：冰点下降测定仪装置如图1-2所示。

测定管内是用来装测定液的，将贝氏温度计固定在测定管中，并插入细搅拌环。再把测定管固定插入套管中。套管又固定在玻璃缸内并插入大



1.—测定管；2.—大搅拌环；
3.—套管；4.—玻璃缸；5.—贝
氏温度计；6.—细搅拌环；7.—
冰盐冷却剂。

图1-2 冰点下降测定仪