




全国高等农业院校教材

全国高等农业院校教材指导委员会审定



**植物生理生化**  
**实验指导**

● 农学类各专业用  
● 邹琦 主编

中国农业出版社

全国高等农业院校教材

# 植物生理生化实验指导

邹琦 主编

农学类各专业用

中国农业出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

植物生理生化实验指导/邹琦主编.-北京:中国农业出版社,1995.5(2000.3重印)

全国高等农业院校教材·农学类各专业用

ISBN 7-109-03414-3

I. 植… II. 邹… III. ①植物生理学-高等学校-教材②植物学:生物化学-实验-高等学校-教材 IV. Q945-33

---

出版人 沈镇昭  
责任编辑 张玉珍  
出版 中国农业出版社  
(北京市朝阳区农展馆北路2号)  
发行 新华书店北京发行所  
印刷 北京忠信诚胶印厂  
\* \* \*  
开本 787mm×1092mm16开本  
印张 7.25 字数 160千字  
版、印次 1995年5月第1版  
2000年7月北京第4次印刷  
印数 8601~11600册 定价 9.80元

---

书号 ISBN 7-109-03414-3/Q.205

## 前 言

本实验指导是根据农业部全国高等农业院校教材指导委员会 1989 年制定的“七五”—“八五”教材建设计划组织编写的。农业部曾于 1987 年开始，组织编写过一批全国高等农业院校教材。这些教材对于迅速恢复高校教学秩序起了很大的作用。当时，山东农学院和西北农学院共同承担了《植物生理学实验指导》一书的编写任务，1980 年由山东科技出版社正式出版，并为国内不少农业院校所采用。近十余年来，植物生理学与生物化学实验技术又有了很大进展，各农业院校仪器设备条件也有了改善。原书中一些内容已显陈旧，有必要加以修订和补充。农业部主持制定的教材建设规划，提供了修订原教材的机会。因此，本教材实际上是 1980 年版《植物生理学实验指导》的修订本。为了适应部分专业精减课程设置的需要，教材指导委员会确定编写一本《植物生理生化》教材。为了与这本教材配套，本次修订仍编入部分生物化学内容，并改名为《植物生理生化实验指导》，但其内容仍适用于单独开设植物生理学课程的农学类各专业。

实验课的目的是加深学生对基础理论的理解与认识，加强学生基本操作能力、基本技能的训练，培养严格的科学态度和提高分析问题与解决问题的能力，因而是高等学校教学过程的重要环节。实验技能的强弱，是学生培养质量的重要标志，面对科学技术飞速发展的现实，应当通过实验内容的更新使学生了解和接触更多的新技术和新方法。我们在这次编写时注意了以下几方面：

1. 删旧增新，体现实验技术的新进展。如删去原书中 pH 比色法测定光合速率，目视比色法测定叶绿素含量等。增加了红外线  $\text{CO}_2$  气体分析仪法测定光合速率，压力室法测水势，冰点渗透压计测渗透势，超氧化物歧化酶活力的测定等。这些方法所需仪器设备，目前均可在国内购到。

2. 对于方法虽简单但至今仍不失其启发作用和应用价值、并继续为大部分院校所采用的实验，则仍予以保留。如小液流法测水势，质壁分离法测渗透势等。

3. 删除了一些验证性实验项目。这些项目有的可在课堂上演示，也有的可通过第二课堂活动由学生自己完成。

4. 由于学时所限，本次修订已将篇幅适当压缩。但为了供不同院校根据实际情况对实验项目有所选择，没有作大幅度删减，在某些实验中，仍照顾到较简易的方法和需要精密仪器的方法并存。目前保留的 36 个实验项目，可供各院校选择使用。

5. 根据国家规定，本书一律采用法定计量单位。

本书的修订，是一项集体的成果。书中编入的实验项目都曾经许多同志多年教学实践的考验，这次编写时，又在实验方法的更新和技术改进上做了大量工作。除三位编者外，还有山东农业大学的郑国生、连恒才、赵世杰、彭涛、郑素琴、李德全、田纪春、孟庆伟、许长成、张元湖、冯东升、西北农业大学部分教师参加编写。插图均由彭涛同志精

心绘制。此外，在编写过程中，承蒙沈阳农业大学、北京农业大学、南京农业大学、浙江农业大学、四川农业大学等兄弟院校植物生理、生化教研室惠赠实验指导及有关资料。初稿完成后，经北京农业大学孟繁静教授仔细审阅以及北京农业大学、南京农业大学和华中农业大学的同行们对实验进行实测和验证并提出了许多宝贵意见，我们又根据审稿意见进行了最后修改。对于他们的关心和支持，我们表示诚挚的谢意。敬希使用本书的兄弟院校师生对本书的缺点错误继续批评指正，以便今后再次修订补充，使其日臻完善。

编 者

# 目 录

## 前 言

实验一 植物细胞的质壁分离及死活鉴定 .....	1
一、植物细胞的活体染色与死活鉴定 .....	1
二、植物细胞的质壁分离 .....	2
三、质壁分离的不同形式 .....	2
实验二 植物组织水势的测定 .....	4
一、小液流法 .....	4
二、压力室法 .....	5
实验三 植物细胞渗透势的测定 .....	7
一、质壁分离法 .....	7
二、冰点下降法 (冰点渗透压计) .....	9
实验四 植物组织汁液浓度的测定 .....	11
实验五 植物组织中自由水和束缚水含量的测定 .....	15
实验六 气孔状况的观察 .....	16
一、渗入法 .....	16
二、印迹法 .....	17
三、气孔密度和孔口总面积的测定 .....	18
实验七 蒸腾速率的测定——快速称重法 .....	19
实验八 伤流液的收集和伤流量的测定 .....	21
一、容积法测定伤流量 .....	21
二、重量法测定伤流量 .....	22
实验九 植物的无土培养和缺素症状 .....	23
实验十 植物体内硝态氮含量的测定 .....	26
实验十一 植物体内硝酸还原酶活力的测定 .....	27
一、活体法 .....	28
二、离体法 .....	29
实验十二 根系活力的测定 .....	30
一、根系总吸收面积和活跃吸收面积的测定 .....	30
二、氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法测定根系活力 .....	32
实验十三 叶绿体色素的提取、分离和理化性质 .....	33
一、提取与分离 .....	33
二、理化性质 .....	34
实验十四 叶绿体色素的定量测定 .....	36
实验十五 改良半叶法测定光合速率 .....	39

实验十六 红外线 CO <sub>2</sub> 气体分析仪法测定植物光合与呼吸速率 .....	41
一、光合速率的测定 .....	43
二、呼吸速率的测定 .....	45
三、CO <sub>2</sub> —光合曲线的测定 .....	46
实验十七 氧电极法测定光合速率和呼吸速率 .....	47
实验十八 广口瓶法测呼吸速率 .....	50
实验十九 植物组织中可溶性糖和淀粉的测定 .....	53
实验二十 萌发小麦种子内淀粉酶活力的测定 .....	56
实验二十一 植物组织中游离氨基酸总量的测定 .....	59
实验二十二 谷类作物种子中赖氨酸含量的测定 .....	62
实验二十三 植物体内蛋白质氮和非蛋白质氮的测定 .....	63
实验二十四 植物体内可溶性蛋白质含量的测定 .....	68
一、Lowry 法 .....	69
二、考马斯亮蓝法 .....	70
实验二十五 植物体内的酶促转氨基作用 .....	72
实验二十六 花椰菜总 DNA 的提取和电泳分离 .....	73
实验二十七 过氧化氢酶的活性测定 .....	76
实验二十八 植物可溶性蛋白和同工酶凝胶电泳 .....	78
实验二十九 植物激素类物质的生理效应及生物鉴定 .....	82
一、生长素类物质对根、芽生长的影响 .....	83
二、生长素的生物鉴定——芽鞘伸长法 .....	83
三、细胞分裂素的生物鉴定——萝卜子叶增重法 .....	84
四、赤霉素的生物鉴定——水稻幼苗法 .....	85
实验三十 作物生长的化学控制 .....	86
实验三十一 种子生活力的快速测定 .....	90
一、氯化三苯基四氮唑法 (TTC 法) .....	90
二、红墨水 (酸性大红 G) 染色法 .....	92
实验三十二 植物春化现象的观察 .....	93
实验三十三 植物生长的相关性 .....	93
实验三十四 植物组织逆境伤害程度的测定——电导法 .....	94
实验三十五 植物体内游离脯氨酸含量的测定 .....	96
实验三十六 超氧化物歧化酶活力的测定 .....	97
附录一 计量单位 .....	100
附录二 常用缓冲溶液的配制 .....	102
附录三 离心力 (g) 与离心机转速测算表 .....	106
附录四 不同质量摩尔浓度下各种盐的等渗系数 (i 值) .....	106
附录五 常见的生长调节物质及其主要性质 .....	107

## 实验一 植物细胞的质壁分离及死活鉴定

细胞是植物结构与功能的基本单位，而原生质则是细胞中有生命的部位。死、活细胞原生质的理化性质有显著差别，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。本实验练习两种鉴定方法：质壁分离法及活体染色法，同时还可以通过对比质壁分离及活体染色结果的观察，了解原生质的某些特性，如黏滞性、荷电性等，以加深对有关理论的理解。

### 一、植物细胞的活体染色与死活鉴定

〔原理〕 活体染色是利用某种对植物无害的染料稀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 之间（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分泌，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，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 1 台；小培养皿 1 套；载玻片 2 片；盖玻片 2 片；单面刀片 1 片；尖头镊子 1 把；酒精灯 1 具；火柴 1 盒；擦镜纸、吸水纸适量。

〔试剂〕 0.03% 中性红溶液； $1\text{mol}/\text{dm}^3$  硝酸钾溶液。

〔方法〕

1. 选用洋葱鳞茎（或大葱假茎基部幼嫩部位）及小麦叶片作实验材料。

2. 切下一片较幼嫩的洋葱鳞片，用单面刀片在鳞片内侧纵横割划成  $0.5\text{cm}^2$  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，其他禾本科植物均可用此法制备表皮细胞制片。将刮好的制片切成约  $0.5\text{cm}^2$  的小块。

3. 将制好的洋葱鳞茎内表皮或小麦叶片下表皮小块投入 0.03% 的中性红溶液中，染色 5~10min，取出 1~2 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，将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



子发生吸附作用的结果。

4. 将步骤3中的活体染色制片取出几片放入 pH 略高于 7.0 的自来水中浸泡 10~15min, 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。

为了确证中性红染色的部位, 可将上述洋葱内表皮染片浸入  $1\text{mol}/\text{dm}^3$  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。

5. 将步骤4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。

6. 在活染制片中仔细寻找, 可能看到个别死细胞, 其细胞核因被中性红染色而呈橙红色, 清晰可辨。

## 二、植物细胞的质壁分离

〔原理〕 成长的植物细胞一般具有中央液泡, 在中央液泡和细胞壁之间为细胞质的薄层及其内外膜——液泡膜和质膜。液泡中的胞液具有一定的溶质势(或称渗透势), 而活的原生质特别是液泡膜和质膜则具有半透性。所以, 当细胞与外界溶液接触时, 便与外液构成渗透系统, 并可能发生水分的移动。若外液的水势低于胞液的溶质势, 则水分外渗的结果可使原生质随着液泡一起收缩而脱离细胞壁, 发生质壁分离, 质壁分离的细胞与水或水势较高的溶液接触时, 可重新吸水而使质壁分离复原。

受到严重伤害或被杀死的植物细胞, 由于质膜和液泡膜失去了半透性, 不能在低水势溶液中发生质壁分离, 因此质壁分离法可用来鉴定细胞的死活。

〔仪器、用具、试剂〕 见本实验项目一。

〔方法〕

1. 取洋葱鳞片或小麦叶片按本实验项目一的方法进行制片和活体染色。

2. 将染好色的制片放在载玻片上, 盖好盖玻片, 在显微镜下观察, 可以看出液泡被染色, 无色透明的原生质体则紧贴细胞壁。

3. 从盖玻片的一边滴加  $1\text{mol}/\text{dm}^3$  硝酸钾溶液而在对边用滤纸吸水, 将硝酸钾溶液引入盖玻片下使与制片接触并立即镜检, 仔细观察质壁分离现象。

4. 观察到质壁分离后, 于盖玻片一边小心滴加清水, 于对边用滤纸慢慢吸去硝酸钾溶液, 反复几次, 以洗净硝酸钾。镜检, 仔细观察质壁分离复原的情况。质壁分离复原缓慢进行时, 细胞仍会正常存活, 如进行太快, 则原生质会发生机械损伤而死亡。

5. 另取一部分制片, 置载玻片上, 先在酒精灯火焰上加热, 以杀死细胞, 镜检细胞染色情况, 再引入硝酸钾溶液, 观察有无质壁分离现象发生。

## 三、质壁分离的不同形式

〔原理〕 植物细胞常因原生质体和细胞壁结合的紧密程度或原生质的黏性大小而表

现不同的质壁分离形式。质壁分离的主要形式有凸形和凹形两种，有时也把特别严重的凹形质壁分离叫做“痉挛式”质壁分离。质壁分离最初一般由凹形开始，以后或保持这一形式或逐渐转为凸形。保持凹形质壁分离的时间长短与原生质的黏性关系很大，凡是原生质黏性大的，能维持较长时间的凹形，甚至成为“痉挛形”，而原生质黏性很低的，则较快地转为凸形质壁分离。本实验观察由于  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$  离子对原生质黏性的不同影响而发生不同形式的质壁分离现象。 $\text{Ca}^{2+}$  能降低原生质水合度，使原生质黏性加大， $\text{K}^+$  正好相反。所以经  $\text{Ca}^{2+}$  处理后，发生凹形质壁分离，经  $\text{K}^+$  处理后则发生凸形质壁分离。当用  $\text{KNO}_3$  的高渗溶液进行长时间质壁分离时，由于原生质强烈膨胀，使原生质层变厚，似帽状包围在收缩的液泡两端，因此称为帽状质壁分离。此时能清楚地区别无色透明的原生质和染成红色的液泡（图 1）。

〔仪器、用具、试剂〕 同本实验项目一。另加  $1\text{mol}/\text{dm}^3$  氯化钙溶液。

#### 〔方法〕

1. 按本实验项目一的方法制取洋葱内表皮或小麦叶表皮活染制片各两份，分别置于载玻片上，一片滴加 1~2 滴  $1\text{mol}/\text{dm}^3$  硝酸钾溶液，另一片滴加 1~2 滴  $1\text{mol}/\text{dm}^3$  氯化钙溶液，盖上盖玻片立即进行镜检，可见钾盐溶液使细胞发生凸形质壁分离，放置约 10min 后可见帽状质壁分离；而钙盐溶液处理的则发生凹形或痉挛形质壁分离，经较长时间（15~20min）后，可能有部分细胞原生质全部离开细胞壁，原生质体受表面张力的影响而转变为凸形质壁分离，但绝不会发生帽形质壁分离，可与  $\text{K}^+$  处理的相区别。

2. 将观察到的凹形、凸形、帽形等不同形式的质壁分离，选择典型的细胞各绘一图，并解释实验观察结果及其原理。

#### 〔思考题〕

1. 渗透作用在植物生理上有何重要意义？
2. 质壁分离在细胞生理的研究上有哪些用途？

#### 〔参考文献〕

- [1] 山东农学院、西北农学院合编．植物生理学实验指导，1~8 页．山东科技出版社，1985
- [2] O.A. 华尔捷尔著，徐健安等译．植物生理学附生物化学原理实验指导，14~19 页、20~22 页，农业出版社，1966
- [3] 张宪政等．植物生理学实验指导，3~4 页．辽宁出版社，1989
- [4] 上海植物生理学会编．植物生理学实验手册，28~30 页．上海科学技术出版社，1985

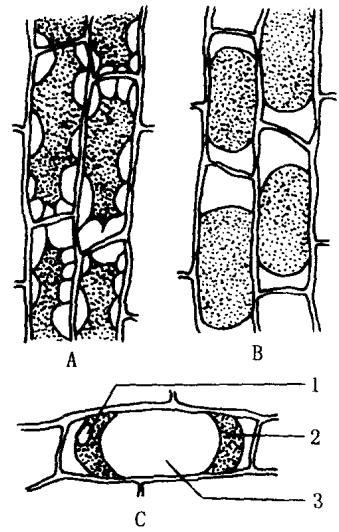


图 1 质壁分离的不同形式  
A. 凹形质壁分离 B. 凸形质壁分离  
C. 帽形质壁分离 1. 细胞核  
2. 膨胀的原生质 3. 液泡

## 实验二 植物组织水势的测定

### 一、小液流法

〔原理〕 当植物组织与外液接触时，如果植物的水势低于外液的溶质势（渗透势），则组织吸水而使外液浓度变大；反之，则失水而使外液浓度变小；若二者相等，则外液浓度不变。溶液浓度不同，则比重不同。当两个不同浓度的溶液相遇时，稀的由于比重小而上浮，浓的则由于比重较大而下沉。如果取浸过植物组织的溶液一小滴（为便于观察可先染色），放在与原来浓度相同而未浸植物组织的溶液中，就可根据液滴的升降情况而断定浓度的变化，如果小液滴不动，则表示溶液浸过植物组织后浓度未变，此溶液的溶质势即等于植物组织的水势。

〔仪器与用具〕 小液流法测水势装置 1 套，包括  $5\text{cm}^3$  试管 16 支，其中 8 支试管（甲组）附有软木塞，另 8 支（乙组）附有中间插橡皮头弯嘴毛细管的软木塞；特制试管架 1 个；面积为  $0.5\text{cm}^2$  左右的打孔器 1 个；镊子 1 把；解剖针 1 支； $5\text{cm}^3$  移液管 8 支；特制木箱 1 个（可将上述用具装箱携至田间应用）。

〔试剂〕 甲烯蓝（即亚甲蓝）粉末，装于小试管中；氯化钙溶液，包括 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40 质量摩尔浓度 8 种浓度。

#### 〔方法〕

1. 测定组织水势时所用的溶液，一般最常用的是蔗糖溶液。但也可用无机盐溶液，本实验用的是  $\text{CaCl}_2$  溶液。与蔗糖相比，无机盐溶液的优点是不会发生霉变，可在室温下久贮而不变质。

可先配制 1 质量摩尔浓度的  $\text{CaCl}_2$  溶液，配好后用 pH 指示剂或 pH 计测定溶液的 pH。如发现 pH 值小于 6 可用浓 NaOH 溶液将 pH 调整到 6。

2. 取干燥洁净的  $5\text{cm}^3$  试管 8 支（甲组），分别在各试管中依次加入 0.05~0.40mol/kg  $\text{H}_2\text{O}$  8 种浓度的  $\text{CaCl}_2$  溶液之一（浓度范围根据植物组织水势的大小而定），各  $4\text{cm}^3$  左右。另取干燥洁净的  $5\text{cm}^3$  试管 8 支（乙组），用同法分别加入 8 种不同浓度的  $\text{CaCl}_2$  溶液各  $0.5\text{cm}^3$ 。各试管标明浓度后，按浓度顺序将甲、乙组试管相间排列在试管架上。甲组试管塞好软木塞，以防蒸发。乙组试管上塞一支有橡皮头的弯嘴毛细管的软木塞，以便吸取溶液。全部试管装于一特制木箱内，以便田间测定。

3. 在试验植株上，选取数片叶子（如 8~10 片）放在一起，用打孔器打取圆片，每一孔打得 8~10 片，放入乙组试管内的一种浓度中，并使叶片全部被溶液浸没，盖紧软木塞。共打 8 次，将 8 支乙组试管放完为止（要注意操作迅速，以防水分蒸发）。放置 20min（如用蔗糖溶液，则应放置 30min 以上），并经常轻轻摇动试管，以加速水分平衡（温度低时应适当延迟放置时间）。为使叶圆片在各管间尽量一致，8 次打片可以这样做：对称叶在叶子中脉对称的两侧各打 4 次（4 孔），孔与孔间尽量靠拢。

4. 到预定时间后，按照放叶片的顺序在乙组的每一试管中用解剖针投入甲烯蓝（或

甲基橙)粉末微量,拌匀,使溶液着色。用毛细管吸取有色溶液少许,插入原为同样浓度的甲组试管中,使毛细管尖端在溶液中部,然后轻轻挤出有色溶液一滴使成小滴,小心取出毛细管(注意勿搅动溶液)插回原处,观察有色小液滴的升降动向。如果有色液滴上升,表示浸过组织的溶液浓度变小(即植物组织中有水排出),说明叶片组织的水势高于该浓度溶液的溶质势,如果有色液滴下降,则说明叶片组织的水势低于该浓度溶液的溶质势;如果有色液滴静止不动,说明叶片组织的水势等于该浓度溶液的溶质势;如果在前一浓度中下降,而在后一浓度中上升,则植物组织的水势为二种浓度溶液的溶质势的平均值。

分别测定不同浓度中有色液滴的升降情况(可从中间浓度开始),找出与组织水势相当的浓度,根据下列公式计算出该组织的水势。

$$\psi_s = -iCRT$$

$\psi_s$ ——溶液的溶质势,以 MPa 为单位;

$R$ ——气体常数  $0.008314 \text{ MPa} \cdot \text{dm}^3 / \text{mol} \cdot \text{K}$ ;

$T$ ——绝对温度,即  $273 + t^\circ\text{C}$ ;

$C$ ——溶液的质量摩尔浓度,1kg 水溶解 1mol 的溶质为单位;

$i$ ——溶液电解质的等渗系数,  $\text{CaCl}_2$  的  $i$  值可用 2.6 (附录四)。

5. 测定并比较不同条件,如植株或枝条上中下不同高度、不同土壤水分条件(应同时测定土壤水含量),一天不同时刻等条件下叶子水势,记录并分析结果。

#### 【注意事项】

1. 所取材料部位,组织大小要一致,不要取有伤口的叶片。
2. 带有结晶水的甲烯蓝不易溶于  $\text{CaCl}_2$  溶液中,可在  $100^\circ\text{C}$  下烘干成无水甲烯蓝粉末使用。

#### 【思考题】

1. 小液流法测定植物组织的水势及质壁分离法测溶质势都以外液浓度(即外液溶质势)为根据,方法相似,主要区别何在?
2. 小液流法测植物组织水势的优缺点如何?

### 二、压力室法

【原理】植物叶片通过蒸腾作用不断向周围环境散失水分,产生蒸腾拉力,使叶片木质部导管中的水柱具有一定的张力或负压。切下叶片,叶片木质部的液流由于张力的解除,迅速缩回木质部。将叶片装入压力室钢筒,叶柄切口朝外,逐渐加压,使导管中的液流恰好推回到切口处,表明所施加的压力抵偿了导管中的原始负压。或者说,加压值(平衡压)使叶片中的水势提高到相当于开放在大气中的导管中液体的渗透势  $\psi_{S(sap)}$ 。而通过活细胞的半透膜进入导管的汁液,其渗透势常接近于零。因此,若将所测得的平衡压加负号,就等于叶子原来的水势。三者之间的关系可用下式表示:

$$P + \psi_w = \psi_{S(sap)} \approx 0$$

式中  $P$ ——平衡压(正值);

$\psi_w$ ——叶片水势(负值);

$\psi_{S(sap)}$ ——木质部液体的渗透势。

〔仪器与用具〕 压力室目前国内有美、英、日进口压力室和国产压力室等多种型号，图2为压力室的基本结构；剪刀1把；双面刀片；放大镜。

〔方法〕 下面以美国土壤水分仪器公司生产的3005型压力室为例，介绍使用方法。

1. 顺时针方向旋紧调压阀，将调压三通阀转到“关闭”位置上，从压力室上取下夹样器，放在样品预处理板的凹槽内，打开高压气瓶的气封阀。在钢筒内侧粘附一层湿滤纸，以减少水分蒸发导致的水势降低。

2. 选取一定叶位的叶片，从叶柄处切断，切口要平。迅速装入密封垫的气隙中，切口露出垫圈2~3mm，旋紧螺旋环套。将夹样器放入钢筒内，顺时针方向旋转锁定夹样器。

3. 旋转调压三通阀到“加压”位置，打开调压阀，以每秒30~50kPa速度加压，左手持放大镜从侧面仔细观察样品切口的变化，当切口出现水膜时，迅速关闭调压三通阀，记录压力表读数，此即平衡压。

4. 旋转三通阀排气使压力读数降低0.1~0.2MPa再重新测定平衡压。如果两次测量所得平衡压值相近，其平均值即为被测样品水势的绝对值。

5. 把调压三通阀旋转到“排气”位置，放气、压力表指针退回至零。将夹样器逆时针方向旋转，取出夹样器，再进行第二个样品的测定。

〔注意事项〕

1. 装样时螺旋环套不要拧得太紧，以免压伤植物组织。

2. 加压速度不能太快，以每秒接近50kPa为好，接近叶水势时，加压速度要放慢，否则会影响测量精度，调压阀应尽量置于一固定位置上，以便一批样品承受同样的加压速度。

3. 注意安全，加压时不要使脸部处于钢瓶顶盖上方。钢瓶的搬运和使用要遵照钢瓶使用规定。

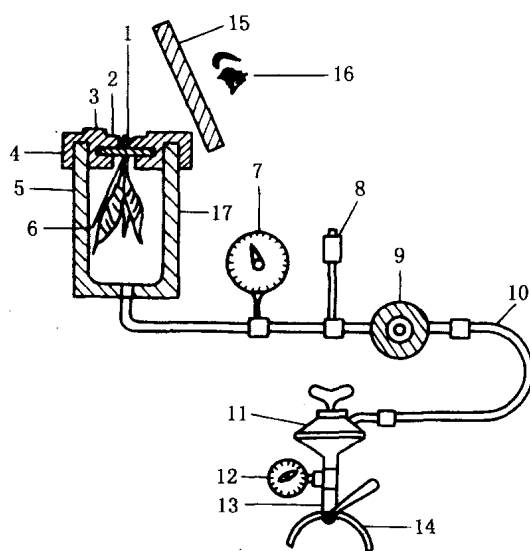


图2 压力室构造简图

1. 溢出液被观察到的地方
2. 压紧封口的环套
3. 高度抗强的钢螺栓
4. 外侧的螺丝压制环套
5. 缸壁
6. 软皮封口（或特制的硅橡胶密封垫圈）
7. 精密压力表
8. 调压阀
9. 调压三通阀
10. 柔韧的高压软管
11. 最大压力调节阀
12. 钢瓶气量贮存表
13. 关钢瓶的阀门
14. 压缩氮气或空气钢瓶
15. 密封失效时的防护
16. 肉眼观察或用显微镜的物镜
17. 压力室的钢筒

〔思考题〕

1. 测定时，加压速度为什么不能太快？

2. 试比较压力室法和小液流法测定植物叶片水势的优缺点。你还知道测定植物水势的其它方法吗？

## 〔参 考 文 献〕

- [1] 上海植物生理学会.《植物生理学实验手册》, 55~59页.上海科学技术出版社, 1985
- [2] Soil moisture Equipment Corp.Sata Barbara, USA Operating instruction for the model 3000 and 3005 PWSC.

## 实验三 植物细胞渗透势的测定

植物细胞的渗透势主要取决于液泡的溶质浓度, 因此又称溶质势。渗透势与植物水分代谢、生长及抗性等有密切关系。已知在干旱、盐渍等条件下, 一些植物常在细胞内主动积累溶质, 以降低其渗透势, 增加吸水能力, 而在一定程度上维持膨压, 保障细胞的生长和气孔的开放, 这种现象叫做渗透调节作用。渗透调节能力的大小可以用逆境条件下细胞渗透势的降低值来表示, 在水分生理与抗性生理研究中经常需要测定。以下介绍两种测定方法。

### 一、质壁分离法

〔原理〕 将植物组织放入一系列不同浓度的蔗糖溶液中, 经过一段时间, 植物细胞与蔗糖溶液间将达到渗透平衡状态。如果在某一溶液中细胞脱水达到平衡时刚好处于临界质壁分离状态, 则细胞的压力势  $\psi_P$  将下降为零。此时细胞液的渗透势  $\psi_S$  等于外液的渗透势  $\psi_{S0}$ , 即  $\psi_S = \psi_{S0}$ , 此溶液称为该组织的等渗溶液, 其浓度称为该组织的等渗浓度, 即可计算出细胞液的渗透势 ( $\psi_S$ )。实际测定时, 由于临界质壁分离状态难以在显微镜下直接观察到, 所以一般均以初始质壁分离作为判断等渗浓度的标准。处于初始质壁分离状态的细胞体积, 比吸水饱和时略小, 故细胞液浓缩而渗透势略低于吸水饱和时的渗透势, 此种状态下的渗透势称基态渗透势。

〔仪器与用具〕 显微镜 1 台; 载玻片与盖玻片各若干; 温度计 1 支; 尖头镊子 1 把; 刀片 1 片; 小培养皿 (直径 6cm) 9 套; 试剂瓶若干; 烧杯、容量瓶、量筒、吸管等; 吸水纸适量。

#### 〔试剂〕

1 质量摩尔浓度的蔗糖溶液 (1kg 水溶解 1mol 蔗糖溶液) 称取预先在 60~80℃ 下烘干的蔗糖 34.2g, 溶于 100g 蒸馏水中, 即为 1 质量摩尔浓度的蔗糖溶液。

0.03% 中性红溶液。

蔗糖系列标准液 取干燥洁净的小试剂瓶 9 支编号, 用 1 质量摩尔浓度的蔗糖溶液依  $C_1V_1 = C_2V_2$  公式配制 0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70 质量摩尔浓度等一系列不同浓度的蔗糖溶液 (具体范围可根据材料不同而加以调整), 贮于试剂瓶中, 瓶口加塞以防蒸发浓缩。

#### 〔方法〕

1. 选用洋葱或大葱鳞茎内表皮、小麦叶片等作实验材料。
2. 取干燥洁净的培养皿 9 套编号，将配制好的不同浓度的蔗糖溶液按顺序加入各培养皿中使成一薄层，盖好皿盖备用。
3. 用镊子剥取供试材料下表皮或用刀片小心刮取小麦叶片上表皮（参考实验一），大小以  $0.5\text{cm}^2$  为宜。吸去切片表面水分，立即浸入不同浓度的蔗糖溶液中，每一浓度 4~5 片。

为便于观察，可先将切片于 0.03% 中性红内染色 5min 左右，吸去水分，再浸入蔗糖溶液中，但如不加染色即能区别质壁分离时，仍以不染色为宜。

4. 切片在蔗糖溶液中浸泡 20~30min，同时记录室温，取出放在载玻片上，滴一滴相同浓度的糖液，盖以盖玻片，在显微镜下观察，确定引起 50% 以上细胞发生初始质壁分离（即原生质体刚从细胞壁的角隅分离）的浓度，每 1 制片观察的细胞不应少于 100 个。如果在两个相邻浓度的切片中，一个没有发生质壁分离，另一个发生质壁分离的细胞数超过 50%，则这两个浓度的平均值为其等渗浓度。检查时可先从中间浓度开始。

5. 由所得到的等渗浓度和测定的室温，可用下式计算细胞液的渗透势 ( $\psi_s$ )。

$$\psi_s = -iCRT$$

式中各参数的意义见实验二（植物组织水势的测定）。

6. 也可用  $\text{CaCl}_2$  或  $\text{NaCl}$  代替蔗糖，但须改变式中等渗系数值。 $\text{CaCl}_2$  的  $i$  值可用 2.6， $\text{NaCl}$  一般为 1.8（见附录四）。

$\text{NaCl}$  的实际渗透势常比依上式计算所得为低，因而应用时最好根据等渗浓度查附表，以求出组织的渗透势。

7. 试比较不同植物材料的渗透势，把结果列于下表：

测定植物组织渗透势记载表

植物材料	质壁分裂	不同浓度下的质壁分离情形 (1kg 水中含 mol 溶质量)									等渗浓度	细胞液渗透势 $\psi_s$ (-MPa)
		0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	0.65	0.70		

### 【思考题】

1. 配制蔗糖溶液时为何用质量摩尔浓度而不用容积摩尔浓度 ( $\text{mol}/\text{dm}^3$ )?
2. 某植物叶片吸水饱和时的渗透势经测定为  $-0.8\text{MPa}$ ，又用质壁分离法测出其渗透势为  $-0.9\text{MPa}$ ，请计算质壁分离状态的细胞液体积相当于饱和时的百分数。

### 【参考文献】

- [1] 山东农学院、西北农学院编. 植物生理学实验指导. 129~132 页. 山东科学技术出版社, 1980  
 [2] 贾银锁等. 介绍一种质壁分离法测定植物基态渗透浓度的新方法. 植物生理学通讯, 1987 (4) 69~71

## 二、冰点下降法（冰点渗透压计）

〔原理〕 根据拉乌尔冰点下降原理，任何溶液，如果其单位体积中溶解的溶质的颗粒（分子和离子）总数目相同时，则引起溶液冰点下降的数值也相同。1mol 的任何非电解质溶解于 1 000g 水中，则使水的冰点由 0℃ 下降至 -1.857℃；而 1mol 的电解质溶于 1 000g 水中，其冰点下降值为离解离子与未离解的总物质的量同 1.857 的乘积。因此，欲求某一溶液的溶质颗粒数目，可先测其冰点下降值，然后按下式算出：

$$OS = \frac{\Delta t}{1.857}$$

式中 OS —— 1 000g 水中所溶解的溶质的颗粒数目，即质量摩尔浓度；

$\Delta t$  —— 冰点下降数值（℃）；

1.857 —— 水的摩尔冰点下降常数。

溶液的冰点下降值可用冰点渗透压计测定，该仪器以高灵敏度感温元件测量溶液冰点，并转换为渗透摩尔浓度单位（OSmol）。冰点是指溶液的固态和液态处于平衡状态下的温度。对于水溶液，在从液态向固态冷却变化的过程中，温度虽已达到甚至低于冰点而不发生结冰的现象称之为“过冷现象”，处于过冷状态下的液体是极不稳定的，任一扰动便可“触发”其立刻结晶而变为固态，释放出“晶化热”，将使过冷的溶液在冰晶形成瞬间产生温度回升现象。上述过程，可用“结冰曲线”来描述（图 3）。

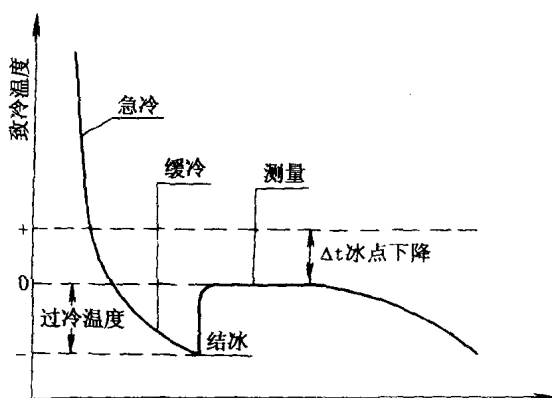


图 3 结冰曲线

从结冰曲线可以看出，过冷的溶液在结冰后有一段温度平稳的时间，这段较平稳的温度即为溶液的冰点，本实验所用冰点渗透压计已直接将冰点下降值换算成渗透摩尔浓度单位（ $iC$ ），且显示读数。然后根据  $\psi_s = -RTiC$  公式便可计算出溶液的渗透势。

式中  $\psi_s$  —— 溶液的渗透势，以 MPa 为单位；

$R$  —— 气体常数，为  $0.008314 \text{ MPa} \cdot \text{dm}^3 / (\text{mol} \cdot \text{K})$ ；

$T$  —— 绝对温度，即  $273 + t^\circ\text{C}$ （实验当时温度）；

$C$  —— 溶液的质量摩尔浓度（1kg 水中含 1mol 溶质）；

$i$  —— 溶液电解质的等渗系数。

〔仪器与用具〕 FM-4 型冰点渗透压计；温度计； $30\text{cm}^3$  注射器；纱布。

### 〔方法〕

1. 仪器调试，参照仪器结构图（图 4）进行以下操作：

(1) 从致冷槽口加入  $40\text{cm}^3$  左右不冻液，观察仪器的液面刻度（红线），至刻度为止。

(2) 打开冷却水，使水流量为  $0.5 \text{ l/min}$  左右。

(3) 在冷却水循环后，打开电源开关，预热仪器  $20 \sim 30\text{min}$ 。



(4) 按下调零键，如数字不为“0.000”，可用螺刀调节“调零”电位器，使数字为“0.000”，而前面的“+”，“-”符号任意，放开调零键，应显示一个数字（与测量数字无关）。

(5) 将温度计插入致冷槽，仪器致冷器的最低温度一般应调至 $-7\sim-8^{\circ}\text{C}$ 左右，可用螺丝刀调节温度调整螺栓，并观察液面后面的指示灯（指示灯亮为降温）。

(6) 在洁净干燥的测定管中倒入 $1\text{cm}^3$ 参考液（300或800），将测定管放入致冷槽，用洁净卫生纸把测量探头的热敏电阻和振棒擦净。按“下降”键，此时测量探头缓慢下降在测量管内，显示数字开始从正数下降至负数，至 $-1000$ 左右时，会听到测定管内发出强振声，同时测量探头自动提升到中位，如果提升数字不在 $-1000$ 左右，可调节“提升”电位器。

(7) 提升到中位后，所显示的数字的绝对值由大到小，退到最小的数字即是样品的渗透浓度值，如果数字回升变大，可按“高位”，提升测量探头到原位，测量完毕。

(8) 测量出的数字与“300”参考液数据有误差，调整“校正 I”电位器（应显示300）；如果与“800”参考液数据有误差，可调整“校正 II”电位器（应显示800）。

## 2. 植物样品渗透势的测定

(1) 取植物叶片，用潮湿纱布轻轻擦去表面灰尘，放入洁净的塑料袋中，立即放入 $-30^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱3h以上，杀死植物细胞。

(2) 从低温冰箱中取出材料，融冰后，用剪刀将材料剪碎，放入注射器内，将细胞液压出，存于 $0.3\text{cm}^3$ 或 $1\text{cm}^3$ 测定管内（视细胞液多少而定），盖好塞子。压出液应不少于 $0.3\text{cm}^3$ 才能测定。

(3) 测定步骤参考仪器调试第（6）—（7）步，以材料压出液代替参考液进行测定。

### 〔注意事项〕

1. 试验条件不同时，结冰曲线的形状会有变化，从而影响冰点测定结果，为此必须通过反复试验，选择能产生一段较为稳定而线性较好的结冰曲线的实验条件。

2. 在测定过程中，如果自来水突然断水，必须立即停机，以免烧坏半导体致冷器。

3. 测量探头的热敏电阻比较娇贵，在移动测量探头时一定要注意保护。

4. 在测量过程中，显示数字达 $-1000$ 左右，但样品测定管内未发出强振声，同时也未提升，即自动提升失灵，此时可按“中位”键提升，随后显示测量数字。

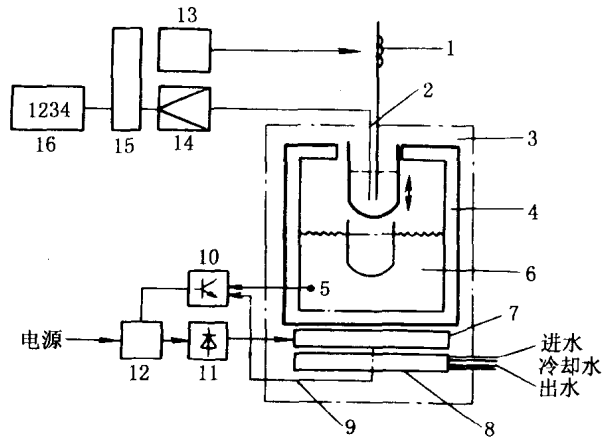


图4 冰点渗透压计仪器结构示意图

1. 振棒 2. 热敏电阻 3. 保温层 4. 冷却槽 5. 热敏电阻
6. 不冻液 7. 致冷器 8. 冷却水箱 9. 断水报警
10. 致冷温控 11. 整流 12. 降压 13. 振幅变换
14. 检测放大 15. 程控操作 16. 显示