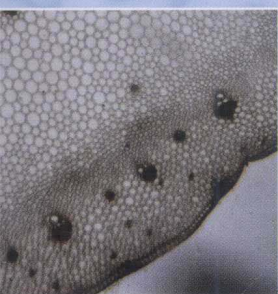


21世纪高等院校教材



植物生理学 实验技术教程

张蜀秋 主 编
李 云 副主编
武维华 主 审



科学出版社

21 世纪高等院校教材

植物生理学实验技术教程

张蜀秋 主 编
李 云 副主编
武维华 主 审

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本实验教程包括植物生理学的主要研究内容。分为细胞生理和细胞信号转导、水分生理和矿质营养、光合作用和呼吸代谢、植物激素和次生物质、植物生长发育调控、植物逆境生理等几部分。每部分较全面介绍相关研究技术和扩展知识;列出的实验既有基本常用的实验,又有较新的、重要的研究技术,部分实验提出研究思路,有学生自主设计的空间,启迪学生创新性,体现了植物生理学教学、研究工作的特色。实验介绍有详有略;每个实验都提出讨论的问题;附主要的原始参考文献。书后还列出缓冲液、计量单位等附录表;插入了主要仪器装置和重要实验结果的彩图。

本书既适于生物科学、农业科学本科生使用,也适于植物相关专业研究生参考。

图书在版编目(CIP)数据

植物生理学实验技术教程/张蜀秋主编. —北京:科学出版社,2011.2
(21世纪高等院校教材)
ISBN 978-7-03-030164-2

I. 植… II. ①张… III. ①植物生理-实验-高等学校-教材
IV. Q945-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 016168 号

责任编辑:单再东 / 责任校对:何晨琛
责任印制:张克忠 / 封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

骏杰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011年2月第一版 开本:B5(720×1000)

2011年2月第一次印刷 印张:15 插页:2

印数:1—3 000 字数:300 000

定价:30.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《植物生理学实验技术教程》编委会

主 编 张蜀秋

副主编 李 云

编写者 (按章节顺序排序)

韩玉珍 张蜀秋 李 云 吴晓岚

张 军 李颖章 张学琴 洪旭晖

叶 德 杨淑华 陈其军 袁 明

主 审 武维华

前 言

植物生理学是一门理论和实验性都很强的生命科学的基础学科,其基本理论来源于严格的科学实验。实验课教学,学生亲自操作和观察,使学生掌握重要的植物生理学研究技术和方法,训练学生的基本操作技能,培养学生分析问题与独立解决问题的能力、严肃认真与实事求是的科学态度,启发研究思路和创新意识,便于学生在做自己的研究课题以及毕业后的教学科研或相关工作中加以应用。

《植物生理学实验技术教程》既涵盖植物生理学基本内容的实验,又体现专业特点;既有一些经典的实验,又尽可能结合当前新的研究技术。主要内容包括:植物细胞生理和细胞信号转导;植物水分生理和矿质营养;植物光合作用和呼吸代谢;植物激素和次生物质检测;植物生长发育及其调控;植物逆境生理等。其中的主要内容经多年实验课的检验,不断调整、完善;尽量结合科研工作需要,介绍实用的新方法、新技术,如细胞骨架的荧光标记,细胞信号转导中的钙荧光检测,植物激素的分离提取和酶联免疫测定,气孔运动的调控,拟南芥的种植、遗传转化和突变体观察等。其中的一些实验,需由学生自己查阅文献,设计不同的实验处理或检测方法,以启发研究思路,发挥学生的创造性。本书还列有附录,包括取样及植物材料处理的原则;常用缓冲液配制;计量单位;植物生长调节物质重要性质;组织培养常用培养基配方等,可供使用者研究、工作时参考。

全书共分六部分,由中国农业大学生物学院植物科学系老师参加编写。其中第一部分主要由韩玉珍编写;第二部分主要由张蜀秋和李云编写;第三部分主要由吴晓岚编写;第四部分主要由张军编写;第五部分主要由李颖章编写;第六部分主要由张学琴和洪旭晖编写;附录主要由李云老师整理。其他还有袁明、叶德、杨淑华、陈其军等老师参与编写,均已在实验后注明。

敬请各位老师、同学及其他读者提出宝贵意见。

编 者

2009年12月

目 录

图版
前言

第一部分 植物细胞生理和细胞信号转导

§ 1 植物细胞的活体染色与细胞死活鉴定	3
§ 2 植物组织(细胞)化学染色技术	6
2.1 核酸的组织化学鉴定	7
2.1.1 孚尔根法鉴定 DNA	7
2.1.2 甲基绿-派罗宁法鉴定 DNA、RNA	9
2.2 酶的组织化学鉴定	9
2.2.1 多酚氧化酶染色法	9
2.2.2 细胞色素氧化酶染色法	11
2.2.3 酸性磷酸酯酶染色法	12
2.2.4 三磷酸腺苷酶染色法	13
2.2.5 转基因植物的 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)活性的组织化学鉴定	14
§ 3 植物细胞荧光检测技术	16
3.1 植物肌动蛋白细胞骨架的荧光标记	17
3.2 植物微管蛋白的免疫荧光染色	18
3.3 细胞核的荧光标记	19
3.4 显微注射荧光探针法研究植物细胞间的共质体通讯	21
§ 4 植物活细胞中自由钙的检测	23
4.1 气孔保卫细胞中游离钙浓度的测定	25
4.2 植物花粉管胞质游离钙浓度的测定	26
§ 5 荧光探针法测定植物细胞内 pH 的变化	28
参考文献	30

第二部分 植物水分生理和矿质营养

§ 6 压力室法测定植物组织水势	33
§ 7 溶液渗透浓度测定仪测定植物组织渗透势的方法	37

§ 8	用 CB-1301 型稳态气孔计测定叶片蒸腾速率和气孔导度	40
§ 9	植物叶片气孔运动的调节	43
§ 10	植物的溶液培养及缺素诊断	45
§ 11	植物根系活力的测定(TTC 法)	50
§ 12	硝酸还原酶活性测定	52
§ 13	H ⁺ -ATPase 活性测定	54
13.1	质膜 H ⁺ -ATPase 活性的测定	54
13.2	液泡膜 H ⁺ -ATPase 活性的测定	56
§ 14	原子吸收光谱测定植物中 K ⁺ 含量	59
§ 15	测定植物全细胞跨膜钾离子流的膜片钳技术	61
	参考文献	66

第三部分 植物的光合作用和呼吸代谢

§ 16	叶绿体色素的提取和定量分析	69
§ 17	红外线 CO ₂ 仪测定叶片的光合速率、呼吸速率以及 CO ₂ 补偿点	73
§ 18	氧电极法测定叶片组织和分离叶绿体的光合速率和呼吸速率	78
18.1	绿色植物叶片组织的光合放氧速率和呼吸速率测定	81
18.2	分离叶绿体的光合放氧速率测定	83
§ 19	离体叶绿体的光还原反应	87
§ 20	离体线粒体的氧化作用和磷酸化作用	89
§ 21	二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)羧化活性的测定	93
21.1	分光光度法	93
21.2	同位素法	95
§ 22	PEP 羧化酶活性的测定	97
	参考文献	100

第四部分 植物激素和次生物质检测

§ 23	植物激素提取和分析常识	103
§ 24	植物细胞分裂素类物质的分离提取	106
§ 25	HPLC-ELISA 法测定细胞分裂素	109
§ 26	植物激素乙烯的气相色谱法测定	113
§ 27	ABA 免疫组织化学定位模型实验	116
§ 28	生长素的生理效应及生物鉴定法	121
28.1	用芽鞘伸长法测定生长素类物质的浓度和效价	121
28.2	用绿豆根形成法测定生长素类物质的浓度或效价	122

§ 29 赤霉素的生物测定	125
§ 30 赤霉素对 α -淀粉酶的诱导形成	129
§ 31 细胞分裂素对菜豆叶片生长和衰老的效应	131
§ 32 生长素和乙烯对叶片脱落的效应	134
§ 33 分光光度法测定烟碱含量	136
33.1 紫外分光光度法	137
33.2 萃取分光光度法	139
参考文献	141

第五部分 植物生长发育及其调控

§ 34 叶片培养——植物组织培养中的脱分化与再分化过程	145
§ 35 植物细胞薄层培养	149
§ 36 植物细胞悬浮培养	152
§ 37 拟南芥叶肉细胞原生质体的分离、培养及应用	155
§ 38 拟南芥的遗传转化——浸蘸法	160
§ 39 日本牵牛开花的光周期诱导与成花信号转移	165
§ 40 植物成花刺激物的传递	167
§ 41 花粉萌发和花粉活力的测定	169
41.1 花粉萌发的测定	169
41.2 花粉活力的测定	170
41.2.1 TTC 显色法	170
41.2.2 I_2 -KI 染色测定法	171
41.2.3 过氧化物酶法	171
§ 42 种子生活力测定	173
42.1 溴麝香草酚蓝(BTB)法	173
42.2 氯化三苯基四氮唑(TTC)法	174
42.3 红墨水染色法	175
42.4 荧光法	175
§ 43 种子萌发的调控	177
43.1 光质对种子萌发的影响	177
43.2 外源植物激素对种子萌发的影响	178
§ 44 拟南芥发育缺陷突变体 <i>mt50</i> 的表型观察	180
参考文献	183

第六部分 植物逆境生理

§ 45	植物游离脯氨酸含量的测定	187
§ 46	甜菜碱含量测定	189
§ 47	植物保护酶(SOD, POD, CAT)活性测定	191
47.1	SOD 活性测定——NBT 法	191
47.2	过氧化氢酶活性的测定	193
47.3	过氧化物酶活性的测定	194
§ 48	H ₂ O ₂ 含量的测定和组化定位检测	197
48.1	H ₂ O ₂ 含量的测定	197
48.1.1	分光光度计法	197
48.1.2	荧光分光光度计法	198
48.2	过氧化氢组化定位检测——DAB 染色法	199
§ 49	植物组织中丙二醛含量测定	201
§ 50	电导仪法测定植物细胞质膜透性	203
§ 51	盐胁迫对拟南芥盐敏感突变体生长的影响	205
§ 52	RD29A-GUS 转基因植物在非生物胁迫下的基因表达分析	210
§ 53	植物组织电阻和电位的测定	213
	参考文献	216
附录		217
	一、取样及植物材料处理的原则	217
	二、计量单位	218
	三、常用缓冲液	220
	四、常用植物生长调节物质主要性质	226
	五、组织培养常用培养基配方	227
	参考文献	230

第一部分

植物细胞生理和细胞信号转导

细胞不仅是有机体结构的基本单位,而且是代谢和功能以及遗传的基本单位。细胞的分裂、生长、分化以及信号转导是有机体生长和发育的基础。植物科学的发展与对细胞的不断深入研究是分不开的。

本部分实验内容结合课堂上细胞生理内容的讲授,选择了植物细胞活体染色与细胞死活鉴定、植物组织(细胞)化学染色等经典的细胞生理学研究方法,以及细胞骨架动态与功能、细胞游离钙浓度和 pH 动态与细胞信号转导、发育过程中细胞间胞间连丝通透性变化等现代细胞生理学广泛应用的技术,引导学生从研究细胞生理开始,逐步掌握植物生理学的基本实验原理和方法。

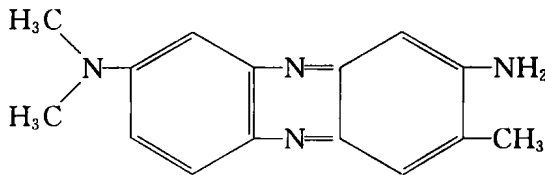
细胞骨架是真核细胞特有的由蛋白质聚合而成的三维网架系统,在细胞分裂、细胞生长、物质运输、细胞壁合成等许多生理过程中都具有非常重要的作用,荧光标记技术及激光扫描显微镜的应用为深入研究细胞骨架的功能奠定基础。植物生活在复杂多变的环境中,对环境信号及内部信号的感受和传导是协调植物整体生长发育所必需的。钙是细胞转导途径的重要组分,几乎所有不同的胞外信号都能引起胞内游离钙浓度的变化,而胞内游离钙浓度的微小变化可能显著影响细胞的生理生化活动,对细胞钙离子动态的研究是研究植物细胞信号转导机制的重要环节。

§ 1 植物细胞的活体染色与细胞死活鉴定

活体染色技术是介于活体观察和固定、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死亡的方法。活体染色的重要特征是染料分子聚集在细胞内特定的构造里,这种聚集主要受染料分子电荷的影响。碱性染料的胶粒表面带有阳离子,酸性染料的胶粒表面带有阴离子,而被染的部分本身也具有阳离子或阴离子,这样它们彼此之间发生吸引作用。活体染色普遍以碱性染料最为适用。除少数例外,酸性染料一般不适合作为活体染色之用。常用于活体染色技术的碱性染料有:中性红、詹纳斯绿、次甲基蓝,甲苯胺蓝、甲基紫等。活体染色除真实地显示细胞的天然构造外,还常用于细胞和组织死活的鉴定。本实验主要介绍中性红对细胞的活体染色及其在细胞死活鉴定中的应用。

■ 原理

中性红属噻嗪基染料(见分子式),是最常用的活性染料之一,又是一种 pH 指示剂,变色范围为 pH 6.4~8.0(由红变黄)。



中性红在酸性及中性的范围内解离度很强,带色的阳离子呈樱桃红色,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。如果用低于泡液 pH 的缓冲液配制的中性红溶液进行活体染色时,由于中性红在介质中已成为解离态,其带色的阳离子很容易被吸附在细胞壁上使壁显红色,而难于跨细胞膜进入细胞内,因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液泡中,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,橙红色的中性红分子被

吸附在凝固的原生质表面,表现为细胞核和细胞质着色,而液泡不着色;因此用中性红染色可鉴定细胞死活。

■ 材料、仪器与试剂

1. 植物材料 洋葱鳞茎(或大葱叶基部分、小麦叶片等)。
2. 仪器与用具 显微镜,小培养皿,载玻片,盖玻片,刀片,尖头镊,粗滤纸,火柴。
3. 试剂 0.03%中性红溶液:0.3 g 中性红溶于 1000 mL 蒸馏水中。

■ 实验步骤与结果

- (1) 取洋葱的内层幼嫩鳞片,用刀片在鳞片内侧纵横切割成 0.5 cm^2 的小块,用尖头镊子将小块内表皮轻轻撕下,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含有泡液的中央大液泡。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,然后将其切成约 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 min,然后取出浸入自来水中冲洗 10 min,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羟基上,因此细胞壁呈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红色,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橙红色。

■ 思考与讨论

- (1) 根据实验结果,说明活细胞和死细胞原生质性质有哪些不同?除本实验的方法外,还可用什么方法鉴定细胞的死活?
- (2) 在用中性红活体染色时,用自来水(pH 7 以上)冲洗浸泡与用蒸馏水(pH 7 以下)冲洗浸泡效果有何不同,为什么?

(韩玉珍)

§ 2 植物组织(细胞)化学染色技术

组织化学亦称细胞化学,是介于细胞学、组织学和生物化学之间的一门边缘学科。它是在基本上不改变组织和细胞生活状态时的细微结构的条件下,采用显微镜技术观察某些化学成分和酶活性在细胞和组织内的存在、分布、含量及其变化规律,以阐明其在组织细胞中的功能与意义。

在应用组织化学技术显示组织和细胞内化学物质的定位、定量以及代谢状态时,要满足以下要求:①保持组织和细胞形态结构的良好状态;②保存组织和细胞内的化学成分及酶活性;③显色反应具有高度特异性和灵敏性;④反应产物应是一种能形成沉淀的有色物质以供光镜定位,或者电子密度高的物质以供电镜观察。

组织(细胞)化学研究一般分固定、组织切片、显色与镜检观察几个步骤。组织固定的目的是将细胞生活状态的结构和化学物质双重地保存下来。固定的方法有物理方法和化学方法。一般常用于细胞固定的化学试剂有:甲醇、乙醇、丙酮、甲醛、戊二醛和锇酸等,这些试剂均能使细胞结构及其中的某些化学物质固定保存。不同化学试剂所保存的化学成分、对酶活性的影响、保存结构的细腻度均不相同。因此,要根据实验要求和组化反应,选择最佳固定法和固定剂。

常用的组织化学显色方法有以下几种。

(1) 化学方法:采用已知的化学反应,在细胞上生成有色沉淀以显示其定位。绝大部分组织化学方法均属此类。例如,①金属沉淀法:利用金属化合物在反应过程中生成有色沉淀,借以辨认所检查的物质或酶活性。如酸性磷酸酯酶分解磷酸酯底物后,反应产物最终生成 PbS 有色沉淀,而显示出酶活性。②席夫反应法:细胞中的醛基可使席夫试剂中的无色品红变为红色。这种反应通常用于显示多糖类(PAS 反应)和脱氧核糖核酸(Feulgen 反应),也可用以检查蛋白质(茚三酮席夫反应)和不饱和脂类。③联苯胺反应显示过氧化物酶:过氧化物酶分解 H_2O_2 产生新生态氧,后者再将无色的联苯胺氧化成联苯胺蓝,进而变成棕色化合物。④普鲁士蓝反应显示三价铁:三价铁与酸性亚铁氰化钾作用,形成普鲁士蓝。⑤Nadi 反应显示细胞色素氧化酶。

(2) 物理学方法:如①脂溶染色法:苏丹染料溶于脂类而使脂类显色;②放射自显影术:给细胞以同位素标记的特定化合物,以探测物质代谢途径和细胞增殖周期等。

(3) 免疫学方法:大分子物质具有免疫特异性因而可制成特异抗体,再用各种标记物如荧光素、过氧化物酶和胶体金标记该抗体,利用免疫学抗原抗体反应原理,用标记抗体显示相应的抗原。

近年来,在光镜细胞化学基础上,又发展起电镜细胞化学,免疫电镜技术,高精

度显微分光光度测定, 荧光细胞化学, 免疫荧光细胞化学等技术, 使组织(细胞)化学技术更广泛地应用于植物科学各领域的研究中。

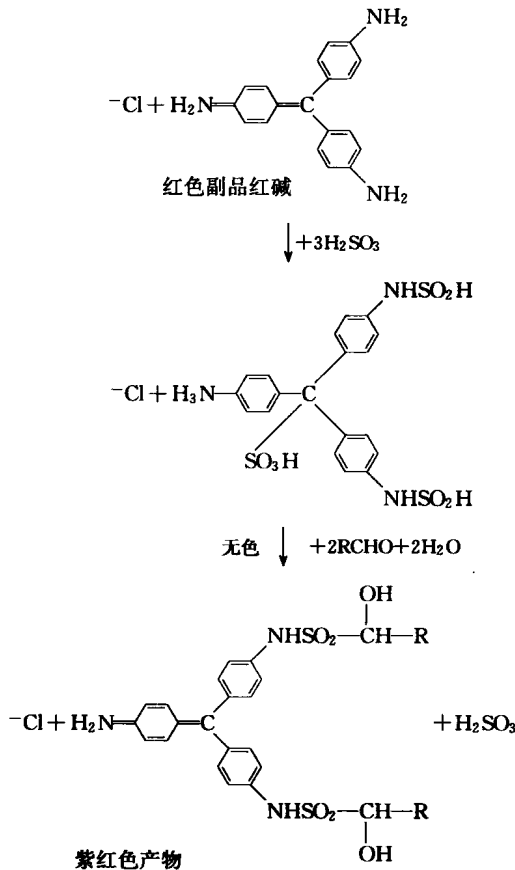
本实验主要学习细胞内核酸和几种酶的组织化学染色方法。

2.1 核酸的组织化学鉴定

2.1.1 孚尔根法鉴定 DNA

■ 原理

组织受 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$ 60°C 水解处理后, 可使 DNA 的脱氧戊糖间的醛基获得自由状态, 席夫试剂即与醛基发生反应, 在细胞核染色质中产生紫色物质。此反应可特异地显示核中的 DNA, 并可用显微分光光度计定量测定。席夫试剂与醛基的反应如图所示。



■ 材料、仪器与试剂

1. 植物材料 大葱或洋葱。
2. 仪器与用具 恒温水浴,显微镜,烧杯,培养皿,吸管,镊子,载玻片,盖玻片,双面刀片。
3. 试剂
 - (1) 席夫试剂:将 0.5 g 碱性品红(basic fuchsin)溶于 100 mL 重蒸馏沸水中,全溶后冷却至 50℃ 过滤,过滤后加入 10 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸及 0.5 g 偏亚硫酸氢钾(或钠)或亚硫酸钾(或钠),待溶液均匀混合后盛入棕色瓶内。置于暗处,经 18~24 h 的熟化过程后即可使用。配制此染色液时,所用药品及容器必须纯净,并应用重蒸馏水作为溶剂,染色液配制后应为透明无色的液体,若稍带淡黄色,则需加入少量活性炭进行吸附,过滤后即可使用,如若配得的染色液仍显红色,则不能使用。
 - (2) Carnoy 固定液:无水乙醇 30 mL,氯仿 15 mL,乙酸 5 mL。
 - (3) 亚硫酸溶液: $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 5 mL,10%亚硫酸钠 5 mL,加蒸馏水至 100 mL。

■ 实验步骤与结果

- (1) 取大葱或洋葱鳞茎内层幼嫩鳞片,用刀片在鳞片内侧纵横切割成 0.5 cm^2 小块,用尖头镊子将内表皮小块轻轻撕下,置 Carnoy 固定液固定 10~15 min。
- (2) 吸去固定液,加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 数毫升,60℃ 水浴迅速加热 4~5 min (不能超过),冷却后,再用常温下的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 冲洗一次。
- (3) 加入席夫试剂数毫升,放置暗处,染色 1~2 h。
- (4) 用亚硫酸液冲洗一次,即可进行镜检。
- (5) 镜检。细胞核红色,核仁无色。绘图或拍照显示观察到的结果。

■ 注意事项

- (1) 水解时间要求严格,常随材料而定,需要经过试验,一般为 6~10 min,水解时的温度要严格控制在 $(60 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。
- (2) 注意所用一切仪器必须用重蒸馏水冲洗,最好所有实验步骤均在一个小玻璃杯内进行,以免转换仪器时制片易受污染或损坏。