

ZHIWU SHENGLIXUE SHIYAN

薛应龙 主编



高等学校试用教材

植物生理学实验

高等教育出版社

高等学校试用教材

植物生理学实验

薛应龙 主编

高等教育出版社

内 容 提 要

本书是在复旦大学生物系植物生理教研室多年的教学与科研基础上，由薛应龙教授负责主编而成的。

本书内容较广，涉及到植物生理学各章的内容，并吸收了一些较新的研究方法。内容包括细胞生理、水分生理、矿质营养、光合作用、代谢作用、植物体内的物质运输、生长发育及对不良环境的反应。书后附有常用缓冲溶液配制方法、显微摄影技术和高速离心技术的介绍及两个附表。

本书可作为综合大学生物系各专业的教材，也可供师范院校，农、林院校有关专业师生和科研人员参考。

责任编辑：林金安

高等学校试用教材

植物生理学实验

薛 应 龙 主 编

*

高等教育出版社出版
新华书店北京发行所发行
北京印刷一厂印装

*

开本850×1168 1/32 印张 5.75 字数 139,000

1985年9月第1版 1985年9月第1次印刷

印数 00,001—2,350

书号 13010·01145 定价 1.30 元

前 言

植物生理学实验是培养学生独立操作能力和建立植物生理研究基础的课程,是推动植物生理学不断进展的一个重要环节。过去以验证植物生理过程为主的实验已经不能适应现代植物生理学的研究与发展,也不能满足学生掌握新技术和新方法的要求,因此编写植物生理学实验教材,不仅要使学生通过实验课程来加深植物生理学基础理论的认识,而且还要使学生提高植物生理学的研究技术。因此,我们编写这本实验书的指导思想是:

一、让学生较全面地接触到植物生理学各个过程的实验研究方法。

二、我们选择的实验内容既有较新的现代科学技术,又有较简单的、但仍有应用价值的方法,掌握这些实验方法将有利于开展有关植物生理课题的研究。

三、考虑到不同类型学校的实验课时,实验条件以及实验深度的要求不同,我们选择的内容既可供植物生理专业学生作为植物生理大实验用,也可供非植物生理专业学生根据需要选其中一部分实验作普通植物生理实验用。

四、本书中所有实验内容都经过编者的反复实践,证明这些方法都是切实可行的。

本书中所选的实验未必都是完美的,一定还存在不少缺点,我们诚恳希望选用本书作实验的学校教师和学生能及时提出问题和批评意见,以便以后修改。

参加本书编写的有下列同志:欧阳光察,周秀良,陈定善,高国肖,张克荣,沃绍根,李侃淳等。

薛 应 龙
复旦大学生物系
一九八四、一

目 录

第一章 细胞生理学的实验方法	1
I 植物细胞内含物成分的鉴定	1
实验一 碳水化合物的鉴定——过碘酸-锡夫法	1
实验二 脂肪类物质的鉴定——苏丹混合液染色法	4
实验三 蛋白质的鉴定	6
方法(一) 显示SH基铁氰化物法	6
方法(二) 双缩脲反应	7
实验四 核酸的鉴定	9
方法(一) 甲基绿-派罗宁法鉴定DNA、RNA	9
方法(二) 孚尔根法鉴定DNA	11
II 酶的定位组织化学鉴定	14
实验五 细胞色素氧化酶的鉴定	14
实验六 过氧化物酶的鉴定	16
实验七 多酚氧化酶的鉴定	18
实验八 三磷酸腺苷酶的鉴定	19
实验九 脱氢酶的鉴定	21
III 植物组织培养	23
实验十 愈伤组织培养	23
实验十一 原生质体的游离和培养	26
第二章 水分生理的实验方法	30
I 植物细胞和组织水势的测定	30
实验十二 小液流法测定植物组织水势	30
实验十三 质壁分离法测定植物细胞的水势	32
实验十四 电导法测定植物组织的水势	34

II 植物根系的主动吸水·····	37
实验十五 根压昼夜周期性的测定·····	37
III 气孔开闭对蒸腾影响的测定·····	39
实验十六 脱落酸 (ABA)对气孔关闭的作用·····	39
第三章 植物矿质营养的实验方法·····	42
实验十七 植物的溶液培养及缺素培养·····	42
实验十八 植物根系对矿质元素的选择吸收·····	47
实验十九 植物根系对钾离子的吸收——钾电极法·····	49
实验二十 单盐毒害与混合盐的拮抗作用·····	53
实验二十一 微量元素硼对花粉萌发和花粉管生长的影响·····	55
第四章 光合作用的实验方法·····	59
实验二十二 叶绿体色素的提取、分离及其理化性质的鉴定·····	59
实验二十三 半叶法测定光合作用强度·····	62
实验二十四 离体叶绿体的光诱导电子传递的测定·····	65
实验二十五 光合磷酸化反应活力的测定·····	72
方法 (一) ^{32}P 酯化法测定光合磷酸化反应活力·····	73
方法 (二) 萤光素酶法测定光合磷酸化反应活力·····	78
实验二十六 植物光呼吸的测定——微量定积测压法·····	81
第五章 呼吸和代谢的实验方法·····	85
I 测定呼吸的方法·····	85
实验二十七 微量定积测压计反应瓶体积的测定·····	85
实验二十八 呼吸强度的测定·····	90
实验二十九 呼吸商的测定·····	95
实验三十 呼吸抑制剂对呼吸作用的影响·····	97
实验三十一 水稻线粒体的制备及其活性测定·····	99
II 测定酶的方法——植物苯丙氨酸解氨酶(PAL)	
的提取、纯化及其活性测定·····	104
实验三十二 PAL的提取——离心和盐析法的应用·····	105

实验三十三	PAL的纯化——分子筛和离子交换层析的应用	107
实验三十四	PAL的进一步纯化——亲和层析法的应用	111
实验三十五	PAL的活性测定——紫外分光光度法的应用	113
实验三十六	PAL纯度的初步鉴定——聚丙烯酰胺凝胶电泳的应用	115
第六章	植物体内物质运输的实验方法	119
实验三十七	原生质细胞核的穿壁转移现象的观察	119
实验三十八	磷在植物体内运输与分布的检定	121
方法(一)	^{32}P 在植物活体内运输与分布的动态测定	121
方法(二)	^{32}P 在植物体内运输与分布的放射自显影	123
实验三十九	环割和呼吸抑制剂阻止物质运输的测定	125
第七章	植物的生长、发育及对不良环境反应的实验方法	128
I	植物体内生长素的提取、分离和生物鉴定	128
实验四十	植物体内生长素的提取与纯化	128
实验四十一	生长素的生物鉴定——小麦芽鞘段法	132
II	种子萌发的测定	134
实验四十二	种子生活力的鉴定	135
方法(一)	氯化三苯基四唑法(TTC法)	135
方法(二)	溴麝香草酚蓝法(BTB法)	136
III	植物的发育	138
实验四十三	光周期诱导对植物开花的调节	138
IV	植物激素对植物生长发育的影响	140
实验四十四	乙烯利对雌花的诱导作用	140
实验四十五	赤霉素对雄花的诱导作用	142
实验四十六	不同激素对器官脱落的调节作用	143
V	植物感应性的实验方法	146

实验四十七 植物感应性的电刺激反应	146
VI 植物对不良环境反应的实验方法	151
实验四十八 低温（冻害）对植物的影响	151
实验四十九 环境中的盐度对植物体内脯氨酸含量的影响	152
附录(一) 常用缓冲液配制方法	156
附录(二) 显微摄影技术	163
附录(三) 高速离心技术	168
附表(一) 一个大气压与空气平衡的蒸馏水的 O ₂ 浓度	171
附表(二) 调整硫酸铵饱和度计算表 (0℃)	172

第一章 细胞生理学的实验方法

显微化学 (Microchemistry) 是应用某种化学处理, 使组织或细胞的某一部分起化学变化, 产生特殊的染色反应, 通过显微镜直接鉴定出该组织或细胞内含物的性质和位置的一种方法。此法有时比利用剥离部分器官或组织来作生化测定更能说明问题。

I 植物细胞内含物成分的鉴定

植物细胞内含物的含量和种类与生命活动有密切关系, 最主要的有碳水化合物、脂肪、蛋白质和核酸。

本实验应用组织化学鉴定法, 了解上述内含物在植物体内的分布情况, 为今后科学研究奠定基础。

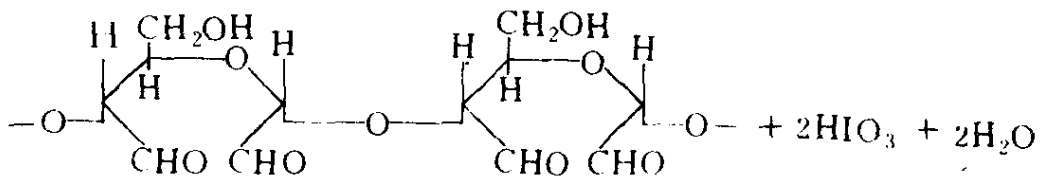
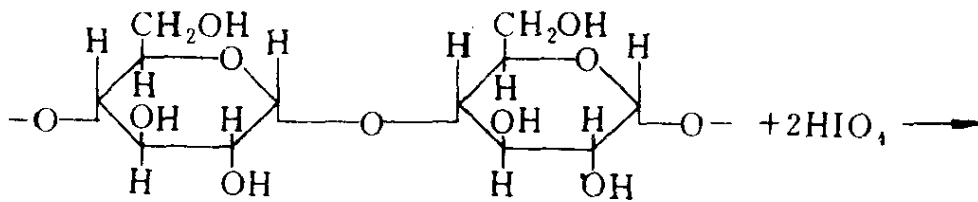
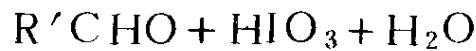
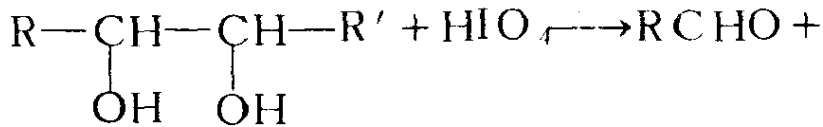
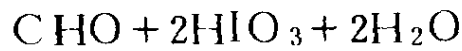
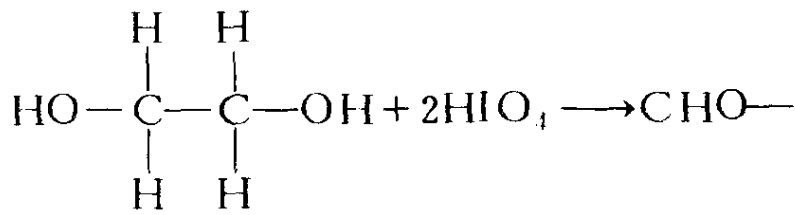
实验一 碳水化合物的鉴定——过碘酸-锡夫 (Schiff) 法

一、原理

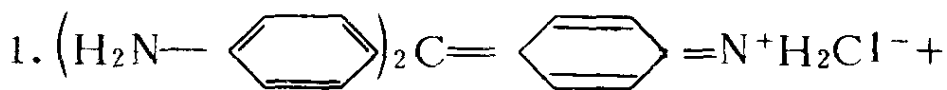
过碘酸-锡夫反应, 简称 PAS 反应。能与多糖、中性粘多糖、粘蛋白和糖蛋白、糖脂类及不饱和脂类和磷脂呈正反应的组织化学法。

过碘酸是一种氧化剂, 它能使乙二醇氧化为乙二醛, 使 1,2-二元醇类氧化, C—C 键断裂产生醛。

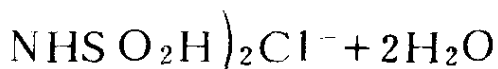
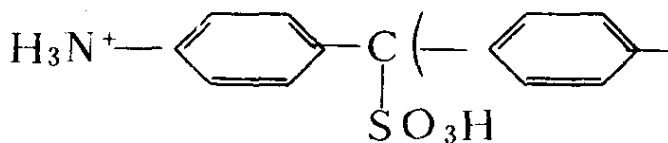
反应如下:



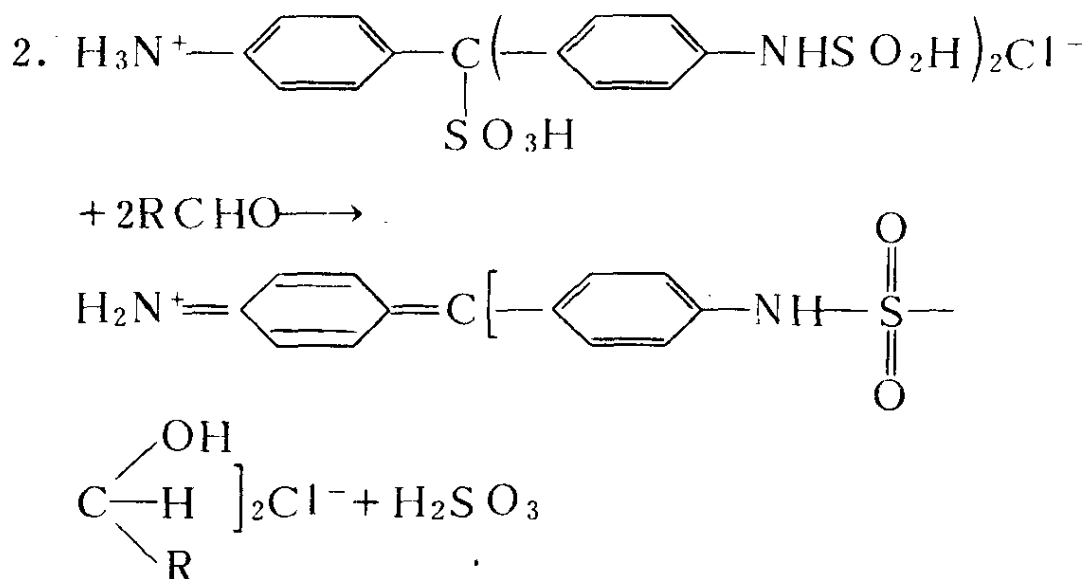
而且它不再进一步氧化所产生的醛，因此醛可与锡夫试剂结合产生红色复合物，反应所产生的颜色深度决定于1,2-二元醇类化合物量的多少。



碱性品红 (假洋红)



锡夫试剂（无色）



紫堇色

二、器材与药品

1. 材料准备

- (1) 实验前24小时浸泡蚕豆种子；
- (2) 马铃薯块茎。

2. 仪器

- (1) 显微镜；(2) 载玻片；(3) 盖玻片；(4) 烧杯；(5) 培养皿；(6) 吸管；(7) 镊子；(8) 双面刀片等。

3. 药剂

(1) 过碘酸溶液：溶解0.8克过碘酸于20ml H₂O中，加入10ml 0.2mol·dm⁻³醋酸钠溶液（2.72克醋酸钠溶于100ml H₂O中），加70ml 无水乙醇，该溶液可在室温下暗处保存，如呈黄色便不能使用；使用前将试剂溶液与样品人的组织一起匀浆。

(2) 锡夫试剂：称取0.1克碱性品红，溶于100ml (SO₂饱和的蒸馏水中，并继续通入SO₂直到品红颜色消失为止，然后加入100ml 蒸馏水稀释即成。

此试剂的另一常用制法：溶解0.25克碱性品红于50ml 热

蒸馏水中，冷却后通入 SO_2 ，直到碱性品红颜色消失为止，然后用蒸馏水稀释到250ml即成。在贮藏过程中，如出现红色，则在试用前须重新通入 SO_2 ，直到红色消失为止。

三、方法与步骤

1. 将浸胀的蚕豆子叶或马铃薯块茎作成切片。
2. 置切片于盛有过碘酸的5ml烧杯中，在 30°C 下处理1小时左右。
3. 吸去过碘酸溶液，以70%乙醇洗涤。
4. 弃去乙醇，加入锡夫试剂，在 30°C 下作用1小时左右。
5. 吸掉锡夫试剂，然后用水洗数次。
6. 镜检。结果细胞壁呈紫堇色。

四、注意事项

1. 锡夫试剂不可加热，否则会放出二氧化硫，恢复品红原有的颜色，故宜在室温下实验。
2. 注意观察反应最后颜色，它与原来品红的颜色不同，它不是浅红色的而是带有蓝紫色。某些酮类及不饱和性化合物，能与亚硫酸作用，而使试剂恢复原来品红的颜色，所以若试验后出现浅红色，便不能视作正结果。

实验二 脂肪类物质的鉴定—— 苏丹混合液染色法

一、原理

当苏丹染料在脂肪类物质中的溶解度大于其在溶剂中的溶解度时，染料便大量进入脂肪类物质的结构内，并吸附在脂肪颗粒结构上，故呈红色。

二、器材与药品

1. 材料准备

- (1) 实验前一天浸泡大豆种子（浸20—24小时）；

(2) 蓖麻子、花生仁 (也可以浸泡 20—24 小时)。

2. 仪器

同实验一。

3. 药剂

(1) Herxheimer 混合液: 丙酮和 70% 乙醇等份混合;

(2) 1 克苏丹 III 和 1 克苏丹 IV 干粉置于干净棕色试剂瓶中, 加入 30ml Herxheimer 混合液, 振荡数分钟, 放置 12—24 小时, 至饱和。使用时吸取上清液 (也可用优质滤纸过滤后使用), 保存时严密加盖防止蒸发;

(3) 苏木精液: 将 10mg 苏木精溶于 20ml 无水乙醇中, 加水 40ml;

(4) 70% 乙醇。

三、方法与步骤

1. 将以上材料作切片 (也可任选一种材料)。

2. 置切片于盛有苏丹混合液的 5ml 烧杯中, 在 30℃ 下染色 3—5 分钟。

3. 吸去苏丹混合液, 用 70% 乙醇洗涤。

4. 吸去乙醇, 用蒸馏水洗净乙醇。

5. 吸干水后加入苏木精溶液 (以浸没切片为宜), 在 30℃ 下复染 10—15 分钟。

6. 镜检。脂类物质呈橙红色, 尤其油滴更为清晰。绘图表示实验结果。

四、注意事项

苏丹混合液必须是澄清的, 稍有混浊就会影响实验结果。用后及保存时应立刻严密加盖, 以防蒸发。

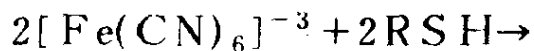
实验三 蛋白质的鉴定

方法（一） 显示SH基铁氰化物法

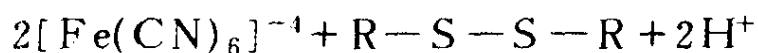
一、原理

新制备的铁氰化物溶液在pH2.4的酸性介质中被组织中的硫氢基还原。

反应如下：

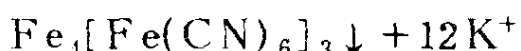
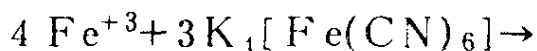


高铁氰化物



亚铁氰化物

生成的亚铁氰化物与三价铁离子(来自氯化高铁)结合形成普鲁士蓝沉淀。



亚铁氰酸铁(普鲁士蓝沉淀)

二、器材与药品

1. 材料准备

- (1) 实验前一天浸泡大豆种子(20—24小时)；
- (2) 蓖麻种子、花生仁(也可浸泡20—24小时)。

2. 仪器

同实验一。

3. 药剂

- (1) 3%乙醇；
- (2) 碱性乙醇液：0.1克NaOH+100ml 3%乙醇；
- (3) 0.1mol·dm⁻³NaOH溶液；

(4) 1% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液;

(5) 0.1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液;

(6) 铁氰化物试剂: 1% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (新配) 3份加0.1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (新配) 1份以 $0.1\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH 调pH至2.4, 此液须在临用前配。

三、方法与步骤

1. 在以上三种材料中任选一种或二种作切片。
2. 置切片于盛有铁氰化物试剂的微型烧杯中, 在 30°C 下染色5—10分钟。
3. 吸去染色液, 用碱性乙醇液洗涤半分钟, (如蓝色迅速褪去, 可缩短时间), 使背景组织的弥散性蓝色减少。
4. 迅速吸去碱性乙醇液, 用蒸馏水洗涤。
5. 镜检。可见到有些细胞中呈普鲁士蓝, 示含SH基蛋白质处。

绘图表示实验结果。

四、注意事项

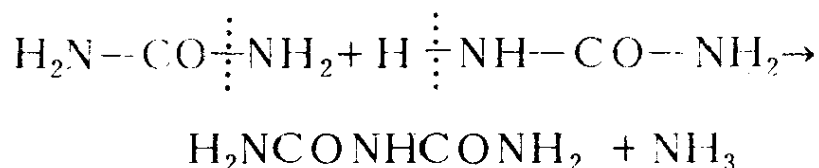
1. 此法有时分色不好, 用碱性乙醇液洗涤后, 不仅可减少背景结构的弥散性蓝色; 而且还可加深SH基成分的颜色。
2. SH基呈蓝色。有时切片上会出现绿色, 此为非特异性的吸附色。

方法(二) 双缩脲反应

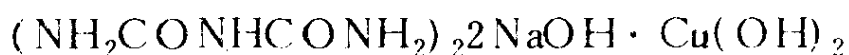
一、原理

碱性溶液中的 CuSO_4 可使蛋白质染成红色或蓝紫色, 这一反应称双缩脲反应。凡在本身结构中具有双缩脲基的所有蛋白质, 都能进行双缩脲反应, 这是蛋白质所共有的颜色反应。由于自然界中无产生双缩脲反应的其他物质 (除人工制造的物质外), 所以双缩脲反应便是证实“双缩脲”蛋白质与其类似的

分解产物存在的可靠证据。



双缩脲在碱溶液中与铜盐生成鲜红的络合物，这是双缩脲反应的特性，此种络合物在碱溶液中的成分如下：



二、器材与药品

1. 材料准备

同实验三方法（一）。

2. 仪器

同实验一。

3. 药剂

（1）5% CuSO_4 溶液；

（2）25% NaOH 溶液。

三、方法与步骤

1. 将浸泡过的大豆作切片（其余二种材料可任选一种）。

2. 置切片于滴有5% CuSO_4 溶液的载玻片上。

3. 5—10分钟后，吸去多余的 CuSO_4 溶液，再滴上1—2滴25% NaOH 溶液。

4. 加盖玻片，用水蒸汽加热2—3分钟。

5. 冷后镜检。凡有蛋白质处均呈蓝紫色。

绘图表示实验结果。

四、注意事项

镜台必须平放，以防 NaOH 溢出损坏显微镜。

实验四 核酸的鉴定

方法（一） 甲基绿-派罗宁法鉴定DNA、RNA

一、原理

Brachet 1940年证明甲基绿可以染DNA；派罗宁可以染RNA，但机制不明。有人认为染色反应的差异，不表示其化学性质的不同，仅仅反映了核酸的不同聚合状态。也有人认为只要DNA分子的双螺旋结构不受损伤，其与甲基绿结合的能力就不变。目前一般认为甲基绿对DNA的结合能力，主要与DNA分子的双螺旋空间构型的完整性有关；这二种染料是通过与核酸中的磷酸根结合而起作用的。

二、器材与药品

1. 材料准备

(1) 马铃薯茎（取幼嫩部位）； (2) 洋葱鳞茎。

2. 仪器

(1) 分液漏斗； (2) 试剂瓶棕、白各3只； (3) 同实验一。

3. 药剂

(1) 甲基绿的精制：甲基绿能氧化成甲基紫，市售甲基绿是甲基绿和甲基紫的混合物，配制前必须将甲基紫除去。方法是先配成2%水溶液，置于分液漏斗中，然后加过量氯仿提取，待氯仿层不显紫色为止，水层备用；

(2) 派罗宁的精制：先配成5%水溶液，置于分液漏斗中，然后加过量氯仿提取，待氯仿层不显红色为止，水层备用；

(3) 甲基绿-派罗宁溶液的制备：

甲液：

2%甲基绿(Methylgreen经氯仿提纯)水溶液1.0ml 5%