



全国高等农业院校教材  
全国高等农业院校教学指导委员会审定

# 植物生理学

## 实验指导

邹琦  
主编

农学 园艺 植保 土壤等专业用



中国农业出版社

全国高等农业院校教材

# 植物生理学实验指导

邹琦 主编

农学 园艺 植保 土壤等专业用

中国农业出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

植物生理学实验指导/邹琦主编. - 北京: 中国农业出版社, 2000.7

全国高等农业院校教材

ISBN 7-109-06436-0

I. 植… II. 邹… III. 植物生理学-实验-高等学校-教学参考资料 IV. Q945-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 29867 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 沈镇昭

责任编辑 舒 薇

---

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2000 年 8 月第 1 版 2003 年 8 月北京第 3 次印刷

---

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 12.5

字数: 280 千字

定价: 15.60 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

主 编 邹 琦  
副 主 编 赵世杰 王 忠 李合生 孙 群  
编写人员 (以姓氏笔画为序)

王 玮	王 忠	王学奎	田纪春	朱晓红
孙 群	李合生	李学俊	李德全	杨兴洪
邹 琦	宋 平	宋克敏	陈 刚	张元湖
赵世杰	赵会杰	顾蕴洁	徐 虹	龚月华
崔克辉	彭 涛	董新纯	潘海春	

# 前 言

这本实验指导可以看作是我们 20 世纪 70 年代编写的《植物生理学实验指导》的第三次修订本。

20 世纪 70 年代末，随着“文化大革命”的结束和我国高等学校教学工作逐渐步入正轨，各高校普遍感到缺乏适用的教材。面对这种情况，农业部从 1978 年开始，组织各高等农业院校编写了第一批全国高等农业院校统编教材，这批教材对于迅速恢复高等学校教学秩序发挥了重要作用。经由当时的植物生理学教材编写组商定，把《植物生理学实验指导》一书的编写任务交与原山东农学院和西北农学院（现山东农业大学和西北农林科技大学）共同完成。为了满足急需，初稿经修订后曾于 1979 年春由黑龙江农垦大学协助印刷试用，1980 年由山东科学技术出版社正式出版发行。

该书的第一个版本出版后一直使用了 10 余年，这期间，正是在改革开放政策的指引下，我国经济、科技、教育取得辉煌成就的时期，也是植物生理学、生物化学和分子生物学等学科飞速发展的时期，新的实验技术、方法和仪器设备层出不穷，各农业高校的装备水平也有了明显改善。因此，原书中不少内容已显得陈旧。恰在此时，农业部领导的高等农业院校教材指导委员会于 1989 年制定了“七五”至“八五”教材建设规划，为这本教材的修订提供了很好的机会。为了适应课程设置精简的需要，教材指导委员会决定编写一本《植物生理生化》教材，为了与这本教材配套，便将《植物生理学实验指导》书名更改为《植物生理生化实验指导》，并适当增加了生物化学的有关内容，仍由山东农业大学和原西北农业大学共同编写。该书于 1995 年由中国农业出版社出版，可看作是《植物生理学实验指导》的第二版。

随着我国经济建设的不断发展和改革的不断深入，特别是随着我国经济体制由计划经济向社会主义市场经济的过渡，社会对高校毕业生知识与能力结构的要求正在发生着深刻的变化，高校毕业生也面临着人才市场的严峻考验。这一切，都大大促进了高等学校办学体制和人才培养模式的改革。面对这种情况，国家教育委员会决定在全国高校中开展面向 21 世纪教学内容和课程体系改革的研究与实践；农业部则将原教材指导委员会重新组建为教学指导委员会，并制定了“九五”教材建设规划。教材规划确定重新编写供农业院校本科生使用的《植物生理学》及其配套教材《植物生理学实验指导》，于是便产生了这部实验指导的重编版本。这次的编写成员，比前两次有所扩大，除山东农业大学和西北农林科技大学的作者外，还增加了华中农业大学和扬州大学农学院的同志，其中个别实验还邀请了河南农业大学的同志参与编写，全书经邹琦最后修改、润色。为了便于联系，我们在每一个实验项目的最后将编者姓名列出，书中插图全部由彭涛作进一步的计算机加工处理，部分文字的处理则由彭涛和潘海春协助完成。

植物生理学是一门实验科学，它的一切结论都是通过严格的科学实验得出的，学生虽

## 前 言

然不可能也没有必要将以往的全部结论都用自己的实验重新验证一遍，然而，通过自己的手、脑并用，无论是重新演示前人的某些结论还是利用所学实验技术得出某些新的结论，从初学者的角度来看，都会是一种创造性的劳动，这种学习方式是读书、听课所绝对不能代替的。具体地讲，本实验课的目的是加深学生对基础理论的理解和认识，加强基本技能的训练，培养严格的科学态度，提高分析问题和解决问题的能力，因而是高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。特别是现在，我国高校的教学工作，面对着人才市场对毕业生实际问题能力的严格选择和科学技术飞速发展的双重挑战，大学生培养模式必须从过去的过分偏重知识型向知识—能力型转变。这些都对实验课提出了更高的要求，实验教材的内容和体系理应作大力修改。然而，本书毕竟是为初涉植物生理学的大学使用的实验手册，因此还应强调其实用性，可使学生在实验课中据此独立完成实验；又由于该书由多所院校联合编写，因此还必须考虑对各校的针对性和适用性，希望能将各校的传统实验项目包容进去。考虑到各高等农业院校仪器设备的现状和植物生理学实验学时的限制，本实验指导仍以各校目前开设的传统实验项目为主；同时，为了反映植物生理学实验技术的新进展，本书编入了几项需要较复杂仪器的现代实验项目，如恒态气孔计、露点微伏压计以及近年来已被广泛使用的  $\text{CO}_2$  气体分析仪、压力室、冰点渗透压计、薄膜氧电极测氧仪等仪器，这些仪器虽然不一定都能让学生亲自操作，但抽点时间作简短介绍，使学生有一些现代仪器和实验方法的概念也是好的。特别是如果将植物生理学实验作为一门课程单独开设，那就更有必要了。此外，为了增强本书在科学研究中的实用性，除收入少量验证性项目外，大部分实验为定量性质，均可做出准确、可信的结果，从而使本书不但可作教材，而且还可作为科研技术与方法的参考。

由于我们的水平所限，书中缺点错误在所难免，特别是由于近年来植物生理生化实验技术日新月异的发展，使我们深感有必要不断充实本书内容。敬希使用者提出批评建议，以便今后补充修订。

编 者

2000年4月

# 目 录

## 前言

植物材料的采取、处理与保存 .....	1
一、原始样品及平均样品的采取、处理 .....	1
二、分析样品的处理和保存 .....	2
实验 1、植物细胞的质壁分离及死活鉴定 .....	4
一、植物细胞的活体染色与死活鉴定 .....	4
二、植物细胞的质壁分离与质壁分离复原 .....	5
三、质壁分离的不同形式 .....	6
实验 2、叶肉细胞的分离及其活力的检查 .....	8
一、机械法分离叶肉细胞 .....	8
二、酶解法分离叶肉细胞 .....	8
三、游离细胞活力的检查 .....	9
实验 3、植物组织含水量的测定 .....	11
实验 4、植物组织汁液浓度（可溶性固形物）的测定 .....	13
实验 5、植物组织中自由水和束缚水含量的测定 .....	18
实验 6、植物组织水势的测定 .....	21
一、液相平衡法测定植物组织水势 .....	21
二、压力平衡法（压力室法）测定植物组织水势 .....	23
实验 7、植物细胞渗透势的测定 .....	25
一、质壁分离法测定植物细胞渗透势 .....	25
二、冰点降低法测定植物汁液的渗透势 .....	26
实验 8、露点法测定植物叶片水势和渗透势 .....	30
实验 9、气孔开闭状况的测定 .....	33
一、渗入法 .....	33
二、印迹法 .....	34
三、气孔密度和孔口总面积的测定 .....	34
实验 10、气孔运动及其影响因素 .....	38
一、显微镜下观察气孔运动 .....	38
二、光诱导气孔的开启 .....	39
三、钾离子对气孔开度的影响 .....	39
四、保卫细胞内钾离子变化的观察 .....	40
五、ABA 对气孔关闭的作用 .....	41
实验 11、称重法测定植物的蒸腾速率 .....	43
一、离体快速称重法 .....	43

## 目 录

二、干燥管吸湿法 .....	44
实验 12、用恒态气孔计测定叶片蒸腾速率和气孔扩散阻力 .....	46
实验 13、植物的无土培养和缺素症状 .....	51
实验 14、植物体内硝态氮含量的测定 .....	54
实验 15、植物体内硝酸还原酶活力的测定 .....	56
一、离体法 .....	56
二、活体法 .....	58
实验 16、植物根系活力的测定 .....	60
一、根系总吸收面积和活跃吸收面积的测定 .....	60
二、氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法测定根系活力 .....	62
实验 17、植物组织中游离氨基酸总量的测定 .....	64
实验 18、叶绿体色素的提取、分离和理化性质 .....	67
一、叶绿体色素的提取与分离 .....	67
二、叶绿体色素的理化性质 .....	68
实验 19、叶绿体色素的定量测定 .....	72
实验 20、叶绿体的分离及其完整度的测定 .....	76
一、叶绿体的分离 .....	76
二、叶绿体被膜完整度的测定 .....	77
实验 21、改良半叶法测定叶片光合速率 .....	79
实验 22、红外线 CO <sub>2</sub> 气体分析仪法测定植物光合与呼吸速率 .....	82
一、密闭系统斜率法 .....	83
二、密闭系统落差法 .....	87
三、开放式气路系统 .....	88
实验 23、氧电极法测定植物的光合与呼吸速率 .....	91
实验 24、真空渗入法测定环境因子对光合作用的影响 .....	98
实验 25、滴定法测定呼吸速率 .....	100
实验 26、微量检压法测定植物的呼吸速率 .....	103
实验 27、植物组织中可溶性糖与淀粉的测定 .....	110
一、苯酚法测定可溶性糖 .....	110
二、蒽酮法测定可溶性糖 .....	111
三、3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖 .....	112
四、淀粉的测定 .....	113
实验 28、植物体内蛋白质氮和非蛋白质氮的测定 .....	115
一、微量凯氏定氮法 .....	117
二、用凯氏定氮仪自动定氮的方法 .....	121
三、纳氏比色法定氮 .....	122
实验 29、植物体内谷氨酰胺合成酶活力的测定 .....	125
实验 30、植物体内可溶性蛋白质含量的测定 .....	127
一、Lowry 法 (劳里法) .....	127
二、考马斯亮蓝 G-250 染色法 .....	129



实验 31、植物同工酶和可溶性蛋白质的凝胶电泳 .....	131
实验 32、植物激素类物质的生理效应及生物鉴定 .....	136
一、生长素类物质对根、芽生长的影响 .....	136
二、生长素的生物鉴定——芽鞘伸长法 .....	137
三、细胞分裂素的生物鉴定——萝卜子叶增重法 .....	138
四、赤霉素的生物鉴定——水稻幼苗法 .....	139
实验 33、种子生活力的测定 .....	140
一、氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法 .....	140
二、红墨水染色法 .....	141
实验 34、作物生长的化学控制 .....	143
实验 35、花粉活力的测定 .....	148
一、花粉萌发测定法 .....	148
二、碘—碘化钾染色测定法 .....	148
三、氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法 .....	149
实验 36、谷物种子萌发时淀粉酶活力的测定 .....	151
实验 37、植物春化和光周期现象的观察 .....	154
一、植物春化现象的观察 .....	154
二、植物光周期现象的观察 .....	155
实验 38、植物激素对愈伤组织形成和分化的影响 .....	156
实验 39、植物组织逆境伤害程度的测定——电解质外渗量法 .....	159
实验 40、植物体内游离脯氨酸含量的测定 .....	161
实验 41、植物组织中超氧化物歧化酶活性测定 .....	163
实验 42、植物组织中过氧化氢含量及过氧化氢酶活性测定 .....	166
一、 $H_2O_2$ 含量的测定 .....	166
二、过氧化氢酶的活性测定——高锰酸钾滴定法 .....	167
三、过氧化氢酶的活性测定——紫外吸收法 .....	168
实验 43、抗坏血酸含量及抗坏血酸过氧化物酶活性的测定 .....	171
一、抗坏血酸含量 .....	171
二、抗坏血酸过氧化物酶 (AsA-POD) 活性 .....	172
实验 44、植物组织中丙二醛含量的测定 .....	173
附录一、计量单位 .....	175
附录二、常用酸碱及其主要性质 .....	178
附录三、常用酸碱摩尔浓度的近似配制表 .....	180
附录四、常用有机溶剂及其主要性质 .....	181
附录五、常用缓冲溶液的配制 .....	183
附录六、不同质量摩尔浓度下各种盐的等渗系数 ( $i$ 值) .....	186
附录七、植物组织培养常用培养基的成分 .....	187
附录八、常见植物生长调节物质及其主要性质 .....	188
附录九、植物激素和生长调节剂在农业生产中的应用 .....	190

# 植物材料的采取、处理与保存

植物材料分析结果的准确性，除决定于分析方法是否恰当和分析操作是否严格外，还决定于采取的样品是否具有最大的代表性。如果采样方法不科学，样品没有代表性，即使分析结果准确无误，也不可能得出正确的结论。因此，必须对样品的采取、处理与保存给予足够的重视。

从大田或实验地取回的样品，一般数量较大，称为原始样品。进行分析之前，应首先按样品的类别（如植物的根、茎、叶、花、果实、种子等）选出平均样品。再根据分析的目的、要求和样品种类的特征，采用适当的方法从平均样品中选出供分析用的分析样品。

## 一、原始样品及平均样品的采取、处理

### （一）原始样品的取样法

1. 随机取样 在试验区（或大田）中选择有代表性的取样点，取样点的数目应视田块大小而定。选好点后，随机采取一定数量的样株，或在每一个取样点上按规定的面积采取样株。

2. 对角线取样 在试验区（或大田）按对角线选定5个取样点，然后在每个点上随机取一定数量的样株，或在每个取样点上按规定的面积采取样株。

### （二）平均样品的采取法

1. 混合取样法 一般颗粒状（如种子等）或粉末状样品可以采取混合取样法进行：将样品铺在木板（或玻板、牛皮纸）上成为均匀的一层，按对角线划分为四等分。取对角的2份为进一步取样的材料，将其余的2份淘汰。再把已取中的2份样品充分混合后重复上述方法取样。如此反复操作，每次均淘汰50%的样品，直至所取样品达到所要求的数量为止。这种取样的方法叫做四分法。经过四分法的反复混合、淘汰所取得的样品，在实验室中再经适当的处理之后即可制成分析样品。

一般禾谷类、豆类及油料作物的种子均可采用这个方法取样。但应注意样品中不要混有残破、虫噬或空瘪种子及其他混杂物。

2. 按比例取样法 对体积较大、生长不均等的材料，如甘薯、甜菜、马铃薯等块根、块茎材料，应按原始样品大、中、小不同类型的比例选取样品，再将每一单个样品纵切，各取 $1/4$ 或 $1/2$ 混在一起组成平均样品。

在采取桃、梨、苹果、柑橘等果实的平均样品时，即使是从同一株果树上取样，也应考虑到着果枝在树冠上的不同部位以及果实的大小和成熟度上的差异，按各自的比例取样，混合成平均样品。

### (三) 取样注意事项

1. 取样的地点，一般应距田埂或地边有一定距离，或在特定的取样区内取样。为避免边缘效应的影响，勿在边行或靠近边行取样，取样点的四周也不应有缺株现象。

2. 取样后，按分析的目的分成各部分（如根、茎、叶、果实……等），捆齐，附上标签，装入纸袋。有些多汁果实的样品需要剖开时，应用锋利不锈钢刀剖切，并注意勿使果汁流失。

3. 对于多汁的瓜、果、蔬菜及幼嫩器官等样品，因含水分较多，容易变质或霉烂，可以在冰箱中冷藏，或用蒸汽灭菌、干燥灭菌，也可用适当浓度的酒精处理保存，或者减压脱水冷藏以备以后分析之用。

4. 选取平均样品的数量应不少于供分析样品的两倍。

5. 为了动态地了解供试植物在不同生育期的生理状况，常按植物的生育期采取样品进行分析。取样方法系在植物不同生育期调查植株的生育状况并区分为若干类型，计算出各种类型植株所占的百分比，再按此比例采取相应数目的样株作为平均样品。

## 二、分析样品的处理和保存

1. 采回的新鲜样品（平均样品）在做分析之前，一般先要经过净化、杀青、烘干（或风干）等一系列处理。

(1) 净化 新鲜样品从田间或试验地取回时，常沾有泥土等杂质，应用柔软湿布擦净，不应用水冲洗。

(2) 杀青 为了保持样品化学成分不发生转变和损耗，应将样品置于 105℃ 的烘箱中烘 15min 以终止样品中酶的活动。

(3) 烘干 样品经过杀青之后，应立即降低烘箱的温度，维持在 70~80℃ 直到烘至恒重。烘干所需的时间因样品数量和含水量、烘箱的容积和通风性能而定。在无烘箱的条件下，也可将样品置蒸笼中以蒸汽杀青，而后于阴凉通风处风干。但在蒸汽杀青过程中，常有可溶性物质的外渗损失，因此，此法仅可作为测量大量样品干重时的变通方法，在进行成分分析时应尽量避免。烘干时应注意温度不可过高，否则会把样品烤焦，特别是含糖较多的样品，更易在高温下焦化。为了更精密地分析，避免某些成分的损失（如蛋白质、维生素、糖等），在条件许可的情况下最好采用真空干燥法。

2. 已经烘干（或风干）的样品，可根据样品的种类、特点进行以下处理：

(1) 种子样品的处理 一般种子（如禾谷类种子）的平均样品清除杂质后要进行磨碎，在磨碎样品前后都应彻底清除磨粉机（或其他碾磨用具）内部的残留物，以免不同样品之间的机械混杂，也可将最初磨出的少量样品弃去，然后正式磨碎，最后使样品全部无损地通过 1mm 筛孔的筛子，混合均匀作为分析样品贮存于具有磨口堵塞的广口瓶中，贴上标签，注明样品的采取地点、试验处理、采样日期和采样人姓名等。长期保存的样品，贮存瓶上的标签还需要涂蜡。为防止样品在贮存期间生虫，可在瓶中放置一点樟脑或对位二氯甲苯。

对于油料作物种子（如芝麻、亚麻、花生、蓖麻等）需要测定其含油量时，不应当用磨粉机磨碎，否则样品中所含的油分吸附在磨粉机上将明显地影响分析的准确性。所以，对于油料种子应将少量样品放在研钵内研碎或用切片机切成薄片作为分析样品。

(2) 茎秆样品的处理 烘干（或风干）的茎秆样品，均要进行磨碎，磨茎秆用的电磨与磨种子的磨粉机结构不同，不宜用磨种子的电磨来磨碎茎秆。如果茎秆样品的含水量偏高而不利于磨碎时，应进一步烘干后再进行磨碎。

(3) 多汁样品的处理 柔嫩多汁样品（如浆果、瓜、菜、块根、块茎、球茎等）的成分（如蛋白质、可溶性糖、维生素、色素等）很容易发生代谢变化和损失，因此常用其新鲜样品直接进行各项测定及分析。一般应将新鲜的平均样品切成小块，置于电动捣碎机的玻璃缸内进行捣碎。若样品含水量不够（如甜菜、甘薯等）可以据样品重加入0.1~1倍的蒸馏水。充分捣碎后的样品应成浆状，从中取出混合均匀的样品进行分析。如果不能及时分析，最好不要急于将其捣碎，以免其中化学成分发生变化而难以准确测定。

有些蔬菜（如含水分不太多的叶菜类、豆类、干菜等）的平均样品可以经过干燥磨碎，也可以直接用新鲜样品进行分析。若采用新鲜样品，可采用上述方法在电动捣碎机内捣碎，也可用研钵（必要时加少许干净的石英砂）充分研磨成匀浆，再进行分析。

在进行新鲜材料的活性成分（如酶活性）测定时，样品的匀浆、研磨一定要在冰浴上或低温室内操作。新鲜样品采后来不及测定的，可放入液氮中速冻，再放入-70℃冰箱中保存。

（华中农业大学 李合生等）

# 实验 1、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着本质的差别。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；而死细胞的原生质则丧失了这些特性。在植物生理学研究中，经常需要鉴定细胞的死活。本实验介绍两种鉴定方法：活体染色法及质壁分离法，同时还可以通过对活体染色及质壁分离结果的观察，了解原生质的某些特性，如粘滞性、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，细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；小培养皿；载玻片；盖玻片；单面刀片；尖头镊子；酒精灯；火柴；擦镜纸；吸水纸适量。

### 【试剂】

0.03% 中性红溶液；  
1mol·L<sup>-1</sup> 硝酸钾溶液。

### 【方法】

1. 选用洋葱鳞茎（或大葱假茎基部）及小麦叶片作材料。
2. 切下一片较幼嫩的洋葱鳞片，用单面刀片在鳞片内侧割划成 0.5cm<sup>2</sup> 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也可用此法制备表皮细胞制片。将刮好的制片切成约 0.5cm<sup>2</sup> 小块。

3. 将制好的洋葱鳞茎内表皮或小麦叶片上表皮小块投入 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 1 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, 可看到细胞壁被染成红色, 而原生质和液泡均不染色, 这是因为蒸馏水常偏酸性 (请解释原因), 在弱酸性条件下, 细胞壁带负电荷而中性红则解离为阳离子并被细胞壁所吸附的结果。

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部位, 可将上述洋葱内表皮染片浸入  $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  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. 在活体染色制片中仔细寻找, 可能看到个别死细胞, 其细胞核因被中性红染色而呈红色, 清晰可辨。

## 二、植物细胞的质壁分离与质壁分离复原

### 【原理】

成长的植物细胞是一个渗透系统, 活细胞的细胞质及其表层 (质膜和液泡膜) 有分别透性, 细胞内部含有一个中央液泡, 构成液泡的细胞液具有一定的溶质势。当细胞与外界高渗溶液 (即低水势溶液) 接触时, 细胞内的水分外渗, 原生质体随着液泡一起收缩而发生质壁分离, 其后, 当与清水或低渗溶液 (即水势较高的溶液) 接触, 或当外面的溶质进入细胞时, 具有液泡的原生质体重新吸水而发生质壁分离复原。

受到严重伤害或被杀死的植物细胞, 由于原生质体失去了分别透性, 因而不能发生质壁分离。

### 【仪器与用具】

见本实验项目一。

### 【试剂】

0.03% 中性红溶液;

$1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硝酸钾溶液;

$4\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (24%) 尿素溶液。

### 【方法】

1. 取洋葱鳞片或小麦叶片按本实验项目一中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, 可以看出明显的液泡染色, 无色透明的原生质层则紧贴细胞壁 (在细胞的角隅上可以看见)。

## 实验 1、植物细胞的质壁分离及死活鉴定

3. 从盖玻片的一边滴 1 滴  $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  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之与制片接触并立即镜检，可看到细胞内很快发生凸形质壁分离。

4. 观察到质壁分离后，于盖玻片一边小心加清水 1 滴，于对边用滤纸缓缓吸去硝酸钾溶液（速度不可过快），重复两次，使质壁分离剂（即高渗的硝酸钾溶液）基本上被吸去。镜检，可看到质壁分离停止进行；相反，带有液泡的原生质体开始重新吸水膨大，最后又充满整个细胞腔，这就是质壁分离复原现象。质壁分离复原缓慢进行时，细胞仍会正常存活；如进行很快，则原生质体会发生机械破坏而死亡。

5. 撕取蚕豆（或其他植物）叶片下表皮置于载玻片上，滴加  $4\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （24%）尿素溶液后立即盖上盖玻片并进行镜检。首先可见表皮细胞及保卫细胞同时发生质壁分离，约 10~15min 后保卫细胞开始发生质壁分离复原，气孔大开；而其他表皮细胞长时间（甚至几小时）后才开始发生质壁分离复原。

6. 另取一大部分制片置载玻片上，先在酒精灯上加热，以杀死细胞，再引入高渗硝酸钾溶液，观察有无质壁分离发生。

### 三、质壁分离的不同形式

#### 【原理】

植物细胞常因原生质和细胞壁结合的紧密程度或原生质的粘性大小而表现不同的质壁分离形式。质壁分离主要有两种形式：凹形和凸形，有时把严重的凹形质壁分离叫做痉挛形质壁分离。质壁分离最初由凹形开始，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粘性关系很大，凡是原生质粘性大的，能维持较长时间的凹形，甚至成为痉挛形，而原生质粘性很低的，则较快地转为凸形质壁分离。

本实验将观察由于  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$  对原生质粘性的不同影响而发生不同形式的质壁分离现象。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，由于细胞质强烈膨胀、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 1-1）。

#### 【仪器与用具、试剂】

同本试验项目二；另加  $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氯化钙溶液。

#### 【方法】

1. 按本实验项目二的方法，制取洋葱内表皮或小麦叶表皮活染制片各 2 份，分别置于载玻片上，一片滴加 1~2 滴  $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硝酸钾溶液，另一片滴加 1~2 滴  $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氯化钙溶液，盖上盖玻片立即进行镜检，可见钾盐溶

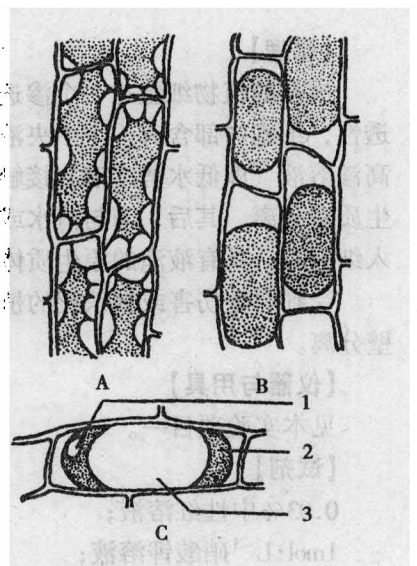


图 1-1 质壁分离的不同形式

A. 凹形质壁分离 B. 凸形质壁分离

C. 帽状质壁分离

1. 细胞核 2. 膨胀的原生质

3. 液泡

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（10~20min）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，但绝不会发生帽状质壁分离，可与  $K^+$  处理的相区别。

2. 从观察到的凹形、凸形、帽状等不同形式的质壁分离中选择典型的细胞各绘一图，并解释观察结果及其原理。

### 【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处？
3. 在高渗的尿素溶液中，蚕豆叶片下表皮保卫细胞出现质壁分离后很快就发生质壁分离复原，且气孔大张；而其他表皮细胞长时间后才开始发生质壁分离复原，原因何在？

### 【参考文献】

- [1] 邹琦. 植物生理生化实验指导. 北京: 中国农业出版社, 1995
- [2] 山东农学院, 西北农学院. 植物生理学实验指导. 济南: 山东科学技术出版社, 1980
- [3] 上海植物生理学会. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985

(山东农业大学 邹琦)



## 实验 2、叶肉细胞的分离及其活力的检查

在对植物的细胞培养、形态观察和生理生化的研究中，常需从植物组织中分离出一定数量具有活力的单细胞作为实验材料，本实验学习从叶片中分离叶肉细胞以及检查其活力的方法。

### 【原理】

分离植物细胞常用的方法有两种：一是机械分离法，用机械力破除细胞间的联接；二是酶法分离，用果胶酶、离析酶等酶分解粘联细胞的中胶层。经分离可得到有活性的叶肉细胞，其细胞质中的叶绿体排列规则，质膜完整，不易被染料染色，并具有光合放氧的能力。因此，可用镜检、染色和测定光合放氧活性等方法来检测细胞的活力。

### 一、机械法分离叶肉细胞

#### 【仪器与用具】

组织捣碎机 1 台或研钵 1 套；低速台式离心机 1 台；100 目尼龙纱布（30cm × 30cm）1 块；100ml 量筒 1 个；100ml 烧杯 2 个；200ml 烧杯 1 个；冰瓶 1 个；离心管、滴管若干。

#### 【试剂】

STN 液（蔗糖  $0.4\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，Tricine  $20\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH7.8，NaCl  $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ）：将 137g 蔗糖、3.58g Tricine（三羟甲基甘氨酸）、0.58g NaCl 溶于 800ml 左右水中，用 NaOH 溶液调至 pH7.8，加水至 1 000ml，置  $0\sim 4^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

#### 【方法】

1. 选用甘薯、大豆等植物的嫩叶 50g 左右，洗净，去叶脉，剪成 2mm 左右宽的叶条，放入捣碎机中，加入 150ml 左右的冷 STN 液，以  $10\ 000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  转速，快速捣碎 15s，或取 10g 左右的叶片剪碎后，放入研钵中，加入 50ml 冷 STN 液，研磨 1min。

2. 先将匀浆用 100 目的单层尼龙纱布过滤，将滤液用台式离心机低速（ $500\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ）离心 30s。去上层液，用少量 STN 液悬浮沉淀，悬浮液即为叶肉细胞。如果第一次离心后，沉淀中细胞碎片较多，可再悬浮与离心一次。提取过程最好在  $4^{\circ}\text{C}$  左右温度下进行。

3. 细胞悬浮液于  $0^{\circ}\text{C}$  下贮存备用。

### 二、酶解法分离叶肉细胞

#### 【仪器与用具】

抽真空装置 1 套或大针筒 1 套；恒温水浴（最好用恒温振荡器）1 台；感量 0.01g 天平 1 台；离心机 1 台；100、50ml 烧杯各 2 个；镊子 1 把；剪刀 1 把；100 目尼龙纱布（30cm ×