

北京农学院
[自编教材指导书]

《植物生理学》实验指导

(2016 版)

李奕松 姬谦龙 马兰青
葛秀秀 杨明峰 王文平 赵筱萌编

北京农学院生物科学与工程学院
2016.2

目 录

★★★实验室特别提醒

实验一	质壁分离法测定细胞渗透势·····	4
实验二	小液流法测定植物组织水势·····	5
实验三	叶绿体色素的提取分离理化性质及定量测定·····	7
实验四	植物根系活力的测定（法）·····	10
实验五	过氧化氢酶（）活性的测定·····	12
实验六	植物硝酸还原酶（）活性的测定·····	14
实验七	植物细胞膜透性的测定·····	16
实验八	植物光合速率的测定·····	17

★★★实验室特别提醒

一、 实验室纪律要求

1. 按照规定，穿好实验服进入实验室。
2. 不允许将食品和饮用水带进实验室。
3. 按照教师指定的实验台进行实验，不允许私自调换位置。
4. 实验课中禁止大声喧哗、跑动和打闹。

二、 实验安全注意事项

5. 注意电源使用安全，禁止湿手拔插插头。
6. 水浴锅锅盖开启关闭时，注意避免蒸汽烫伤。
7. 注意抽气泵安全使用。
8. 注意使用分光光度计时参比液体样品不能满溢洒漏。

三、 实验课程要求

9. 提前预习实验指导内容，熟悉实验原理和步骤。
10. 检查台面用具是否完好，若否，须报告进行补充调整。
11. 清洗器皿程序：“自来水→去污粉→自来水→去离子水”。
12. 实验原始结果记录需要指导教师审查签字。
13. 实验后填写仪器使用记录。
14. 实验完毕清洁实验器皿和台面、地面卫生。
15. 离开实验课堂需要得到指导教师批准。

实验一 质壁分离法测定细胞渗透势

一、原理：

在生活细胞和外界溶液构成的渗透体系中，水分总是从高水势一方流向低水势一方。将植物组织放入一系列不同浓度的蔗糖溶液中，经过一段时间以后，有的细胞吸收水分，细胞膨胀；有的失去水分，细胞发生质壁分离。如果在某一溶液中细胞脱水达到平衡时刚好细胞处在**临界质壁分离状态**，此时细胞内的压力势等于零，外界溶液的渗透势等于细胞渗透势，故此外界溶液称为该组织的等渗溶液，其浓度称之为该组织的等渗浓度。根据公式即可计算出该组织细胞液的渗透势。在实际测定时，由于**临界质壁分离状态**难以在显微镜下直接观察到，所以一般均以细胞**初始质壁分离状态**作为判断组织等渗浓度的标准。如果细胞质壁分离较为明显，可根据引起质壁分离的溶液浓度，与相邻的不引起质壁分离的溶液浓度，取其平均值，求出组织等渗浓度，并计算出溶液的渗透势，即为该组织细胞的渗透势。

二、材料与设备：

- 1.植物材料：洋葱鳞茎、大葱、蚕豆叶片或其它植物叶片。
- 2.设备：显微镜 1 台、培养皿 7 套；滴管；载玻片、盖玻片各 5 片；镊子 1 把；单面刀 1 片；滤纸适量。
- 3.试剂：1.00 蔗糖溶液，0.03%中性红溶液。

三、实验步骤：

1. 以 1.00 蔗糖溶液为母液,依照公式 $C_1V_1=C_2V_2$ 配制 0.30、0.40、0.50、0.60、0.70 蔗糖溶液各 10 于干燥清洁的小培养皿内备用。注意盖上培养皿盖，防止蒸发浓缩。
2. 用刀片在洋葱鳞茎内表皮上划出边长为 5mm 的小方格，用镊子剥取内表皮数块浸入盛有 0.03%中性红溶液的小培养皿内，染色 3，取出后放入盛有自来水的小培养皿内，冲洗中性红留存在细胞间隙、细胞壁等上面的浮色，用滤纸吸干内表皮上的多余水分。
- 3.在盛有不同浓度蔗糖溶液的培养皿内分别放入染过色并漂洗后的内表皮数块。20 后，按从高浓度到低浓度蔗糖溶液的顺序各取出内表皮小块，依次开始镜检，绘图记录质壁分离情况，求出组织细胞的等渗溶液浓度。

四、结果计算：

由所得到的组织细胞的等渗浓度和测定时的室温，用下式计算植物细胞的渗透势。

$$\Psi \quad ()$$

Ψ_s ：为细胞渗透势，以表示。

i ：为溶液的等渗系数（蔗糖溶液的 1）。

C ：等渗溶液的浓度（）。

T ：为绝对温度，（273℃）K， t 为实验时的室温。

R ：为气体常数，0.008314（L·k）

实验二 小液流法测定植物组织水势

一、原理

水势表示水分的化学势，水分从水势高处流向低处。植物体细胞之间、组织之间以及植物体和环境之间的水分移动方向都由水势决定。

当植物细胞或组织分别放在一系列浓度递增的溶液中时，如果植物组织的水势小于溶液的渗透势，则组织吸水而使外界溶液浓度变大；反之，则组织水分外流而使外界溶液浓度变小。若植物组织的水势与溶液的渗透势相等，则二者水分保持动态平衡，所以外界溶液浓度不变，而外界溶液的渗透势即等于所测植物组织的水势。溶液浓度不同，比重不同，当两个不同浓度的溶液相遇时，稀溶液由于比重小而上浮，浓溶液则由于比重较大而下沉。取浸过植物组织的溶液一小滴（为了便于观察可先染色），放在原来浓度的溶液中，观察液滴升降情况即可判断浓度的变化，如小液滴不动，则表示溶液浸过植物组织后浓度未变，即外界溶液的渗透势等于组织的水势。

二、材料与设备：

1. 植物材料：胡萝卜肉质根或其它作物的叶片。

2. 设备：青霉素小瓶或小试管（12×10mm）6支（均具塞）；大试管（15×150）6支（具塞）；10移液管2支；1移液管2支；毛细滴管6支；打孔器1个；温度计1支；解剖针1支；镊子1把。

三、实验步骤：

1、以1.00蔗糖溶液为母液,依照公式 $C_1V_1=C_2V_2$ 配制一系列不同浓度的蔗糖溶液（0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5）于6支干净、干燥的大试管中，各管加塞，并编号。按编号顺序在试管架上排成一列，作为对照组。

2、另取6支干净、干燥的青霉素小瓶，编定序号，按顺序放在试管架上，作为实验组。然后由对照组的各试管中分别取溶液1移入相同编号的实验组试管中，加塞，备用。

3、取胡萝卜肉质根（或剪下具有代表性的新鲜叶片）立即用打孔器打园片。注意实验材料的取样部位一定要一致，若为叶片组织要避开大的叶脉部分。迅速将适量植物材料放在青霉素小瓶（或小试管）中。一般胡萝卜肉质根放入8片（厚约1）左右，叶片材料放入20片左右。摇动小瓶，使植物材料浸入到溶液中。注意这个过程操作要快，防止水分蒸发。放置20。在此期间摇动小瓶2-3次，使组织和溶液之间进行充分的水分交换。

4、20后，分别在各小瓶中加入甲烯兰粉末少许，摇匀，使溶液为蓝色。按浓度依次分别用毛细吸管吸取少量蓝色溶液，轻轻插入相应浓度的试管中，伸至溶液中部，小心缓慢地放出蓝色溶液一小滴，慢慢取出毛细管（注意避免搅混溶液）。观察并记录液滴的升降情况：

如果有色液滴向上移动，说明浸过植物组织的蔗糖溶液浓度变小，植物组织失水，表明植物组织的水势高于该浓度溶液的渗透势；如果有色液滴向下移动，说明浸过植物组织的蔗糖溶液浓度变大，植物组织吸水，表明植物组织的水势低于该浓度溶液的渗透势；如果液滴静止不动，则说明植物组织的水势等于该浓度溶液的渗透势。在测定中，如果在前一浓度溶液中液滴下降，而在后一浓度溶液中液滴上升，则该组织的水势为前后

二种浓度溶液渗透势的平均值。

四、结果计算

记录液滴静止不动的试管中蔗糖溶液的浓度。

由所得到的等渗浓度和测定的室温，按下式计算植物组织的水势。

$$\Psi_w = - \quad ()$$

Ψ_w : 为植物组织水势，以表示。

i : 为溶液的等渗系数（蔗糖溶液的 1）。

C : 为等渗溶液的浓度：（）。

T : 为绝对温度：（273℃）K， t 为实验时的室温。

R : 为气体常数：0.008314（L·k）

实验三、叶绿体色素的提取、理化性质及定量测定

I. 叶绿体色素的提取、理化性质

一、原理：

叶绿体中含有绿色素（叶绿素 a 和 b）和黄色素（胡萝卜素和叶黄素）。这两类色素能溶于有机溶剂，且各种色素的脂溶性不同。根据它们在有机溶剂（如乙醇、甲醇、丙酮等）中的溶解特性，可将它们从叶子中提取出来。

叶绿素是一个双羧酸的脂，在碱的作用下，可发生皂化反应。在酸性条件下，叶绿素卟啉环中央的镁可被氢取代，于是叶绿素成为褐色的去镁叶绿素。叶绿素中的镁也可被铜、锌等金属离子取代，此时叶绿素仍可保持绿色。叶绿素在光照下会发出暗红色的荧光。

二、材料与设备：

1. 植物材料：新鲜植物叶片。

2. 设备：研钵一套；漏斗一个；剪子一把；细玻璃棒一支；烧杯（50）1支；20 刻度试管 5 支；5 刻度试管 2 支；25 刻度吸管 2 支；酒精灯；石棉网；铁三脚架；滤纸适量。

3. 试剂：丙酮；₃；80%丙酮；苯；醋酸酐粉末；50%醋酸；甲醇溶液（20 克溶于 100 甲醇中）

三、实验步骤：

1. 色素的提取

取洗净新鲜的植物叶子 5 克，剪碎放入到研钵中，加入少量碳酸钙和石英砂，再少量多次加入丙酮共 10，研磨至丙酮染成深绿色，将丙酮提取液滤入小烧杯内，再用 10 丙酮重复研磨，过滤，滤液待用。

2. 理化性质的测定

1) 荧光现象

取叶绿素提取液，放入试管中，在反射光下观察，溶液的颜色为暗红色，这是叶绿素辐射荧光的现象；在透射光下为绿色，是由于叶绿素分子不吸收绿色光的原因。

2) 皂化作用

用移液管吸取叶绿素提取液 5，放入到一大试管中，再加入 1.5 20%甲醇溶液，摇匀。紧接着加入 5 苯，马上摇匀。沿试管壁加入蒸馏水 1，轻轻转动试管，静置于试管架上，可看到溶液逐渐分成两层，上层是苯溶液，其中溶有黄色的类胡萝卜素，下层为稀的丙酮溶液，其中溶有绿色的皂化的叶绿素 a 和 b。

3) 取代作用[和 2^+ 对叶绿素分子中 2^+ 的取代]

用移液管吸取叶绿素提取液 5，放入试管中，加入 50%醋酸数滴（或浓 1~2 滴），摇匀，可观察到溶液由绿色变成褐色，此时叶绿素分子中的 2^+ 被取代，为去镁叶绿素。之后将溶液倒一半于另一试管中，加醋酸酐粉末少许，微微加热，则溶液颜色又变成绿色，此时去镁叶绿素分子中的被 2^+ 取代，为铜代叶绿素。将两试管中的溶液进行比较。

· 叶绿素的吸收光谱与定量测定

一、原理

实验目的：掌握紫外分光光度计的使用，学习测定叶绿素的含量及吸收光谱的测定方法。

根据叶绿素对可见光有特定的吸收光谱，利用分光光度计在某一特定波长下测定其光密度，利用公式计算叶绿素的含量。该法不但精确度高而且能在未分离的情况下，分别测定叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量。

已知叶绿素 a、b 在红光区的最大吸收峰分别位于 663 和 645，又已知在波长 663 下叶绿素 a、b 的 80%丙酮溶液的比吸收系数为 82.04 和 9.72，在波长 645 下分别为 16.75 和 45.60。其关系式：

$$D_{663} = 82.04 + 9.72 \dots\dots\dots (1)$$

$$D_{645} = 16.75 + 45.6 \dots\dots\dots (2)$$

D_{663} 、 D_{645} ：分别为叶绿素溶液在波长 663 和 645 的光密度。

a 、 b ：分别为叶绿素 a、b 的浓度，单位为

解方程(1)(2)得：

$$a = 12.7 D_{663} - 2.59 D_{645} \dots\dots\dots (3)$$

$$b = 22.9 D_{645} - 4.67 D_{663} \dots\dots\dots (4)$$

与 a 相加，既得叶绿素总量

$$a + b = 20.3 D_{645} + 8.03 D_{663} \dots\dots\dots (5)$$

根据叶绿素 a、b 在 652 处有相同的比吸光系数（34.5），即可在此波长下测定光密度（ D_{652} ）而求出叶绿素总浓度：

$$D_{652} \times 1000 \dots\dots\dots (6)$$

34.5

二. 材料和设备：

1. 实验材料：菠菜叶片
2. 设备：756 紫外分光光度计，电子天平，研钵一套，漏斗一个，25 容量瓶一个
3. 试剂：80%丙酮，3 粉末

三. 实验步骤：

1. 叶绿素提取液的置备：称取新鲜干净的叶片（去主脉）0.1 克，剪碎，放入研钵中，加入少量 3 粉末和石英砂，加入 80%丙酮，仔细研磨成匀浆，再加入适量丙酮，继续研磨至组织残渣变为白色，静止片刻，将提取液过滤至 25 容量瓶中，再用 80%丙酮冲洗研钵和滤纸，将色素冲洗干净，最后用 80%丙酮定容至 25，摇匀、待用。

2. 光密度测定与吸收光谱扫描：以 80%丙酮做对照，按下列步骤输入程序：

- 1) **开机**：依次打开外部电源(如稳压器)、主机电源。
- 2) **仪器自检**：当打开仪器电源时，仪器便进入自检程序，自检各项都“ ”后，进入选择工作方式界面；预热半小时后进行以下操作。

3) 光度测量未知叶绿素 a、b 总浓度的测定：

3.1 进入光度测量(652.)：在选择工作方式界面中按①键进入光度测量。

3.2 参数设置：按 F1 键进行参数设置：选测光方式为“ ”，按键退出；按 F2 键进入测量模式；按 λ 输入测量样品波长值。

3.3 校零：在第一样品池中放入参比溶液，按 λ 键，仪器进行自动校零，校完后取出参比溶液。

3.4 测量：将取出的参比溶液倒掉，换上样品溶液，放入第一样品池内，按 λ 即可测

量样品值。

4) 光谱测量

4.1 进入光谱测量：在选择工作方式界面中按②键进入光谱测量。

4.2 参数设置：按 F1 进入参数设置：（1）测量波长范围(700-300)；（2）记录范围（0-3）；（3）采样间隔（1）；（4）光度方式(一般为)；（5）扫描速度（一般为中速）。参数设置完后按键退出参数设置。

4.3 基线校正：在第一样品池中放入参比溶液，按键仪器进行基线校正，校完后取出参比溶液。

4.4 扫描：将取出的参比溶液倒掉，换上样品溶液，放入第一样品池中，按 仪器自动进行扫描。

四、叶绿素含量的计算：

按公式（3）、（4）分别计算叶绿素 a、b 的浓度，相加既得总浓度，也可按公式（6）直接算出叶绿素总浓度。

然后按公式（7）或（8）算出叶绿素总含量：

$$\text{叶绿素含量 (鲜重\%)} = \frac{() \times \text{提取液总体积(L)} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品鲜重 ()}} \times 100\% \dots\dots (7)$$

$$\text{叶绿素含量 ()} = \frac{() \times \text{提取液总体积(L)} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品鲜重 (g)}} \dots\dots (8)$$

实验四、植物根系活力的测定（法）

一、原理

根是植物的重要器官，它不断生长，具有吸收水分和矿质养分的功能，而且还能进行合成代谢，如氨基酸、植物激素等的合成。所谓根系活力是泛指根的吸收、合成代谢等等的的能力。根系活力与吸收作用的强弱有直接关系，与脱氢酶系活性的强弱成正比。法测定根系活力就是根据根系脱氢酶系氧化还原能力强弱而设计的。

氯化三苯基四氮唑（ TTC ）是标准氧化还原电位为 -80 的氧化还原物质。其氧化态无色，并溶于水，但被还原后即生成不溶于水的三苯基甲腙，呈红色，它在空气中不会自动氧化，相当稳定，所以可用作为脱氢酶的氢受体。

植物根所引起的还原，可因加入琥珀酸、延胡索酸、苹果酸得到加强；而被丙二酸、碘乙酸等所严重抑制。所以还原量能表示脱氢酶活性，并作为根系活力的指标。

二、材料与设备

1. 植物材料：水培或砂培植物幼苗的根，或仔细洗净泥土的植物幼苗的根。玉米根系发达，是较好的实验材料。

2. 设备：721型分光光度计；温箱；电子天平；研钵1套；镊子1把；漏斗1个；刻度吸管21支、102支、0.51支；容量瓶101个、刻度试管206支；烧杯5001个；石英砂适量。

3. 试剂

[1]、乙酸乙酯（分析纯）500；

[2]、分析纯连二亚硫酸钠（ S_2O_4 ）粉末少许；

[3]、1溶液，准确称取1.000g，溶于水中，定容至100；溶液应在6.5~7.5，以试纸试之，如不易溶解，可先加少量酒精，使其溶解后再加水。

[4]、0.4溶液，准确称取0.400g，溶于水中，定容至100；

[5]、1/15磷酸缓冲液（7.0），配制方法为：A液：称取分析纯 $H_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 11.876g溶于蒸馏水中成1000，B液：称取分析纯 Na_2HPO_4 ，9.078g溶于蒸馏水中成1000。用时取A液60、B液40混合即成。

[6]、1硫酸：用量筒取出比重1.84的浓硫酸55，边搅边加入盛有500 H_2O 的烧杯中，冷却后稀释至1000。

三、实验步骤（定量测定）

（1）标准曲线的制作：吸取0.25~0.4%溶液放入10刻度试管中，加入少许 S_2O_4 粉末[应尽量多加一些，以使充分还原]，摇匀后立即产生红色的三苯基甲腙。用乙酸乙酯原液定容至刻度，摇匀。然后分别取此液0.10，0.25，0.50，0.75，1.00置10刻度试管中，分别加乙酸乙酯4.90，4.75，4.50，4.25，4.00，即得到含三苯基甲腙0.01，0.025，0.05，0.075，0.10的标准比色系列，以乙酸乙酯做空白作参比，在485波长下测定光密度。以还原量为横坐标，光密度为纵坐标，绘制标准曲线。

（2）剪取植物根尖1部分为实验材料，称取0.1g，放入刻度试管中，加入0.4溶液和磷酸缓冲液的等量混合液10，把根充分浸在溶液内，在37℃下保温40~60，植物根尖部分成为红色。之后加入1硫酸2，以停止反应。空白试验为先加硫酸再加入根样品，其它操作相同。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。

如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/637161142114006112>