

植物生物学实验-植物生理部分

实验五

矿质元素缺乏症状的观察及光合特征的测定（2）

- 植物形态特征的变化是由于生理变化引起的，而且总是落后于生理变化，因此将叶片光合色素的含量、净光合速率等生理指标的测定与形态观察相结合来研究植物缺素症，能更全面地反应在不同缺素条件下植物的生长状况。

【实验内容】

- 叶片净光合速率的测定
- 光合色素的提取分离和含量测定及理化性质的观察
 - 光合色素的提取和含量的测定
 - 荧光现象的观察
 - 光合色素的分离
 - 叶黄素和叶绿素的分离
 - 胡萝卜素的分离
- 用氢离子和铜离子取代叶绿素中的镁离子

叶片净光合速率的测定

采用**LI-6400光合测定系统**来测定完全培养 and 缺素培养后叶片的净光合速率等指标。本实验在开路系统下进行测定。

净光合速率是单位时间内光合作用减去呼吸作用的差值。

光合速率以每秒每平方米叶面积吸收二氧化碳的微摩尔数表示。

Li-6400记录的参数

- PAR ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$): 光合有效辐射 (100-1800)
- CO₂ int (ppm): 细胞间隙CO₂ 浓度
- P ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$): 净光合速率
- E($\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$): 蒸腾速率
- C($\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$): 气孔导度 (气孔开度)
- Rate (lpm): 空气流速 (0.5 lpm)
- TA (°C): 叶室空气温度
- Hr(%): 相对湿度
- CO₂o (ppm): 当前叶室出气口CO₂ 浓度
- CO₂i (ppm): 当前叶室进气口CO₂ 浓度





光合色素的提取分离和含量测定 及理化性质的观察

■ 光合色素的提取

1. 精确称取完全培养和缺素培养（一组即可）的叶片各0.05g左右，剪碎研钵（用约2ml 95%乙醇），过滤到干燥的10或者25ml锥形瓶中。
2. 再加入少量95%乙醇继续研磨提取，直到绿色消失为止。最后定容到刻度备用。

■ 光合色素含量的测定

光合色素含量的计算公式如下：

$$C_a = 12.7A_{665} - 2.69A_{649}$$

$$C_b = 22.9A_{649} - 4.68A_{665}$$

$$C_{a+b} = 20.2A_{649} + 8.02A_{665}$$

$$C_k = 4.7A_{440} - 0.27C_{A+B}$$

C_a 、 C_b 、 C_{a+b} 、 C_k 分别为叶绿素a、叶绿素b、叶绿素a+b、类胡萝卜素的浓度($\mu\text{g/mL}$)， A_{665} 、 A_{645} 、 A_{440} 分别为665nm、649nm、440nm处的吸光度值。

■ 叶绿素含量的计算

根据得到的叶绿素含量，分别计算叶绿素a、叶绿素b、叶绿素a+b、类胡萝卜素的含量（单位： $\mu\text{g/g}$ ，也可通过单位换算，将单位变为： mg/g ）

$$\text{叶绿素a含量} = C_a \times V/W$$

$$\text{叶绿素b含量} = C_b \times V/W$$

$$\text{叶绿素(a+b)含量} = C_{a+b} \times V/W$$

$$\text{类胡萝卜素含量} = C_k \times V/W$$

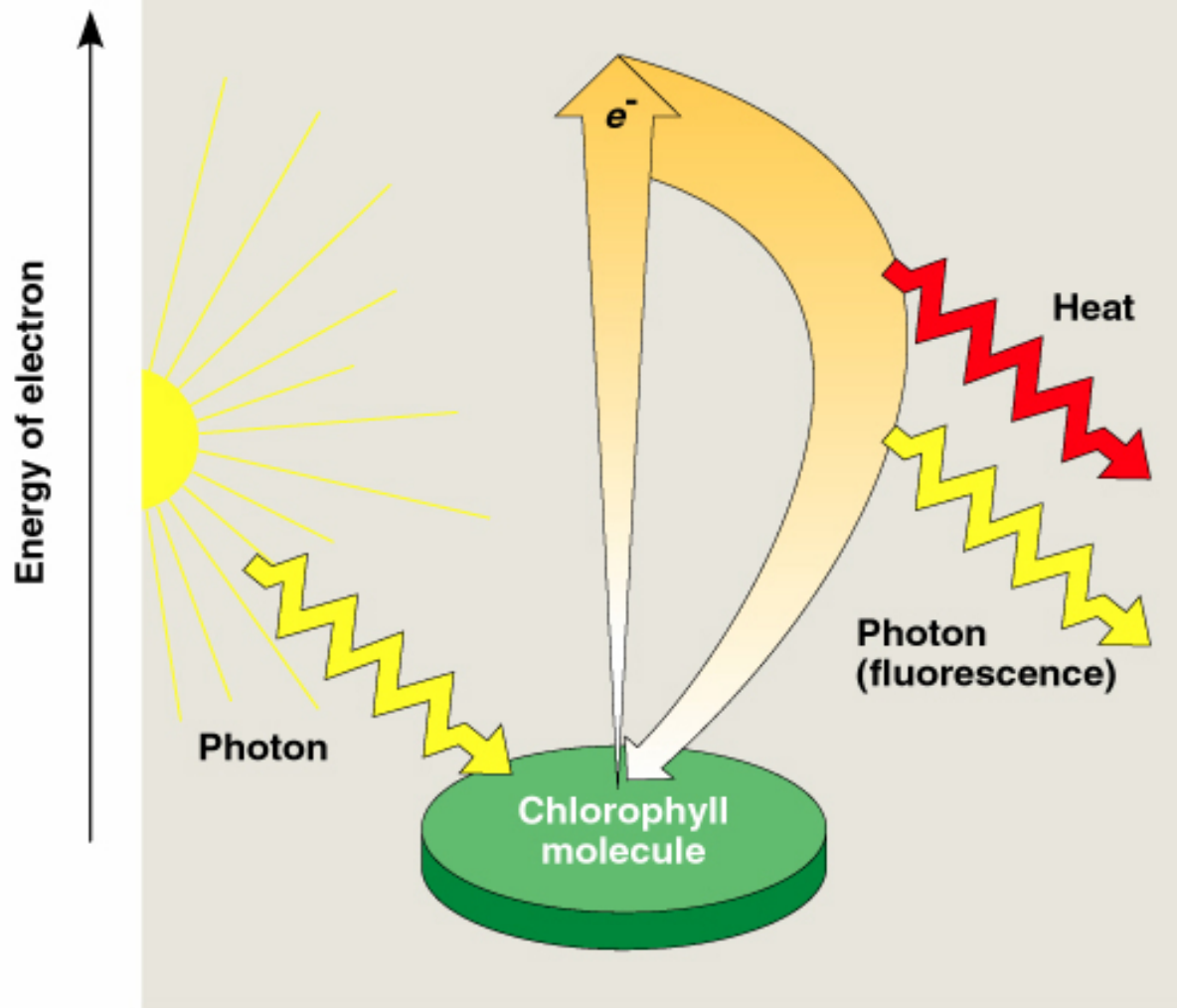
式中， V ：提取叶绿素的总体积（mL）；
 W ：植物材料的鲜重（g）。

荧光现象的观察

将叶绿素提取液置于光下，观察其反射光的颜色。

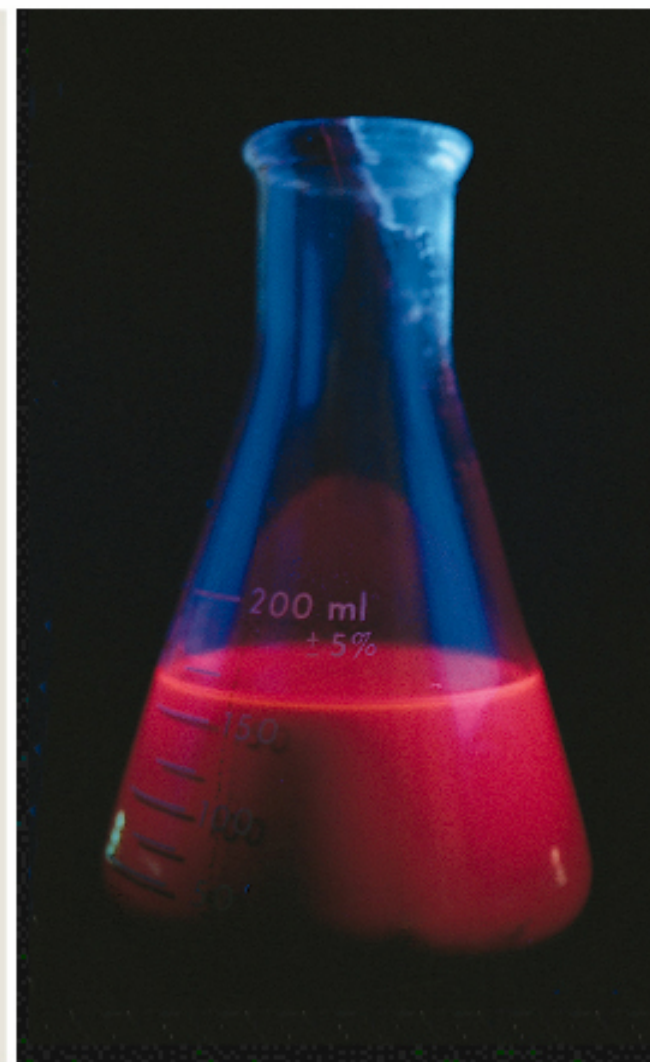
荧光的定义：伴随着激发态分子自发地衰减并回到基态所发出的光称为荧光。

正确的观测结果为：叶绿素溶液的透射光呈绿色，反射光呈红色。



(a)

©1999 Addison Wesley Longman, Inc.



(b)

光合色素的分离

■ 叶黄素和叶绿素的分离

取3mL提取液于试管中，加等量的石油醚振荡成乳浊分层（如分层不明显，可再加少量），因叶绿素与胡萝卜素易溶于石油醚，所以上层为绿色、下层为叶黄素，把乙醇染成黄色，如果分层不明显，可加1~2滴水。

■ 胡萝卜素的分离

取3mL提取液于试管中，加1mL 20%NaOH乙醇溶液，摇匀后，放在水浴上煮沸，冷却后，加入3mL石油醚，振荡并分层，上层为黄色的胡萝卜素，下层为叶绿酸的钠盐和叶黄素。

氢、铜取代反应

- 取 5ml 提取液于试管中，加 1—2 滴 10 % HCl，由于氢离子取代了叶绿素分子中的镁离子生成褐色的黑籽酸，然后在黑籽酸中加入少量醋酸铜晶体，在水浴上加热，溶液由褐色转变成暗绿色，铜离子又取代了黑籽酸中的氢离子。

【思考与作业】

- 描述各种元素的缺素症，包括最早出现的部位、根生长情况、叶片颜色的变化等现象，并分析产生这些不同症状的可能原因。
- 你观察到的荧光是什么颜色？其颜色和光强度及叶绿素提取液浓度有关系吗？为什么？
- 比较缺素培养和完全培养的叶片净光合速率和叶绿素含量的差异,试解释可能的原因？