



Министерство сельского хозяйства
Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«Самарская государственная
сельскохозяйственная академия»

Кафедра «Садоводство, ботаника
и физиология растений»

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

Методические указания и рабочая тетрадь
для выполнения лабораторных работ

Студент_____

Курс_____ Группа_____

Кинель

РИЦ СГСХА
2014

УДК 581.1.(07)
Ф-50

Ф-50 Физиология и биохимия растений : методические указания и рабочая тетрадь для выполнения лабораторных работ / сост. В. М. Царевская, М. В. Коваленко, Г. К. Марковская. – Кинель : РИЦ СГСХА, 2014. – 82 с.

Методические указания и рабочая тетрадь предназначены для студентов агрономического факультета, обучающихся по направлению подготовки 110400.62 «Агрономия», профиль подготовки: «Агрономия», «Защита растений» (квалификация (степень) выпускника: бакалавр).

Учебное издание содержит описания лабораторных работ, охватывающих все основные разделы программы дисциплины «Физиология и биохимия растений», вопросы и задания для самостоятельной работы, вопросы для подготовки к зачету и экзамену, учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины. Для каждой работы дано ее краткое теоретическое обоснование и описана методика выполнения опытов.

© ФГБОУ ВПО Самарская ГСХА, 2014
© Царевская В. М., Коваленко М. В.,

«Физиология и биохимия растений» – это дисциплина о процессах жизнедеятельности растений и их биохимических основах. Основными разделами этой дисциплины являются: физиология и биохимия растительной клетки, фотосинтез, дыхание, водный режим, минеральное питание, превращение и транспорт веществ в растении, рост и развитие растений, физиология формирования урожая и его качество, устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды.

Учебное издание для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Физиология и биохимия растений» включает структуру и методики опытов, проводимых на аудиторных занятиях по 19 темам. По каждой теме дано краткое теоретическое введение, основные физиологические и биохимические понятия, вопросы для самоконтроля, указания по методике проведения лабораторных работ и рекомендации по оформлению полученных результатов. Это позволяет качественно освоить материал темы, самостоятельно проконтролировать полученные знания, приобрести навыки в выполнении опытов. 2 темы даны для самостоятельного изучения.

Целью методических указаний является изучение 21 темы по физиологии и биохимии растений и более эффективное и продуктивное использование учебного времени студентов.

Задачи методических указаний:

- дать основные понятия и термины по изучаемым темам;
- стимулировать самостоятельное творческое мышление;
- организовать самостоятельную работу студентов.

Методические указания предназначены для студентов II курса агрономического факультета, обучающихся по направлению подготовки 110400.62 «Агрономия».

В результате изучения дисциплины студент должен

знать:

- биохимический состав растений;
- строение клетки как структурной и функциональной единицы растительного организма;
- сущность физиологических и биохимических процессов в растениях;
- закономерности роста и развития растений и их зависимость от условий окружающей среды;

- физиологию формирования урожая и процессов в ходе хранения продукции растениеводства;

уметь:

- проводить сравнительную оценку биохимического состава растений;
- определять интенсивность процессов жизнедеятельности у разных видов сельскохозяйственных растений;
- площадь листьев и чистую продуктивность фотосинтеза;
- устойчивость растений к действию неблагоприятных факторов и прогнозировать результаты перезимовки озимых культур;
- диагностировать недостаток или избыток элементов минерального питания по морфофизиологическим показателям;
- давать физиологическое обоснование агротехническим мероприятиям и срокам их проведения;

владеть:

- навыками приготовления временных препаратов и постановки несложных опытов;
- навыками обработки и анализа экспериментальных данных, систематизации результатов и разработки физиологических подходов для повышения эффективности растениеводства

В процессе изучения дисциплины у студента должны сформироваться **профессиональные компетенции:**

- способность использовать основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности, применять методы математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования;
- способность распознавать по морфологическим признакам наиболее распространенные в регионах дикорастущие растения и сельскохозяйственные культуры, оценивать их физиологическое состояние, адаптационный потенциал и определять факторы улучшения роста, развития и качества продукции.

Лабораторная работа 1 ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КЛЕТКИ

Цель занятия. Ознакомиться с локализацией основных органических веществ в клетке, применяя простейшие методы качественного анализа.

В состав клетки входят органические и минеральные вещества. Основными органическими веществами в составе растительной клетки являются белки, жиры, углеводы и нуклеиновые кислоты.

Белковые вещества представляют собой высокомолекулярные органические соединения, построенные из аминокислот. Белки выполняют в клетке конституционные, каталитические, защитные, транспортные и запасные функции. Наличие в молекуле белка различных свободных групп и радикалов – аминных ($-\text{NH}_2$), карбоксильных ($-\text{COOH}$), гидроксильных ($-\text{OH}$), сульфгидрильных ($-\text{SH}$), дисульфидных ($-\text{S-S-}$) и др. – обуславливает огромное разнообразие реакционных возможностей, как отдельных структурных элементов белка, так и всей белковой молекулы. Это используется для выявления и количественного определения белков. Белки в различных количествах находятся во всех органах растений. В вегетативных органах количество белков обычно достигает 5-15% от веса сухой массы, в семенах злаков 10-20%, в семенах бобовых и масличных культур – 25-35%.

Нуклеиновые кислоты представляют собой органические кислоты с огромным молекулярным весом. Они играют важную роль в передаче наследственных свойств живых организмов и в процессе синтеза белка. Различают два вида нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновую кислоту – ДНК, которая в основном локализована в клеточном ядре и рибонуклеиновую кислоту – РНК, которая находится и в ядре, и в цитоплазме клетки. При гидролизе нуклеиновые кислоты дают пуриновые и пиримидиновые основания, сахар (пентозу), рибозу и дезоксирибозу и фосфорную кислоту.

Жиры и жироподобные вещества. Жиры (триглицериды) – тройные эфиры глицерина и трех молекул жирных кислот. Жиры чаще выполняют функции запасных веществ, конституционную и транспортную. Жироподобные вещества (липоиды) отличаются от жиров тем, что один из гидроксильных глицерина замещен не жирной кислотой, а каким-либо другим гидрофильным веществом, например, остатком фосфорной кислоты (фосфолипиды), к которому в свою очередь может присоединиться какое-либо органическое основание (например, холин). Некоторые из липоидов вместо глицерина включают в молекулу другой многоатомный спирт (например, инозит). Липоиды чаще выполняют функции конституционных (липопротеидная мембрана), реже запасных (фосфолипиды) или защитных (воска) веществ. Общим, что объединяет жиры и липоиды, является их растворимость в органических растворителях: эфире, хлороформе, сероуглероде, бензине и не растворимость в воде.

Работы выполняются в порядке их расположения, используя свободное время для подготовки следующей работы.

Работа 1.1. ОБНАРУЖЕНИЕ БЕЛКА В ЛИСТЬЯХ (ПО ЧАЙЛАХЯНУ)

Метод основан на проведении биуретовой реакции. Эта реакция характерна для веществ, содержащих пептидную связь ($-\text{CO-NH-}$). При обработке щелочного раствора белка раствором медного купороса появляется фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание.

Методика выполнения. К черешку листа привязать нитку. Листья погрузить на 1-2 мин в кипящую воду, затем перенести в колбу с 96% спиртом. Колбу с обратным холо-

дильником погрузить в горячую водяную баню для экстрагирования хлорофилла. Через 0,5-1 ч наступает полное обесцвечивание листа. Обесцвеченные листья смочить дистиллированной водой и расправить в чашке Петри. Провести биуретовую реакцию, для чего листья на 1 ч залить 7% раствором медного купороса, промыть дистиллированной водой и залить 10% щелочью.

Листья приобретают фиолетовую окраску, усиливающуюся в течение часа, что указывает на присутствие белков. По интенсивности полученной окраски можно определить относительное содержание белков в разных частях листа и листьях различных культур, оценивая его по 5-бальной системе.

Оформление результатов опыта

- 1) Зарисовать исследуемые листья.

Рис. 1.1. Лист _____

Рис. 1.2. Лист _____

- 2) Заполнить таблицу 1.

Таблица 1

Окраска листьев после обработки по Чайлахяну

Культура	Окраска	Оценка количества белка в баллах

- 3) Сделать выводы. В каких частях листа и у каких растений содержание белка выше?

Работа 1.2. ОБНАРУЖЕНИЕ БЕЛКА НА СРЕЗАХ ТКАНИ

Метод основан на получении характерных цветных реакций на тонких срезах тканей путем просмотра полученных препаратов под микроскопом.

а) Биуретовая реакция. Тонкий срез семени кормовых бобов поместить на предметное стекло в каплю 7% раствора медного купороса на 20-30 мин. Тщательно убрать этот раствор с помощью фильтровальной бумаги и промыть срез водой. Обработать 10% раствором щелочи до появления фиолетовой окраски. Препарат покрыть покровным стеклом и рассматривать под микроскопом.

б) Нингидриновая реакция служит для обнаружения как свободных, так и связанных аминокислот. Основана на образовании окрашенного соединения в результате сдваивания молекул нингидрина и присоединения к ней азота аминокислоты.

Методика выполнения. Кусочек эпидермиса с мясистой чешуи лука поместить в 0,5% раствор нингидрина на предметное стекло. Подогреть препарат на спиртовке до появления синей окраски. Покрыть препарат покровным стеклом и рассмотреть под микроскопом.

Оформление результатов опыта

1) Зарисовать препараты. Наименование ткани _____

Рис. 1.3. Окраска нингидрином

Рис. 1.4. Биуретовая реакция

2) Можно ли выделить в клетке места преимущественной локализации белков? Почему? _____

Работа 1.3. ОБНАРУЖЕНИЕ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКЕ

В цитохимии нуклеиновых кислот широко используют смесь двух красителей – пиронина и метилового зеленого. Пиронин адсорбируется с РНК, метиловый зеленый избирательно связывается с ДНК. Это дает возможность одновременно выявить локализацию в клетке РНК и ДНК.

Методика выполнения. С вогнутой стороны мясистой чешуи лука снять кусочек эпидермиса и поместить его в каплю красителя на предметное стекло на 5-20 мин. Оттянуть краску фильтровальной бумагой, добавляя с противоположной стороны воду. Препарат покрыть покровным стеклом и рассматривать под микроскопом сначала при малом, а затем при среднем увеличении. Под действием красителя РНК окрашивается в малиновый цвет, ДНК – в синий. На хорошо приготовленных препаратах в ядре можно рассмотреть ядрышко, имеющее иную, чем ядро, окраску.

Оформление результатов опыта

1) Крупным планом зарисовать несколько клеток после окраски их пиронином плюс метиловый зеленый.

2) Сделать выводы о локализации ДНК и РНК в клетке.

Работа 1.4. ОБНАРУЖЕНИЕ ЖИРОВ И ЛИПОИДОВ

Жиры и близкие к ним вещества могут быть обнаружены с помощью специальных красителей. Чаще используется Судан-III. Окраска, по-видимому, основана на растворении этой краски в жирах и жироподобных веществах.

Методика выполнения. Вдоль замоченного зерна кукурузы, через зародыш, сделать срезы. Первый срез выбрасывается, второй используется для изготовления препарата. Срез поместить на предметное стекло в каплю красителя на 10-20 мин. Краситель оттянуть фильтровальной бумагой, капнуть каплю глицерина, покрыть покровным стеклом и рассматривать под бинокулярным микроскопом. Если окраска проявляется слабо, слегка подогреть препарат над спиртовкой.

Оформление результатов опыта

1) Зарисовать срез зерна кукурузы после окраски Судан-III.

2) Сделать выводы. Где в зерне кукурузы, в основном, локализованы жиры и жироподобные вещества?

Задание для самостоятельной работы

Заполните таблицу 2, используя результаты работ по теме 1, учебных и лекционных материалов.

Таблица 2

Характеристика отдельных компонентов растительной клетки

Компоненты	Элементарный состав, строение молекулы (мономер)	Место синтеза и локализация
БЕЛКИ		
ДНК		
РНК		
ЛИПИДЫ		

Лабораторная работа 2

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРА РАСТИТЕЛЬНОГО БЕЛКА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СВОЙСТВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ БЕЛКОВ (ИЭТ)

Цель занятия. Ознакомиться с отдельными свойствами белков.

Белки или протеины – сложные полимеры, построенные из аминокислот, соединенных между собой пептидными связями $-\text{CO}-\text{NH}-$. В результате образования водородных и дисульфидных связей между различными аминокислотами молекула белка приобретает определенную пространственную конфигурацию, это явление называется **конформация белка**. Потеря белком конформации изменяет химические и физические свойства молекулы, приводит к потере физиологической активности.

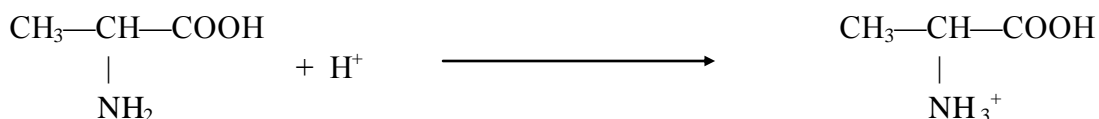
Устойчивость белковой молекулы в растворах определяется ее гидратацией. В белковой молекуле много гидрофильных групп, способных притягивать к себе воду. Так, $-\text{CO}-\text{NH}-$ связывает одну, $-\text{COOH}$ – две, $-\text{NH}_2$ – три молекулы воды. Такая гидратация называется химической.

Молекула белка в растворе имеет заряд. Молекулы воды, обладая свойствами диполей, под действием электростатических сил правильно ориентируются к белковой молекуле, образуя вокруг неё водную оболочку. Чем дальше молекула воды удалена от поверхности белковой молекулы, тем беспорядочней их расположение и слабее связь.

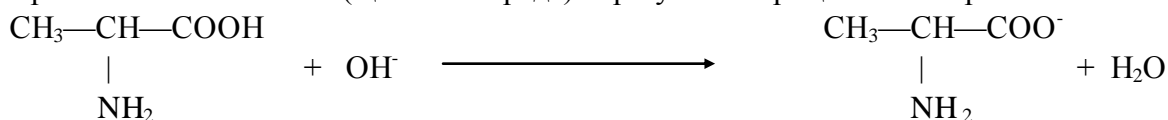
Осаждение белка из раствора можно вызвать действием водоотнимающих средств (спирт, ацетон) или добавлением достаточно большого количества соли. Выделение белка из раствора под влиянием солей называется **высаливанием**. Этот процесс применяется для получения в чистом виде белков и ферментов. При высаливании не происходит необратимого изменения конфигурации белковой молекулы и после снижения концентрации соли белок вновь переходит в раствор.

Под действием высокой температуры и концентрированных кислот белок переходит в необратимое состояние, происходит его денатурация. Она выражается в потере растворимости, снижении водопоглотительной способности, утрате физиологических функций. Аминокислоты и белки являются амфотерными электролитами и могут диссоциировать как кислоты или как основания.

При избытке ионов водорода (кислая среда) будут образовываться положительно заряженные ионы:



При избытке ионов OH^- (щелочная среда) образуются отрицательно заряженные ионы:



При некоторой определенной величине pH образование положительно и отрицательно заряженных ионов подавляется в одинаковой степени и молекула белка и аминокислоты становится электронейтральной. Это значение pH называется **изоэлектрической точкой (ИЭТ)**. Для разных белков и аминокислот ИЭТ неодинакова и зависит от соотношения свободных карбоксильных и аминокислотных групп. Важно отметить, что в растворе устойчивость белковой молекулы в ИЭТ значительно ниже, так как при этом происходит потеря заряда, снижение гидратации и коагуляция белка.

Работа 2.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛОБУЛИНА ИЗ СЕМЯН ГОРОХА