

УДК 581.1:612.8.015.32:577.11  
ББК 41.2я73  
Р598

**Рогожин В. В.**  
Р598 Практикум по физиологии и биохимии растений : учеб. пособие /  
В. В. Рогожин, Т. В. Рогожина. — СПб. : ГИОРД, 2013. — 352 с.  
ISBN 978-5-98879-151-5

В учебном пособии рассматриваются основные физиологические и биохимические методы (в том числе: изучение физиологии растительной клетки, водный обмен, дыхание, фотосинтез, элементы растений, рост и развитие, приспособленность и устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды), используемые при подготовке и исследовании образцов растительных тканей, а также способы расчета содержания в них биологически активных веществ.

Практикум предназначен для студентов биологических, технических и сельскохозяйственных вузов, а также может быть полезен научным работникам.

УДК 581.1:612.8.015.32:577.11  
ББК 41.2я73

ISBN 978-5-98879-151-5

© «Издательство „ГИОРД“», 2013

# ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ .....	12
ВВЕДЕНИЕ .....	14
<b>Глава 1. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА .....</b>	<b>17</b>
1.1. Правила техники безопасности при проведении исследований в физиолого-биохимической лаборатории .....	18
1.2. Подготовка образцов для физиолого-биохимических исследований .....	21
1.3. Методы расчета экспериментальных данных .....	35
1.4. Порядок записи лабораторной работы .....	37
<b>Глава 2. ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ .....</b>	<b>39</b>
2.1. Выделение субклеточных фракций из колеоптилей пшеницы .....	41
2.2. Выделение микросомальной фракции в ступенчатом градиенте плотности сахарозы .....	42
2.3. Способ выделения ядер из клеток эвглены .....	43
2.4. Плазмолиз клеток растений .....	45
2.5. Влияние ионов калия и кальция на вязкость цитоплазмы .....	46
2.6. Накопление метиленового синего в клетках элодеи .....	46
2.7. Определение сосущей силы клеток .....	47
2.8. Определение целлюлозы в растительной ткани (по Кюршнеру и Ганеку) .....	48
2.9. Определение крахмала в тканях растений .....	50
2.10. Выделение крахмала из зерновок злаковых культур .....	52
2.11. Выделение крахмала из клубней картофеля .....	53
<b>Глава 3. БИОГЕННЫЕ МОЛЕКУЛЫ .....</b>	<b>55</b>
3.1. Определение глюкозы в биологических жидкостях о-толуидиновым методом .....	59
3.2. Определение содержания общих липидов в растительных тканях .....	61
3.3. Определение этанола в биологическом материале .....	63

3.4. Определение содержания пировиноградной кислоты . . . . .	64
3.5. Определение содержания аскорбиновой кислоты . . . . .	66
3.6. Определение АТФ и глюкозо-6-фосфата в растительных тканях. . . . .	68
3.7. Определение АТФ с помощью люциферазы (по Угаровой и Бровко). . . . .	70
3.8. Определение содержания НАДФ. . . . .	72
3.9. Определение содержания НАД . . . . .	73
3.10. Определение глутатиона в растительных тканях. . . . .	74
<b>Глава 4. ЭЛЕМЕНТЫ РАСТЕНИЙ . . . . .</b>	<b>76</b>
4.1. Отбор растительного материала для анализа на микроэлементы. . . . .	79
4.2. Определение зольности зерновок злаковых культур . . . . .	80
4.3. Озоление растительного материала. . . . .	82
4.4. Определение фосфора ванадо-молибдатным методом . . . . .	83
4.5. Определение марганца в растительных тканях формальдоксидным методом. . . . .	85
4.6. Определение калия и натрия на пламенном фотометре . . . . .	86
4.7. Определение железа роданидным методом . . . . .	88
4.8. Определение железа с помощью 4,7-дифенил-1,10- фенантролин-3,6-дисульфоновой кислоты . . . . .	89
4.9. Определение меди в гомогенатах растительных тканей . . . . .	91
<b>Глава 5. ФЕРМЕНТЫ . . . . .</b>	<b>93</b>
5.1. Методы осаждения белков (ферментов) сульфатом аммония . . . . .	96
5.2. Осаждение белков (ферментов) с помощью органических растворителей. . . . .	98
5.3. Методы осаждения белков (ферментов) ацетоном. . . . .	99
5.4. Диализ белков (ферментов) . . . . .	100
5.5. Метод гель-фильтрации раствора пероксидазы и 2,4-динитрофенола . . . . .	102
5.6. Метод очистки пероксидазы. . . . .	103
5.7. Определение концентрации пероксидазы спектрофотометрически. . . . .	106
5.8. Определение величин каталитических констант ( $V_m$ , $K_m$ , $k_{cat}$ ) в реакции пероксидазного окисления <i>o</i> -дианизидина . . . . .	107
5.9. Определение активности пероксидазы по <i>o</i> -дианизидину . . . . .	112

5.10. Определение активности пероксидазы по ферроцианиду калия .....	115
5.11. Влияние концентрации пероксидазы на скорость ферментативной реакции. ....	116
5.12. Получение очищенного препарата алкогольдегидрогеназы из зерновок пшеницы .....	118
5.13. Определение концентрации алкогольдегидрогеназы методом титрования активного центра. Выявление функционально важных SH-групп фермента .....	120
5.14. Определение активности алкогольдегидрогеназы в реакции окисления этанола по НАДН .....	122
5.15. Определение активности алкогольдегидрогеназы в реакции окисления этанола по иоднитротетразолиевому фиолетовому .....	123
5.16. Определение активности алкогольдегидрогеназы в реакции восстановления ацетальдегида .....	126
5.17. Определение активности альдегиддегидрогеназы .....	127
5.18. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы по НАДФН .....	129
5.19. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы по иоднитротетразолиевому фиолетовому .....	130
5.20. Определение активности 6-фосфоглюконатдегидрогеназы ...	132
5.21. Определение активности глицерол-3-фосфатдегидрогеназы ...	134
5.22. Определение активности триозофосфатизомеразы .....	136
5.23. Определение активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы .....	137
5.24. Определение активности гексокиназы .....	139
5.25. Определение активности лактатдегидрогеназы .....	140
5.26. Определение активности аминотрансфераз .....	142
5.27. Определение активности щелочной фосфатазы .....	145
5.28. Определение числа доступных карбоксильных групп в ферментах с помощью <i>o</i> -дианизидина и водорастворимого карбодиимида .....	147
5.29. Влияние pH среды на активность пероксидазы .....	149
5.30. Кислотная инаktivация ферментов .....	150
5.31. Изучение температурной денатурации ферментов .....	151
<b>Глава 6. АЗОТНЫЙ ОБМЕН .....</b>	<b>153</b>
6.1. Определение общего азота в растительных тканях (по А. Т. Усовичу) .....	156

6.2. Определение нитритов в растительных тканях . . . . .	158
6.3. Определение нитратов в растительных тканях . . . . .	160
6.4. Определение содержания мочевины по реакции с диацетилмонооксидом . . . . .	162
6.5. Определение мочевой кислоты по методу Мюллера-Зейфелта . . . . .	164
6.6. Определение содержания креатинина по цветной реакции Яффе. . . . .	165
6.7. Определение креатина. . . . .	167
6.8. Определение аминокислот с помощью нингидрина . . . . .	167
6.9. Определение содержания глутаминовой кислоты . . . . .	169
6.10. Определение общего белка по биуретовой реакции. . . . .	171
6.11. Метод определения белка по Лоури . . . . .	174
6.12. Метод определения белка по Брэдфорду . . . . .	176
6.13. Изучение кислотной денатурации белков . . . . .	178
6.14. Изучение температурной денатурации белков . . . . .	179
6.15. Метод выделения ДНК . . . . .	180
6.16. Метод определения содержания ДНК с помощью дифениламина . . . . .	181
6.17. Гидролиз ДНК. . . . .	182
6.18. Определение содержания пуриновых оснований . . . . .	182
<b>Глава 7. ВОДНЫЙ ОБМЕН РАСТЕНИЙ . . . . .</b>	<b>183</b>
7.1. Содержание влаги в семенах. . . . .	185
7.2. Определение содержания воды и сухого вещества в растительном материале . . . . .	186
7.3. Изучение скорости набухания зерновок пшеницы . . . . .	187
7.4. Определение скорости набухания семян . . . . .	188
7.5. Наблюдение за движениями устьиц . . . . .	189
<b>Глава 8. ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ . . . . .</b>	<b>191</b>
8.1. Способ выделения митохондрий из растительных тканей . . . . .	195
8.2. Выделение митохондрий из мезокотилей этиолированных проростков кукурузы. . . . .	196
8.3. Определение активности ферментов перуватдегидрогеназного комплекса . . . . .	198
8.4. Определение активности ферментов перуватдегидрогеназного комплекса с помощью ИНТФ . . . . .	200

8.5. Определение активности ферментов кетоглутаратдегидрогеназного комплекса. ....	201
8.6. Определение активности глутаматдегидрогеназы .....	203
8.7. Определение активности цитохромоксидазы .....	205
8.8. Определение активности сукцинатдегидрогеназы .....	207
8.9. Определение активности НАД-зависимой малатдегидрогеназы .....	208
8.10. Определение активности НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы .....	210
8.11. Определение активности аскорбатоксидазы .....	212
8.12. Определение активности полифенолоксидазы .....	213
8.13. Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы .....	214
8.14. Определение активности каталазы .....	216
8.15. Определение активности пероксидазы в зерновках, корнях и надземной части проростков пшеницы .....	217
8.16. Ингибирование дыхания зерновок пшеницы с помощью 2,4-динитрофенола. ....	219
8.17. Исследование перекисного окисления липидов (ПОЛ) ....	221
8.18. Определение содержания флавоноидов в биологическом материале .....	222
8.19. Определение общей антиокислительной активности .....	224
8.20. Определение содержания водорастворимых антиоксидантов .....	226
8.21. Определение общего содержания антиоксидантов .....	228
8.22. Определение содержания антиоксидантов в гомогенатах тканей (по Глевинду) .....	231
8.23. Определение стероидных (сердечных) гликозидов .....	233
8.24. Влияние низких концентраций аскорбиновой кислоты на прорастание зерновок пшеницы .....	236
<b>Глава 9. ФОТОСИНТЕЗ .....</b>	<b>238</b>
9.1. Выделение хлоропластов из листьев $C_3$ -растений .....	240
9.2. Выделение хлоропластов из листьев $C_4$ -растений .....	241
9.3. Выделение протопластов из листьев $C_4$ -растений .....	242
9.4. Получение вытяжки пигментов из побегов пшеницы .....	243
9.5. Разделение пигментов (по Краусу) .....	244
9.6. Количественное определение хлорофиллов и каротиноидов ....	245

9.7. Омыление хлорофиллов щелочью . . . . .	247
9.8. Разделение пигментов методом бумажной хроматографии . . . . .	247
9.9. Роль света в процессах синтеза хлорофиллов . . . . .	249
9.10. Определение площади листьев методом отпечатков . . . . .	252
<b>Глава 10. ПОКОЙ, РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ . . . . .</b>	<b>253</b>
10.1. Прерывание покоя клубней картофеля при помощи биологически активных веществ . . . . .	255
10.2. Определение жизнеспособности семян гороха методом окрашивания индигокармином . . . . .	256
10.3. Определение жизнеспособности зерновок пшеницы методом окрашивания цитоплазмы . . . . .	258
10.4. Определение жизнеспособности зерновок пшеницы тетразольным методом . . . . .	259
10.5. Определение активности $\alpha$ -амилазы в зерновках пшеницы. . . . .	260
10.6. Активность пероксидазы в различных частях зерновок пшеницы . . . . .	262
10.7. Изучение процесса набухания зерновок пшеницы . . . . .	264
10.8. Изучение процесса проклеивания зерновок пшеницы . . . . .	265
10.9. Определение основных физиологических показателей проростков пшеницы . . . . .	266
10.10. Рост и развитие побегов проростков пшеницы. . . . .	268
10.11. Влияние света на прорастание проростков пшеницы . . . . .	269
10.12. Определение активности пероксидазы в корнях и побегах проростков пшеницы на начальных этапах прорастания. . . . .	271
10.13. Хемотропизм корней проростков пшеницы . . . . .	273
10.14. Рост и развитие различных частей проростков пшеницы . . . . .	274
10.15. Значение листьев для укоренения черенков . . . . .	276
10.16. Влияние индолил-3-уксусной кислоты на укоренение черенков фасоли . . . . .	276
<b>Глава 11. ПРИСПОСОБЛЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ . . . . .</b>	<b>279</b>
11.1. Изучение термостабильности очищенного препарата пероксидазы хрена. . . . .	281
11.2. Влияние температуры на активность пероксидазы зерновок пшеницы . . . . .	282
11.3. Влияние альбумина и хлорида кальция на стабильность пероксидазы . . . . .	284

## Оглавление

11.4. Влияние различных соединений на стабильность алкогольдегидрогеназы зерновок пшеницы . . . . .	286
11.5. Влияние высокой температуры на проницаемость цитоплазматических мембран . . . . .	288
11.6. Влияние высокой положительной температуры на жизнеспособность зерновок пшеницы. . . . .	289
11.7. Влияние низкой отрицательной температуры на жизнеспособность зерновок пшеницы. . . . .	290
11.8. Действие высокой температуры на зерновки пшеницы с различной влажностью . . . . .	292
11.9. Влияние низкой положительной температуры на жизнеспособность зерновок пшеницы. . . . .	293
11.10. Действие низкой отрицательной температуры на зерновки пшеницы с различной влажностью . . . . .	294
11.11. Влияние ультрафиолета на процессы перекисного окисления липидов в зерновках пшеницы . . . . .	296
11.12. Влияние температуры на проклеивание зерновок пшеницы . . . . .	298
11.13. Влияние влажности на прорастание зерновок пшеницы . . . .	299
11.14. Влияние избытка влаги на всхожесть зерновок пшеницы. . . .	300
11.15. Влияние pH и природы ионов на прорастание зерновок пшеницы . . . . .	301
11.16. Влияние различных концентраций этанола и ацетальдегида на всхожесть зерновок пшеницы. . . . .	303
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ . . . . .</b>	<b>305</b>
Приложение 1. Способы расчета содержания биогенных соединений в исследуемых жидкостях и тканях. . . . .	305
Приложение 2. Диапазоны pH буферных растворов и их кислотные и щелочные компоненты. . . . .	308
Приложение 3. Молекулярные массы некоторых соединений . . . .	309
Приложение 4. Основные приборы, необходимые для выполнения физиолого-биохимических исследований . . . . .	314
<b>СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ . . . . .</b>	<b>320</b>
<b>ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА . . . . .</b>	<b>345</b>