



Przewodnik do ćwiczeń z fizjologii roślin

pod redakcją

Marii Skłodowskiej

i Elżbiety Kuźniak-Gębarowskiej

Przewodnik do ćwiczeń z fizjologii roślin

Autorzy rozdziałów

dr Katarzyna Bergier – rozdz. 2, 7, 11

dr hab. Ewa Gajewska – rozdz. 4, 9, 10

prof. dr hab. Elżbieta Kuźniak-Gębarowska – rozdz. 3, 12

dr hab. Urszula Małolepsza – rozdz. 19

dr Marcin Naliwajski – rozdz. 21

dr Justyna Nawrocka – rozdz. 5

dr hab. Jacek Patykowski – rozdz. 16

prof. dr hab. Maria Skłodowska – rozdz. 14

dr Marzena Wielanek – rozdz. 8, 13, 15, 17, 18, 20

dr Anna Wyrwicka – rozdz. 1, 6, 16

Rysunki

mgr inż. Urszula Świercz

Przewodnik do ćwiczeń z fizjologii roślin

pod redakcją

Marii Skłodowskiej

i Elżbiety Kuźniak-Gębarowskiej



WYDAWNICTWO
UNIWERSYTETU
ŁÓDZKIEGO

Łódź 2020

Elżbieta Kuźniak-Gębarowska, Maria Skłodowska – Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin
90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16

RECENZENT

Andrzej Kornaś

REDAKTOR INICJUJĄCY

Beata Koźniewska

REDAKCJA

Barbara Sikora

SKŁAD I ŁAMANIE

Munda – Maciej Torz

KOREKTA TECHNICZNA

Anna Sońta

PROJEKT OKŁADKI

krzysztof de mianiuk

Zdjęcie wykorzystane na okładce autorstwa Joanny Chojak-Koźniewskiej

© Copyright by Authors, Łódź 2020

© Copyright for this edition by Uniwersytet Łódzki, Łódź 2020

Wydane przez Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego

Wydanie I. W.09850.20.0.S

Ark. wyd. 9,0; ark. druk. 15,875

ISBN 978-83-8220-012-6

e-ISBN 978-83-8220-013-3

Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego

90-131 Łódź, ul. Lindleya 8

www.wydawnictwo.uni.lodz.pl

e-mail: ksiegarnia@uni.lodz.pl

tel. 42 665 58 63

SPIS TREŚCI

Przedmowa / 7

Rozdział I

SKŁAD CHEMICZNY ROŚLIN. WYKRYWANIE SKŁADNIKÓW
MINERALNYCH W ROŚLINACH / 9

Rozdział II

MINERALNE ODŻYWIANIE ROŚLIN / 23

Rozdział III

KOMÓRKA ROŚLINNA JAKO UKŁAD OSMOTYCZNY / 31

Rozdział IV

PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON PLAZMATYCZNYCH / 41

Rozdział V

DALEKI TRANSPORT WODY, TRANSPIRACJA / 53

Rozdział VI

BARWNIKI ASYMLACYJNE I ICH WŁAŚCIWOŚCI / 69

Rozdział VII

REAKCJA HILLA / 81

Rozdział VIII

ODDYCHANIE / 87

Rozdział IX

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA REGULATORÓW WZROSTU ROŚLIN / 97

Rozdział X

METABOLIZM AZOTOWY ROŚLIN. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI
REDUKTAZY AZOTANOWEJ / 115

Rozdział XI

WŁAŚCIWOŚCI GLEB / 123

Rozdział XII

KIEŁKOWANIE NASION / 133

Rozdział XIII

ALLELOPATIA. WPŁYW METABOLITÓW WTÓRNYCH NA KIEŁKOWANIE NASION I WZROST SIEWEK / 143

Rozdział XIV

AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW AMYLOLITYCZNYCH W PRZECHOWYWANYCH ORGANACH SPICHRZOWYCH / 157

Rozdział XV

TEST TOLERANCJI KOMÓREK ROŚLINNYCH NA ABIOTYCZNE CZYNNIKI STRESOWE / 167

Rozdział XVI

REAKCJE ROŚLIN NA STRES ABIOTYCZNY / 175

Rozdział XVII

CAŁKOWITA ZDOLNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH POCHODZENIA ROŚLINNEGO / 183

Rozdział XVIII

ZAWARTOŚĆ KWASU ASKORBINOWEGO (WITAMINY C) W WARZYWACH I OWOCACH / 193

Rozdział XIX

INDUKCJA TKANKI KALUSOWEJ I PĘDÓW PRZYBYSZOWYCH W KULTURZE *IN VITRO* FIOŁKA AFRYKAŃSKIEGO / 203

Rozdział XX

METABOLITY WTÓRNE O ZNACZENIU PROZDROWOTNYM. ANTRAZWIAZKI LIŚCI I KULTUR *IN VITRO* ALOESU / 209

Rozdział XXI

ANALIZA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA WYBRANYCH METABOLITÓW WTÓRNYCH W ROŚLINNYCH SUROWCACH LECZNICZYCH / 221

ZAŁĄCZNIKI DO ĆWICZEŃ / 233

PYTANIA POMOCNICZE DO POWTÓRKI MATERIAŁU / 247

Przedmowa

Przewodnik do ćwiczeń z fizjologii roślin adresowany jest głównie do studentów studiów licencjackich na kierunkach biologia, ochrona środowiska i biotechnologia. Może być również pomocny dla studentów innych kierunków przyrodniczych i rolniczych. Przy opracowaniu ćwiczeń autorzy wykorzystali swoje wieloletnie doświadczenie dydaktyczne w zakresie fizjologii i biochemii roślin, zdobyte w czasie prowadzenia zajęć praktycznych w Katedrze Fizjologii i Biochemii Roślin na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Ćwiczenia zostały tak opracowane, aby zapoznać studentów z podstawowymi procesami związanymi z funkcjonowaniem roślin, ułatwić ich zrozumienie i wzajemne relacje, co ma istotne znaczenie w kontekście praktycznego wykorzystania roślin w życiu człowieka. Zamiarem autorów było też wykazanie, że fizjologia roślin, będąca jednym z podstawowych działów biologii, posługuje się nowoczesnymi metodami z zakresu biochemii, biofizyki i biotechnologii. Każdy rozdział został poprzedzony krótkim wstępem teoretycznym, przygotowującym do zajęć laboratoryjnych dotyczących omawianych zagadnień, który ma ułatwić zrozumienie samego procesu lub reakcji i ich uwarunkowań.

Przewodnik zawiera zestaw ćwiczeń, które można wykonać bez zaawansowanej aparatury, przy jednoczesnym znacznym zaangażowaniu studentów w prowadzone doświadczenia. Autorzy wyrażają nadzieję, że niniejsze opracowanie będzie przydatne dla wszystkich zainteresowanych biologią eksperymentalną roślin.

ROZDZIAŁ I. **SKŁAD CHEMICZNY ROŚLIN**
WYKRYWANIE SKŁADNIKÓW
MINERALNYCH W ROŚLINACH

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Tkanki roślinne składają się z wody, związków organicznych oraz związków nieorganicznych. Zawartość wody w roślinach stanowi średnio 70–95% ogólnej ich masy i może różnić się znacznie w zależności od gatunku, wieku rośliny, organu, pory roku oraz aktualnie panujących warunków środowiska. Największą zawartością wody charakteryzują się tkanki, w których intensywność procesów metabolicznych jest najwyższa. Średnia zawartość wody wyrażona w procentach całkowitej masy rośliny jest najwyższa w płatkach kwiatów (90–95%), w liściach wynosi około 60–95%, a najmniej zasobne w wodę są nasiona i ziarniaki zbóż (5–15%). Naturalnie uwodniona, zważona bezpośrednio po pobraniu masa rośliny lub jej części to **świeża masa roślinna (ś. m.)**.

Z uwagi na dynamikę zmian zawartości wody w tkankach roślinnych, aby przeprowadzić analizę składu chemicznego pobranego materiału, pozyskuje się suchą masę roślinną. **Sucha masa roślinna (s. m.)** jest masą tkanki roślinnej otrzymaną w procesie ogrzewania próbki w temperaturze 105°C przez dwie godziny, a następnie w 80°C – aż do uzyskania stałej masy. Podczas ogrzewania lotne związki zawarte w tkance uchodzą do atmosfery, a substancje wrażliwe na działanie wysokiej temperatury zostają rozłożone do związków prostych. Sucha masa roślinna jest pozostałością zawierającą związki organiczne i nieorganiczne oraz wodę związaną chemicznie. Prawie połowę suchej masy roślinnej stanowi węgiel (ok. 45%), podobnie tlen (ok. 42%), około 6,5% – wodór, a 1,5% – azot. W celu dalszej analizy składu mineralnego tkanek suchą masę poddaje się procesowi spalenia prowadzonemu w temperaturze 600°C. Spaleniu ulega materiał organiczny, a powstające w tym procesie CO₂, H₂O, NH₃ i H₂S ulatniają się do atmosfery. Pozostała część związków nielotnych otrzymana po prażeniu to **popiół roślinny**, który zawiera

pierwiastki pobrane z podłoża, z wyjątkiem azotu oraz częściowo siarki, i stanowi 0,2–20% suchej masy. W skład popiołu wchodzi głównie tlenki takich pierwiastków, jak: K, Mg, Na, Fe, P, S, Si, a także sole: chlorki, siarczki i fosforany.

Kryteria podziału pierwiastków występujących w organizmach roślinnych:

1. **Kryterium jakościowe** – dzieli pierwiastki na podstawie niezbędności pobieranych ze środowiska jonów oraz ich sposób działania:
 - a) **pierwiastki niezbędne** – są konieczne do przejścia całego cyklu rozwojowego rośliny, od kiełkowania do wydania żywotnych nasion, i nie mogą być zastąpione innymi pierwiastkami (N, K, Ca, Mg, P, S oraz Cl, Fe, Cu, B, Zn, Mn, Mo, Ni);
 - b) **pierwiastki korzystne (pożądane)** – wpływają pozytywnie na wzrost i rozwój roślin, ale nie są niezbędne w przebiegu ontogenezy (Na, Si, Co, Al, V);
 - c) **pierwiastki zbędne (balastowe)** – jeśli występują w podłożu, mogą być pobierane przez roślinę, jednak nie pełnią żadnych funkcji fizjologicznych lub mogą wykazywać działanie toksyczne (np. Pb, Cd, Hg).
2. **Kryterium ilościowe** – dotyczy ilości, w jakiej są pobierane pierwiastki z podłoża oraz ich zawartości w suchej masie roślin:
 - a) **makroelementy** – występują w roślinach na ogół w ilości powyżej 0,1% (1000 ppm) suchej masy. Są to: N, K, Ca, Mg, P, S;
 - b) **mikroelementy** – występują w roślinach w ilości około 1000-krotnie mniejszej niż makroelementy (0,01–0,00001%; 100–0,1 ppm). Są to: Cl, Fe, Cu, B, Zn, Mn, Mo, Ni.
3. **Kryterium właściwości chemicznych oraz fizjologiczno-biochemicznych:**
 - a) pierwiastki organogenne: C, H, O; roślina pobiera je w postaci CO_2 , H_2O i O_2 ;
 - b) niemetale: N, S, P, B, Cl;
 - c) metale alkaliczne i ziem alkalicznych: K, Ca, Mg, Na oraz półmetal Si;
 - d) metale ciężkie: Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, Ni, Co, Al, V.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Doświadczenie I

Mikroanaliza popiołu roślinnego

Cel ćwiczenia

Wykrycie obecności chloru, fosforu, magnezu, potasu, siarki, wapnia i żelaza w popiele roślinnym.

Zasada metody

Składniki mineralne popiołu roślinnego wykrywa się za pomocą charakterystycznych reakcji chemicznych, w wyniku których poszczególne jony tworzą łatwo krystalizujące lub barwne związki.

Materiał

popiół roślinny, np. z liści tytoniu lub z drewna

Odczynniki

10% HCl, 10% HNO₃, 1% AgNO₃, 1% (NH₄)₂MoO₄, 1% HNO₃, 10–25% NH_{3(aq)}, 1% Na₂HPO₄, 70% HClO₄, 96% C₂H₅OH, 5% BaCl₂, nasycony roztwór (NH₄)₂C₂O₄, 1% H₂SO₄, 2% heksacyjanożelazian (II) potasu – K₄[Fe(CN)₆]

Sprzęt laboratoryjny

waga analityczna, mikroskop świetlny, 2 probówki chemiczne, 7 szkiełek podstawowych, szkiełka nakrywkowe, płytka pH-metryczna, bagietki szklane

I.A. PRZYGOTOWANIE DWÓCH RODZAJÓW WYCIĄGÓW Z POPIOŁU

Na wadze odważyć dwie porcje po 50 mg popiołu roślinnego otrzymanego z liści tytoniu lub z drewna. Każdą z porcji przenieść do osobnych, podpisanych probówek i zalać 2 cm³:

- a) 10% HCl,
- b) 10% HNO₃.

Zawartość probówek ostrożnie wymieszać i pozostawić na 5 minut, aby osad opadł na dno. Do wykrywania składników mineralnych w popiele używać płynu znad osadu, bez uprzedniego sączenia przez bibułę. W celu wykrycia składników mineralnych wszystkie reakcje chemiczne przeprowadzać na szkiełkach podstawowych, bez używania szkiełek nakrywkowych.

Przeprowadzając poniższe doświadczenia, zawsze należy: (1) podpisać szkiełko podstawowe, (2) nałożyć za pomocą bagietki szklanej kroplę analizowanego wyciągu, (3) w odległości około 1 cm od kropli wyciągu nałożyć kroplę odczynnika, (4) za pomocą bagietki szklanej połączyć obie krople wąskim kanalikiem. Po upływie 2–5 minut (w zależności od rodzaju reakcji) w analizowanych preparatach obserwować pod mikroskopem (powiększenie obiektu 10× lub 20×) charakterystyczne kryształy, które zazwyczaj najszybciej będą widoczne na brzegach kropli. Po dokonaniu obserwacji:

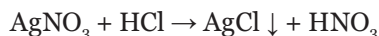
- 1) zapisać zasadę oznaczenia wraz z równaniem zachodzącej reakcji;
- 2) narysować kryształy wykrytych związków chemicznych, uwzględniając ich kształt, wielkość oraz barwę;
- 3) zapisać wnioski dotyczące obecności pierwiastków w analizowanym popiele.

UWAGA: Przy wykonywaniu reakcji na szkiełkach podstawowych zachować szczególną ostrożność, gdyż niektóre odczynniki są silnie żrące lub mają intensywną woń.

I.B. WYKRYWANIE PIERWIASTKÓW W POPIELE ROŚLINNYM

1. Wykrywanie chloru

Obok kropli wyciągu z popiołu w 10% HNO₃ umieścić kroplę 1% AgNO₃. W miejscu połączenia płynów powstaje białe osad AgCl.



2. Wykrywanie fosforu

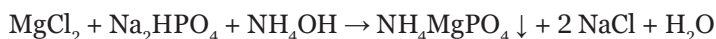
Obok kropli wyciągu z popiołu w 10% HNO₃ umieścić kroplę 1% molibdenianu (VI) amonu w 1% HNO₃. W miejscu

połączenia kropli wytrącają się żółte kryształy fosfomolibdenianu amonu.



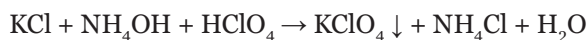
3. Wykrywanie magnezu

Kroplę wyciągu z popiołu w 10% HCl zobojętnić amoniakiem (1–2 krople), dodać kroplę 1% roztworu Na_2HPO_4 . Wytrącają się drobne kryształy fosforanu amonowo-magnezowego.



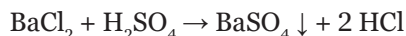
4. Wykrywanie potasu

Kroplę wyciągu z popiołu w 10% HCl zobojętnić amoniakiem (1–2 krople), dodać 2–3 krople kwasu chlorowego (VII). Wytrąca się biały osad nierozpuszczalny w 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.



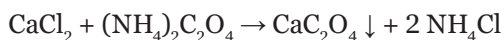
5. Wykrywanie siarki

Do wyciągu z popiołu w 10% HCl dodać kilka kropli 5% BaCl_2 . Wytrąca się biały, nierozpuszczalny osad BaSO_4 .

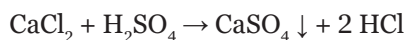


6. Wykrywanie wapnia

a) Wyciąg z popiołu w 10% HCl zobojętnić amoniakiem (1–2 krople), a następnie dodać kroplę nasyconego roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$. Wytrąca się biały osad szczawianu wapnia.

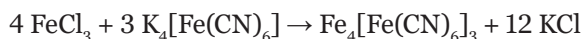


b) Do wyciągu z popiołu w 10% HCl dodać kroplę 1% H_2SO_4 . Powstaną kryształy siarczanu wapnia.



7. Wykrywanie żelaza

Do wyciągu z popiołu w 10% HCl dodać kroplę 2% heksacyjanożelazianu (II) potasu. Powstaje niebieskie zabarwienie – osad heksacyjanożelazianu (II) żelaza (III), czyli błękit pruski. Reakcję wykonać na płytce pH-metrycznej.



Doświadczenie II

Wykrywanie składników mineralnych w tkankach roślin (reakcje histochemiczne)

Cel ćwiczenia

Wykrycie obecności magnezu, wapnia, szczawianu wapnia oraz rozpuszczalnych szczawianów ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$), azotanów (V) (NO_3^-), jonów amonowych (NH_4^+) i żelaza w tkankach roślin.

Zasada metody

Reakcje histochemiczne służą do wykrywania niewielkich ilości poszczególnych pierwiastków bezpośrednio w tkankach roślinnych. Są to reakcje mikrochemiczne, podczas których powstają barwne lub krystaliczne substancje. Wyniki reakcji histochemicznych obserwuje się najczęściej pod mikroskopem.

Materiał

siewki pomidora, ogonki liściowe pelargonii, łuska cebuli, łodyga begonii, korzeń marchwi, liście pszenicy, łodyga skrzypu

Odczynniki

1% wodorofosforan sodowo-amonowy ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$), 25% $\text{NH}_3(\text{aq})$, 2% H_2SO_4 , 5% $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ w 5% CH_3COOH , 8% NaHCO_3 , 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, nasycony roztwór NaOH w 90–96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 0,5% difenylamina [$(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{NH}$] w 48% H_2SO_4 , 48% H_2SO_4 , 20% NaOH, odczynnik Nesslera [$\text{K}_2(\text{HgI}_4) + \text{KOH}$],

gorący C_2H_5OH , 2% $K_4[Fe(CN)_6]$, 2% HCl, 10% tiocyjanian potasu (KSCN), 10% HCl

Sprzęt laboratoryjny

zlewka 800 cm³, zlewka 50 cm³, kolba stożkowa 250 cm³, szkiełko zegarkowe o średnicy 7 cm, żyłetka, 2 skalpele, 2 pęsety, 10 szkiełek podstawowych, szkiełka nakrywkowe, mikroskop świetlny, 2 szalki Petriego, krystalizator na 50 cm³, bibuła filtracyjna, parownicza, waga analityczna, probówki chemiczne, bagietki szklane

1. Wykrywanie magnezu

W komórkach fotosyntetyzujących roślin magnez występuje głównie jako składnik chlorofilu. Spotyka się go również w formie mineralnej, szczególnie w nasionach i tkankach merystematycznych. Obecność magnezu mineralnego można łatwo wykazać przez wytrącenie go w formie kryształów fosforanu magnezowo-amonowego.

Na szkiełko podstawowe za pomocą bagietki szklanej nanieść kroplę 1% $NaNH_4HPO_4$, zanurzyć w niej wykonany żyłetką poprzeczny skrawek hipokotylu uzyskany z siewki pomidora. Całość umieścić w atmosferze nasyczonej parami amoniaku, np. pod szklanym kloszem (zlewka 800 cm³), pod którym uprzednio wstawiono szalkę Petriego lub krystalizator ze stężonym amoniakiem. Po 5–15 minutach wyjąć spod klosza szkiełko podstawowe z preparatem. Preparat przykryć szkiełkiem nakrywkowym i obejrzeć pod mikroskopem (powiększenie obiektu 10× lub 20×). W preparacie są widoczne kryształy fosforanu amonowo-magnezowego, które należy narysować w zeszycie.

2. Wykrywanie wapnia

W tkankach roślinnych wapń wchodzi w skład blaszki środkowej (protopektyny), występuje również w formie rozpuszczalnej w soku komórkowym. Przeważająca ilość wapnia, szczególnie w starszych organach, znajduje się w komórkach w formie kryształów: szczawianów, węglanów lub winianów wapnia.