

Министерство образования Республики Беларусь

Учреждение образования  
«Белорусский государственный педагогический университет  
имени Максима Танка»

*Мазец Ж.Э., Судейная С.В.*

**ПРАКТИКУМ ПО  
ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ  
Часть I**

**Учебно-методическое пособие**

Минск  
2009

УДК [581.1]  
ББК [28.591 + 28.592.6]я73  
Б947

Печатается по решению редакционно-издательского совета БГПУ,  
Рекомендовано секцией естественных и сельскохозяйственных наук БГПУ  
(протокол № 5 от 23.04.2009)

*Рецензенты:*

Кафедра физиологии и биохимии растений БГУ;  
Кандидат биологических наук, заведующая сектором биохимии ГНУ  
«ЦБС НАН Беларуси» Е.В. Спиридович;

- Мазец, Ж.Э., Судейная, С.В.**  
Б947 Практикум по физиологии растений. Часть I /Ж.Э. Мазец, С.В. Судейная. – Минск: БГПУ, 2009. – 64 с.  
ISBN 978-985-501-583-4
- Пособие содержит лабораторные работы по четырем разделам «Физиологии растений», позволяющие получить представления о физиологических процессах в растительном организме и методах их исследования.
- Издание предназначено для самостоятельного контроля знаний по теоретическому и лабораторному курсу «Физиология растений» для студентов педагогических вузов, обучающихся по биологическим специальностям.

**ISBN 978-985-501-583-4**

**УДК 581.1.  
ББК**

© Мазец Ж.Э. и др., 2009  
© БГПУ, 2009

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр
Предисловие	4
Общие методические указания	5
Тема 1. Физиология растительной клетки	7
Работа 1. Изучение вязкости цитоплазмы плазмолитическим методом	7
Работа 2. Изучение проницаемости плазмалеммы и тонопласта	10
Работа 3. Явления плазмолиза и деплазмолиза	13
Работа 4. Влияние температуры на проницаемость клеточных мембран для бета-цианина	14
Работа 5. Движение цитоплазмы в растительных клетках	15
Работа 6. Определение потенциального осмотического давления клеточного сока методом плазмолиза	18
Работа 7. Определение водного потенциала (сосущей силы) тканей растений по изменению их размеров (метод Уршпрунга)	19
Работа 8. Определение водного потенциала растительных тканей по изменению концентрации внешнего раствора методом «струек» (по Шардакову)	23
Вопросы и задачи по теме «Физиология растительной клетки»	26
Тема 2. Водный обмен растений	29
Работа 1. Определение поглощения воды растением потометрическим методом	30
Работа 2. Изучение состояния устьичного аппарата растений	32
Работа 3. Определение интенсивности транспирации весовым методом по Л.А. Иванову	35
Вопросы и задачи по теме «Водный обмен растений»	38
Тема 3. Минеральное питание	41
Работа 1. Микрохимический анализ золы	41
Работа 2. Обнаружение нитратов в растениях	45
Вопросы и задачи по теме «Минеральное питание»	49
Тема 4. Фотосинтез	51
Работа 1. Извлечение пигментов из листьев	51
Работа 2. Разделение пигментов листа хроматографическим методом	53
Работа 3. Физические свойства пигментов листа	55
Работа 4. Химические свойства пигментов листа	58
Работа 5. Определение содержания основных пигментов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений	60
Работа 6. Образование крахмала в зеленых листьях на свету	63
Работа 7. Образование сахара в зеленых листьях на свету	64
Работа 8. Значение хлорофилла для образования в листьях крахмала	65
Вопросы и задачи по теме «Фотосинтез»	67
Литература	69

## ПРЕДИСЛОВИЕ

В настоящем учебном пособии представлены лабораторные работы по физиологии растений для студентов педагогических университетов по специальностям 1-02 04 01 Биология с дополнительными специальностями и 1-02 04 05-01 География. Биология.

Цель лабораторного практикума — углубление теоретических положений лекционного курса физиологии растений и освоение методики физиологического эксперимента. Пособие включает лабораторные работы по четырем разделам курса: «Физиология растительной клетки», «Водный обмен растений», «Минеральное питание» и «Фотосинтез». В соответствии с новой рабочей типовой программой курса перечень работ несколько расширен, введены новые работы, соответствующие современному уровню технического оснащения кафедры. Работы сгруппированы по разделам курса, в конце каждого раздела приводятся задачи для закрепления теоретического и экспериментального материала. Приведенные работы рассчитаны на два часа, более продолжительные и объемные задания вынесены на полевую практику.

В каждой из предлагаемых работ приведены список материалов и оборудования, краткие теоретические объяснения, описание хода работы, рекомендации по оформлению результатов.

Работы выполняются побригадно (3-4 человека). Выполнению работы предшествует ознакомление с теоретическими положениями и ходом работы, формулирование цели и задач исследования. После выполнения работы каждая из бригад докладывает свои результаты. Полученные результаты заносятся в общую таблицу, подготовленную заранее на доске. Пользуясь пособием, студенты оформляют результаты эксперимента по определенной схеме. Работы предусматривают самостоятельную формулировку выводов с теоретическим обоснованием полученных результатов.

После изучения основных разделов курса проводятся семинары. Анализ записей и усвоение изучаемого материала контролируется преподавателем на каждом занятии.

## ОБЩИЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Лабораторные занятия по физиологии растений являются продолжением лекций и служат для закрепления и расширения знаний студентов по теоретическому курсу. Навыки экспериментальной работы, приобретенные студентами на занятиях, будут способствовать грамотной постановке физиологических опытов учителями на уроках и факультативных занятиях по биологии.

Пособие содержит описание лабораторных работ по четырем основным разделам программы по физиологии растений: «Физиология растительной клетки», «Водный обмен растений», «Минеральное питание» и «Фотосинтез». В каждом разделе практикума имеются работы двух типов: 1) сравнительно простые опыты, иллюстрирующие теоретические положения лекционного курса; 2) более сложные работы, связанные с количественным определением различных физиологических показателей. Перед лабораторной работой проводится предварительная беседа по теории и практике темы лабораторного занятия, выясняются цели и задачи выполняемого эксперимента, в конце занятия подводятся итоги и демонстрация полученных результатов.

Чтобы придать занятиям исследовательский характер при выполнении работ (там, где это возможно) используется несколько объектов — растения разных видов или выращенные в неодинаковых условиях или различные органы и ткани одного растения. Студенты работают по бригадам с одним из рекомендованных объектов, а затем результаты, полученные всей группой, сводятся в единую таблицу, оформляемую на доске.

Независимо от того, выполняется работа одним студентом, бригадой или всей группой, рабочую тетрадь должен вести каждый. Записи в тетрадях следует делать по **следующей схеме**:

1. Название темы.
2. Название работы и номер по порядку.
3. Дата на полях.
4. Цель работы. Объект исследования.
5. Задача исследования.
6. Методы исследования.
7. Материалы, оборудование.
8. Ход работы.
9. Результаты работы. Таблицы, графики, диаграммы, рисунки.
10. Анализ результатов по данной задаче исследования.
11. Выводы по пунктам.
12. Общая таблица по теме работы.
13. Выводы по общей таблице.

### **Требования к анализу результатов**

1. Теоретическое обоснование изучаемой темы.
2. Анализ отдельных результатов, сравнение их с теоретическими положениями.
3. Выявление закономерностей и их обсуждение.

### **Требования к таблицам**

1. Обозначение и нумерация «Таблица 1» дается над таблицей в левом углу.
2. Дать название таблице, которое отражает его основной смысл.
3. В таблице должны быть указаны: объекты исследования, варианты опыта, единицы измерения, повторность опыта, средние величины.

4. Единицы измерения указываются в заголовках рубрик таблицы.
5. На каждой странице следует оставлять поля 2 см.

### **Обсуждение результатов**

1. Определить закономерность, объяснить ее.

### **Выводы**

Ответить на поставленный в начале работы вопрос.

Расчеты производить в специальных тетрадях, переносить в основную тетрадь только после проверки их преподавателем.

Между работами оставлять одну страницу для работы над ошибками.

В конце каждой темы приводятся вопросы и задачи, предназначенные для самостоятельной работы студентов.

РЕПОЗИТОРИЙ БГПУ

## ТЕМА 1. ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Живая растительная клетка представляет собой открытую гетерогенную биологическую систему, включающую в себя комплекс структур, взаимодействующих друг с другом и обменивающихся с окружающей средой веществом, энергией и информацией. В отличие от других эукариотических организмов для растительных клеток характерны: 1) пластидная система, возникающая в связи с фототрофным способом питания; 2) полисахаридная клеточная стенка, окружающая клетку; 3) центральная вакуоль в зрелых клетках, играющая важную роль в поддержании тургора.

Клеточная стенка состоит из комплекса полисахаридов и некоторых других полимеров (структурных белков, ферментов, фенольных соединений и др.), которые секретируются клеткой. Клеточная стенка растений отличается от клеточных стенок других организмов и выполняет следующие функции: внешнего скелета, защитно-изолирующую, участвует в поглощении и передвижении веществ. Вследствие гидрофильности компонентов, клеточная оболочка насыщена водой и играет роль буфера в водоснабжении клетки.

Основой структуры протопласта служат клеточные мембраны. Мембраны обуславливают все жизненно важные свойства и функции клеток: избирательную проницаемость, пространственное разобщение продуктов обмена, транспорт метаболитов внутрь клетки, особенности ферментативной активности, информационную и энергетическую деятельность. Одна из главных функций мембран — барьерная, позволяющая осуществить пространственное разграничение биохимических процессов внутри малого объема цитоплазмы, так в митохондриях происходит окисление, а в хлоропластах — восстановление.

Основными свойствами цитоплазмы являются вязкость, эластичность и движение. Они обуславливаются спецификой ее структуры — наличием микрофиламентов и микротрубочек, мембранных структур цитоплазмы.

Нормальное функционирование растительной клетки определяется согласованной деятельностью ее отдельных компонентов при обязательном участии мембран.

Поэтому целью данной темы является ознакомление с важнейшими свойствами живой цитоплазмы — вязкостью, проницаемостью, движением, раздражимостью, гетерогенностью составляющих ее белков; приобретение представлений о лабильности свойств цитоплазмы, их взаимосвязи и приспособительном значении; определение роли клеточной структуры и пограничных слоев цитоплазмы в поступлении воды и веществ в клетку.

### Работа 1. Изучение вязкости цитоплазмы плазмолитическим методом

**Цель:** ознакомиться с важнейшими свойствами живой цитоплазмы — вязкостью и влиянием на нее различных факторов

**Объекты, реактивы, оборудование:** веточки элодеи или мха мниум, листья традесканции, камнеломки, бегонии, содержащие антоциан, луковицы синего лука; 0,8 М NaCl, 1М KNO<sub>3</sub>, 0,7М Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1М сахароза; препаровальные иглы, стеклянные палочки или глазные пипетки, фильтровальная бумага, пинцеты, предметные и покровные стекла, микроскопы.

## Краткие сведения

Одним из важнейших показателей физико-химического состояния коллоидов цитоплазмы является ее вязкость.

**Вязкость** — это способность цитоплазмы оказывать сопротивление перемещению одних частиц (ионы, молекулы, органеллы) относительно других. Цитоплазма в отличие от других вязких сред обладает так называемой структурной вязкостью, степень которой определяется мерой ее оводненности и спецификой строения белков микрофиламентов, определяющей количество точек скрепления между ними. Вязкость имеет большое приспособительное значение в жизни растений. Она легко изменяется под действием внешних факторов: температуры, водообеспеченности и т.д. Обезвоживание цитоплазмы естественным путем, например при созревании семян или под действием концентрированных кислот и щелочей, увеличивает ее вязкость. Ионы кальция и алюминия, образуя дополнительные точки скрепления между отдельными молекулами белков, повышают вязкость цитоплазмы. Ионы калия, напротив, увеличивают дисперсность коллоидов цитоплазмы, оводняют, разжижают ее.

Вязкость цитоплазмы зависит также и от внутренних факторов: видовых особенностей растения, характера экотипа, возраста органов и фазы онтогенеза растения. Она может быть различна в разных органах. В целом вязкость цитоплазмы весьма лабильный показатель, тесно связанный с жизнедеятельностью растений.

Имеется несколько методов определения вязкости цитоплазмы. Один из наиболее простых и наглядных — определение вязкости по времени плазмолиза. Время плазмолиза — это промежуток времени от погружения клеток в гипертонический раствор до появления выпуклого плазмолиза более чем у половины клеток в поле зрения микроскопа. Время плазмолиза находится в прямой зависимости от вязкости цитоплазмы. Чем ниже вязкость, тем легче цитоплазма отстает от клеточной оболочки и промежуточный, вогнутый плазмолиз быстрее переходит в выпуклый, т.е. время плазмолиза меньше.

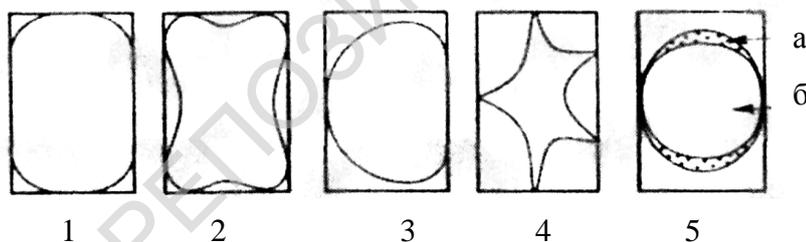


Рис. 1. Формы плазмолиза: 1 — угловатый; 2 — вогнутый; 3 — выпуклый; 4 — судорожный; 5 — колпачковый (а — цитоплазма; б — вакуоль)

Если переход от вогнутого к выпуклому плазмолизу не происходит в течение длительного времени наблюдения (20 мин.), то отмечают, что время плазмолиза данного объекта > 20 мин. В качестве плазмолитика используется либо 0,8 М раствор NaCl либо 1М раствор сахарозы.

### Ход работы

Кусочек ткани исследуемого объекта поместить на предметное стекло в каплю воды и рассмотреть исходное состояние клеток. Убрать полоской фильтровальной бумаги воду и капнуть 0,8 М раствор NaCl (кроме задачи 5). Отметить время погружения объекта в раствор. Каждые 5 мин. отмечать степень плазмолиза, делая при

этом соответствующие зарисовки типичной клетки по образцу табл.1. В конце графы записать время плазмолиза.

Таблица 1

Время наблюдения, мин	Вид растения		
	Камнеломка	бегония	синий лук
5			
10			
15			
20			

**Задача.** Изучить зависимость вязкости цитоплазмы:

1) от вида растения (в клетках нижнего эпидермиса листа камнеломки, традесканции, бегонии либо в клетках выпуклой стороны чешуи синего лука);

2) от возраста листа (в нижнем окрашенном эпидермисе молодых, зрелых, старых листьев камнеломки);

3) от места обитания растений (у мезофитов – традесканции, камнеломки и у гигрофитов – элодеи или мха);

4) от температуры. Часть луковицы синего лука поместить в холодильник при 2<sup>0</sup>С за 2-3 ч до начала работы, предварительно завернув в увлажненную фильтровальную бумагу; другую часть луковицы поместить в термостат или водяную баню при 30<sup>0</sup>С, третью оставить при комнатной температуре. Сравнить вязкость цитоплазмы в клетках эпидермиса выпуклой стороны луковичной чешуи при данных температурах. В качестве объекта можно взять также нижний окрашенный эпидермис зрелого листа камнеломки;

5) от влияния ионов K<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup>. Кусочки нижнего эпидермиса листа камнеломки или выпуклой стороны чешуи синего лука поместить на предметное стекло: 1) 1М раствор сахарозы; 2) 0,7М Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 3) 1М KNO<sub>3</sub>. Каждые 5 мин. отмечать степень плазмолиза в соответствующих растворах, делая зарисовки. Раствор сахарозы, не содержащий ионов, используется в качестве контрольного.

Средние показатели работы записать по образцу табл. 2.

Таблица 2

№ п/п	Вариант опыта	Время плазмолиза, мин				
		5	10	15	20	
1.	Вид растения	Камнеломка				
		Традесканция				
		бегония				
2.	Экотип	Гигрофит				
		Мезофит				
		Ксерофит				
3.	Температура, °С	2				
		20				
		30				
4.	Действующие ионы	Сахароза (контроль)				
		K <sup>+</sup>				
		Ca <sup>2+</sup>				
5.	Возраст листа	Молодой				
		Зрелый				
		Старый				

Сделать выводы о влиянии внешних и внутренних факторов на вязкость цитоплазмы.

## **Работа 2. Изучение проницаемости плазмалеммы и тонопласта**

**Цель:** изучить влияние различных факторов на проницаемость цитоплазмы

**Объекты, реактивы, оборудование:** луковицы бесцветного и синего лука, 1 М растворы сахарозы и  $KNO_3$ , 0,5% индигокармин, 0,01 % нейтральный красный, 1 М растворы  $KNO_3$  и сахарозы с эозином, 10% глицерин; пинцеты, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, кусочки фильтровальной бумаги, стаканчики с водой, пипетки глазные, микроскопы.

### **Краткие сведения**

Биомембрана обладает избирательной проницаемостью. *Избирательная проницаемость* — способность мембраны пропускать различные вещества с неодинаковой скоростью. Избирательная проницаемость свойственна только живым мембранам. При высокой температуре, действии кислот, щелочей, растворителей липидов, вследствие коагуляции белковых компонентов мембран или вымывания их липидного матрикса она теряет это свойство и беспрепятственно пропускает вещества. Проницаемость мембраны увеличивается при повышении температуры и освещения, при водном дефиците, а также при старении клетки — в результате нарушения естественной структуры мембран.

Установлено, что краска нейтральный красный проникает в живую клетку и накапливается там в значительном количестве. Однако цитоплазма живой клетки имеет слабое сродство к красителю. Одной из причин аккумуляции нейтрального красного в вакуолях живых клеток связана с разностью рН между цитоплазмой и вакуолярным соком. Нейтральный красный накапливается в «кислом компартменте» клетки, так как сам является слабым основанием. Окрашивание цитоплазмы и ядра — признак повреждения клетки. В то же время живая цитоплазма непроницаема для индигокармина и кислого фуксина. На окрашивании этими красителями основано определение жизнеспособности тканей клубней, семян и их зародышей и т.д. Имеется разница в проницаемости пограничных мембран цитоплазмы — плазмалеммы и тонопласта — для одних и тех же веществ.

Ионы  $K^+$  сравнительно хорошо проникают через плазмалемму и значительно хуже через тонопласт. Накапливаясь в цитоплазме, калий увеличивает ее осмотическую, вследствие чего она набухает и приобретает вид колпачков, хорошо различимых на концах плазмолизированного протопласта (колпачковый плазмолиз).

Колпачковый плазмолиз можно наблюдать при использовании гипертонического раствора какой-нибудь калиевой соли, чаще всего нитрата калия. Цитоплазма, обычно покрывающая тонким слоем вакуоль, при набухании становится хорошо видимой. Это позволяет определить локализацию красителя в клетке. Если краситель накапливается в вакуоли, то колпачки цитоплазмы сероватого цвета. В случае накопления красителя в цитоплазме она окрашивается более интенсивно, чем вакуоль. Появление «колпачков» обусловлено разжижающим действием ионов калия, которые относительно быстро проходят через плазмалемму в протопласт, накапливаясь в мезоплазме, и гораздо медленнее проникают из протопласта в вакуоль.

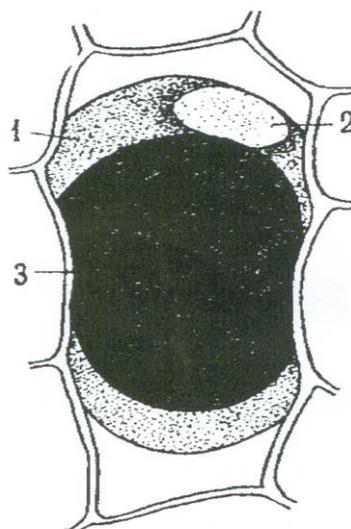


Рис. 1. Колпачковый плазмолиз. 1 – набухшая протоплазма, образовавшая колпачки; 2 – ядро; 3 – вакуоля с окрашенным клеточным соком.

### Ход работы

Обнаружение проницаемости пограничных слоев цитоплазмы по отношению к тем или иным веществам основано на выдерживании ткани в соответствующих растворах в течение определенного времени с последующим микроскопированием для выявления локализации этих веществ в клетке. Изучение проницаемости тонопласта и плазмалеммы для разных соединений требует специальных методических приемов. Поэтому они рассматриваются конкретно в каждой задаче.

**Задача.** Изучить проницаемость пограничных мембран цитоплазмы:

**1) для нейтрального красного.** Несколько кусочков бесцветного эпидермиса вогнутой стороны луковичной чешуи поместить на два предметных стекла в каплю воды. Убить клетки на одном из стекол, проведя его несколько раз над пламенем спиртовки. Фильтровальной бумагой убрать воду с обоих стекол и нанести на них по капле 0,02% раствора нейтрального красного. Через 10 мин убрать краситель, отмыть ткань водой с помощью пипетки, убрать остатки воды, капнуть на стекло 1 М раствор  $\text{KNO}_3$ . Через 20—30 мин просмотреть клетки под микроскопом. Отметить, одинаковая ли окраска ткани на стеклах, наблюдается ли плазмолиз, какая часть клетки (вакуоль, цитоплазма) окрасилась красителем. (Следует иметь в виду, что среди клеток эпидермиса лука, не подвергавшихся нагреванию, также могут быть нежизнеспособные клетки). Результаты записать по образцу табл. 1.

Таблица 1

Общий вид клетки (рисунок)	
без нагревания	с нагреванием

**2) для индигокармина.** Обработать ткань, как указано в задаче 1. Нанести на два стекла по капле 0,05% раствора индигокармина. Через 20 мин убрать краситель кусочком фильтровальной бумаги и отмыть ткань. Нанести на стекла по капле 1 М раствора  $\text{KNO}_3$ .

Через 20—30 мин посмотреть клетки под микроскопом. Сравнить окраску убитой и живой ткани. Отметить, какая часть клетки (цитоплазма, вакуоль) окрасилась красителем, имеется ли плазмолиз. Результаты записать в табл. 2 (аналогичной таблице 1). Сделать вывод о проницаемости пограничных мембран цитоплазмы живой и убитой клетки для индигокармина.

**3) для ионов калия.** Кусочки эпидермиса выпуклой стороны мясистой чешуи синего лука поместить на предметные стекла в 1 М растворы сахарозы и  $KNO_3$ . Через 30—40 мин посмотреть клетки под микроскопом. В варианте с сахарозой вакуоль окружена тонким слоем цитоплазмы, тогда как в  $KNO_3$  слой цитоплазмы, особенно со стороны поперечных стенок, приобретет значительную толщину в виде «колпачков». Требуется объяснить наблюдаемое явление, а результаты (рисунок клетки) записать по форме табл. 3

Таблица 3

Действующее вещество	1 М сахароза	1 М $KNO_3$ .	1М сахароза + 1 М $KNO_3$ .
Общий вид клетки (рисунок)			

**4) для эозина.** Кусочки эпидермиса вогнутой стороны чешуи бесцветного лука поместить на предметные стекла в 1 М растворы сахарозы + эозин и  $KNO_3$  с эозином. Через 30 мин посмотреть клетки под микроскопом. Отметить появление колпачкового плазмолиза, окраску вакуоли и цитоплазмы на обоих стеклах. Результаты записать по форме табл. 4;

Таблица 4

Действующее вещество	1 М сахароза + эозин	1 М $KNO_3$ + эозин
Общий вид клетки (рисунок)		

Общие результаты работы записать по образцу табл. 5.

Таблица 5

Действующее вещество	Нейтральный красный	Индигокармин	Эозин	$K^+$
Плазмалемма Тонопласт				

Отметить наличие проницаемости пограничных мембран цитоплазмы для вещества знаком «+», а отсутствие — знаком «—».

Сделать выводы о характере проницаемости пограничных слоев цитоплазмы к различным веществам.

### Работа 3. Явления плазмолиза и деплазмолиза

**Цель:** изучить особенности явлений плазмолиза и деплазмолиза и веществ, их вызывающих

**Объекты, реактивы, оборудование:** луковица синего лука, 10% глицерин; пинцеты, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, кусочки фильтровальной бумаги, стаканчики с водой, пипетки глазные, микроскопы.

#### Краткие сведения

В настоящее время явление плазмолиза широко используется в экспериментальной цитологии и физиологии растений для определения осмотического потенциала, вязкости цитоплазмы, клеточной проницаемости, доказательства жизнеспособности растительных клеток и многих других процессов. Для наблюдения явления плазмолиза клетки помещают в раствор какого-нибудь плазмолитика, например гипертонический раствор соли или ферментов — целлюлазы, гемицеллюлазы, пектиназы. В этом случае отток воды из клеток приводит к уменьшению объема протопластов и их отделению от клеточных стенок (происходит плазмолиз). Плазмолиз, процесс характерный только живым клеткам, является обратимым.

При помещении плазмолизированной клетки в гипотонический раствор или воду наступает деплазмолиз.

Однако подобные явления могут возникать и в том случае, если клетка находится в растворе плазмолитика длительное время, а его молекулы невелики (глицерин, мочевины) и проникают через пограничные мембраны цитоплазмы (плазмалемму и тонопласт), накапливаются в вакуоли, повышают концентрацию клеточного сока и вызывают обратный ток воды в клетку, т.е. отмечается явление самопроизвольного деплазмолиза.

#### Ход работы:

Кусочки нижнего эпидермиса листа камнеломки или выпуклой стороны чешуи синего лука поместить на предметное стекло в каплю воды, накрыть покровным стеклом и рассмотреть под микроскопом. Затем заменяют воду 10% раствором глицерина. Для этого наносят на предметное стекло рядом с покровным большую каплю раствора и убирают воду кусочком фильтровальной бумаги, прикладывая его с другой стороны от покровного стекла. Повторяют этот прием 2—3 раза до полной замены воды раствором. Все время наблюдают под микроскопом за тем, что происходит в клетках, делая зарисовки каждые 3 мин. Вода поглощается клетками, и внутреннее содержимое постепенно начинает заполнять весь объем клетки. Клетка возвращается в прежнее состояние. Это явление называется деплазмолизом, а состояние клетки тургидным.

Отметить время наступления полного плазмолиза, начала и завершения деплазмолиза. Результаты записать по форме табл. 1, отметив в конце соответствующей графы время плазмолиза и деплазмолиза.

Таблица 1

Состояние цитоплазмы	Время наблюдения, мин	Общий вид клетки(рисунок)	Время плазмолиза и деплазмолиза, мин
Плазмолиз			
Деплазмолиз			

Объяснить, почему при обработке глицерином наступивший плазмолиз со временем сменяется деплазмолизом.

#### **Работа 4. Влияние температуры на проницаемость клеточных мембран для бетацианина**

**Цель работы:** Определить влияние температуры на проницаемость мембран для бетацианина по степени выделения его в различные инкубационные среды.

**Объекты, реактивы, оборудование:** корнеплод столовой свеклы; 0,5 М раствор сахарозы; пробковое сверло диаметром 5 мм; лезвие, линейка; воронка Бюхнера; пробирки; пипетки; термостаты с температурой 35 и 45° С, ФЭК или спектрофотометр.

#### **Краткие сведения:**

Пигмент столовой свеклы *бетацианин* — относительно большая, хорошо растворимая в воде молекула, находящаяся в клеточном соке. Чтобы попасть во внешнюю среду, молекула бетацианина должна пройти через тонопласт, основной цитоплазматический матрикс и плазмалемму. Диффузия бетацианина из вакуоли в среду может проходить достаточно быстро при действии различных факторов или агентов, вызывающих изменение проницаемости мембраны. Измеряя оптическую плотность инкубационной среды через определенный промежуток времени, можно оценить степень воздействия данного фактора на проницаемость мембран. Этот простой и быстрый метод, использующийся обычно в прикладных исследованиях при изучении действия какого-либо вещества или фактора на биологические объекты.

#### **Ход работы:**

Из корнеплода столовой свеклы сверлом вырезают столбики ткани диаметром 5 мм, с помощью лезвия и линейки разрезают их на миллиметровые кусочки, отбирая одинаковые по цвету. Отсчитывают 60 дисков, которые для удаления остатков клеточного сока течение 15—20 мин промывают водопроводной водой на воронке Бюхнера.

В три пробирки наливают по 10 мл воды, в три другие — по 10 мл сахарозы. В каждую пробирку помещают по 10 дисков свеклы. Две пробирки (одна с водой, другая с сахарозой) оставляют при комнатной температуре, две другие помещают на водяную баню с температурой 35°С, остальные также помещают на водяную баню при 45° С и фиксируют время.

В течение 1 ч через каждые 10—15 мин в пробирках измеряют выход бетацианина в раствор. Для этого из опытной пробирки пипеткой отливают раствор в чистую пробирку и после измерения оптической плотности выливают раствор в ту же опытную пробирку, стараясь не терять жидкость. Измерение плотности проводят на ФЭКе с зеленым светофильтром (кюветы 0,5 см) или спектрофотометре  $\lambda = 535$  нм.

Полученные результаты заносят в итоговую таблицу.

Таблица 1

Время, мин	Оптическая плотность					
	Вода (контроль)			Сахароза, 0,5 М		
	22 <sup>0</sup> С	35 <sup>0</sup> С	45 <sup>0</sup> С	22 <sup>0</sup> С	35 <sup>0</sup> С	45 <sup>0</sup> С
15 мин						
30 мин						
45 мин						

Постройте график зависимости оптической плотности раствора от времени. Сделайте выводы.

### Работа 5. Движение цитоплазмы в растительных клетках

**Цель:** изучить влияние различных факторов на скорость движения цитоплазмы

**Объекты, реактивы, оборудование:** веточки элодеи, листья валлиснерии, 0,1 и 0,3 М растворы  $KNO_3$ , 0,1 и 0,001 М растворы глюкозы, растворы спирта – 2 и 15 капель 96% спирта на 10 мл воды, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, микроскоп, лампы на 60 и 300 Вт, водяные бани, термометры.

#### Краткие сведения

*Движение* цитоплазмы свойственно практически всем живым активно функционирующим клеткам. У одних растений цитоплазма движется с высокой скоростью (клетки листьев водных растений, эпидермальные волоски тыквенных и глосиниевых), у других — движение ее едва заметно.

Выделяют несколько типов движения цитоплазмы. Рассмотрим лишь два наиболее распространенных — ротационное (циклоз) и циркуляционное.

Циклоз свойствен клеткам, имеющим крупную центральную вакуоль (например, у водных растений). Он заключается в скольжении тонкого пристенного слоя цитоплазмы по периметру клетки. Вместе с током цитоплазмы перемещаются оргanelлы.

Циркуляционное движение присуще цитоплазме клеток, имеющих несколько крупных вакуолей (например, в волосках тычиночных нитей традесканции). Оно сводится к перемещению цитоплазмы в различных направлениях по цитоплазматическим тязам, разделяющим вакуоли.

В организации движения цитоплазмы участвуют белки, образующие цитоскелет клетки. Структуры цитоскелета подразделяют на микротрубочки, толстые, тонкие и промежуточные микрофиламенты и микротрабекулы. Цитоскелет — это очень лабильная, постоянно меняющаяся система. Его элементы способны быстро распадаться (деполимеризоваться) и вновь собираться в структуры (полимеризоваться).

Внутриклеточное движение или движение самой клетки зависит главным образом от скольжения одного структурного элемента относительно другого. Это скольжение происходит за счет взаимодействия белков. Два основных белка, ответственных за двигательную систему, существуют во всех клетках. Это немышечные формы актина и миозина.

Движение цитоплазмы активизирует превращение метаболитов и тем самым ускоряет обмен веществ и энергии в клетке.

Движение цитоплазмы — активный процесс, сопровождающийся затратой энергии АТФ. Поэтому оно протекает при определенном температурном оптимуме и соответствующем значении рН среды (4,5—5,0). Непосредственным источником АТФ служит дыхание и фотосинтез.

Скорость движения цитоплазмы зависит также от внешних факторов. Температура, ионы, свет действуют на движение цитоплазмы косвенно, через изменение ее вязкости. При повышении температуры среды до верхней предельной для каждого вида границы вязкость цитоплазмы снижается и движение ее ускоряется. Одновалентные ионы ( $K^+$ ,  $Na^+$ ) оводняют и разжижают цитоплазму, ускоряя тем самым ее движение, двухвалентные ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), наоборот, замедляют и даже останавливают его. Наличие или отсутствие движения цитоплазмы, изменение его скорости могут указывать на функциональное состояние растительной клетки.

### Ход работы

У предварительно подготовленного водного растения, выдержанного не менее двух часов на ярком свете, берут лист вблизи верхушечной почки растения. Помещают его на предметное стекло в каплю воды, покрывают покровным, рассматривают его под микроскопом при увеличении  $\times 10$ . Выбирают несколько клеток, в которых хорошо заметно движение хлоропластов. Обычно это клетки, расположенные вдоль центральной жилки. Здесь количество хлоропластов меньше, а отток ассимилятов наиболее интенсивный. Переводят объектив на увеличение  $\times 40$ , определяют время оборота одного хлоропласта в трех клетках, имеющих приблизительно равный объем. Данные заносят в таблицу, определяют, среднюю величину показателя.

Таблица 1

Объект исследования	Вариант опыта	Повторность	Время оборота хлоропласта, с
		1	
		2	
		3	
		среднее	

**Задача.** Изучить зависимость скорости движения цитоплазмы от влияния различных факторов. Контролем для всех вариантов являются выдержанные в воде при обычном освещении водные растения. За 2 дня до опыта воду в аквариуме меняют, растения промывают.

- От состава воды.** Контрольные растения помещают на предметное стекло в воду из аквариума, опытные – в водопроводную, причем температура воды должна быть одинаковой. Определяют время оборота хлоропласта в обоих вариантах, как описано выше.
- От интенсивности освещения.** Определяют время оборота хлоропласта у контрольных (естественное освещение) листьев элодеи и у опытных, которые освещались в течение 2 часов лампами 60 и 300Вт.
- От температуры.** Определяют время оборота хлоропласта в клетках листьев элодеи, выдержанных 10 мин при температуре  $10^{\circ}$ ,  $37^{\circ}$ ,  $42^{\circ}C$  а также у контрольных (комнатной температуры).
- От влияния различных концентраций спирта.** Молодые листья элодеи помещают на предметное стекло на 10 мин в растворы (2 и 15 капель на 10 мл

воды) и определяют время оборота хлоропластов в контрольных (вода) и опытных растениях.

5. **От влияния различных концентраций глюкозы.** Листья элодеи выдерживают 10 мин в 0,1 и 0,001 М растворах глюкозы и определяют время оборота хлоропласта в контрольном (вода) и опытном вариантах.
6. **От влияния ионов калия.** Определяют время оборота хлоропластов в клетках листьев элодеи, которые находились 10 мин в 0,1 и 0,3 М растворах  $KNO_3$  и контрольных (вода).
7. **От возраста листа.** В основании, середине, верхушке веточки элодеи берут по листочку и определяют время оборота хлоропластов в различных по возрасту листьях растения.

Полученные усредненные данные записывают в итоговую таблицу.

Таблица 2

№ п/п	Вариант опыта		Время оборота хлоропласта, с			
			1	2	3	среднее
1.	Интенсивность освещения	Естественное освещение (контроль)				
		60 Вт				
		300 Вт				
2.	Температура	20 <sup>0</sup> С(контроль)				
		10 <sup>0</sup> С				
		37 <sup>0</sup> С				
		42 <sup>0</sup> С				
3.	Влияние различных концентраций спирта	Вода (контроль)				
		2 капли/10 мл воды				
		15 капли/ 10 мл воды				
4.	Влияние ионов калия	Вода (контроль)				
		0,1 М $KNO_3$				
		0,3 М $KNO_3$				
5.	Возраст листа	Молодой				
		Зрелый				
		Старый				

Анализируют итоговую таблицу, делают вывод о влиянии различных факторов внешней и внутренней среды на скорость движения цитоплазмы элодеи, предварительно объяснив механизм этого влияния. Обсуждают достоинства и недостатки каждого варианта, возможность их использования при демонстрации данного явления в школе.

## Работа 6. Определение потенциального осмотического давления клеточного сока методом плазмолиза

**Цель:** определить осмотическое давление клеточного сока синего лука плазмолитическим методом.

**Объекты, реактивы, оборудование:** луковица синего лука с чешуями, 1М раствор сахарозы или  $KNO_3$ , безопасные бритвы, микроскопы, предметные и покровные стекла, бюксы, градуированные пипетки на 10 мл, препаровальные иглы, часы, фильтровальная бумага, термометр.

### Краткие сведения

*Клеточный сок* — водный раствор различных органических и неорганических веществ. Потенциальное осмотическое давление зависит от числа частиц, находящихся в этом растворе, т. е. от концентрации и степени диссоциации растворенных молекул. *Потенциальное осмотическое давление* выражает максимальную способность клетки всасывать воду. Величина этого показателя указывает на возможность растения произрастать на почвах различной водоудерживающей силы. *Повышение осмотического давления* при засухе служит критерием обезвоживания растений и необходимости полива.

Данный метод основан на подборе такой концентрации наружного раствора, которая вызывает самый начальный (уголковый) плазмолиз в клетках исследуемой ткани. В этом случае осмотическое давление раствора примерно равно осмотическому давлению клеточного сока. Такой наружный раствор называют *изотоническим*.

### Ход работы

В бюксах готовят по 10 мл растворов согласно форме таблицы 1. Для опыта можно взять сахарозу 1 М (или  $KNO_3$ ) и с помощью разбавления дистиллированной водой получить нужную концентрацию. Растворы тщательно перемешивают, бюксы закрывают крышками, чтобы предотвратить испарение, и ставят в ряд по убывающей концентрации.

Лезвием безопасной бритвы делают тонкие срезы с выпуклой поверхности пигментированной чешуи луковицы размером примерно  $25 \text{ мм}^2$  из среднего хорошо окрашенного участка.

В каждый бюкс, начиная с высокой концентрации, с интервалом 3 мин опускают по два-три среза. Через 30 мин после погружения срезов в первый бюкс их исследуют под микроскопом. Затем через каждые 3 мин наблюдают срезы из последующих бюксов. Таким способом достигают равную продолжительность пребывания срезов в растворах плазмолитиков. Срезы рассматривают под микроскопом в капле раствора из того бюкса, откуда они были взяты.

Определяют стадию плазмолиза (см. рис. 1 работы 1) клеток в каждом растворе и находят изотоническую концентрацию как среднюю арифметическую между концентрацией, при которой плазмолиз только начинался, и концентрацией, которая уже не вызывает плазмолиза.

Результаты опыта записывают в таблицу 1 по приведенной форме.

Таблица 1

Концентрация раствора, моль/л	На 10 мл раствора		Стадия плазмолиза	Изотоническая концентрация, моль/л	Потенциальное осмотическое давление, кПа
	1М раствора сахарозы или KNO <sub>3</sub> , мл	Воды, мл			
0,7	7	3			
0,6	6	4			
0,5	5	5			
0,4	4	6			
0,3	3	7			
0,2	2	8			
0,1	1	9			

Потенциальное осмотическое давление

$\Pi = RcTi$ , где R – универсальная газовая постоянная, равная 8,314 Дж/моль·К; T- абсолютная температура в Кельвинах; c- изотоническая концентрация, М; i- изотонический коэффициент Вант-Гоффа.

Коэффициент Вант-Гоффа характеризует ионизацию растворов:  $i = 1 + \alpha(n-1)$ , где  $\alpha$  – степень диссоциации раствора данной концентрации, n – число ионов, на которое диссоциирует соль.

Так как неэлектролиты не диссоциируют, для сахарозы  $i = 1$ .

Степень диссоциации KNO<sub>3</sub> разной концентрации приведена ниже.

Концентрация	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Степень	0,71	0,74	0,76	0,79	0,83

В зависимости от вязкости цитоплазмы в клетках чешуи репчатого лука осмотическое давление варьирует, как правило, от 300 до 1300 кПа.

Определить осмотическое давление в клетках синего лука при комнатной температуре (20<sup>0</sup>С) и при температуре 4<sup>0</sup>С.

### Работа 7. Определение сосущей силы (водного потенциала) тканей растений по изменению их размеров (метод Уршпрунга)

**Цель:** определить сосущую силу, тургорное и осмотическое давление растительных тканей

**Объекты, реактивы, оборудование:** свежие и подвявшие клубни картофеля, корнеплоды сахарной или столовой свеклы; молярные растворы сахарозы от 0,1 до 0,9 М, алюминиевые бюксы, разделочная доска, ножи, лезвия, пинцеты, линейки.

## Краткие сведения

Сила, с которой клетка в данный момент поглощает воду, называется сосущей. Сосущая сила клетки зависит от ее физиологического состояния и от внешних условий. В покоящихся семенах и меристематических клетках она обусловлена главным образом давлением набухания коллоидов протоплазмы и пектиновых веществ клеточных оболочек. В клетках, закончивших рост и имеющих большую центральную вакуоль, сосущая сила в значительной степени определяется величиной осмотического давления клеточного сока  $\pi$  и тургорного давления  $P$ , которое в свою очередь зависит от эластичности клеточной оболочки и содержания воды в клетке.

Осмотическое давление окружающего раствора ( $\pi$ ) равно:  $\pi = iCRT$ . Сосущая сила клетки обычно равна разности осмотического давления клеточного сока и тургорного давления:  $S_{\text{кл.}} = \pi_{\text{кл.сока}} - P$ . В зависимости от насыщения клетки водой величина тургорного давления будет меняться, соответственно изменится и сосущая сила клетки.

Водообмен между клеткой и окружающей средой определяется соотношением сосущей силы клетки и осмотическим давлением наружного раствора. Поглощение или отдача воды клетками сопровождается изменением как их размеров и веса, так и концентрации окружающего раствора. При погружении кусочка ткани растения в раствор с большим осмотическим давлением вода из клеток поступает в раствор и размеры кусочка уменьшаются ( $P=0$ , следовательно,  $S = \pi$ ). Если сосущая сила клеток выше, чем  $\pi$  окружающего раствора, клетки всасывают воду и кусочек ткани увеличивается. При равенстве сосущей силы ткани и  $\pi$  окружающего раствора между выходом и поступлением воды в клетку устанавливается равновесие и размеры кусочка ткани не изменяются.

Задача настоящей работы сводится к тому, чтобы из серии растворов найти такой, осмотическое давление которого равнялась бы сосущей силе клеток ткани. Зная, что  $S_{\text{кл.}} = \pi_{\text{р-ра}}$ , находим  $\pi_{\text{р-ра}}$ . Осмотическое давление раствора ( $\pi_{\text{р-ра}}$ ) легко рассчитать, зная его молярную концентрацию.

Однако в настоящее время для характеристики энергетического уровня молекул воды (их способности диффундировать или испаряться) используется термодинамический показатель – водный потенциал, который для чистой воды принят за нуль ( $\Psi_{\text{H}_2\text{O}} = 0$ ), а для любого раствора – меньше нуля. При замене осмотических показателей растительной клетки ( $S_{\text{кл.}} = \pi_{\text{кл.сока}} - P$ ) термодинамическими вышеприведенное уравнение примет следующий вид:

$$-\Psi_{\text{H}_2\text{O}_{\text{кл}}} = -\Psi_{\pi} + \Psi_{\text{р}},$$

где  $\Psi_{\text{H}_2\text{O}_{\text{кл}}}$  – водный потенциал клетки;  $\Psi_{\pi}$  – осмотический потенциал клеточного сока;  $\Psi_{\text{р}}$  – гидростатический потенциал.

Из уравнения видно, что осмотический потенциал понижает водный потенциал клетки, а потенциал давления повышает его. Как правило,  $\Psi_{\text{H}_2\text{O}}$  клетки отрицателен, и лишь при полном насыщении клетки водой, когда  $\Psi_{\text{р}} = \Psi_{\pi}$ , этот показатель равен нулю.

При погружении растительной клетки в какой-либо раствор водообмен между ними определяется соотношением их водных потенциалов: вода перемещается в сторону более отрицательного водного потенциала.

## Ход работы

Поставить бюксы с растворами сахарозы указанной молярности на лабораторный стол. Вырезать из клубня или корнеплода (поперек продольной оси органа) пластинку толщиной 3-4 мм в форме прямоугольника размером 30x40 мм. С помощью лезвия и линейки разрезать ее на ряд одинаковых полосок величиной 3x40мм (нарезать полоски следует быстро, не допуская подвядания). Излишки клеточного сока, вытекающие при разрезании ткани, удалить фильтровальной бумагой. Погрузить по 3 полоски в растворы сахарозы (погружение должно быть полным). Через 30 мин извлечь полоски из растворов и измерить. Данные повторностей и средние из них записать по образцу в табл. 1.

Таблица 1

Концентрация сахарозы, М			0,9	0,7	0,5	0,3	0,2	0,1
Длина полосок, мм	Исходная ( $l_0$ )							
	через 30 мин ( $l_0$ )	Повтор- ность	1					
			2					
			3					
			В сред- нем					
	Разность до и после погружения в раствор ( $\Delta l$ ), мм							
$\Delta l$ , %								

На основании измерений рассчитывают % изменения длины полосок в каждом растворе по формуле:

$$\Delta l\% = \frac{l_0 - l_u}{l_u}$$

Данные заносят в таблицу. Используя их, строят график зависимости изменения длины полосок в % от концентрации наружного раствора. На оси абсцисс откладывают концентрации (С) приготовленных растворов, а на оси ординат —  $\Delta l$ , %.

Объяснить причину изменения длины полосок в растворах разных концентраций. На основании графика выяснить следующие концентрации растворов, где клетки находятся: в состоянии полного тургора, частичного тургора, его отсутствия. Отмечают гипертонические, гипотонические и изотоническую концентрацию наружного раствора по отношению к концентрации клеточного сока растительной ткани.

Для определения величины сосущей силы клеток растительной ткани исходят из того, что в изотоническом растворе величина сосущей силы клеток равна осмотическому давлению наружного раствора, которое определяется по уравнению Вант-Гоффа  $\pi = iCRT$ .

Определить раствор, сосущая сила которого равна сосущей силе данной ткани.

Рассчитать сосущую силу ткани по сосущей силе раствора.

Исходя из полученных результатов работы, вычертить диаграмму, отражающую зависимость между осмотическим давлением, водным потенциалом (сосущей силой) и тургорным давлением ткани. Для этого необходимо заполнить табл. 2.

Таблица 2

Концентрация сахарозы, М	L (длина полосок ткани через 30 мин), мм	S (сосущая сила клеток), Па $S=cRT$	$\pi$ (осмотическое давление клеточного сока), Па	$P = \pi - S$ (тургорное давление), Па
0,9				
0,7				
0,5				
0,3				
0,2				
0,1				

В 1-ую графу записывается молярная концентрация использованных растворов сахарозы.

Во 2-ую — длина полосок ткани после их 30-минутного пребывания в соответствующем растворе.

В 3-ю — значение сосущей силы ткани в соответствующем растворе. Поскольку полоски находились в растворах достаточно продолжительное время и размеры их перестали меняться, то можно считать, что сосущая сила их уравнилась с осмотическим давлением окружающего раствора, т.е.  $S_{\text{тк.}} = \pi_{\text{р-ра}}$ ;  $\pi_{\text{р-ра}}$  легко вычислить по формуле  $\pi = iCRT$ .

В 4-ую графу вносятся значения  $\pi$  клеточного сока. Принимаем, что для самой короткой полоски  $P = 0$ , тогда, исходя из формулы  $S = \pi - P$ ,  $\pi_1 = S_1$ . В растворах меньшей концентрации полоски ткани будут иметь более низкие значения  $\pi$ , которые уменьшаются обратно пропорционально длине полосок ткани:

$$\pi \cdot L_1 = \pi_n \cdot L_n, \text{ значит } \pi_n = \pi L_1 / L_n$$

Имея все значения S и  $\pi$ , можно заполнить последнюю графу таблицы, рассчитав значения P для исследованных полосок ткани по формуле

$$\pi = P - S$$

Далее необходимо вычертить диаграмму (рис.1).

На оси абсцисс в масштабе 1см : 1мм откладывают значения длины полосок ткани в порядке возрастания; на оси ординат — значения  $\pi$ , затем P для соответствующих полосок. Откладывать значения S нет необходимости, так как на графике они представляют отрезки  $\pi_n - P_n$ . Соединив точки  $\pi$  и P линиями, получим график зависимости  $\pi$ , S и P. На основании этого требуется сделать вывод о взаимной зависимости трех величин и объяснить, от какого показателя,  $\pi$  или P зависит в основном изменение сосущей силы отрезков ткани.

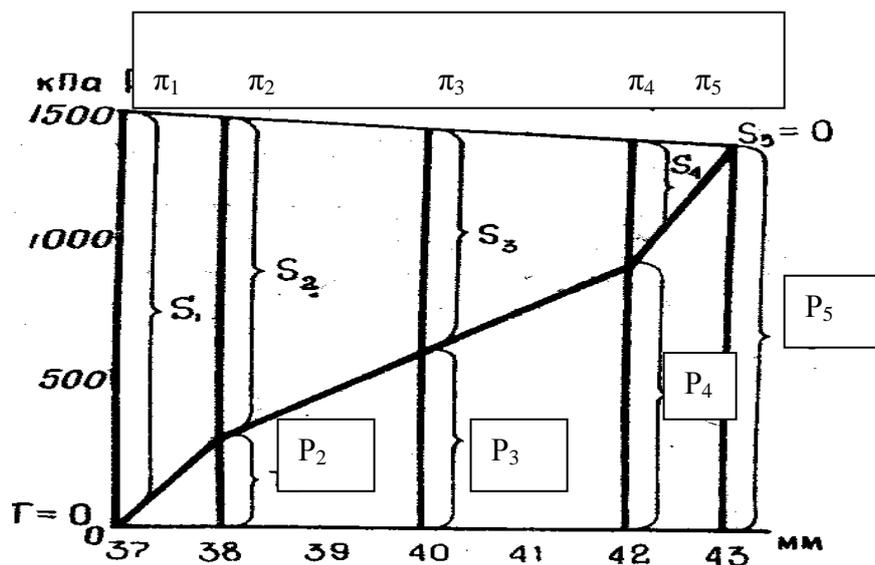


Рис. 1. Диаграмма зависимости между сосущей силой, осмотическим и тургорным давлением растительных клеток, по-разному насыщенным водой.

### Работа 8. Определение водного потенциала растительных тканей по изменению концентрации внешнего раствора методом «струек» (по Шардакову)

**Цель:** определить и рассчитать водный потенциал (сосущую силу) кусочков ткани выбранных объектов.

**Объекты, реактивы, оборудование:** корнеплоды свеклы, клубни картофеля, листья пеларгонии или бегонии; 1 М раствор NaCl, из которого готовят 0,9; 0,7; 0,5; 0,2; 0,1 М растворы, дистиллированная вода, метиленовая синь в порошке; комплект пробирок, пипетки с оттянутым концом, препаровальные иглы, пробочные сверла диаметром 0,8-1 см, большие резиновые или корковые пробки или куски картона, маркер, термометр комнатный, тонкая стеклянная палочка

#### Краткие сведения

Метод Шардакова основан на определении изменения концентрации раствора после выдерживания в нем исследуемых растительных тканей. Этот метод отличается высокой чувствительностью и точностью. Он прост, удобен и широко используется для определения сосущей силы листьев поливных растений при установлении сроков полива.

Метод Шардакова основан на сравнении плотностей исходного (контрольного) раствора с этим же раствором после выдерживания в нем ткани. У раствора, не изменившего плотности,  $-\psi_{H_2O} = -\psi_{TK}$ . В этом случае величина водного потенциала раствора равна водному потенциалу клеток ткани.

Сущность метода в следующем. Если погрузить ткань в раствор, водный потенциал ( $\psi_{H_2O}$ ) которого ниже водного потенциала ткани ( $\psi_{TK}$ ), вода из ткани начинает поступать в раствор и его водный потенциал возрастает. Если же водный потен-

циала ткани ( $\psi_{\text{тк}}$ ) выше водного потенциала ( $\psi_{\text{H}_2\text{O}}$ ) раствора, то вода из раствора будет поступать в клетки и концентрация раствора увеличится. Если водные потенциалы ткани и окружающего раствора равны, устанавливается равновесие в поступлении и выходе воды из клеток в раствор и обратно, концентрация окружающего раствора не меняется.

Изменение концентрации раствора определяется по изменению его удельного веса. Для этого из растворов различных концентраций, в которых 20 - 30 минут была погружена растительная ткань, извлекают кусочки и подкрашивают эти растворы метиленовым синим (на кончике препаровальной иглы). Затем следят за направлением капли подкрашенного раствора в исходном растворе одной концентрации. Если струйка пойдет вниз, значит, удельный вес, а следовательно концентрация раствора после погружения в него ткани увеличилась, вверх – уменьшилась. Если же капля остается на месте – концентрация не изменилась. В этом случае водный потенциал ткани и раствора равны. Зная его концентрацию можно рассчитать водный потенциал ткани.

У растений, испытывающих недостаток влаги, водный потенциал может достигать 1500 кПа; у хорошо оводненных — 300 – 600 кПа.

### Ход работы

Поставить в штатив два ряда чистых сухих пробирок по 7 штук. В пробирки 1-го ряда налить по 10 мл растворов NaCl разной молярности в порядке ее возрастания. Затем из каждой пробирки отлить по 1 мл раствора в рядом стоящую пробирку 2-го ряда. Обозначить маркером концентрацию растворов в пробирках. Далее с помощью пробочного сверла диаметром 1 см вырезать из листьев диски, не захватывая крупных жилок. Желательно подложить под лист пробку или кусок толстого картона. При использовании мясистой ткани клубней и корнеплодов их нарезают поперек продольной оси на тонкие пластинки (около 2 мм) и на них высекают сверлом диски. После этого в пробирки 2-го ряда («маленькие») опускают по 2 диска ткани на 20-30 минут и закрывают пробками, следя, чтобы диски были погружены в растворы. Через 20-30 минут приступают к определению удельного веса растворов. Для этого в каждую пробирку второго ряда вынимают ткани и добавляют по одному кристаллику метиленовой сини и встряхивают пробирку. Плотность каждого из подкрашенных растворов сравнивают с плотностью исходных растворов следующим образом: пипеткой с тонким оттянутым концом отбирают 0,1 мл подкрашенного опытного раствора и переносят в пробирку 1-го ряда с соответствующим исходным раствором (примерно до его середины). Медленно выпуская струйку раствора, надо проследить за направлением его движения. Прежде чем набирать жидкость из следующей пробирки, пипетку следует вытереть фильтровальной бумагой.

Результаты поместить в таблицу, указав стрелкой направление движения окрашенной струйки.

Таблица 1

Концентрация, М	1,0	0,9	0,7	0,5	0,3	0,2	0,1
Движение капли							

Выявить раствор, в котором  $\psi_{\text{H}_2\text{O}} = \psi_{\text{тк}} = -i c R T$ .

**Задачи.** Определить водный потенциал:

- 1) свежих и подвявших клубней картофеля;
- 2) свежих и подвявших корнеплодов столовой свеклы;
- 3) тургесцентных и подвявших листьев пеларгонии;
- 4) листьев верхнего и нижнего яруса пеларгонии.

Общие результаты записать в таблицу 2.

Таблица 2

Вариант опыта	Водный потенциал, кПа

Сделать вывод о зависимости водного потенциала тканей от степени их оводненности и ярусности листа.

РЕПОЗИТОРИЙ БГПУ

## ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ ПО ТЕМЕ «ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ»

1. Один кусочек эпидермиса синего лука выдержан в гипертоническом растворе  $KNO_3$ , другой — в  $Ca(NO_3)_2$ . В каком из них быстрее наступит выпуклый плазмолиз, почему?
2. Почему у растений жарких сухих мест обитания вязкость цитоплазмы, как правило, выше, чем у мезофитов?
3. Кусочки одной и той же растительной ткани погружены в 1М растворы сахарозы и  $NaCl$ . В каком из них будет более сильный плазмолиз? Пояснить расчетом.
4. Почему при изучении влияния  $K^+$  и  $Ca^{2+}$  на вязкость цитоплазмы используют 1М раствор  $KNO_3$  и 0,7М раствор  $Ca(NO_3)_2$ ? Почему взяты разные концентрации данных плазмолитиков?
5. Опытным путем установлено, что осмотическое давление клеточного сока в клетках клубня картофеля при  $17^\circ C$  равно 15 кПа. Какую молярную концентрацию раствора сахарозы необходимо взять, чтобы вызвать в них плазмолиз цитоплазмы?
6. Два кусочка эпидермиса синего лука соответственно с живыми и убитыми нагреванием клетками поместили в гипертонический раствор сахарозы. Какая картина будет наблюдаться? Почему?
7. Клетки листа перезимовавшей озимой пшеницы поместили в гипертонический раствор сахарозы. Плазмолиз наступил только в 20% клеток. Как растения перенесли зимовку?
8. При погружении кусочков эпидермиса синего лука в гипертонические растворы сахарозы и мочевины оказалось, что в первом случае наступил стойкий плазмолиз, а во втором на смену плазмолизу вскоре пришел самопроизвольный деплазмолиз. Почему?
9. При погружении листочка элодеи в гипертонический раствор оказалось, что в клетках верхушки листа плазмолиз наступил на 20-й минуте, основания — только через час. Почему?
10. При помещении клеток эпидермиса синего лука в гипертонический раствор  $KNO_3$  наблюдается сначала выпуклый, а потом колпачковый плазмолиз. При помещении же их в раствор сахарозы этого не происходит. Почему?
11. Живые клетки эпидермиса лука выдержали 10 мин в растворе 0,02% нейтрального красного, другую партию — 20 мин в растворе 0,05% индигокармина. По истечении указанного времени срезы промыли. Какова будет окраска и почему?
12. Где концентрируется эозин после проникновения в клетку: в цитоплазме или в вакуоли?
13. Семена фасоли перед посевом обработали раствором индигокармина, при этом около 70% зародышей окрасились в синий цвет. Какие выводы относительно всхожести семян можно сделать?
14. Чему равно осмотическое давление 0,1 М раствора глюкозы при  $22^\circ C$ ?
15. Клетка погружена в раствор. Осмотическое давление клеточного сока 7 кПа, среды — 5 кПа. Куда пойдет вода? Рассмотрите три возможных случая.
16. Клетка находится в состоянии начинающегося плазмолиза. Чему равно осмотическое давление клеточного сока и тургорное давление этой клетки, если известно, что ее сосущая сила равна 5 кПа?
17. 0,3 М раствор сахарозы, 0,15 М раствор  $NaCl$  и 0,1М раствор  $CaCl_2$  обладают

- одинаковым осмотическим давлением. Почему?
18. У какого раствора и почему больше осмотическое давление у 5% сахарозы ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) или 5% глюкозы ( $C_6H_{12}O_6$ )?
  19. Найти осмотическое давление клеточного сока при  $17^{\circ}$ , если известно, что 0,3 М и 0,4 М растворы сахарозы плазмолиза не вызывают, а в 0,5 М растворе наблюдается плазмолиз?
  20. В клетках каких растений выше осмотическое давление клеточного сока — у растений на солончаках или на обычных почвах, на открытых сухих местах или в тени и почему?
  21. Кусочки одной и той же растительной ткани погружены в ряд растворов, осмотическое давление которых равно 0,5; 0,7; 1; 1,2; 1,6; 1,8 и 2 МПа. Перед погружением в растворы клетки имели тургорное давление 0,6 МПа, а осмотическое давление клеточного сока 1,6 МПа. В каких растворах: а) клетки будут всасывать воду; б) клетки будут отдавать воду; в) будет наблюдаться плазмолиз клеток?
  22. В 6 сосудов налиты растворы сахарозы с концентрациями: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0 М. В эти растворы поместили полоски, вырезанные из картофельного клубня, длина которых до погружения составляла 40 мм. Через 30 минут длина полосок оказалась равной - 42,40, 38, 35, 35, 35 мм. Как объяснить полученные результаты? Почему длина полосок оказалась одинаковой в трех последних растворах?
  23. Найти осмотическое давление 0,2 М раствора KCl при  $0^{\circ}C$  (изотонический коэффициент его — 1,8).
  24. Равны ли сосущая сила раствора и клетки, если концентрация клеточного сока и раствора одинаковы?
  25. Клетка находится в состоянии полного насыщения водой. Чему равны ее сосущая сила и тургорное давление, если осмотическое давление клеточного сока составляет 8 кПа?
  26. Клетка, осмотическое давление клеточного сока которой 5 кПа, погружена в раствор KCl, где осмотическое давление 9 кПа. Что произойдет с клеткой? Объяснение подтвердить расчетом.
  27. Растворы с осмотическим давлением 9 и 8 кПа вызвали плазмолиз в клетках исследуемой ткани, а с давлением 6 и 7 кПа плазмолиз не вызвали. Чему равно осмотическое давление клеточного сока?
  28. Какова сосущая сила раствора, изотоничного клеточному соку ткани, если осмотическое давление последнего 7 кПа?
  29. Кусочки одной и той же растительной ткани погружены в растворы, осмотическое давление которых 5, 6, 10, 12, 16, 18, 20 кПа. Клетки ткани перед погружением имели тургорное давление 6 кПа, осмотическое давление клеточного сока 16 кПа. В каких растворах клетки будут: всасывать воду, отдавать ее, находиться в состоянии плазмолиза?
  30. После погружения кусочка растительной ткани в 10 % раствор сахарозы концентрация последнего осталась без изменений. В какую сторону изменится концентрация 12% раствора сахарозы при погружении в нее этой ткани; почему?
  31. Чему равна сосущая сила и тургорное давление клетки при насыщении ее водой, недонасыщении, плазмолизе и циторризе?
  32. Чему равны сосущая сила и тургорное давление погруженной в раствор клетки после установления равновесия в поступлении и отдаче воды между нею и раствором, если известно, что осмотическое давление клеточного сока 15

- кПа, раствора 12 кПа?
33. Сосущая сила клетки 0,5 МПа. Рассчитайте тургорное давление этой клетки, если ее осмотическое давление равно 1,2 МПа.
  34. Клетка находится в состоянии полного завядания (начала плазмолиза). Рассчитайте осмотическое давление клеточного сока и тургорное давление этой клетки, если известно, что ее сосущая сила 0,5 МПа.
  35. Как изменится длина кусочка растительной ткани, если ее опустить в раствор с осмотическим давлением 1,0 МПа. Известно, что кусочек той же ткани в растворе с осмотическим давлением 0,8 МПа не изменился в размерах. Ответ объясните.
  36. В живой протоплазме растительной клетки содержится 75% воды. Раствор NaCl какой концентрации будет гипертоническим, а какой гипотоническим относительно протоплазмы этой клетки.
  37. Несмотря на то, что жиры обладают гидрофобными свойствами, в воде происходит набухание семян масличных культур. Как это можно объяснить?
  38. Определить сосущую силу и тургорное давление погруженной в раствор клетки после установления равновесия между клеткой и раствором, если осмотическое давление клеточного сока было 1,4 МПа, а наружного раствора - 1 МПа.
  39. В 4 емкости с раствором хлористого натрия с осмотическим давлением 0,3; 0,6; 0,9 и 1,2 МПа опущены полоски клубня картофеля длиной 40 мм. Через полчаса длина полосок соответственно оказалась 41, 40, 39, 38 мм. Объясните результат.
  40. Куски корня свеклы были измерены и погружены на 30 минут в растворы сахарозы разной концентрации. Оказалось, что в 0,3 М растворе длина куска не изменилась, в 0,4 М растворе уменьшилась, а в 0,2 М растворе увеличилась. Как объяснить полученные результаты?
  41. Найти сосущую силу клеток, если известно, что в растворах с осмотическим давлением 0,3 и 0,5 МПа размеры клеток увеличились, а в растворе, осмотическое давление которого 0,7 МПа, объем клеток уменьшился.
  42. Чему равна сосущая сила клеток, если известно, что при погружении в 0,3 М раствор сахарозы размеры клеток увеличились, а в 0,4 М растворе остались без изменения? Опыт проводился при температуре +27 °C.
  43. Кусочки одной и той же растительной ткани погружены в ряд растворов, осмотическое давление которых равно 0,5; 0,7; 1; 1,2; 1,6; 1,8 и 2 МПа. Перед погружением в растворы клетки имели тургорное давление 0,6 МПа, а осмотическое давление клеточного сока 1,6 МПа. В каких растворах: а) клетки будут всасывать воду; б) клетки будут отдавать вода равно 1 МПа, а тургорное - 0,6 МПа, а у второй клетки соответствующие показатели составляют 1,4 и 1,1 МПа.
  44. У двух соприкасающихся живых клеток осмотическое давление клеточного сока первой равно 1 МПа, а второй - 0,8 МПа. Каковы возможные направления движения воды? (Рассмотрите три случая).
  45. Корни одинаковых сеянцев погружены в сосуды с растворами безвредных солей. Осмотическое давление растворов 0,1; 0,3; 0,5 и 0,7 МПа. Как будет происходить всасывание воды сеянцами, если осмотическое давление клеточного сока корневых волосков этих растений составляет 0,5 МПа?

## ТЕМА 2. ВОДНЫЙ ОБМЕН РАСТЕНИЙ

Все физиологические процессы в растении протекают сбалансировано лишь при оптимальном его обеспечении водой. Вода является не только растворителем, но и активным структурным компонентом клетки. Она участвует практически во всех физиолого-биохимических процессах в клетке: облегчает взаимодействие между молекулами, служит субстратом для фотосинтеза, участвует в многочисленных синтетических и гидролитических процессах.

Вода, обладая высокой теплоемкостью, способствует стабилизации температуры растения. Находясь во всех органах, она создает в растении непрерывную фазу, обеспечивая связь органов друг с другом, а также возможность передвижения по растению питательных веществ.

Водный баланс растения определяется соотношением между поглощением и выделением воды. Для бездефицитного водного баланса необходимо, чтобы расхождение влаги листьями компенсировалось ее поглощением через корни. Подвядание растений приводит к серьезным нарушениям в ультраструктуре клеток и в целом в обмене веществ. Даже кратковременный недостаток воды не проходит для растения бесследно. После установления оптимальных условий водоснабжения фотосинтез восстанавливается лишь через 5-7 дней, рост – через 2-3 недели, что приводит к значительной потере урожая.

Вода поступает в растение в результате сил корневого давления и присасывающего действия транспирации.

Деятельность нижнего двигателя водного тока, состоящая главным образом в активном поглощении воды корневой системой, проявляется в плаче и гуттации растений. Силу, поднимающую воду вверх по сосудам, называют корневым давлением. Величина его обычно составляет 50-150 кПа. Корневое давление имеет большое значение в поглощении воды растением при подземном прорастании и в весеннее время до распускания листьев. Существенная роль корневого давления в поддержании непрерывности водных нитей в сосудах ксилемы. Корневое давление ликвидирует в ночные часы возникающий за день водный дефицит.

Работа верхнего двигателя водного тока обусловлена испарением воды с поверхности листьев – транспирацией. Присасывающее действие транспирации передается корням в форме гидродинамического натяжения, связывающего работу обоих двигателей. Работа верхнего двигателя водного тока, основанная на использовании в качестве источника энергии солнечной радиации, регулируется автоматически (усиление потери влаги снижает водный потенциал испаряющих клеток, что ведет к активизации поступления в них воды). У хорошо облиственных растений присасывающая сила транспирации во много раз превосходит силу корневого давления. Основную роль в регуляции испарения воды играют устьица. Поэтому интенсивность транспирации в значительной степени зависит от степени их открытости. Кроме того, растение может уменьшить транспирацию, снижая испарение воды с поверхности клеток, за счет возрастания водоудерживающей способности цитоплазмы и клеточных стенок.

## Работа 1. Определение поглощения воды растением потометрическим методом

**Цель:** определить влияние различных условий на общее и активное поглощение воды растениями

**Объекты, реактивы, оборудование:** проростки фасоли, бобов, тыквы или др. растений; кипяченая вода; прибор ПВВК (прибор всасывания воды корнем — прибор Веска), пластилин, лампа на 200 Вт, вентилятор, миллиметровая бумага, чугунный штатив с муфтами и лапкам, кристаллизатор или поддон, лезвия.

### Краткие сведения

Поступление воды в растение осуществляется благодаря действию двух двигателей водного тока — верхнего и нижнего. Первый представляет собой присасывающую силу транспирации надземных органов, второй — поглощение воды с участием корневой системы. Если работа верхнего двигателя пассивно зависит от внешних условий — температуры, освещения, насыщенности воздуха водяным паром, то поглощение воды корнями обусловлено в значительной степени их активной метаболической деятельностью, в результате которой создается градиент сосущей силы между клетками корневых волосков и окружающим почвенным раствором. В то же время корням свойственен и пассивный механизм поглощения воды путем диффузии ее по свободному пространству. Тем не менее, для лаконичности поглощение воды с помощью корней будем называть активным, а с участием нижнего и верхнего концевых двигателей — общим.

Поглощение воды за короткие промежутки времени можно определить с помощью прибора потометра.

### Ход работы

Выкапывают растение, стараясь не повредить корни, отмывают их от почвы, вставляют в предварительно подготовленный прибор ПВВК (рис. 1а).

Прибор представляет У-образную изогнутую стеклянную трубку, состоящую из широкого и узкого колена. На узком колене закреплена полоска миллиметровой бумаги. Держат потометр над кристаллизатором или поддоном и наливают кипяченую воду, чтобы изменения уровня воды были более заметными. В потометре не должно быть пузырьков воздуха, их удаляют через широкое колено, слегка наклоняя прибор.

Вкладывают нижнюю часть стебля в канал просверленной и разрезанной вдоль пробки (рис.1). Предварительно определяют совпадение ширины отверстия и диаметра стебля; стенки канала для плотного прилегания стебля обмазывают тонким слоем пластилина. Опускают корни в широкое колено и вращательным движением вставляют, по возможности плотнее и глубже, пробку. Вытесняемая вода выливается через узкое колено. Под пробкой не должно быть пузырьков воздуха. Для этого щели в пробке замазывают пластилином. Наклоняют прибор узким коленом вниз. Если в широкое колено не врывается пузырьки воздуха, продолжают работу. В противном случае все собирают заново.

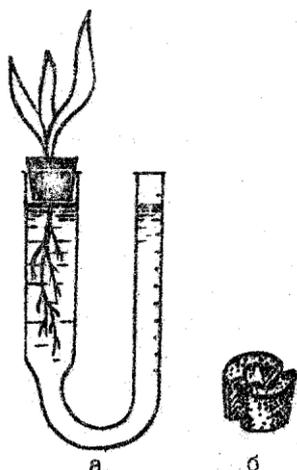


Рис. 1. Прибор для демонстрации (прибор Веска) всасывания воды корнем:  
а — смонтированный прибор, б — пробка для него

Закрепляют потометр в штативе, отмечают уровень воды в узком колене и следят за его изменением через каждые 3 мин. На основании полученных данных рассчитать среднюю скорость смещения мениска (в мм/мин). Затем следует определить среднюю скорость общего поглощения воды (в мм<sup>3</sup>/мин). Для этого нужно измерить с помощью миллиметровой бумаги внутреннее сечение узкого колена потометра (D) и, зная путь L, пройденный мениском в единицу времени (мм/мин), рассчитать объем поглощенной воды по формуле для объема цилиндра:

$$V = \frac{\pi \cdot D^2 \cdot L}{4} = 0,78 \cdot D^2 \cdot L$$

Чтобы сравнить общее поглощение воды различными объектами, необходимо учитывать площадь их листьев. При этом общее поглощение воды выражается в мм<sup>3</sup>/дм<sup>2</sup>, а поглощение с площади листьев в час — мм<sup>3</sup>/дм<sup>2</sup>·ч.

Площадь листьев можно измерить несколькими способами.

1. Лист накладывают на миллиметровую бумагу, обводят контур его и подсчитывают площадь, занимаемую им (в мм<sup>2</sup>).

2. Листья, срезанные с растения, раскладывают на бумаге, обводят по контурам и взвешивают (P<sub>1</sub>)

Затем взвешивают бумажный квадрат (P<sub>2</sub>) из этой же бумаги площадью 1см<sup>2</sup> или 1дм<sup>2</sup> (S<sub>2</sub>). Площадь листьев S<sub>1</sub> находят из пропорции:

$$\begin{array}{l} P_1 \text{ ————— } S_1 \\ P_2 \text{ ————— } S_2 \end{array} \quad S_1 = \frac{P_1 \cdot S_2}{P_2}$$

После определения поглощения воды целым растением с помощью лезвия удаляют его наземную часть, место среза смазывают вазелином и следят за поглощением воды только корнями, отмечая положение мениска каждые 3 мин, как ука-

зывалось ранее. На основании полученных результатов рассчитывают среднюю скорость поглощения ( $\text{мм}^3/\text{мин}$ ) и долю активного поглощения (в % от общего). Полученные данные записывают по форме табл. 1

Таблица 1

Вариант опыта	Поглощение воды										Активное поглощение, %			
	целым растением					Корнями								
	Положение мениска через интервалы времени, мин					Средняя Скорость, $\text{мм}^3/\text{мин}$	Общее поглощение, $\text{мм}^3/\text{дм}^2 \cdot \text{ч}$	Положение мениска через интервалы времени, мин					Средняя скорость, $\text{мм}^3/\text{мин}$	
	0	3	6	9	в среднем			0	3	6		9		в среднем

Сделать вывод о роли присасывающей силы транспирации и активной деятельности корней в поглощении воды растением при различных условиях.

**Задача.** Сравнить интенсивность общего и активного поглощения воды:

- 1) у фасоли и тыквы;
- 2) у фасоли, освещаемой лампой 200Вт; при естественном освещении;
- 3) у фасоли, тыквы, бобов при обычном движении воздуха и под вентилятором.

Общие результаты записать по форме табл.2.

Таблица 2

Объект	Внешние условия	Общее поглощение, $\text{мм}^3/\text{дм}^2 \cdot \text{ч}$	Активное поглощение, %

Анализируют интенсивность общего и активного поглощения у исследованных объектов, влияние на них различных факторов среды.

## Работа 2. Изучение состояния устьичного аппарата растений

**Цель:** определить состояние устьиц растений в зависимости от разнообразных условий

**Объекты, реактивы, оборудование:** листья фасоли, традесканции, ячменя, пеларгонии и др. растений, полоски фильтровальной бумаги, раствор 5% хлоркобальта, предметные стекла, резиновые кольца, пинцет, микроскоп, лезвие бритвы, препаровальные иглы, петролейный эфир, ксилол, этиловый спирт в капельницах, бесцветный маникюрный лак, спиртовка, вентилятор, лампа 200 Вт.

### Краткие сведения:

Процесс испарения воды надземными органами растения называют транспирацией. Транспирация растений происходит через устьица (устьичная), кутикулу (кутикулярная) и перидермальную (через чечевички), а также через репродуктивные органы. Однако главную роль играет регулируемая устьичная транспирация. Доля кутикулярной транспирации зависит от мощности кутикулы, определяемой видовой спецификой растения и условиями произрастания. Она довольно высока в молодых органах, но снижается с возрастом растения.

Интенсивность устьичной транспирации зависит от числа устьиц, приходящихся на единицу поверхности листа, от ширины устьичной щели.

Факторы внешней и внутренней среды прямо и косвенно воздействуют на устьичный аппарат, вызывая в замыкающих клетках преобразования, приводящие к изменению тургора. Из внешних факторов на движения устьиц больше всего влияют влажность воздуха и условия водоснабжения, свет и температура, а из внутренних – парциальное давление  $\text{CO}_2$  в системе межклетников, состояние гидратации растения, ионный баланс и фитогормоны, из которых цитокинин способствует открыванию устьиц, а абсцизовая кислота – закрыванию. На состояние устьиц влияют возраст растения, а также эндогенные суточные ритмы.

Представление о состоянии устьичного аппарата имеет практическое значение: по степени открытия устьиц определяют потребность поливных растений в воде для установления сроков полива.

Существует ряд методов для обнаружения устьиц на нижней и верхней стороне листа и определения их состояния.

### Ход работы

#### 1. Хлоркобальтовый метод (по Шталю).

Метод хлоркобальтовой пробы по Шталю основан на изменении цвета фильтровальной бумаги, пропитанной хлоридом кобальта, при поглощении ею паров воды, испаряемых поверхностью листа. По времени, необходимому для перехода окраски хлоркобальтовой бумаги из голубой (цвет сухого  $\text{CoCl}_2$ ) в розовую (цвет  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), судят о транспирации растений.

Готовят хлоркобальтовую бумагу. Сухой хлористый кобальт ( $\text{CoCl}_2$ ) имеет голубой цвет,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – розовый. Полоски фильтровальной бумаги погружают в 5% раствор хлоркобальта, держа их пинцетом. Когда бумага пропитается раствором, ее достают. Она приобретает розовую окраску. Затем бумагу подсушивают над спиртовкой, появляется голубое окрашивание. Перед употреблением просушивают еще раз, немедленно прикладывают с двух сторон к листу две полоски бумаги. Для устранения действия атмосферной влаги лист осторожно зажимают вместе с бумагой между предметными стеклами, перевязывают резиновыми кольцами. Наблюдают изменение окраски бумаги. По скорости порозовения можно приблизительно судить об интенсивности транспирации, состоянии устьиц.

**Задача.** Изучить расположение устьиц с обеих сторон листа, их состояние:

- у фасоли, традесканции, ячменя, пеларгонии в обычных условиях;
- у фасоли в обычных условиях и в темноте. Результаты записывают.

1. **Метод инфльтрации (по Молишу).** Причиной устьичных движений может быть действие света, изменение водности тканей, температуры, концентрации  $\text{CO}_2$  в межклетниках и др. В условиях недостаточного водообеспечения про-

исходит гидроактивное закрывание устьиц. Степень открытости устьиц может служить физиологическим показателем для определения обеспеченности растений водой и установления сроков полива.

Определение состояния устьиц методом инфильтрации основано на способности жидкостей, смачивающих клеточные стенки, проникать через открытые устьичные щели в ближайшие межклетники, вытесняя из последних воздух. При инфильтрации межклетников соответствующие участки листа становятся прозрачными.

В качестве инфильтрующих растворов берут органические жидкости, обладающие различной вязкостью и неодинаковой способностью смачивать клеточные стенки и поэтому по-разному проникать через устьичные отверстия в межклетники. Относительно легко проникает ксилол, труднее – бензол, еще труднее – спирт. Разная способность этих жидкостей проникать в устьичные щели позволяет определить степень открытости устьиц.

Межклетники листа заполнены воздухом, при рассматривании на свет лист кажется матовым. Если произойдет инфильтрация, т.е. заполнение межклетников жидкостью, то соответствующие участки листа становятся прозрачными. Жидкости проникают в устьичные щели в зависимости от их ширины: петролейный эфир или ксилол – через слабо открытые устьица, бензол – средне открытые, этиловый спирт – широко открытые.

На нижнюю поверхность листа наносят поочередно маленькие капли эфира или ксилола, бензола, спирта. Держат лист в горизонтальном положении до полного исчезновения капель, которые могут либо испариться, либо проникнуть внутрь. Рассматривают лист на свет.

**Задача.** Исследовать состояние устьиц листьев:

- а) фасоли, ячменя, традесканции, пеларгонии в обычных условиях;
- б) фасоли, ячменя в обычных условиях и выдержанных сутки в темноте;
- в) фасоли и ячменя под влиянием движения воздуха.

Результаты наблюдений записывают в таблицу. Знаком «плюс» в схеме отмечают проникновение жидкости, знаком «минус» - отсутствие инфильтрации.

Таблица 1

Вид растения	Вариант опыта	Петролейный эфир или ксилол	Бензол	Спирт	Состояние устьиц

## 2. **Метод отпечатков (по Полачи-Молотковскому).**

Метод основан на получении тонкой прозрачной пленки с отпечатками (репликами) устьиц. Рассматривая их под микроскопом, можно определить число устьиц на единице листовой поверхности и их размер. Для изготовления реплик применяют вещества, образующие пленку при испарении растворителя или в результате полимеризации.

На поверхность листа наносят тонкий мазок раствора бесцветного лака в ацетоне. После испарения растворителя образуется пленка, на которой отпечатывается эпидермис с устьицами. Отпечаток аккуратно снимают с листа, помещают в каплю воды на предметное стекло, покрывают покровным, рассматривают под микроско-

пом и определяют количество, состояние устьиц. Метод позволяет при использовании окуляр- и объект-микрометров измерять устьица, ширину устьичной щели.

**Задача.** Изучить количество и состояние устьиц в нижнем и верхнем эпидермисе листьев:

- а) фасоли, ячменя, традесканции, пеларгонии в обычных условиях;
- б) фасоли, ячменя в обычных условиях и темноте;
- в) фасоли, ячменя под влиянием движения воздуха;
- г) фасоли, ячменя при освещении лампой 200 Вт.

Полученные усредненные данные вносят в итоговую таблицу.

Таблица 2

Вид растения	Вариант опыта	Число устьиц в эпидермисе		Процент открытых устьиц в эпидермисе	
		верхнем	Нижнем	верхнем	нижнем

Дают характеристику устьичного аппарата изученных растений, изменения его состояния под влиянием меняющихся условий среды. Сравнивают достоинства и недостатки использованных методов исследования устьиц, обсуждают возможность их применения в школе.

### Работа 3. Определение интенсивности транспирации весовым методом по Л.А. Иванову

**Цель:** определить интенсивность транспирации по уменьшению массы листьев

**Объекты, реактивы, оборудование:** листья и проростки разных растений, торсионные весы, миллиметровая или писчая бумага, лезвия безопасной бритвы, вазелиновое масло, электролампа на 200-500 Вт, вентилятор, колпаки стеклянные, фильтровальная бумага, чашка Петри.

#### Краткие сведения:

Транспирация — процесс испарения воды надземными частями растения. Интенсивность транспирации — это количество воды, испаряемой растением (в г) за единицу времени (ч) единицей поверхности листа (в  $\text{дм}^2$ ). Эта величина колеблется в пределах 0,15—1,47 г/ $\text{дм}^2$ -ч. Отношение воды, испаряемой листом, к воде, испаряемой со свободной водной поверхности той же площади за один и тот же промежуток времени при одних и тех же условиях называется относительной транспирацией. Этот показатель характеризует способность растений регулировать транспирацию.

Наиболее простой и достаточно точный метод учета транспирации — метод быстро взвешивания, предложенный Л. А. Ивановым. Метод Иванова пригоден только для определения транспирации у листьев небольших размеров, вес которых не превышает максимально допустимой нагрузки на торсионные весы (200-1000 мг). Другая особенность метода заключается в том, что для соблюдения точности результатов необходимо делать взвешивания через короткие интервалы времени (2-3 мин), повторяя их не менее 3 раз.

## Ход работы

Лист срезают с растения и, удалив черешок, место среза смазывают тонким слоем вазелинового масла для предотвращения испарения с его поверхности. Иглой к листу прикрепляют небольшую петельку из нитки. Устанавливают торсионные весы, согласно правилам работы с ними, и включают их. Исследуемый лист взвешивают за петельку на крючок коромысла весов, закрывают весовую камеру, включают весы и делают первое взвешивание ( $P_1$ ). Затем лист быстро вынимают и помещают в исследуемые условия, подвесив петлю к штативу. С интервалом 3 мин взвешивание повторяют трижды ( $P_2, P_3, P_4$ ). По разности между предыдущим и последующим взвешиванием определяют количество воды, испарившийся за данный промежуток времени, и вычисляют среднюю величину ( $P$ ). Для повышения точности определения желательнее иметь трехкратную повторность по каждому варианту, т.е. исследовать по три листа.

Для определения поверхности листа взвесить на технических весах квадрат миллиметровой бумаги известной площади (например,  $100 \text{ см}^2$ ), наложить на этот квадрат исследуемый лист, тщательно обвести карандашом листовую пластинку, вырезать и взвесить полученную бумажную фигуру. Площадь листа вычислить по пропорции  $a/b = c/S$ , где  $a$  – масса квадрата,  $b$  – масса бумажной фигуры,  $c$  – площадь квадрата,  $S$  – площадь листа.

Одновременно определить при тех же условиях интенсивность свободного испарения. Для этого взвесить чашку Петри, наполненную почти до краев водой комнатной температуры (наружная поверхность чашки должна быть совершенно сухой), и через любое время, например через 30 мин, сделать второе взвешивание. Определить испаряющую поверхность, измерив внутренний диаметр чашки. Результаты наблюдений записывают по форме в таблицу 1.

Таблица 1

Вариант опыта	Повторность	Вес испаренной воды (в мг) через интервалы времени, мин				P	Площадь листа, $\text{дм}^2$	И тр, $\text{г/дм}^2 \cdot \text{ч}$
		0	3	6	9			
		$P_1$	$P_1 - P_2$	$P_2 - P_3$	$P_3 - P_4$			

Интенсивность транспирации (И тр) рассчитывается по формуле:

$$\text{И тр} = \frac{P \cdot 1000 \cdot 60}{2S}, \text{ г/дм}^2 \cdot \text{ч}.$$

Вычислить интенсивность свободного испарения (И св. ис) по той же формуле. Найти относительную транспирацию (И от):  $\text{И от} = \text{И тр} / \text{И св. ис}$ .

На основании величины относительной транспирации ( $I_{от}$  от менее 0,5 считается низкой) сделать вывод о регуляции листом процесса транспирации. Сделать вывод о влиянии изучаемого фактора на интенсивность процесса транспирации.

**Задачи.** Сравнить интенсивность транспирации:

- 1) старых и молодых листьев;
- 2) у листьев на свету и в темноте;
- 3) у листьев при нормальном и интенсивном движении воздуха;
- 4) листьев мезофитов и листовых суккулентов;
- 5) у листьев традесканции и пеларгонии.

Общие результаты записать в таблицу 2 .

Таблица 2

Вариант опыта		Интенсивность транспирации, г/дм <sup>2</sup> •ч	Относительная транспирация
Вид растения	Условия		

РЕПОЗИТОРИЙ БГПУ

## ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ ПО ТЕМЕ «ВОДНЫЙ ОБМЕН РАСТЕНИЙ»

1. Сколько воды испарится из растения за 5 мин, если интенсивность транспирации  $120 \text{ г/м}^2\text{ч}$ , а поверхность листьев  $240 \text{ см}^2$ ?
2. На лист пеларгонии нанесли каплю спирта, бензола и ксилола. В двух последних случаях на листе появились прозрачные пятна. Почему?
3. С листовой поверхности древесного растения площадью  $12 \text{ м}^2$  за 2 ч испарилось 3 кг воды. Чему равна интенсивность транспирации?
4. В сосуде с почвой вырастили растение и довели его до состояния устойчивого завядания. Определить коэффициент завядания, зная, что проба почвы из сосуда весом 5,16 г после высушивания при  $100^\circ$  стала весить 4,8 г.
5. Как изменится процент активного поглощения от общего при помещении растения в темноту, в условия повышенной влажности, интенсивного движения воздуха? Почему?
6. С поверхности побега, площадь листьев у которого  $1,2 \text{ дм}^2$ , испарилось на 4-й минуте 0,06 г воды. При тех же условиях со свободной водной поверхности площадью  $20 \text{ см}^2$  за 2 ч испарилось 0,6 г воды. Определить относительную транспирацию.
7. За вегетационный период в растении накопилось 2,1 кг органического вещества, а испарилось 525 кг воды. Определить продуктивность транспирации. К какому экотипу (мезофит, ксерофит) относится растение?
8. Почему в жаркий день растения, несмотря на достаточное количество влаги в почве, подвядают, а в ночные часы тургор восстанавливается?
9. Рассчитать транспирационный коэффициент древесного растения, испарившего за вегетационный период 2 т воды, если за это время накопилось 10 кг сухого вещества. К какому экотипу по характеру водообеспеченности относится растение?
10. Транспирационный коэффициент равен 125 мл/г. Найти продуктивность транспирации. К какому экотипу по характеру водообеспеченности относится, данное растение?
11. Почему при помещении букета в вазу рекомендуется обновлять срез под водой?
12. Продуктивность транспирации растения равна 4 г/л. Найти транспирационный коэффициент.
13. Какая почва называется физиологически сухой? Какие виды почв можно назвать физиологически сухими?
14. Одно из двух одинаковых растений в глиняных горшках поставлено в кристаллизатор с водой  $20^\circ\text{C}$ , другое — с водой при  $30^\circ$ . Какое из них будет более интенсивно поглощать воду, почему?
15. Опытами установлено, что растением за 1 ч испаряется 5 г воды, а поглощается 4,5 г. Какими условиями могло быть вызвано такое несоответствие?
16. Какие листья, верхнего или нижнего яруса, быстрее завядают при недостатке влаги в почве, почему?
17. Одно растение пеларгонии поместили на некоторое время в темноту, другое — во влажную камеру, третье — на проточный воздух. На нижнюю сторону листа среднего яруса каждого растения нанесли по капле спирта, бензина и ксилола. На листе, находившемся в темноте, прозрачные пятна в месте нанесения растворителей не обнаружены. На листе, помещенном в условия повышенной влажности, пятна образовались в месте нанесения всех трех растворителей. На листе, находившемся на проточном воздухе, прозрачное пятно появилось только в месте нанесения ксилола. Объяснить полученный результат.

**18.** Бумагу, пропитанную хлористым кобальтом, приложили к обеим сторонам молодого и зрелого листа пеларгонии. В первом случае порозовели куски бумаги, приложенные как к верхней, так и к нижней стороне, во втором ярче оказалась окраска бумаги, приложенной к нижней стороне. Почему?

**19.** Как изменится соотношение между активным поглощением воды и присасывающей силой транспирации при понижении температуры в зоне корней?

**20.** Что означает активное поглощение воды растением? Какова примерно будет его доля от общего поглощения при обычных условиях?

**21.** У многих злаков в отличие от других растений устьица расположены на верхней стороне листа. Почему?

**22.** Побег, взвешенный сразу после срезания, имел вес 10,26 г, а через 3 мин — 10,17 г. Площадь листьев побега равна 240 см<sup>2</sup>. Определить интенсивность транспирации.

**23.** В утренние часы при высокой влажности воздуха на концах колеоптилей проростков злаков, по краям листьев манжетки и других растений можно наблюдать капли воды. Что это за явление? Объяснить его возникновение.

**24.** Ветку ивы поставили в сосуд с водой, подкрашенной эозином. Через несколько дней сделали продольный срез через стебель. По какой части стебля поднимается вода (окрасится красителем)?

**25.** Растение посадили в почву, осмотическое давление почвенного раствора которой 0,3 МПа. Во время посадки осмотическое давление клеточного сока корневых волосков составило 1 МПа, а тургорное давление — 0,8 МПа. Может ли данное растение жить на этой почве? Ответ обоснуйте.

**26.** Как можно объяснить «плач» березы при повреждении ствола ранней весной и отсутствие этого явления в летнее время.

**27.** Две ветви, которые подвяли поставили в сосуд с водой, причем у одной из ветвей срез стебля обновили под водой. Какая из ветвей раньше и полнее перейдет в состояние тургора? Почему вы так думаете?

**28.** Охарактеризуйте механизм транспирации воды растением, его этапы, механизм регуляции. Значение транспирации.

**29.** Назовите показатели транспирации и объясните их биологический смысл.

**30.** Бумага, пропитанная раствором хлористого кобальта и просушенная до ярко-голубого цвета, была приложена к двум сторонам листа дуба. С нижней стороны листа бумага порозовела через 15 минут, приложенная к верхней стороне изменила свою окраску только через 3 часа. Как объяснить полученные результаты?

**31.** Как объяснить, что при общей небольшой площади устьичных отверстий (не более 1 % от площади листьев) интенсивность транспирации при благоприятных условиях водоснабжения приближается к интенсивности эвалорации (испарения со свободной водной поверхности)?

**32.** На нижнюю поверхность листьев лещины в разные часы ясного летнего дня наносили капли ксилола, бензола и этилового спирта. При этом наблюдалось следующее: в 5 часов утра указанные жидкости не оставляли на листе никакого следа, в 7 часов получились пятна от ксилола и бензола, в 9 часов пятна дали все 3 жидкости, а в 13 часов пятен на листе не оказалось. Как объяснить эти результаты?

**33.** Дерево за 1 час испарило 500 г, а корневая система поглотила за это же время 450 г воды. Какие условия внешней среды могли вызвать несовпадение количества поглощенной и испаренной воды? Как это отразится на растении.

**34.** Как объяснить «плач» березы при поражении ствола ранней весной и отсутствие этого явления в летнее время?

**35.** У некоторых комнатных растений незадолго перед дождем появляются капли воды на кончиках листьев. Как объяснить это явление?

**36.** Растение было выдержано несколько часов в темноте. А затем выставлено на прямой солнечный свет. Как изменится при этом транспирация? Почему?

**37.** Растения одного вида выращиваются в одинаковых почвенных условиях. На одну грядку было внесено определенное количество удобрений, а в другую - вдвое больше. Будет ли различие в процессах поступления и расходования воды этими растениями?

**38.** Почему у растений разных видов, произрастающих в одинаковых условиях, водный режим складывается по-разному?

**39.** Какое влияние на растение оказывает недостаток и избыток воды? Есть ли различия в физиологических процессах в засушливые годы и в годы с нормальным увлажнением?

**40.** Вес побега сразу после срезания составил 10,54 г, а через 3 минуты 10,45 г. поверхность листьев равна 200 см<sup>2</sup>. Определить интенсивность транспирации.

**41.** Чему равна интенсивность транспирации, если дерево с листовой поверхностью 10 м<sup>2</sup> испарило за 2 часа 4 кг воды?

**42.** Чему равна листовая поверхность дерева, если при интенсивности испарения (транспирации) 50 г/м<sup>2</sup>·час, дерево за 30 минут испарило 10 кг воды? Определить экономность транспирации по следующим данным: интенсивность транспирации 25 г/м. кв. в час, площадь листьев 550 см<sup>2</sup> сырая масса 20 г, абсолютно сухая масса 9 г.

**43.** Интенсивность транспирации растения составляет 40 г/м. кв. в час, площадь листьев равна 80 см. кв., сырой вес растения - 40 г, сухой вес -10 г. Определите экономность транспирации.

**44.** Продуктивность транспирации равна 5 г/литр. Найти транспирационный коэффициент.

**45.** При наличии листовой поверхности площадью 1,5 дм<sup>2</sup> побег испарил за 5 минут 0,08 г воды. При тех же условиях со свободной поверхности площадью 25 см<sup>2</sup> за 2 часа испарилось 0,6 г воды. Определить относительную транспирацию.

### Тема 3. МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ

Питание растительных организмов представляет собой процесс поглощения и усвоения из окружающей среды химических элементов, необходимых для их жизнедеятельности. Минеральное питание включает процессы поглощения минеральных ионов из наружной среды, их связывания (преобразования, ассимиляции) и транспорта по клеткам и тканям к местам возможного потребления.

Наземные растительные организмы в естественных условиях получают необходимые минеральные вещества из почвы. В этом случае корни оказываются в сложной системе биологических и физико-химических взаимоотношений между почвенными частицами, почвенным раствором, почвенными микроорганизмами и грибами. Ионы минеральных солей могут поступать в клетки корневой системы растений, как из почвенного раствора, так и в результате контактного обмена с почвенными частицами. Оба эти процесса обычно связаны с обменом ионов  $H^+$  на катионы и анионов  $HCO_3^-$ ,  $OH^-$  и органических кислот на минеральные анионы.

Из почвы минеральные элементы поглощаются в виде катионов и анионов. Попадая в клетку, одни элементы участвуют в метаболизме в форме свободных ионов, другие связываются с органическими соединениями, не претерпевая при этом никаких изменений, третьи же включаются в состав органических молекул только после ряда окислительно-восстановительных превращений.

В растениях обычно обнаруживаются следы почти всех химических элементов, находящихся в окружающей среде. Однако для жизни растений необходимо не более двенадцати элементов, которые получили название биогенных.

Элемент считается необходимым, если его отсутствие исключает нормальный жизненный цикл растения; его нельзя заменить каким-либо другим элементом; для данного элемента четко определены его физиологические функции. Элементы, входящие в состав растения делятся на две основные группы: органогены и зольные, а последние в свою очередь подразделяются на три группы:

2. Макроэлементы первой группы (содержание в % на единицу сухой массы): N (0,5-6,0), K (0,1-1,0), P (0,04-0,6);

3. Макроэлементы второй группы: Ca (0,03-1,7), Mg (0,03-0,3), S (0,01-0,6), Fe (0,002-0,009);

4. Микроэлементы (содержание  $<0,001\%$  на сухую массу): Mo, Mn, Zn, Cu, B, Co и др.

Считается, что для упорядоченного обмена веществ, развития и высокой продуктивности необходимо, чтобы растения получали питательные элементы не только в достаточных количествах, но и в требуемых соотношениях.

#### Работа 1. Микрхимический анализ золы

**Цель:** ознакомиться с методами обнаружения важнейших элементов в золе растений.

**Объекты, реактивы, оборудование:** зола, полученная при сжигании листьев, семян, древесины; 10% растворы HCl и  $NH_3$ , 1% растворы следующих солей в капельнице:  $Na_2HPO_4$ ,  $NaHC_4H_4O_6$ ,  $K_4[F(CN)_6]$ ,  $(NH_4)_2MoO_4$  в 1%  $HNO_3$ , 1% раствор  $H_2SO_4$ ; пробирки, предметные стекла, стеклянные палочки, кусочки фильтровальной бумаги, стаканчики с дистиллированной водой.

## Краткие сведения

При сжигании ткани органомогенные элементы (С, Н, О, N) улетучиваются в виде газообразных соединений и остается несгораемая часть — зола. Содержание ее в разных органах различно: в листе до 10-15%, в семенах — около 3%, в древесине — около 1%. Больше всего золы в живых активно функционирующих тканях, например в мезофилле листа. В его клетках имеется хлорофилл и множество ферментов, в состав которых входят такие элементы, как магний, железо, медь и др. В связи с высокой метаболической активностью живых тканей в них обнаруживается также значительное количество калия, фосфора и других элементов. Содержание золы зависит и от состава почвы, на которой произрастает растение, и от его возраста и от генетических особенностей растений, обуславливающих потребность в элементах минерального питания, вследствие чего растения разных видов, растущие на одинаковой почве, накапливают различное количество зольных элементов.

Органы растений отличаются не только по количественному, но и по качественному составу золы. На количество золы, образующейся при сжигании разных частей растения, влияет также соотношение между живыми и мертвыми клетками: мертвые клетки состоят только из клеточных стенок, в которых находится небольшое количество кальция или кремния, тогда как в цитоплазме и органоидах живых клеток содержится много зольных элементов как в составе органических веществ (сера — в белках, фосфор — в нуклеиновых кислотах и фосфолипидах, магний — в хлорофилле и т.п.), так и в форме минеральных ионов.

Зола, получаемая при сжигании растений, содержит большое количество элементов, среди которых различают макроэлементы (фосфор, сера, калий, кальций, магний) и микроэлементы (железы, медь, цинк, марганец, молибден, бор и ряд других).

Для изучения химического состава золы можно использовать микрохимический метод, для которого требуется небольшое количество материала. Микрохимический метод позволяет обнаружить в золе растений целый ряд элементов. В основе метода лежит способность некоторых реактивов при взаимодействии с зольными элементами давать соединения, отличающиеся специфической окраской или формой кристаллов.

## Ход работы

### ***Получение золы из растений и вытяжки элементов из нее***

Порцию высушенного материала (древесные щепки, листья и размельченные семена) поместить в тигель, добавить несколько мл спирта и поджечь. Процедуру повторить 2-3 раза. Затем тигель перенести в муфельную печь и прокалить, пока обугленный материал не приобретет пепельно-серый цвет. Остатки угля надо выжечь, поместив тигель в муфельную печь на 20 мин.

***Для получения вытяжки Са, Mg, Р и Fe*** необходимо внести в пробирку стеклянной глазной лопаточкой порцию золы, залить ее 4 мл 10% HCl и несколько раз встряхнуть для лучшего растворения.

***Для получения вытяжки калия*** такое же количество золы надо растворить в 4 мл дистиллированной воды и профильтровать в чистую пробирку через маленький бумажный фильтр.

***Обнаружение Са, Mg, Р и Fe***. На чистое предметное стекло стеклянной палочкой нанести небольшую каплю зольной вытяжки, рядом, на расстоянии 2 см, — каплю реактива и палочкой соединить две капли перемычкой (рис. 1). Каждый ре-

актив наносится отдельной пипеткой. В месте соприкосновения растворов произойдет кристаллизация продуктов реакции (смешение двух капель нежелательно, так как вследствие быстрой кристаллизации образуются мелкие нетипичные кристаллы, кроме того, при высыхании капли могут образоваться кристаллы исходных солей). После этого капли оставшихся растворов убрать со стекла кусочком фильтровальной бумаги и рассмотреть кристаллы под микроскопом без покровного стекла. По проведении каждой реакции стеклянную палочку надо прополаскивать водой и вытереть насухо фильтровальной бумагой.

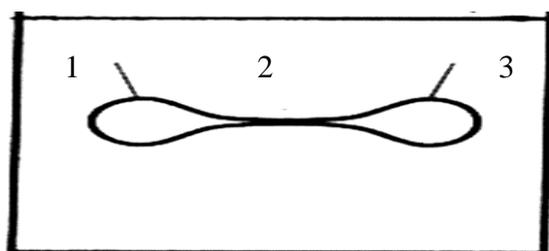


Рис. 1. Микрохимический анализ золы: 1 — капля зольной вытяжки; 2 — «мостик» между раствором и реактивом; 3 — капля реактива.

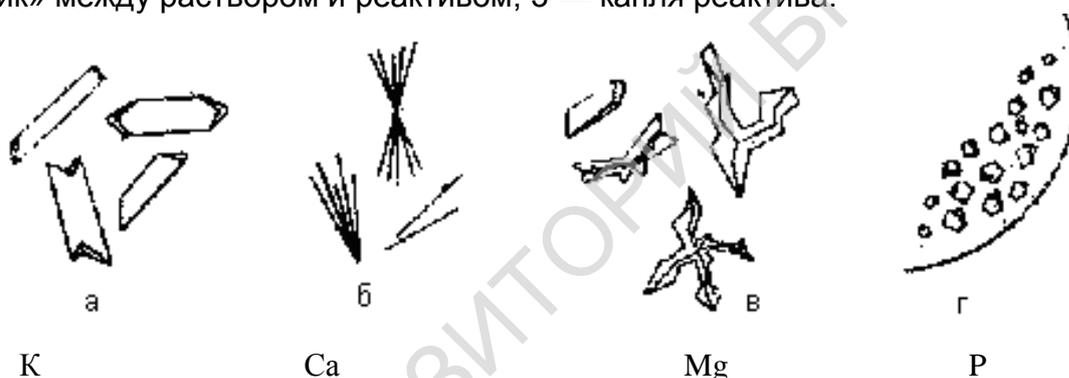
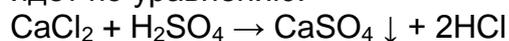


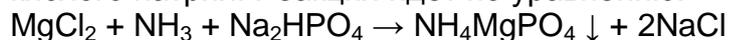
Рис.2. Типичные формы кристаллов кислого виннокислого калия (а), гипса (б), фосфорно-аммиачно-магнезиальной соли (в), и глыбки фосфорно-молибденового аммиака (г).

**Обнаружение кальция** \_проводится 1% раствором серной кислоты, реакция идет по уравнению:



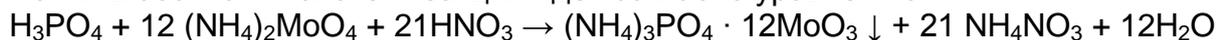
В результате образуется гипс в виде отдельных или собранных в пучки кристаллов игольчатой формы (рис. 1,б).

**Обнаружение магния.** К капле зольной вытяжки вначале добавить каплю 10% раствора аммиака и соединить ее мостиком с каплей 1% раствора фосфорнокислого натрия. Реакция идет по уравнению:



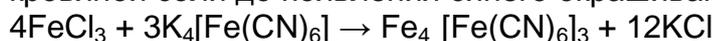
Образуется фосфорно-аммиачно-магнезиальная соль в виде плоских бесцветных кристаллов в форме прямоугольников, крыльев, крышечек (рис. 1,в).

**Обнаружение фосфора** проводится с помощью 1% раствора молибдата аммония в азотной кислоте. Реакция идет согласно уравнению:

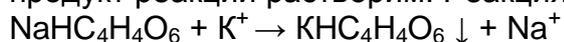


Образуется фосфорно-молибденовый аммиак в виде мелких глыбок желто-зеленого цвета (рис. 1,г)

**Для обнаружения железа** на предметное стекло наносится равное количество зольной вытяжки из разных органов (1-2 мл) и такое же количество 1% желтой кровяной соли до появления синего окрашивания. Образуется берлинская лазурь:



**Для обнаружения калия** используется 1% раствор кислого виннокислого натрия. В результате реакции с зольной вытяжкой образуются кристаллы кислого виннокислого калия  $\text{KHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ , имеющие вид крупных призм. Вытяжку калия в воде необходимо предварительно нейтрализовать, так как в кислой и щелочной среде продукт реакции растворим. Реакция идет по уравнению:



Результаты наблюдения записать по форме табл. 1

Таблица 1 — Химический состав золы

Элемент	Количество в баллах ( мах 3 )		
	зола древесины	зола листьев	зола семян
Ca			
Mg			
P			
Fe			

Записать уравнения реакций. Объяснить, на чем основано выявление указанных элементов и причину различного содержания их в органах растений. Сделать вывод о наличии обнаруживаемых элементов и их количестве в золе исследуемых органов.

**Задача.** Провести реакции выявления элементов и сравнить их содержание в золе:

- 1) древесины и семян;
- 2) древесины и листьев;
- 3) листьев и семян.

## Работа 2. Обнаружение нитратов в растениях

**Цель:** определить содержание нитратов в различных органах растения

**Объекты, реактивы, оборудование:** проростки фасоли, выращенные на полной среде Кнопа с обычной и удвоенной дозой азота, в условиях различного освещения; кочаны капусты, плоды огурца, клубни картофеля, лук (на перо), зелень и корнеплоды петрушки, моркови, салат, 1% раствор дифениламина в концентрированной серной кислоте в капельнице, вода в химических стаканах, чашки Петри, стеклянные палочки, нож, лезвие бритвы, фильтровальная бумага, глазная пипетка, лампа на 300Вт, шкала интенсивности окрашивания дифениламином.

### Краткие сведения

Интенсификация земледелия в XX в. породила нитратную проблему. Азотные удобрения, вносимые без соблюдения дозы и правил, привели к увеличению содержания нитратов в растительных продуктах до размеров, угрожающих здоровью человека.

Попадание большой дозы нитратов в организм грозит острым отравлением. Нередки отравления дынями, арбузами и другими продуктами с повышенным содержанием нитратов; возможно отравление питьевой водой за счет попадания повышенного количества удобрений в водные источники.

По данным Министерства здравоохранения РФ, предельно допустимая доза нитратов для взрослого человека в сутки составляет 500 мг, токсичная — 600 мг, для грудного ребенка доза в 10 мг может быть смертельной.

Соли азотной и азотистой кислот, поглощаемые корнями из почвы, восстанавливаются в растении до аммиака, используемого на синтез аминокислот и других соединений. Для восстановления нитратов требуется АТФ, образующаяся в процессе окислительного или фотосинтетического фосфорилирования.

При достаточном содержании растворимых углеводов и высокой активности соответствующих ферментов перечисленные биохимические процессы происходят в клетках корня. Однако при неблагоприятных условиях часть нитратов (нередко весьма значительная) может пройти через паренхиму коры корня в неизменном виде. В этом случае нитраты попадают в сосуды ксилемы и поднимаются с восходящим током к листьям, где и происходит их восстановление.

Определение содержания нитратов в соке, отжатом из стеблей, черешков и пластинок листа, позволяет судить о восстановлении нитратов в корнях: чем меньше в них обнаруживается нитрат-ионов, тем активнее происходит этот процесс в клетках корня. Сопоставление содержания нитратов в различных органах растения, например в черешках, пластинках листа, корнях, дает представление о нитратредуктазной активности этих органов.

Для обнаружения нитратов можно использовать реактив с дифениламином, который в присутствии иона  $\text{NO}_3^-$  дает синюю окраску.

По интенсивности посинения можно судить о количестве нитратов в исследуемом объекте.

Данные таблицы 1 позволяют с помощью этого реактива оценить количество нитратов в растении на разных стадиях развития и сделать вывод о необходимости азотной подкормки. Малое количество нитратов в начале вегетации растений означает недостаток азотного питания. Такое же малое количество их в фазе цветения является нормой и не требует подкормки растений.

Таблица 1— Необходимость в азотных удобрениях на разных стадиях вегетации растений

Балл	Окраска среза или сока	Необходимость в азотных удобрениях	
		в начале вегетации	в фазу цветения
0	Нет окраски	Очень сильная (60 кг/га)	Средняя (30 кг/га)
1	Бледно-голубая, быстро исчезает	Сильная (60 кг/га)	Слабая (30 кг/га)
2	Голубая, проводящих сосудов	Средняя (30 кг/га)	«—«
3	Голубая, исчезает через 2-3 мин	Слабая (30 кг/га)	«—«
4	Синяя, сохраняется несколько минут	«—«	«—«
5	Темно-синяя, сохраняется некоторое время	Не нуждается	«—«
6	Темно-синяя, устойчивая	Избыток нитратов	

В связи с опасностью, которую представляют нитраты для здоровья человека необходимо знать допустимые пределы содержания данных веществ в овощах, бахчевых культурах, в зеленых органах растений. Эти сведения позволяют избежать токсичных доз нитратов.

У столовой свеклы и редиса необходимо удалять верхнюю и нижнюю части корнеплода. В капусте наибольшее количество нитратов сосредоточено в верхних кроющих листьях и кочерыжке. Кабачки, огурцы и патиссоны накапливают нитраты в кожице и в части, прилегающей к плодоножке. Их необходимо чистить и срезать 2-3 см вместе с плодоножкой.

В картофеле нитратов накапливаются меньше, однако его употребляют чаще других овощей и в большем количестве. Для снижения нитратов в картофеле его следует замачивать на ночь в растворе NaCl.

**Нормы содержания нитратов в продуктах, мг/кг по нитрат-иону.**

В числителе приводятся нормы для ранних и тепличных овощей, в знаменателе — для поздней продукции открытого грунта:

Картофель —	250	Огурцы —	400/150
Капуста —	900/500	Арбузы —	60
Морковь —	400/250	Дыни —	90
Томаты —	300/150	Перец сладкий —	200
Лук репчатый —	80	Кабачки —	400
Лук-перо —	800/600		

T

Таблица 2 — Минимальные и максимальные количества нитратов в овощах, мг/кг, по данным Института почвоведения и фотосинтеза АН России

Культура	Минимум	Максимум	Культура	Минимум	Максимум
Арбузы	44	572	Петрушка (зелень)	1760	1892
Баклажаны	88	264	Ревень	1760	2420
Брюква	398	528	Редька черная	1540	1760
Горошек зеленый	22	88	Редис	440	2640
Горчица салатная	1320	1760	Репа	660	880
Дыни	44	484	Салат	396	2860
Капуста белая	66	2860	Свекла столовая	44	2640
Кабачки	196	704	Кресс-салат	320	4840
Перец сладкий	44	352	Картофель	44	968
Лук зеленый	44	1320	Тыква	308	1320
Лук репчатый	66	880	Укроп	396	2200
Морковь	176	2200	Фасоль	22	880
Огурцы	88	528	Чеснок	44	308
Патиссоны	176	880	Шпинат	660	3960
Тархун	1320	2200	Щавель	264	396

Таблица 3 — Содержание нитратов в различных органах зеленых овощей, мг/кг

Орган	Культура		
	Шпинат	Кориандр	Укроп
Корень	74	90	384
Стебель	833	163	487
Черешок листа	814	165	441
Пластинка листа	213	14	95

### Ход работы

В различных органах (корнях, стеблях, листьях, плодах), их частях (сердцевине, древесине, кожуре, мякоти) отрезают небольшие, одинаковые по размерам кусочки, помещают в чашки Петри, растирают стеклянной палочкой (палочку после каждого варианта ополаскивают водой и промокают фильтровальной бумагой). К полученной массе добавляют 3-4 капли раствора дифениламина и через 1,5 мин определяют цвет ткани, оценивают по 4-х балльной шкале.

**Задача:** Определить содержание нитратов:

1. В проростках фасоли во всех (органах), выращенных при дневном освещении на полной среде Кнопа с обычной и удвоенной дозой азота;
2. В органах проростков фасоли, выращенных на полной среде Кнопа при обычном и ярком (300Вт) освещении;

3. В различных частях органов у кочана капусты, плода огурца, клубня картофеля, корнеплодов петрушки, моркови, листьях лука, петрушки, салата;

4. В овощах, подвергнутых кулинарной обработке – механической очистке, вымачиванию в холодной воде в течение 1, 2, 24 ч, варке в кожуре и очищенном виде и т.д. (задание выполняется учащимися самостоятельно, если для этого есть условия).

Полученные данные (кроме варианта 4) заносят в таблицу.

Таблица 4

Объект исследования	Условия выращивания	Орган растения	Часть органа растения	Повторность	Содержание нитратов	
					балл	Мг/кг сырой массы

Обсуждают влияние условий выращивания (и кулинарной обработки) на содержание нитратов в различных видах растений, их органах. Рассматривают возможность использования подобных опытов в школьном курсе биологии.

## ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ ПО ТЕМЕ «МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ»

1. Почему при выращивании люпина в водной культуре на полной среде Кнопа и с исключением азота, фосфора или калия получаются примерно одинаковые показатели роста и развития растений?
2. В каких органах растений — листьях, одревесневших стеблях, семенах, запасающих тканях — больше зольных элементов, почему?
3. Какие из зольных элементов — К, Mg, Ca, P, Fe — содержатся в большем количестве в указанных выше органах?
4. В каких листьях, молодых или старых, больше зольных элементов; отличаются ли они по качественному составу, как именно, почему?
5. У растения, выращенного на почве с двойной дозой нитратов, определяли содержание их в корне, стебле и листьях с помощью дифениламина. Какие выводы о превращении нитратов можно сделать, если: **а)** ни в одном из органов нитраты не обнаружены; **б)** обнаружены в корне, в большом количестве в стебле и отсутствуют в листьях; **в)** не обнаружены в корне, в небольшом количестве обнаружены в стебле и листьях.
6. У растений с углеводным типом обмена (ячмень) и белковым (люпин), выращенных на одинаковом нитратном фоне в почве, с помощью дифениламина обнаружено различное содержание нитратов. Более высоким оно оказалось у люпина. Почему?
7. Зависит ли интенсивность восстановления нитратов в растении от развития его листовой поверхности? Почему? Какова эта зависимость?
8. Какие листья, верхние или нижние, проявляют более выраженные симптомы голодания по азоту, калию, фосфору? Почему?
9. Как объяснить хлороз растений на почве с большим содержанием извести?
10. В каких сочетаниях лучше использовать  $KNO_3$ ,  $K_2SO_4$ , KCl,  $NH_4NO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $Ca(NO_3)_2$  в качестве источников азота и калия?
11. В какой форме усваиваются из почвы N, P, K, Mg, Ca, Cu, Fe, B, Mo? В состав каких структур и химических соединений клетки они входят? В каких процессах участвуют? Назвать физиологические нарушения, вызванные недостатком этих элементов. Каковы внешние признаки страдания растений при их недостатке?
12. Какие соединения, соли или хелаты железа, лучше вносить при недостатке последнего в почве?
13. Какие меры для устранения хлороза растений надо принять, если в почве имеется достаточное количество соединений железа, но в недоступном для растений состоянии?
14. При выяснении питательных достоинств почвы на одну делянку внесли калийное удобрение, на вторую — фосфорное, на третью — азотное, четвертую не удобряли (контроль). Наиболее высоким урожай оказался на третьей делянке, несколько ниже — на первой, а на второй делянке и в контроле был одинаковым. Каких элементов не хватает в данной почве; почему?
15. При использовании  $Ca_3(PO_4)_2$  в качестве фосфорного удобрения под люпин и гречиху отмечается значительное повышение урожая, тогда как внесение этого удобрения под злаки эффекта не дает. Почему?
16. Почему при внесении в почву  $(NH_4)_2SO_4$  усвоение фосфоритов злаками заметно улучшается?
17. Как поставить опыт, доказывающий наличие кислых корневых выделений у некоторых растений? Назвать эти растения.

18. Внесение азотных удобрений в жаркое сухое лето дало по сравнению с контрольными делянками не повышение, а некоторое снижение урожая. Почему?
19. Каковы физиологические основы применения удобрений?
20. Почему органические удобрения рекомендуется вносить в больших дозах и задолго до посева?
21. Как объяснить резкое улучшение усвоения фосфора овсом при внесении в почву сернокислого аммония?
22. Как вырастить растение без почвы? Какие условия при этом необходимо соблюдать?
23. Относится ли натрий к числу необходимых для растений элементов? Как это доказать?
25. В каких частях растения более высокое содержание зольных элементов: в древесине или в листьях, в старых или молодых листьях? Как объяснить эти различия?
26. У каких листьев, молодых или старых, раньше появится хлороз при недостатке в почве растворимых солей железа?
27. Охарактеризуйте пути транспорта органических и минеральных веществ.
28. Кусочки черешка листовой пластинки исследуемого растения были помещены на тарелку, размяты стеклянной палочкой и облиты раствором дифениламина в серной кислоте (реактив на нитрат-ион). Черешок дал интенсивное синее окрашивание, а листовая пластинка - очень слабое. Как объяснить полученные результаты.
29. К соку, отжатому из стебля, черешка и листовой пластинки, добавили раствор дифениламина в концентрированной серной кислоте. Ни один из перечисленных объектов не дал посинения, несмотря на то, что почва, на которой выращивалось растение, была богата нитратами. Сделать вывод на основе полученных результатов.
30. Как объяснить уменьшение содержания нитратов в листьях при выставлении растения на яркий свет?

## Тема 4. ФОТОСИНТЕЗ

*Фотосинтез* — процесс усвоения растениями световой энергии и использования ее для образования органических веществ из углекислого газа и воды. В ходе этого процесса в атмосферу выделяется кислород. Фотосинтез осуществляется при участии многих ферментов и кофакторов. Условно в нем выделяют две стадии: световую и темновую, или химическую. Первая включает реакции поглощения хлорофиллом и другими пигментами квантов света и последующую трансформацию световой энергии в химическую энергию связей АТФ и восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ-Н). В темновой стадии запасенная в форме АТФ и НАДФ-Н химическая энергия используется для восстановления углекислого газа до углеводов и других продуктов.

У высших растений фотосинтез протекает в специальных клеточных органеллах листьев (и других зеленых частей) - хлоропластах, число которых в клетках зависит от вида растения и ткани. В одной клетке листа присутствует в среднем 20-30 хлоропластов.

Хлоропласты разных растений могут значительно различаться по форме, но обычно имеют вид округлых или дискообразных телец диаметром около 5 мкм, толщиной 2—3 мкм. Снаружи хлоропласты окружены оболочкой, состоящей из двух мембран — наружной и внутренней. Внутренняя мембрана ограничивает бесцветную строму, в которой располагается много уплощенных мембранных мешочков - тилакоидов, собранных в стопки, называемые гранами. Число гран может составлять 40—50 и более. Число тилакоидов в гране колеблется от 5—6 до нескольких десятков. Отдельные тилакоиды соседних гран соединены между собой ламеллами.

Согласно современным представлениям в тилакоидных мембранах локализованы все фотосинтетические пигменты хлоропласта и ферменты, необходимые для осуществления световых реакций фотосинтеза. В строме содержатся ферменты, участвующие в темновых превращениях диоксида углерода. Таким образом, сложная и тонкая структура хлоропласта обеспечивает пространственное разделение отдельных реакций, а тем самым и эффективный ход фотосинтеза в целом. Образующиеся в пластидах продукты ассимиляции транспортируются в другие органы и ткани растения, где используются в процессе метаболизма и роста.

Таким образом, вся совокупность жизненных проявлений организма тесно связана с фотосинтезом. Более того, синтезированные зелеными растениями органические вещества служат пищей для всех остальных организмов, в том числе и для человека, а кислород, выделяемый в процессе фотосинтеза, обеспечивает существование организмов. Ежегодная первичная продуктивность фотосинтеза на планете составляет более 100 млрд т сухой массы, в которой аккумулируется примерно  $17 \cdot 10^{21}$  Дж солнечной энергии. Следовательно, фотосинтез — один из важнейших движущих факторов круговорота веществ и энергии на Земле.

### **Работа 1. Извлечение пигментов из листьев**

**Цель:** экстрагировать пигменты из листа различными растворителями

**Объекты, реактивы, оборудование:** свежие листья различных растений; ацетон, этанол, бензин или петролейный эфир (tкип. 40-60<sup>0</sup>), мел в порошке или углекислый кальций, кварцевый песок или толченое стекло, дистиллированная вода; фарфоровые ступки с пестиком, штатив для пробирок, пробочные сверла диаметром 0,8-1см, стеклянные палочки.

## Краткие сведения

Фотосинтетические пигменты — хлорофилл и каротиноиды (каротины и ксантофиллы) — находятся в живом листе в тесной связи с белково-липоидными компонентами мембран хлоропластов. Характер этой связи окончательно не выяснен. Известно, что она менее прочная, чем ковалентная (возможно, адсорбционная, пространственная), и легко разрушается при действии на лист полярных органических растворителей (спирт, ацетон), вызывающих денатурацию белковой части фотосинтетической мембраны. Определенную роль в поддержании естественного структурного состояния пигментов в живом листе играет вода. Из абсолютно сухих листьев хлорофилл невозможно извлечь безводным растворителем, поэтому используют 85% ацетон или этанол.

Неполярные растворители (бензин, петролейный эфир) не могут разорвать связь хлорофилла с белком мембран и извлечь чистый пигмент. Вода также не способна нарушить связь хлорофилла с белком. Каротины в отличие от ксантофиллов менее прочно связаны с белком и, находясь в липоидном окружении, легче, чем хлорофилл, извлекаются неполярными растворителями.

Задача данной работы — изучить экстрагируемость пигментов листа различными растворителями. Получить вытяжку пигментов листа, необходимую для дальнейшей работы.

## Ход работы

С помощью пробочного сверла 0,8-1,0 см из листа (между жилками) высекают по 4 диска, помещают в фарфоровую ступку и добавляют на кончике скальпеля углекислый кальций или толченый мел (для нейтрализации клеточного сока) и немного прокаленного кварцевого песка (для лучшего растирания), затем приливают несколько капель растворителя, тщательно растирают ткань до получения однородной кашицы, снова добавляют еще 2 мл растворителя, перемешивают и дают отстояться в течение 1-2 мин. Когда песок и грубые частицы осядут на дно ступки, вытяжку сливают по стеклянной палочке в пробирку. Так поступают несколько раз, пока остаток ткани не станет бесцветным. Небольшим количеством растворителя ополаскивают стенки ступки и пестик. Для экстракции следует брать одинаковые порции (по 5 мл) различных растворителей: ацетона, спирта, бензина (петролейный эфир), воды. Полученный ацетоновый экстракт используется далее для хроматографического разделения пигментов.

**Задача.** (Выполняется всеми студентами). Провести экстракцию пигментов листа, используя ацетон, этиловый спирт, бензин, воду. Оценить полноту экстракции пигментов этими растворителями (полная, частичная, отсутствует) и объяснить причину исходя из особенностей локализации пигментов в фотосинтетической мембране. Данные записать по форме табл. 1.

Таблица 1

Растворитель	Цвет экстракта пигментов	Степень экстракции *

\* В скобках указать, какие пигменты экстрагируются данным растворителем.

## Работа 2. Разделение пигментов листа хроматографическим методом

**Цель:** разделить пигменты методом восходящей бумажной хроматографии

**Объекты, реактивы, оборудование:** свежие листья различных растений; ацетон, этанол, бензин или петролейный эфир ( $t_{\text{кип.}} 40-60^{\circ}$ ), мел в порошке или углекислый кальций, кварцевый песок или толченое стекло, дистиллированная вода; фарфоровые ступки с пестиком, пипетки, скальпели, стеклянные стаканчики, пробирки или цилиндры с пробками (для хроматографии), штатив для пробирок, пробочные сверла диаметром 0,8-1 см, чашки Петри, хроматографическая и фильтровальная бумага, стеклянные палочки.

### Краткие сведения

В составе фотосинтетических пигментов листа имеются два хлорофилла *a* и *b* и желтые пигменты — каротиноиды, которые в соответствии с их химическим строением разделяются на две группы: каротины и более окисленные ксантофиллы. Те и другие представляют смесь нескольких пигментов близкого строения, которую можно разделить на отдельные компоненты с помощью метода хроматографии. Этот метод предложен русским ученым М.С.Цветом в 1906 г. и сейчас широко используется.

Все хроматографические системы состоят в основном из двух фаз: неподвижной и подвижной. Обычно подвижная фаза перемещается по неподвижной или пропускается через нее. Хроматографическое разделение смеси веществ может идти при следующих условиях: адсорбционного равновесия между неподвижной твердой и подвижной жидкой фазами (адсорбционная хроматография); равновесного распределения между неподвижной жидкой и подвижной жидкой фазами (хроматография на бумаге); равномерного распределения между неподвижной жидкой и подвижной газовой фазами (газожидкостная хроматография); ионообменного равновесия между ионообменной смолой (неподвижная фаза) и электролитами (ионообменная хроматография); равновесного связывания макромолекулы с малой молекулой, по отношению к которой проявляет сродство (аффинная хроматография).

Метод хроматографии основан на различной подвижности ( $R_f$ ) каждого компонента на определенном адсорбенте. Адсорбент — твердое вещество, способное удерживать на своей поверхности молекулы. В качестве адсорбентов могут быть использованы сахароза, окись магния, крахмал, силикагель, бумага и т.д. Подвижность вещества зависит от его растворимости в растворителе, пропускаемом через адсорбент, и адсорбируемости на данном адсорбенте. Чем выше растворимость пигмента в растворителе и чем хуже он адсорбируется на адсорбенте, тем больше его подвижность, тем дальше он будет расположен от стартовой полосы. Применяя разные комбинации растворителей и адсорбенты различной природы, можно добиться высокой степени разделения и очистки пигментов.

Одним из адсорбентов при хроматографии является бумага. Хроматографирование на бумаге выполняют восходящим и нисходящим способами. При восходящей хроматографии бумажную полосу подвешивают вертикально; при этом нижний ее конец, на который нанесена смесь пигментов, погружают в растворитель. По мере движения растворителя под действием капиллярных сил вертикально вверх происходит разделение растворенных веществ.

При нисходящей хроматографии верхний конец бумажной полосы со смесью пигментов, нанесенных недалеко от кромки бумаги, закрепляют в лотке, который размещают в верхней части камеры. Нижний конец бумаги располагается так, чтобы он не касался налитого на дно камеры растворителя. В результате действия капиллярных сил и силы тяжести растворитель начинает передвигаться вниз по бумажной полосе, в результате чего смесь разделяется.

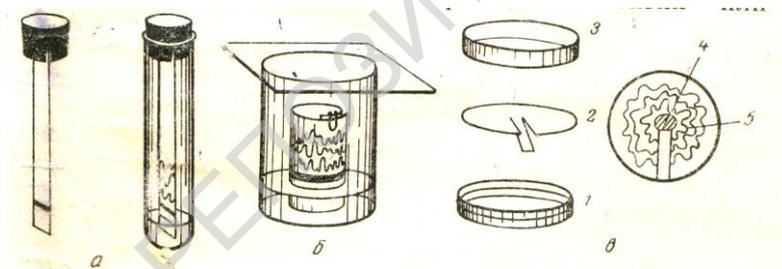
Хроматографирование выполняют в герметично закрытых сосудах, где поддерживают насыщенную парами растворителей атмосферу, что предотвращает их испарение с бумаги. Для эффективного разделения пигментов бумага должна быть равномерной толщины и достаточно плотной.

В зависимости от цели исследования применяют одномерные и двумерные хроматограммы. В первом случае определяют либо хлорофиллы, либо каротиноиды. Если необходимо полное разделение смеси пигментов на отдельные компоненты, применяют двухмерную хроматограмму. В этом случае последовательно разгоняют пигменты на бумаге сначала в одном направлении, а затем в направлении, перпендикулярном первому.

Задача этой работы — разделение полученного из листа экстракта на отдельные пигменты.

### Ход работы

1. На полоску хроматографической или фильтровальной бумаге (2x12см) карандашом нанести стартовую линию (от края полоски 1-1,5 см), погрузить этим концом в вытяжку пигмента на глубину 1-1,5 см, затем высушить на воздухе. Операцию повторить 3-4 раза, до тех пор пока зона погружения не приобретет *достаточно зеленый цвет*. Далее опустить этот конец несколько раз в чистый ацетон на глубину 2 мм, согнать все пигменты в стартовую полосу (ширина 2-3 мм), просушить и вставить противоположным концом в разрез пробки. Закрыть пробкой пробирку, на дно которой налит бензин или петролейный эфир.



Полоска бумаги должна находиться в вертикальном положении, а ее нижний край надо погрузить в растворитель так, чтобы последний не касался стартовой полосы (рис. 1, а). До и после погружения хроматограммы пробирка должна быть закрыта плотно пробкой и находиться на слабом свете во избежание фоторазрушения пигментов. Когда растворитель достигнет верхнего края хроматограммы, полоску бумаги вынуть и просушить на воздухе. На хроматограмме отметить положение полос, соответствующих определенным пигментам.

2. На лист фильтровальной или хроматографической бумаги (15x15см) нанести пипеткой с оттянутым концом полосу пигментов на расстоянии 1,5 см от края. Ширина полосы должна быть около 1см, цвет — интенсивно зеленый. Хроматограмму свернуть трубочкой, склоть скрепкой и опустить нижним концом в банку, на дно которой налит слой бензина высотой около 1 см (рис.1, б). Стартовая полоса не должна касаться бензина. Если разделение пигментов происходит медленно и не-

четко, следует вынуть хроматограмму и добавить к бензину 1-2 мл какого-либо полярного растворителя (спирт, ацетон). Снова погрузить в смесь хроматограмму и плотно закрыть крышкой. Когда пигмент, движущийся с фронтом растворителя, поднимется до верхнего края хроматограммы, ее вынимают, просушивают на воздухе и отмечают положение полос пигментов.

3. На круглом обеззоленном химическом фильтре сделать по радиусу 2 надреза, не доходя до центра, и полученный «язычок» немного отогнуть вниз. В центр с помощью пипетки нанести стартовое пятно пигментов и следить, чтобы оно не расплывалось. Пятно должно иметь интенсивно зеленый цвет, что достигается 2-3 кратным нанесением вытяжки. Затем просушить хроматограмму, положить ее на края чашки Петри, куда налит слой бензина (0,5 см), опустить «язычок» в растворитель и плотно закрыть чашку крышкой. На хроматограмме пигменты будут расположены концентрическими кругами со стартовым пятном в центре (рис. 1 в).

На хроматограммах, полученных каждым из трех способов, пигменты располагаются в одинаковом порядке. Слабо-зеленая зона, которая иногда и наблюдается на месте стартовой полосы или пятна, представляет собой хлорофиллид – бесфитольное производное хлорофилла, нерастворимое в бензине. Непосредственно над стартовой полосой находится хлорофилл б желтовато-зеленого цвета, над ним – хлорофилл а голубовато-зеленого цвета. Далее следуют ксантофиллы, не разделяющиеся на отдельные компоненты при данном способе хроматографии, а затем с фронтом растворителя – каротины.

Отдельным группам провести хроматографию пигментов по одному из указанных способов. На полученных хроматограммах отметить зоны расположения пигментов, обозначить их цифрами и слегка подкрасить в соответствующий цвет, так как на воздухе они быстро выцветают. Вклеить хроматограмму в лабораторную тетрадь. Стрелкой указать направление движения растворителя. Объяснить расположение пигментов на хроматограмме исходя из их химического строения и растворимости. Сделать вывод, какие пигменты можно выделить с помощью данного метода хроматографии и какой из способов пригоден для демонстрации состава пигментов листа в средней школе.

Подписать и расшифровать хроматограмму. В рабочей тетради зарисовать все способы хроматографического распределения пигментов.

### **Работа 3. Физические свойства пигментов листа**

**Цель:** изучить физические свойства фотосинтетических пигментов

**Объекты, реактивы, оборудование:** свежие листья фуксии и бальзамина, концентрированная спиртовая вытяжка пигментов; плоские флаконы или кюветы, спектрометры, настольная лампа, ступка с пестиком, пробирки, воронка, бумажный фильтр, медицинский шприц, дистиллированная вода, пинцеты.

#### **Краткие сведения**

Участие хлорофилла в фотосинтезе обусловлено его избирательной способностью поглощать световую энергию, которая необходима растению для образования органического вещества из воды и углекислого газа. Поглощение света хлорофиллом является не сплошным, а избирательным. В этом можно убедиться, пропуская белый свет через раствор хлорофилла, а затем разлагая его с помощью призмы.

Отдельные участки спектра окажутся поглощенными, и на их месте будут видны темные полосы. Полученный спектр называется спектром поглощения.

Хлорофиллы *a* и *b* имеют два основных максимума поглощения — в красной и синей области видимого спектра. В растворе ацетона или спирта красный максимум находится в пределах длин волн 645-665 нм, синий — 400-470 нм (рис. 1).

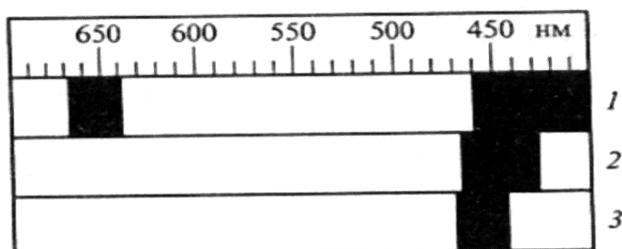


Рис. 1. Спектры поглощения пигментов листа: 1 — хлорофиллы *a* и *b*; 2 — каротин; 3 — ксантофилл

В живом листе красный максимум хлорофилла сдвинут в длинноволновую часть спектра и находится в области 670-720 нм. Это объясняется связью хлорофилла с белками фотосинтетической мембраны и особой структурной организацией пигмент-белковых комплексов в мембранах хлоропластов. Спектр поглощения водных экстрактов хлорофилла близок к таковому в живом листе, поскольку связь хлорофилла с белком при экстракции водой не нарушается. Каротиноиды имеют главный максимум поглощения в синей части спектра при длине волны 450-480 нм. Поглощенную энергию они передают на хлорофилл.

Для изучения спектров поглощения можно использовать спектроскопы всех систем и более совершенные приборы — спектрофотометры с автоматической развороткой спектра. Простейший спектроскоп представляет собой трубку. С одной стороны ее имеется узкая щель, через которую лучи света попадают на линзу, собирающую их в параллельный пучок. Пучок попадает на призму и разлагается на лучи различной длины, выходящие под разным углом. С помощью еще одной линзы эти лучи собираются в одну линию. В фокальной плоскости линзы получается спектр солнечного света или лампы накаливания (рис.2).

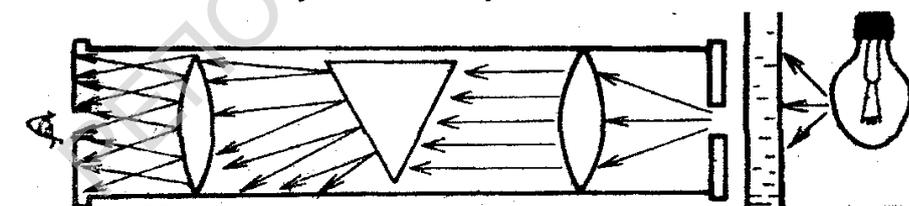


Рис. 2. Схема прохождения лучей света в спектроскопе.

Если между источником света и щелью спектроскопа поместить кювету с раствором хлорофилла, то в видимом спектре появятся две темные полосы — в красной и в сине-фиолетовой части его. Живой лист и раствор каротиноидов будут иметь свои полосы поглощения.

Хлорофилл обладает и способностью к флуоресценции. При поглощении света молекула его переходит в возбужденное состояние, а возврат ее к обычному состоянию сопровождается излучением ранее поглощенной энергии в виде красной флуоресценции. Флуоресценция обнаруживается по красному цвету раствора хлорофилла, рассматриваемого в отраженном свете на темном фоне (рис. 3). Возбуждающий флуоресценцию свет значительно интенсивнее света флуоресценции. Поэтому раствор хлорофиллов выглядит зеленым. В отраженном свете в глаз наблюдате-

ля попадает значительно меньше возбуждающего флуоресценцию света, поэтому становится видна сама флуоресценция.

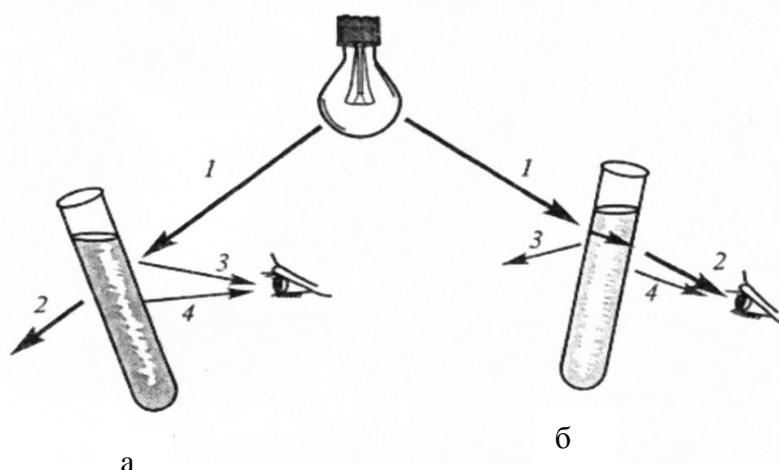


Рис. 3. Спиртовая вытяжка хлорофилла в отраженных (а) и проходящих лучах (б): 1 — свет лампы, освещающий пробирку с раствором хлорофилла и возбуждающий его флуоресценцию; 2 — свет лампы, проходящий через пробирку с раствором хлорофилла; 3 — свет лампы, отраженный от пробирки; 4 — флуоресценция хлорофилла.

Независимо от длины волны возбуждающего света хлорофилл флуоресцирует только красным светом.

В живом листе основным флуоресцирующим пигментом является хлорофилл а. При этом в листьях флуоресценция выражена гораздо слабее, чем в растворе, так как часть поглощенной энергии используется на сенсibilизирование фотохимических реакций. Поэтому возрастание интенсивности фотосинтеза, как правило, влечет за собой ослабление флуоресценции. По интенсивности ее можно судить о состоянии хлорофилла и его участии в фотосинтезе.

### Ход работы

Раствор ацетоновой вытяжки хлорофилла наливают в пузырек (или кювету) с плоскопараллельными стенками и помещают его перед щелью спектроסקопа. Источник света при этом должен находиться за кюветой. В спектроסקопе наблюдаются две полосы поглощения. Затем спектроскопируют живой лист (инфильтрованный лист — с заполненными водой межклетниками) и пузырек с желтыми пигментами. Инфильтрация листа необходима для того, чтобы сделать лист прозрачным:

**Задача** (выполняется всеми студентами). Изучить пигменты листа:

1. оптические свойства. Рассмотреть в спектроסקопе и зарисовать в табл.1 цветными карандашами видимый спектр (соблюдать ширину отдельных участков), спектры хлорофилла в ацетоне и живом листе, каротиноидов, закрасив полосы поглощения черным карандашом.

Таблица 1

Видимый спектр		Ф	С	Г	З	Ж	О	К
Спектр хлорофилла	в ацетоне							
	в листе							
Спектр каротиноидов								

Сделать выводы, в каких частях спектра расположены максимумы поглощения хлорофилла. Каково отличие спектра поглощения хлорофилла в растворе и живом листе, почему? В какой части спектра находится максимум поглощения желтых пигментов?

2. Для наблюдения красной флюоресценции хлорофилла бюкс с концентрированным раствором хлорофилла рассмотреть в отраженном свете.

#### Работа 4. Химические свойства пигментов листа

**Цель:** изучить химические свойства пигментов листа

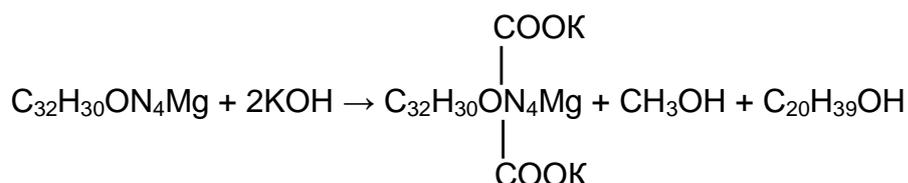
**Объекты, реактивы, оборудование:** свежие листья фуксии и бальзамина, спиртовая вытяжка пигментов; бензин, вода, этиловый спирт, 20% KOH или NaOH, 10% HCl, уксуснокислый цинк в порошке, пробирки, скальпели или металлические шпатели, спички, спиртовка.

#### Краткие сведения

Помимо оптической характеристики, важным физико-химическим свойством пигментов является их растворимость в ряде растворителей. На различной растворимости пигментов основан еще один метод их разделения — жидкостная хроматография.

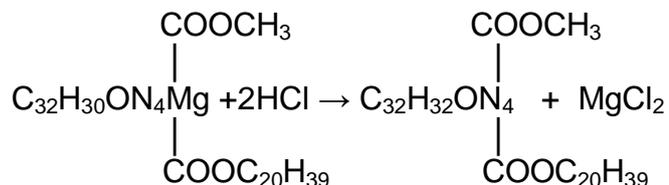
Ксантофиллы можно отделить по методу Крауса. Они, будучи по химической природе двухатомными спиртами, обладают более высокой гидрофильностью и поэтому значительно хуже других пигментов растворимы в бензине.

Каротин легче отделить от смеси пигментов путем омыления хлорофиллов. Хлорофилл, благодаря наличию фитольного «хвоста» обладает высокой растворимостью в бензине. При омылении его раствором щелочи происходит отщепление спиртов, фитола и метанола. Оставшаяся часть молекулы — двухосновная кислота хлорофиллин — образует соль хлорофиллина с калием, которая, как и все соли вообще, растворима в воде, т.е. гидрофильна, и нерастворима в бензине. В результате после омыления в бензине остается только высоколипофильный каротин. Реакция омыления идет следующим образом.

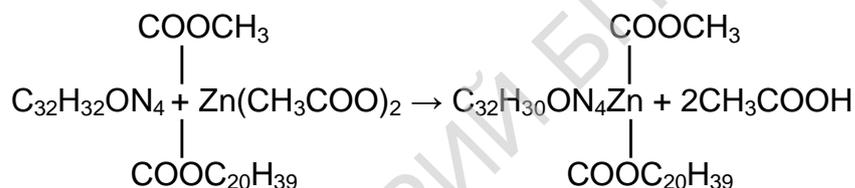


Соли хлорофилла, как и хлорофилл, имеют зеленую окраску, поскольку при омылении не затрагивается структура порфиринового ядра, придающего молекуле зеленый цвет. Способность хлорофилла к реакции омыления показывает, что он является сложным эфиром и, как другие сложные эфиры (например, жиры), способен расщепляться под действием щелочи с образованием солей. Желтые пигменты со щелочами не реагируют.

В центре порфиринового ядра молекулы хлорофилла находится атом магния. Осторожным воздействием разбавленных и слабых кислот атом магния можно заместить на водород. Образуется безмагниевоe производное хлорофилла оливкового цвета — феофитин:



Реакция феофитинизации показывает, что зеленая окраска хлорофилла в значительной степени связана с присутствием атома металла магния. Об этом также свидетельствует реакция восстановления металлоорганической связи:



Реакция между феофитином и солью какого-либо металла, например, уксуснокислым цинком, приводит к замещению водорода металлом и восстановлению зеленой окраски. Получается цинкпроизводное хлорофилла. Однако это соединение уже не обладает свойствами хлорофилла.

### Ход работы

**Разделение пигментов методом Крауса** — демонстрирует различную растворимость пигментов в полярных и неполярных растворителях. К 2-3 мл спиртовой вытяжки пигментов добавляют равное количество бензина, встряхивают, вносят 2-3 капли воды (для лучшего разделения слоев), снова осторожно встряхивают и дают отстояться (сильное встряхивание нежелательно, так как образуется стойкая эмульсия и раствор становится мутным). В результате происходит разделение содержимого пробирки на два слоя: верхний, бензиновый, окрашенный в зеленый цвет (содержит хлорофилл, а также каротин), и нижний, спиртовой, окрашенный в желтый цвет (благодаря наличию ксантофиллов). Если оба слоя окрашены в зеленый цвет, значит, разделение проведено неудачно. В таком случае следует добавить еще немного бензина, хорошо встряхнуть пробирку, внести 1-2 капли воды, снова осторожно встряхнуть и дать отстояться. Если нижний слой недостаточно прозрачен из-за избытка воды, добавить немного спирта.

**Реакция омыления** с последующим выделением каротина демонстрирует, с одной стороны, растворимость пигментов, с другой — свойства хлорофилла как

сложного эфира. К 2-3 мл спиртовой вытяжки пигментов добавляют 2-3 капли 2% раствора щелочи, многократно встряхивают пробирку для лучшего контакта пигментов со щелочью, приливают равный объем бензина, снова осторожно встряхивают, вносят 1-2 капли воды, встряхивают и дают отстояться, пока не произойдет четкое расслоение смеси на две зоны: верхнюю, желтого цвета, содержащую каротин, и нижнюю, зеленого цвета, содержащую калиевую соль хлорофилла.

**Реакция феофитинизации** доказывает наличие магния в молекуле хлорофилла. В две пробирки с 2-3 мл спиртовой вытяжки пигментов добавляют по 2-3 капли 10% соляной кислоты и встряхивают. (Более концентрированные кислоты непригодны, так как вызывают необратимое разрушение порфиринового ядра хлорофилла). Под действием кислоты образуется феофитин оливково-бурого цвета.

Реакция восстановления металлорганической связи показывает, что зеленая окраска хлорофилла обусловлена наличием в нем металла.

В одну из пробирок с раствором феофитина вносят на кончике скальпеля уксуснокислый цинк и доводят до кипения. Если окраска не изменится, следует добавить еще немного соли цинка и снова нагреть. Происходит изменение оливковой окраски на изумрудно-зеленую.

Результаты по изучению химических свойств записать по форме в таблицу 1.

Таблица 1

Исходное вещество	Добавленное вещество	Окраска раствора (рисунок)	Полученное вещество

Сделать вывод о физико-химических (растворимость в полярных и неполярных растворителях) и химических свойствах хлорофилла и каротиноидов.

## Работа 5. Определение содержания основных пигментов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений

**Цель:** определить спектрофотометрически количественное содержание хлорофиллов а и b, каротиноидов в исследуемом материале. Рассчитать соотношение хлорофилл а/хлорофилл b. Показать адаптацию пигментного аппарата растений к световому режиму окружающей среды.

**Объекты, реактивы, оборудование:** листья растений разных световых экотипов; листья или хвоя одного и того же растения, растущие при разном световом режиме (листья внутри кроны, на верхушке побегов и т. д.); листья разного возраста; 96%-й раствор этилового спирта или 80%-й раствор ацетона;  $MgCO_3$  ( $CaCO_3$ ); кварцевый песок; фарфоровые ступки с пестиками; скальпель; ножницы; пинцет; стеклянные палочки; колба Бунзена со стеклянным фильтром № 3; мерные колбы объемом 25 мл; мерный цилиндр объемом 25 мл; стеклянные воронки; конические пробирки; пипетки объемом 2 и 5 мл; фольга; весы торсионные, спектрофотометр.

## Краткие сведения

Для извлечения пигментов из растительных тканей и их разделения обычно используют полярные растворители или смесь полярных (спирт, ацетон) и неполярных (петролейный эфир, гексан, бензин) растворителей. Так как пигменты быстро выцветают на свету, их экстракцию проводят в затемненном помещении с предварительно охлажденными растворителями. Чтобы предотвратить изомеризацию пигментов, экстракцию следует осуществлять возможно быстрее. Пигменты извлекают последовательно несколькими порциями растворителя, фильтруя каждый раз раствор через стеклянный фильтр. При растирании листьев добавляют небольшое количество  $MgCO_3$  или  $CaCO_3$  для нейтрализации кислот клеточного сока и предотвращения феофитинизации пигментов.

Количественное определение пигментов основано на их способности поглощать лучи определенной длины волны. Регистрацию оптической плотности раствора пигментов проводят на спектрофотометре. Определение концентрации хлорофиллов *a* и *b* в растворе без их разделения затруднено, так как спектры обоих хлорофиллов сильно перекрываются, и невозможно найти две длины волны, в которых поглощение обуславливалось бы полностью одним пигментом. Однако имеющиеся различия в спектрах поглощения хлорофиллов *a* и *b* позволяют выбрать точки, где поглощение одного пигмента заметно превышает поглощение другого. Это обстоятельство и используют при проведении количественного определения обоих хлорофиллов без их разделения.

В зависимости от природы растворителя, используемого для извлечения пигментов, их концентрации рассчитывают по следующим формулам (*C* — концентрация, *D* — оптическая плотность):

1) в 80% -м растворе ацетона (Vernon, 1960):

$$C_{\text{хла}}, \text{ мг/л} = 11,63 \cdot D_{665} - 2,39 \cdot D_{649},$$

$$C_{\text{хлб}}, \text{ мг/л} = 20,11 \cdot D_{649} - 5,18 \cdot D_{665},$$

$$C_{\text{хла} + \text{хлб}}, \text{ мг/л} = 6,45 \cdot D_{665} - 17,72 \cdot D_{649};$$

2) в 100% -м растворе ацетона (Wettstein, 1957):

$$C_{\text{хла}}, \text{ мг/л} = 9,784 \cdot D_{662} - 0,990 \cdot D_{644},$$

$$C_{\text{хлб}}, \text{ мг/л} = 21,426 \cdot D_{644} - 4,650 \cdot D_{662},$$

$$C_{\text{хла} + \text{хлб}}, \text{ мг/л} = 5,134 \cdot D_{662} + 20,436 \cdot D_{644},$$

$$C_{\text{кар}}, \text{ мг/л} = 4,695 \cdot D_{440,5} - 0,268 \cdot C_{\text{хла} + \text{хлб}};$$

3) 96-м растворе спирта (Wintermans, de Mots, 1965):

$$C_{\text{хла}}, \text{ мг/л} = 13,70 \cdot D_{665} - 5,76 \cdot D_{649},$$

$$C_{\text{хлб}}, \text{ мг/л} = 25,80 \cdot D_{649} - 7,60 \cdot D_{665},$$

$$C_{\text{хла} + \text{хлб}}, \text{ мг/л} = 6,10 \cdot D_{665} + 20,04 \cdot D_{649} = 25,1 \cdot D_{654};$$

4) в 80%-м растворе ацетона (Lichtenthaler et al., 1982):

$$C_{\text{хла}}, \text{ мг/л} = 12,21 \cdot D_{663} - 2,81 \cdot D_{646},$$

$$C_{\text{хлб}}, \text{ мг/л} = 20,13 \cdot D_{646} - 5,03 \cdot D_{663},$$

$$C_{\text{кар}}, \text{ мг/л} = \frac{1000D_{470} - 3,27C_{\text{хла}} - 100 C_{\text{хлб}}}{229}$$

где  $C_{\text{хла}}$ ,  $C_{\text{хль}}$ ,  $C_{\text{хла+хль}}$  и  $C_{\text{кар}}$  — соответственно концентрации хлорофиллов  $a$ ,  $b$  их суммы и каротиноидов, мг/л;  $D$  — экспериментально полученные величины оптической плотности при соответствующих длинах волн.

### Ход работы

Для решения задачи необходимо провести экстракцию пигментов и определить на спектрофотометре их концентрацию. Навеску растительного материала (100—200 мг) размельчают ножницами, помещают в маленькую ступку, добавляют на кончике скальпеля немного  $\text{MgCO}_3$ , приливают 4—5 мл ацетона и тщательно растирают. Полученную вытяжку сливают по палочке на стеклянный фильтр, вставленный в колбу Бунзена. При помощи насоса жидкость отсасывают. После этого в ступку приливают еще немного ацетона, растирают, снова вливают на фильтр и отсасывают. Эту операцию повторяют несколько раз, пока раствор, стекающий из фильтра, не будет абсолютно бесцветным.

Вытяжку переливают в мерную колбу, колбу Бунзена ополаскивают несколько раз небольшими порциями ацетона и доводят чистым ацетоном объем вытяжки в мерной колбе до метки. Работа количественная, нельзя терять ни одной капли! Полученная ацетоновая вытяжка содержит сумму зеленых и желтых пигментов.

Концентрацию хлорофиллов  $a$  и  $b$  определяют на спектрофотометре. Для этого часть полученного экстракта наливают в кювету спектрофотометра. Вторую кювету, заполненную чистым растворителем, используют как контрольную. Кюветы помещают в кюветную камеру спектрофотометра и определяют оптическую плотность  $D$  вытяжки при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов  $a$  и  $b$  в 80%-м растворе ацетона, 663 и 646 нм. Для определения содержания каротиноидов определяют оптическую плотность  $D$  вытяжки при  $\lambda=470$  нм.

Затем вычисляют содержание пигментов  $A$  в растительном материале, мг/г сырой массы:

$$A = VC/1000P,$$

где  $C$  — концентрация пигментов, мг/л;  $V$  — объем вытяжки, мл (25 мл);  $P$  — навеска растительного материала, г (0,1 — 0,2 г).

Результаты измерений занести в таблицу 1.

Таблица 1

Объект исследования	Масса навески, мг	Оптическая плотность ( $D$ ) при длине волны		
		665	644	470

Результаты расчетов записать в таблицу по следующей форме таблицы 2.

Таблица 2

Объект исследования	Количество пигментов, мг/л раствора			Количество пигментов в сыром листе, мг/г			Соотношение пигментов	
	Хл. а	хлб	каротиноиды	Хл. а	хлб	каротиноиды	хла/хлб	$\Sigma$ (хла+хлб)/каротиноиды

Проанализировать результаты и сделать выводы о соотношении пигментов в изучаемых объектах. Сравнить полученные результаты в различных вариантах опыта, обсудить содержание и соотношение пигментов в листьях разных растений. Рассчитать процентное соотношение пигментов.

### Работа 6. Образование крахмала в зеленых листьях на свету

**Цель:** оценить влияние различных факторов на способность растений образовывать первичный крахмал.

**Объекты, реактивы, оборудование:** проростки фасоли, комнатные растения — пеларгония, проростки фасоли, колеус, примула; этиловый спирт, раствор иода в иодистом калии, лампа мощностью 200 Вт, ножницы, пинцет, лезвие бритвы, штатив с пробирками, водяная баня, электроплитка, держатели пробирок, чашки Петри, препаровальные иглы, сверла.

#### Краткие сведения

Наиболее простой метод обнаружения фотосинтеза — крахмальная проба. Она состоит в том, что лист, выдержанный на свету, обесцвечивают спиртом, а затем обрабатывают раствором иода, окрашивающего образовавшийся в хлоропластах крахмал в темно-синий цвет. Опыт рекомендуется проводить со срезанными и поставленными в воду листьями, у которых крахмал накапливается быстрее, так как отток отсутствует.

Для наблюдения за процессом образования первичного крахмала необходимо, чтобы в начале опыта листья не содержали этого вещества. Обескрахмаливание листьев можно достичь, выдерживая их в течение нескольких дней и в темноте; за это время весь имевшийся в листьях крахмал превратится в сахара, которые будут частично отведены в стебель, а частично израсходованы на дыхание клеток листа

#### Ход работы

Для того, чтобы определить наличие крахмала в листьях, делают сверлом высечку между жилками листа, помещают ее в пробирку с водой, кипятят 2-3 мин, что-

бы убить клетки. Воду сливают, приливают спирт и вновь кипятят на водяной бане, до полного извлечения пигментов. Нагревать следует осторожно, т.к. при бурном кипении может произойти выплескивание спирта из пробирки. Сливают спирт, размягчают ткань листа, наливая на него небольшое количество воды, т.к. после действия спирта она становится хрупкой. Помещают высежку в чашку Петри и добавляют раствор иода в иодистом калии. Через 3-5 мин раствор сливают и определяют содержание крахмала в листе по четырехбалльной шкале: иссиня-черный цвет — 4 балла, темно-синий — 3 балла, светло-синий — 2, голубой — 1, желтый (цвет раствора), отсутствие окраски — 0.

**Задача.** Изучить влияние различных факторов на процесс образования крахмала:

- 1) у растений пеларгонии, колеуса, фасоли, помещенных в темноту на 48 ч;
  - 2) у растений пеларгонии, колеуса, фасоли, предварительно обескрахмаленных, находившихся около лампы мощностью 200 Вт 40 мин,
  - 3) у листьев пеларгонии, колеуса, фасоли, отделенных от растений (растения предварительно обескрахмалены в течение 48 ч), помещенных в стакан с водой около лампы 200 Вт на 40 мин;
- Полученные результаты вносят в таб. 1.

Таблица 1

Объект	Вариант	Содержание крахмала, балл	
		лист	растение

Объяснить причины обескрахмаливания листа в темноте, отметить степень накопления крахмала при разной экспозиции на свету, различной интенсивности освещения в целом растении и срезанных листьях. Обсудить оптимальный вариант (условия, объект исследования) для демонстрации процесса образования крахмала в зеленых листьях на свету.

### **Работа 7. Образование сахара в зеленых листьях на свету.**

**Цель:** оценить способность различных растений накапливать сахар в листьях

**Объекты, реактивы оборудование:** листья лука, чеснока, свеклы столовой; этиловый спирт, раствор иода в иодистом калии, реактив Фелинга, вода, водяная баня, электроплитка, штатив с пробирками, держатели пробирок, пинцет, препаровальные иглы, чашки Петри, сверла, воронки, бумажные фильтры.

#### **Ход работы**

В листьях исследуемых растений делают крахмальную пробу и приступают к определению редуцирующих сахаров. Нарезают на мелкие кусочки листья, запол-

няют ими на  $\frac{1}{4}$  пробирку, заливают небольшим количеством воды и нагревают в кипящей водяной бане не менее 5 мин. Фильтруют полученную вытяжку, приливают к фильтрату реактив Фелинга, кипятят. При наличии моносахаров в пробирке выпадает оранжевый осадок оксида меди, количество которого оценивают по 4-балльной системе.

**Задача.** Выявить сахаробразующие растения, изучив содержание крахмала и моносахаров:

1) в листьях лука, чеснока, свеклы, выдержанных в течение 72 ч около лампы 100 Вт. Полученные данные занести в табл.1.

Таблица 1

Объект исследования	Повторность	Содержание сахаров, балл	Содержание крахмала, балл

Объяснить механизм образования органических веществ в зеленых листьях на свету. Обсудить возможность использования результатов данной работы для постановки школьного эксперимента.

## Работа 8. Значение хлорофилла для образования в листьях крахмала

**Цель:** выяснить необходимость хлорофилла для образования крахмала

**Объекты, реактивы оборудование:** листья пестролистных растений: колесуса Блюмея, хлорофитума, пеларгонии, традесканции; реактивы и оборудование см. в работе «Образование крахмала в зеленых листьях на свету».

### Краткие сведения

Результаты опыта, доказывающего значение хлорофилла для образования крахмала в листьях, зависят от правильного выбора объекта. Это должно быть, прежде всего, крахмалообразующее растение.

### Ход работы

В листьях, предварительно выдержанных на свету растений, определяют содержание крахмала. В синий цвет окрашиваются только высечки с хлорофиллом, но это наблюдается у крахмалообразующих растений. Поэтому, если крахмальная проба не удастся, проверяют наличие моносахаров.

**Задача:** определить значение хлорофилла для образования крахмала в листьях для пестролистных растений, указанных выше, сделав крахмальную пробу и реакцию на моносахара.

Результаты заносят в табл. 3.

Таблица 1

Объект исследования	Содержание крахмала по зонам, балл	
	Без хлорофилла	С хлорофиллом

Объяснить роль хлорофилла в процессе образования крахмала в листьях на свету. Анализируют полученные в работе данные, возможность использования изученных объектов для соответствующего демонстрационного опыта в школе.

РЕПОЗИТОРИЙ БГПУ

## ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ ПО ТЕМЕ «ФОТОСИНТЕЗ»

1. У каких листьев, световых или теневых, толщина мезофилла и содержание хлорофилла выше и почему?
2. Какую роль играют фикоэритрин красных и фикоцианин сине-зеленых водорослей? Участвуют ли они в процессе фотосинтеза?
3. Один лист выдержан на синем, другой, такой же, на красном свете равной интенсивности. В каких лучах будет более активное поглощение  $\text{CO}_2$ ?
4. С помощью каких приемов можно отделить ксантофиллы, каротины от других пигментов?
5. При помощи какой реакции можно доказать, что атом металла придает хлорофиллу зеленый цвет и что хлорофилл — сложный эфир?
6. Спиртовая вытяжка хлорофилла несколько дней стояла на хорошо освещенном окне. Что произошло с пигментами?
7. На каком свете, только на красном или на красном и синем, фотосинтез будет протекать более активно?
8. Как объяснить кажущееся «избыточное» содержание хлорофилла в листьях растений?
9. После омыления хлорофилла к вытяжке листа добавили равное количество бензина, встряхнули и дали отстояться. Какова будет окраска спиртового и бензинового слоя, почему?
10. После повторных заморозков осенью трава приобретает буровато-оливковую окраску. Как объяснить изменение окраски? Жизнеспособны ли такие растения?
11. Почему при хроматографии на бумаге в бензине каротин движется с фронтом растворителя, а ксантофиллы расположены ниже?
12. Почему при хроматографии на бумаге в бензине хлорофилл а находится выше хлорофилла б?
13. При хроматографии пигментов на бумаге в бензине на старте остается иногда некоторое количество зеленого пигмента. Что это за пигмент? Почему в отличие от других он не двигается?
14. При хроматографии смеси пигментов на бумаге в бензине оказалось, что полосы ксантофиллов, хлорофилла а и б плохо отделены одна от другой. Какой растворитель следует добавить к бензину, чтобы добиться разделения полос, почему?
15. Назвать желтые пигменты листа, каковы особенности их окраски? Каково отличие окраски хлорофилла а и б?
16. Как доказать необходимость света, углекислого газа для процесса фотосинтеза?
17. Каково положение главного максимума поглощения хлорофилла б в растворе, в живом листе, почему?
18. Два одинаковых листа выдержаны в полной темноте для обескрахмаливания. Затем один был освещен монохроматическим светом с длиной волны 680 нм, другой — в широкой области красной части спектра. Интенсивность световых потоков была одинакова. В каком листе окажется более высокое содержание крахмала?
19. Одна веточка элодеи освещена синим, другая — красным, третья — зеленым светом одинаковой интенсивности. В каких случаях будут быстрее выделяться пузырьки кислорода, почему?

20. Почему у многих растений в жаркие полуденные часы наблюдается не поглощение, а выделение  $\text{CO}_2$ ?
21. Почему в опытах по обнаружению фотосинтеза методом крахмальной пробы срез черешка обескрахмаленного в темноте листа следует обновлять под водой?
22. При освещении, составляющем около 1% от полного солнечного, листья клена поглощают  $\text{CO}_2$ , листья дуба выделяют его, у листьев ивы не наблюдается ни выделения, ни поглощения его. Объяснить причину наблюдаемого явления.
23. Компенсационная точка для липы равна 50 лк, для дуба 200 лк. Какова причина этого различия?
24. Сколько органического вещества выработает растение за 15 мин, если известно, что интенсивность фотосинтеза составляет  $20 \text{ мг/дм}^2\text{-ч}$ , а поверхность листьев равна  $2,5 \text{ м}^2$ ?
25. За 20 мин побег, листовая поверхность которого равна  $240 \text{ см}^2$ , поглотил  $16 \text{ мг CO}_2$ . Определить интенсивность фотосинтеза.
26. Почему при варке листья щавеля, петрушки приобретают буровато-коричневую окраску?
27. Почему у сосны в сомкнутом насаждении нижние побеги отмирают и опадают, а у ели нет?
28. В отличие от большинства растений у суккулентов устьица обычно закрыты в течение жаркого летнего дня и открываются только ночью. Как у них протекает фотосинтез, почему?
29. Почему такие растения, как сорго, кукуруза, сахарный тростник, могут успешно фотосинтезировать при закрытых в дневное время устьицах?
30. На свету у зеленого листа, который находился в атмосфере, лишенной  $\text{CO}_2$ , отмечается флюоресценция, тогда как в присутствии  $\text{CO}_2$  флюоресценция прекращается. Как можно объяснить это явление?
31. За 30 минут растение, листовая поверхность которого составляет  $250 \text{ см}^2$  поглотило  $20 \text{ мг CO}_2$ . Рассчитайте интенсивность фотосинтеза.
32. За 40 минут побег с листовой поверхностью  $300 \text{ см}^2$  выделяет  $10 \text{ мг O}_2$ . Определите интенсивность фотосинтеза.
33. Чему равна интенсивность фотосинтеза, если побег с листовой поверхностью  $3 \text{ дм}^2$  за 45 минут накопил  $15 \text{ мг}$  сухого вещества.
34. Сколько органического вещества вырабатывает растение за 15 минут, если известно, что интенсивность фотосинтеза составляет  $20 \text{ мг CO}_2/\text{дм}^2 \text{ ч}$ , а поверхность листьев составляет  $2,5 \text{ м}^2$ ?
35. Какое биологическое значение имеет красная окраска глубоководных морских водорослей?
36. При каких условиях РБФК может действовать как оксигеназа? Каков вероятный результат этой реакции?
37. Рассчитайте листовую продуктивность фотосинтеза, если начальная биомасса растений с  $1 \text{ м}^2$  составляет  $42,5 \text{ г}$ , а конечная —  $412,3 \text{ г}$ , время роста растений 10 дней. Площадь листьев растений в начале и в конце исследований равна  $1,3$  и  $8,4 \text{ м}^2$  соответственно.
38. Определите величину ассимиляционного числа листа, который содержит  $4,2 \text{ мг}$  хлорофилла и поглощает  $120 \text{ мг CO}_2$  за 3 часа.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Батурицкая Н.В., Фенчук, Т. Д. Удивительные опыты с растениями: кн. Для учащихся. – Мн.: Нар. света, - 1990.- 206 с.
2. Васильева З.В., Кириллова Г.А., Строчкова А.В. Учебно-методическое пособие по физиологии растений.— Москва «Просвещение», 1977.— 94 с.
3. Викторов Д.П. Практикум по физиологии растений.-2-е изд.- Воронеж: Изд-во ВГУ, 1991.- 160 с.
4. Гавриленко, В.Ф. Большой практикум по физиологии растений: учебно-метод. пособие/ В.Ф. Гавриленко, М.Е. Ладыгина, Л.М. Хандобина.- М.: Высш. шк.- 1975.- 322 с.
5. Еремин В.М., Бойко В.И., Рой Ю.Ф., Зеркаль С.В. Малый практикум по физиологии растений. - Брест; Изд-во Брестского ун-та, 2000.— 88 с.
6. Малый практикум по физиологии растений: Учеб. пособие.— 9-е изд., перераб. и доп./ Под ред. А.Т. Мокроносова. — М.: Изд-во МГУ, 1994. — 183 с.
7. Медведев С.С. Физиология растений: Учебник.- СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004.- 336 с.
8. Пилильщикова И.В. Физиология растений с основами микробиологии- М.: Мир, 2004.- 182 с.
9. Полевой В.В. Физиология растений. –М., 1989.- 464 с.
10. Практикум по физиологии растений /Н.Н. Третьяков, Л.А. Паничкин, М.Н. Кондратьев и др.- М.: КолосС.- 2003.- 288 с.
11. Практикум по физиологии растений: Учеб. пособие для студ. высш. пед. учебн. заведен. / В.Б. Иванов, И.В. Плотникова, Е.А. Живухина и др./ Под ред. В.Б. Иванова – М.: Изд. центр «Академия», 2004.— 144 с.
12. Тарасенко С.А., Дорошкевич Е.И. Физиология и биохимия растений. Практикум: учебное пособие.— УО Гродненский го. аграр. университет, — Гродно.— 2004. — 210 с.
13. Туманов В.Н. Малый практикум по ФЗР/ В.Н. Туманов, С.Л. Чирук.- Гродно: ГрГУ, 2008. - 139 с.
14. Шабельская Э.Ф. Лабораторные занятия по физиологии растений. – учебн. пособие. — Мн.: «Вышэйшая школа», 1981, - 143 с.
15. Школьный физиологический эксперимент в курсе физиологии растений – метод. руководство/ Сост. Утыро Л.Б. – Мн.: МГПИ им. А.М. Горького, — 46 с.

Учебное издание

**Мазец Жанна Эмануиловна**  
**Судейная Светлана Васильевна**

**ПРАКТИКУМ ПО**  
**ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**  
**Часть I**

Издается в авторской редакции

*Ответственный за выпуск Л.М. Кореневская*  
*Компьютерная верстка Ж.Э. Мазец*

Подписано в печать . Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub> Бумага офсетная. Гарнитура Arial. Печать Riso.  
Усл.печ.л. .Уч.-изд.л. .Тираж 100 экз. Заказ .

*Издатель и полиграфическое исполнение:*

Учреждение образования «Белорусский государственный педагогический университет  
имени Максима Танка»  
ЛИ № 02330/0133496 от 01.04.04  
ЛП № 02330/0131508 от 30.04.04  
220050, Минск, Советская, 18.

*Отпечатано с оригинал-макета заказчика в Учебно-издательском центре БГПУ.*  
220007, Минск, Могилевская, 37.  
E-mail: izdat@bspu.unibel.by.

РЕПОЗИТОРИЙ БГПУ

РЕПОЗИТОРИЙ БГПУ