

Министерство образования Республики Беларусь

Учреждение образования
«Белорусский государственный педагогический университет
имени Максима Танка»

Мазец Ж.Э., Жукова И.И., Деревинская А.А.

ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие

Минск
2017

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

Печатается по решению редакционно-издательского совета БГПУ,
Рекомендовано секцией БГПУ
(протокол № от 2017)

Рецензенты:

Жарина И.А., доцент кафедры естествознания УО «Могилевский государственный университет имени А.А. Кулешова», кандидат биологических наук, доцент
Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений БГУ

Мазец, Ж.Э., Жукова, И.И., Деревинская, А.А.

Б947 Практикум по физиологии растений / Ж.Э. Мазец, И.И. Жукова, А.А. Деревинская. – Минск : БГПУ, 2017. – 176 с.
ISBN 978-985-501-583-4

Пособие содержит лабораторные работы по основным разделам «Физиологии растений», позволяющие получить представления о физиологических процессах происходящих 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.

**УДК 581.1.
ББК**

© Мазец Ж.Э. и др., 2017
© БГПУ, 2017

ISBN 978-985-501-583-4

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	5
Правила техники безопасности	7
Методические указания к оформлению лабораторных работ	8
Тема 1. Физиология растительной клетки	10
Работа 1. Изучение плазмолиза и деплазмолиза в растительных клетках	10
Работа 2. Изучение вязкости и движения цитоплазмы в растительных клетках	13
Работа 3. Изучение проницаемости плазмалеммы и тонопласта	19
Работа 4. Проницаемость живого и мертвого протопласта для клеточного сока	23
Работа 5. Влияние температуры на проницаемость клеточных мембран для бетацианина	26
Работа 6. Определение жизнеспособности семян по окрашиванию цитоплазмы	28
Работа 7. Определение потенциального осмотического давления клеточного сока методом плазмолиза	30
Работа 8. Определение водного потенциала (сосущей силы) тканей растений по изменению их размеров (метод Уршпрунга)	33
Работа 9. Определение водного потенциала растительных тканей по изменению концентрации внешнего раствора методом струек» (по Шардакову)	37
Вопросы и задания по теме «Физиология растительной клетки»	41
Тема 2. Водный обмен растений	47
Работа 1. Определение поглощения воды растением потометрическим методом	47
Работа 2. Изучение состояния устьичного аппарата растений	51
Работа 3. Определение интенсивности транспирации весовым методом (по Л.А. Иванову)	55
Работа 4. Значение пробки для защиты растений от потери воды	57
Вопросы и задания по теме «Водный обмен растений»	59
Тема 3. Минеральное питание	65
Работа 1. Микрохимический анализ золы	65
Работа 2. Обнаружение нитратов в растениях	69
Вопросы и задания по теме «Минеральное питание»	72
Тема 4. Фотосинтез	75
Работа 1. Извлечение пигментов из листьев	75
Работа 2. Разделение пигментов листа хроматографическим методом	76
Работа 3. Физические свойства пигментов листа	81
Работа 4. Химические свойства пигментов листа	84
Работа 5. Определение содержания основных пигментов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений	88

Работа 6. Образование крахмала в зеленых листьях на свету	91
Работа 7. Образование сахара в зеленых листьях на свету	94
Работа 8. Значение хлорофилла для образования в листьях крахмала	95
Работа 9. Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла на реакцию переноса водорода (по А. А. Гуревичу)	97
Работа 10. Накопление первичного крахмала в клетках C_3 - и C_4 -растений	101
Вопросы и задания по теме «Фотосинтез»	103
Тема 5. Дыхание растений	107
Работа 1. Определение дыхательного коэффициента	107
Работа 2. Органические вещества растений и их превращения при прорастании семян	110
Работа 3. Обнаружение активности каталазы в растительном материале	113
Работа 4. Обнаружение активности пероксидазы	115
Работа 5. Определение активности полифенолоксидазы в растительных тканях (по А.Н. Бояркину)	117
Работа 6. Обнаружение активной амилазы в растительном материале	121
Работа 7. Влияние температуры на активность амилазы	124
Работа 8. Влияние рН среды на активность амилазы	127
Работа 9. Определение интенсивности дыхания семян в закрытых сосудах	129
Работа 10. Интенсивность дыхания прорастающих семян	131
Вопросы и задания по теме «Дыхание растений»	136
Тема 6. Рост и развитие растений	140
Работа 1. Определение содержания хлорофилла в семядолях	140
Работа 2. Периодичность роста древесных растений	143
Вопросы и задания по теме «Рост и развитие растений»	145
Тема 7. Вторичный метаболизм растений	151
Работа 1. Определение содержания суммарной фракции флавоноидов	150
Тема 8. Физиологические основы устойчивости растений	154
Работа 1. Определение жаростойкости растений (по Ф. Ф. Мацкову)	154
Работа 2. Влияние сахарозы на морозоустойчивость растительных клеток	156
Работа 3. Определение засухоустойчивости растений	159
Работа 4. Влияние засоления на растения	162
Вопросы и задания по теме «Физиологические основы устойчивости растений»	167
Приложение	172
Литература	175

ПРЕДИСЛОВИЕ

Физиология растений является фундаментальной наукой, изучающей закономерности процессов жизнедеятельности растительных организмов в непосредственной связи и взаимодействии с условиями окружающей среды. Физиология растений с помощью эксперимента объясняет сущность физиологических и биохимических процессов происходящих в растительном организме. Поэтому в дополнение к теоретическому лекционному курсу большое внимание и время отводится лабораторным экспериментальным работам. Предлагаемый практикум составлен на базе общего курса физиологии растений и включает все основные разделы: физиология растительной клетки, водный режим, фотосинтез, минеральное питание, дыхание, рост и развитие растений, устойчивость растений к неблагоприятным условиям среды, вторичный метаболизм.

В настоящем учебном пособии представлены лабораторные работы по учебной дисциплине «Физиология растений» для студентов педагогических университетов по специальностям 1-02 04 01 Биология и химия, 1-02 04 02 Биология и география.

Цель лабораторного практикума – углубление теоретических положений лекционного курса и освоение методики подготовки и проведения физиологического эксперимента. В соответствии с новой учебной программой курса и уровнем технического оснащения кафедры перечень работ уточнен и дополнен. Работы сгруппированы по разделам курса, в конце каждого раздела приводятся вопросы и задания для закрепления теоретического и экспериментального учебного материала. В каждой из предлагаемых работ приведены: список материалов и оборудования, краткие теоретические сведения по теме, описание хода работы, рекомендации по оформлению результатов эксперимента и формулировке выводов.

Работы выполняются в парах или индивидуально, приведенные лабораторные работы рассчитаны на 2–4 часа. Выполнению работы предшествует ознакомление с теоретическими положениями и ходом работы, формулирование цели эксперимента и получение допуска к выполнению работы. После выполнения работы каждый студент самостоятельно оформляет и анализирует полученные результаты, формулирует выводы.

По итогам выполнения и оформления лабораторной работы студент защищает ее на каждом занятии, что является допуском к сдаче зачета и экзамена по учебной дисциплине.

После изучения каждой темы курса проводится рейтинговая контрольная работа.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

1. К работе в лаборатории допускаются студенты, прошедшие инструктаж по технике безопасности.
2. Нужно работать в белом халате из хлопчатобумажной ткани.
3. На каждом занятии назначается дежурный, который отвечает за чистоту и порядок.
4. За каждым студентом закрепляется рабочее место, которое необходимо содержать в чистоте и порядке.
5. Запрещается держать в лаборатории пищевые продукты, принимать пищу, пить воду из химической посуды.
6. Запрещается работать с разбитой посудой, пользоваться реактивами из банок без этикеток.
7. Необходимо переливать приготовленные растворы в склянки с надписями. Нельзя оставлять без присмотра включенные приборы и электрооборудование.
8. Работать с летучими и ядовитыми веществами можно только под тягой.
9. Для отмеривания кислот, щелочей и ядовитых реактивов использовать цилиндры либо пипетки с резиновой грушей или ватным тампоном.
10. При работе с едкими веществами следует надевать предохранительные очки, резиновые перчатки и фартуки.
11. Для нагревания горючих и летучих реактивов нужно пользоваться водяными банями. Их нельзя нагревать на открытом огне или вблизи пламени.
12. Работать с ртутными термометрами нужно очень осторожно.
13. После окончания работы привести в порядок рабочее место (убрать со стола реактивы и оборудование, из ящиков стола – мусор, стол вымыть, протереть сухой тряпкой) и сдать дежурному.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

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

Данное учебное пособие содержит описание лабораторных работ по следующим разделам программы: «Физиология растительной клетки», «Водный обмен растений», «Минеральное питание», «Фотосинтез», «Дыхание», «Рост и развитие растений», «Вторичные метаболиты» и «Физиологические основы устойчивости». В практикуме имеются работы двух типов: опыты, иллюстрирующие теоретические положения лекционного курса; экспериментальные работы, связанные с количественным определением физиологических показателей.

Перед началом выполнения лабораторной работой проводится предварительная беседа по теоретическим вопросам, выясняются цели и задачи выполняемого эксперимента, поясняется ход работы, в конце занятия проводится анализ и подводятся итоги полученных результатов. Каждый студент оформляет лабораторные работы в отдельной тетради последовательно в рамках тематического раздела по **следующей схеме**:

1. Название работы и номер по порядку, дата на полях.
2. Цель работы.
3. Объекты исследования.
4. Реактивы и оборудование.
5. Методы исследования.
6. Ход работы.
7. Результаты работы (таблицы, графики, диаграммы, рисунки).

8. Анализ результатов.

9. Выводы.

Требования к таблицам и рисункам

1. Нумерация и название дается над таблицей в левом углу, заголовок таблицы должен отражать ее содержание. В таблице должны быть указаны: объекты исследования, варианты опыта, единицы измерения.

2. Нумерация и название дается под рисунком по центру, заголовок рисунка должен отражать его содержание. На графиках должны быть указаны: названия осей координат или столбцов диаграмм, объекты исследования или варианты опыта, единицы измерения.

Требования к анализу результатов

1. Теоретическое обоснование изучаемой темы.

2. Анализ полученных результатов, сравнение их с теорией.

3. Выявление закономерностей и их обсуждение.

Требования к выводам

Сформулировать выводы в соответствии с поставленной целью лабораторной работы и полученными результатами экспериментальных исследований.

ТЕМА 1. ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Работа 1. Изучение плазмолиза и деплазмолиза в растительных клетках

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. Для наблюдения явления плазмолиза клетки помещают в раствор плазмолитика, например, в гипертонический солевой раствор. В этом случае возникает осмотический ток воды из клеток, что приводит к уменьшению объема протопластов и их отделению от клеточных стенок (происходит плазмолиз). Эластичная цитоплазма сокращается вслед за вакуолью, а клеточная оболочка лишь теряет напряженное состояние, но не сокращается, поэтому между ней и протопластом возникает промежуток, заполняемый внешним раствором. Плазмолиз, процесс характерный только живым клеткам, является обратимым.

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 (рисунок 1.1).

Если переход от вогнутого к выпуклому плазмолизу не происходит в течение длительного времени наблюдения, то отмечают, что время плазмолиза данного объекта более 20 минут. В качестве плазмолитика в нашем случае используется 0,8М раствор NaCl или 1М раствор сахарозы.

При замене гипертонических растворов плазмолитиков водой градиент водного потенциала меняет свое направление, вода начинает поступать из

раствора в вакуоль, т.е. в клетке происходит *деплазмолиз*, она возвращается в состояние тургора.

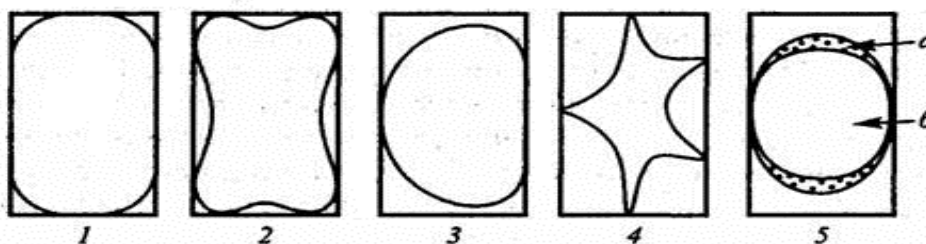


Рисунок 1.1 – Формы плазмолиза:
1 – уголковый, 2 – вогнутый, 3 – выпуклый,
4 – судорожный, 5 – колпачковый (а – цитоплазма, б – вакуоль)

Однако подобное явление может возникать и в том случае, если клетка находится в растворе плазмолитика длительное время, а его молекулы невелики (например, глицерин и 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*.

Цель: изучить явления плазмолиза и деплазмолиза в растительных клетках.

Объекты: веточки элодеи или мха мниума; листья традесканции, камнеломки, бегонии, содержащие антоциан; луковицы синего лука.

Реактивы и оборудование: 0,8М NaCl, глицерин, вода, препаровальные иглы, пипетки, полоски фильтровальной бумаги, пинцеты, предметные и покровные стекла, световые микроскопы.

Ход работы

Наблюдение форм плазмолиза в растительных клетках.

Кусочек ткани исследуемого объекта (срез нижнего эпидермиса листа камнеломки, традесканции или бегонии, лист элодеи или мха мниума, эпидермис выпуклой стороны чешуи синего лука) поместить на предметное

стекло в каплю воды, накрыть покровным стеклом и рассмотреть исходное состояние клеток.

Затем заменить воду на 0,8М раствор NaCl. Для этого на предметное стекло рядом с покровным нанести большую каплю раствора, а с другой стороны покровного стекла оттянуть воду полоской фильтровальной бумаги. Повторить этот прием 2–3 раза до полной замены воды раствором.

Следить за изменением состояния клеток под микроскопом и зарисовать наблюдаемые формы плазмолиза (смотреть рисунок 1.1).

Наблюдение явления плазмолиза и деплазмолиза.

Кусочки выпуклой стороны чешуи синего лука поместить на два предметных стекла в каплю воды, накрыть покровным стеклом и рассмотреть под микроскопом.

Затем воду на одном предметном стекле заменить 10% раствором глицерина, на втором – 0,8М раствором NaCl (постоянно наблюдать под микроскопом за тем, что происходит в клетках).

После наступления выпуклого плазмолиза только на предметном стекле с 0,8М NaCl, раствор снова заменить на воду. Вода поглощается клетками и внутреннее содержимое постепенно начинает заполнять весь объем клетки. Клетка возвращается в прежнее состояние. Это явление называется деплазмолизом, а состояние клетки тургесцентным.

На предметном стекле с глицерином наблюдаем самопроизвольный деплазмолиз.

Результаты внести в таблицу 1.1 (сделать рисунки клеток, отметить время наступления полного плазмолиза и деплазмолиза).

Таблица 1.1 – Плазмолиз и деплазмолиз в растительных клетках

Раствор	Общий вид клетки (рисунок)	Время плазмолиза, минуты	Время деплазмолиза, минуты
0,8М раствор NaCl			
Глицерин			

Проанализировать и оформить полученные результаты в лабораторных тетрадах. Сформулировать выводы о наблюдаемых формах плазмолиза и объяснить условия наступления деплазмолиза.

Работа 2. Изучение вязкости и движения цитоплазмы в растительных клетках

Вязкость – это способность цитоплазмы оказывать сопротивление перемещению одних частиц (ионы, молекулы, органеллы) относительно других. Цитоплазма 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, местообитания, возраста и фазы онтогенеза растения. Она может быть различна в разных органах. В целом вязкость цитоплазмы весьма лабильный показатель, тесно связанный с жизнедеятельностью растений.

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 глуксиниевых), у других – движение ее едва заметно. Выделяют

несколько типов движения цитоплазмы. Рассмотрим лишь два наиболее распространенных – ротационное (круговое) и циркуляционное (струйчатое).

Ротационное движение свойственно клеткам, имеющим крупную центральную вакуоль (например, у водных растений). Оно заключается в скольжении тонкого пристенного слоя цитоплазмы по периметру клетки. Вместе с током цитоплазмы перемещаются органеллы. **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 тяжам, разделяющим вакуоли.

В организации движения цитоплазмы участвуют белки, образующие цитоскелет клетки – микротрубочки, толстые, тонкие и промежуточные микрофиламенты и микротрабекулы (рисунок 1.2). Цитоскелет – это очень лабильная, постоянно меняющаяся система, его элементы способны быстро распадаться (деполимеризоваться) и вновь собираться в структуры (полимеризоваться).

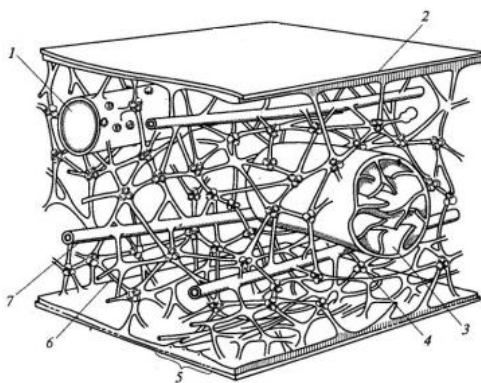


Рисунок 1.2 – Цитоскелет клетки:

1 – ЭПС, 2 – клеточная мембрана, 3 – митохондрия, 4 – полисомы, 5 – микрофиламенты, 6 – трабекулярные нити, 7 – микротрубочка

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: 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 служат процессы дыхания и фотосинтеза.

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.

Цель: изучить свойства живой цитоплазмы – вязкость и движение, установить влияние различных факторов на изменение вязкости и скорости движения цитоплазмы в растительных клетках.

Объекты: веточки элодеи или мха мниума; листья традесканции, камнеломки, бегонии, содержащие антоциан; луковицы синего лука.

Реактивы и оборудование: 0,8М NaCl, 0,1М, 0,3М и 1М KNO_3 , 0,7М $Ca(NO_3)_2$, 1М сахароза, 0,1М раствор глюкозы, растворы спирта – 2 и 15 капель 96% спирта на 10 мл воды, препаровальные иглы, стеклянные палочки, пипетки, фильтровальная бумага, пинцеты, предметные и покровные стекла, световые микроскопы, лампы на 60 Вт, водяная баня или термостат, термометры.

Ход работы

1) Сравнение вязкости цитоплазмы в клетках растений различных местообитаний.

Кусочки нижнего эпидермиса листа камнеломки и бегонии, лист мха мниума и элодеи канадской поместить на отдельные предметные стекла в каплю воды и рассмотреть исходное состояние клеток. Затем заменить воду на 0,8 М раствор NaCl (смотреть работу 1). Постоянно следить в микроскоп за тем, что происходит в клетках, отмечать наступление плазмолиза. Результаты оформить в таблицу 1.2 (указать время наступления выпуклого плазмолиза («+») или его отсутствие («-»)).

Таблица 1.2 – Влияние различных факторов на вязкость цитоплазмы растительных клеток

№	Вариант опыта		Время плазмолиза, минуты				
			3	6	10	15	20
1.	Местообитания растений	Камнеломка					
		Мох мниум					
		Бегония					
		Элодея					
2.	Температура	2 ⁰ С					
		20 ⁰ С					
		30 ⁰ С					
3.	Действующие ионы	Сахароза (контроль)					
		K ⁺					
		Ca ²⁺					

2) Сравнение вязкости цитоплазмы в клетках эпидермиса выпуклой стороны луковичной чешуи при различных температурах.

За 2–3 часа до начала работы часть луковицы синего лука поместить в холодильник при 2⁰С (предварительно завернув ее в увлажненную фильтровальную бумагу), другую часть луковицы поместить в термостат или водяную баню при 30⁰С, а третью оставить при комнатной температуре.

На три предметных стекла в каплю воды поместить по кусочку эпидермиса выпуклой стороны чешуи синего лука, находившихся в различных

температурных условиях и рассмотреть исходное состояние клеток. После этого заменить воду на 0,8М раствор NaCl. Постоянно следить в микроскоп за тем, что происходит в клетках, отмечать время наступления выпуклого плазмолиза. Результаты занести в таблицу 1.2 (указать время выпуклого плазмолиза или его отсутствие).

3) Сравнение вязкости цитоплазмы в растительных клетках под действием различных ионов.

Кусочки выпуклой стороны чешуи синего лука поместить на три предметных стекла в различные растворы:

- 1-е предметное стекло – 1М раствор сахарозы,
- 2-е предметное стекло – 0,7М Ca(NO₃)₂,
- 3-е предметное стекло – 1М KNO₃.

Каждые несколько минут отмечать форму плазмолиза. Раствор сахарозы, не содержащий ионов, используется в качестве контрольного. Результаты оформить в таблицу 1.2.

4) Изучение скорости движения цитоплазмы в клетках растений.

У предварительно подготовленного растения элодеи канадской, выдержанного не менее двух часов на ярком свете, берут лист вблизи верхушечной почки побега. Помещают его на предметное стекло в каплю воды, накрывают покровным стеклом, рассматривают под микроскопом при увеличении x10.

Выбирают несколько клеток, в которых хорошо заметно движение хлоропластов (обычно это клетки, расположенные вдоль центральной жилки, т.к. здесь количество хлоропластов меньше, а отток ассимилятов наиболее интенсивный). Переводят объектив микроскопа на увеличение x40 и определяют время оборота одного хлоропласта вдоль клеточной стенки в трех клетках, имеющих приблизительно равный объем.

Полученные данные заносят в таблицу 1.3, и определяют среднюю скорость оборота хлоропласта (для каждого варианта опыта берут отдельные предметные стекла):

а) контроль для всех вариантов опыта: выдержанные в воде при обычном освещении листья элодеи канадской;

б) листья элодеи, которые освещались в течение 2 часов лампой 60 Вт;

в) листья элодеи, выдержанных 10 минут при температурах 10⁰С, 37⁰С, 45⁰С и при комнатной температуре;

г) листья элодеи, помещенные на 10 минут в растворы спирта различной концентрации (2 и 15 капель спирта на 10 мл воды);

д) листья элодеи, помещенные на 10 минут в 0,1М и 0,01М растворе глюкозы;

е) листья элодеи, которые находились 10 минут в 0,1 и 0,3М растворах KNO₃.

Таблица 1.3 – Влияние различных факторов на время движения хлоропластов в растительных клетках

№	Вариант опыта		Время оборота хлоропласта, секунды			
			1	2	3	среднее
1.	Интенсивность освещения	Естественное освещение (контроль)				
		60 Вт				
2.	Температура	20 ⁰ С (контроль)				
		10 ⁰ С				
		37 ⁰ С				
		45 ⁰ С				
3.	Влияние различных концентраций спирта	Вода (контроль)				
		2 капли /10 мл воды				
		15 капель / 10 мл воды				
4.	Влияние ионов калия	Вода (контроль)				
		0,1 М KNO ₃				
		0,3 М KNO ₃				
5.	Влияние глюкозы	Вода (контроль)				
		0,1М раствор глюкозы				
		0,01М раствор глюкозы				

Проанализировать полученные результаты. Объяснить зависимость скорости движения цитоплазмы от времени движения хлоропластов, от ее вязкости. Сформулировать выводы о влиянии внешних и внутренних факторов на вязкость и скорость движения цитоплазмы.

Работа 3. Изучение проницаемости плазмалеммы и тонопласта

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 в ней в значительном количестве. Однако цитоплазма живой клетки имеет слабое сродство к красителю, что является одной из причин аккумуляции нейтрального красного в вакуолях живых клеток и связано 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 оводненность, вследствие чего она набухает и приобретает вид колпачков, хорошо различимых на концах плазмолизированного протопласта – колпачковый плазмолиз (рисунок 1.3).

Колпачковый плазмолиз можно наблюдать при использовании гипертонического раствора 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.

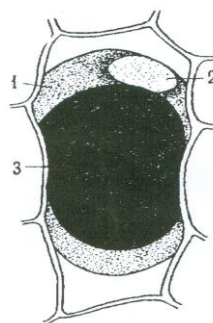


Рисунок 1.3 – Колпачковый плазмолиз:

1 – набухшая протоплазма, образовавшая колпачки; 2 – ядро; 3 – вакуоль с окрашенным клеточным соком

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 для каждого вещества.

Цель: изучить проницаемость плазмалеммы и тонопласта для различных веществ.

Объекты: луковицы бесцветного и синего лука.

Реактивы и оборудование: 1М растворы сахарозы и KNO_3 , 0,5% индигокармин, 0,01% нейтральный красный, 1М растворы KNO_3 и сахарозы, 0,5 % эозин, 10% глицерин, 0,8М раствор NaCl , пинцеты, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, кусочки фильтровальной бумаги, стаканчики с водой, пипетки глазные, микроскопы.

Ход работы

1) Определение проницаемости пограничных мембран цитоплазмы для нейтрального красного.

Кусочки 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 минут убрать краситель, отмыть ткань водой с помощью пипетки, убрать остатки воды фильтровальной бумагой, капнуть на стекло 1М раствор KNO_3 . Через 20–30 минут посмотреть 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 занести в таблицу 1.4 (используя цветные карандаши, изобразить клетки и раскрасить содержимое в нужный цвет; при наличии изобразить форму плазмолиза в клетках).

Таблица 1.4 – Проницаемость плазмалеммы и тонопласта для нейтрального красного и индигокармина

Краситель	Общий вид клетки (рисунок)	
	без нагревания	с нагреванием
Нейтральный красный		
Индигокармин		

2) *Определение проницаемости пограничных мембран цитоплазмы для индигокармина.*

Обработать ткань бесцветного эпидермиса вогнутой стороны луковичной чешуи, как указано в пункте первом.

Затем нанести на два предметных стекла по капле 0,05% раствора индигокармина. Через 20 минут убрать краситель кусочком фильтровальной бумаги и отмыть ткань водой. Фильтровальной бумагой убрать воду и нанести на стекла по капле 1М раствора KNO_3 . Через 20–30 минут посмотреть клетки под микроскопом. Сравнить окраску убитой и живой ткани. Отметить, какая часть клетки (цитоплазма, вакуоль) окрасилась красителем, наблюдается ли плазмолиз.

Результаты записать в таблицу 1.4 (используя цветные карандаши, изобразить клетки и раскрасить содержимое клеток в нужный цвет; при наличии изобразить форму плазмолиза в клетках).

3) *Определение проницаемости пограничных мембран цитоплазмы для ионов калия.*

Кусочки эпидермиса выпуклой стороны мясистой чешуи синего лука поместить на два предметных стекла – в 1М раствор сахарозы и в 1М раствор KNO_3 . Через 30–40 минут 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».

Результаты занести в таблицу 1.5 (зарисовать клетки, отметив форму наблюдаемого плазмолиза).

Таблица 1.5 – Проницаемость плазмалеммы и тонопласта для KNO_3 и эозина

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

4) Определение проницаемости пограничных мембран цитоплазмы для эозина.

Кусочки эпидермиса вогнутой стороны чешуи бесцветного лука поместить на два предметных стекла в 1М растворы сахаразы с эозином и KNO_3 с эозином. Через 30 минут просмотреть клетки под микроскопом.

Результаты записать в таблицу 1.5 (отметить появление колпачкового плазмолиза, сделать рисунок клетки, окрасить вакуоль и цитоплазму).

Общие результаты работы занести в таблицу 1.6. Отметить наличие проницаемости пограничных мембран цитоплазмы для рассмотренных веществ знаком «+», а отсутствие – знаком «-».

Таблица 1.6 – Проницаемость плазмалеммы и тонопласта для различных веществ

Действующее вещество	Нейтральный красный	Индигокармин	Эозин	K^+
Плазмалемма				
Тонопласт				

Сформулировать выводы о характере проницаемости пограничных слоев цитоплазмы для различных веществ.

Работа 4. Проницаемость живого и мертвого протопласта для клеточного сока

Проницаемость протопласта связана с его структурной разнокачественностью. В протопласте живой клетки имеются три ограниченных слоя: наружный, прилегающий к целлюлозной оболочке клетки – плазмалемма, средний – мезоплазма и внутренний, представляющий собой мембрану вакуоли, – тонопласт. Плазмалемма и тонопласт имеют мембранное строение и обладают свойством полупроницаемости. Проницаемость протопласта непостоянна, она зависит от внешних факторов и физиологического состояния самой клетки. Таким образом, живой протопласт способен регулировать транспорт веществ и удерживать некоторые вещества в клеточном соке внутри вакуоли. При повреждении протопласт утрачивает свойство избирательной проницаемости, поэтому вещества, содержащиеся в клеточном соке, свободно выходят из клетки. Коагуляцию, свертывание протопласта вызывают такие факторы как высокие и низкие температуры, наркотические вещества, химические соединения, яды.

Цель: изучить влияние внешних факторов на проницаемость протопласта.

Объекты: замороженный и свежий корнеплод столовой свеклы.

Реактивы и оборудование: дистиллированная вода, 50% спирт, 30% раствор уксусной кислоты, пробочное сверло, ступки, штатив, пробирки, мерные цилиндры, спиртовка или водяная баня, спички, держатель для пробирок, нож или скальпель.

Ход работы

Из свежего корнеплода свеклы нарезать пластинку толщиной 0,5–08 мм, затем пробочным сверлом сделать высечки (всего необходимо 12 высечек). Аналогично сделать три высечки из замороженного корнеплода свеклы.

Тщательно промыть полученные высечки водой (не путая замороженный и свежий корнеплоды), пока вода не станет бесцветной.

Три высечки из свежего корнеплода свеклы положить в пробирку с водой (4-5 мл) и кипятить на водяной бане (или спиртовке) в течение 2 минут.

Приготовить пять пробирок и заполнить их по следующей схеме:

- 1-я пробирка: 4 мл дистиллированной воды и 3 высечки из свежего корнеплода свеклы;
- 2-я пробирка: 4 мл дистиллированной воды и 3 высечки из свежего прокипяченного корнеплода свеклы;
- 3-я пробирка: 4 мл дистиллированной воды и 3 высечки из замороженного корнеплода свеклы;
- 4-я пробирка: 4 мл 50% спирта и 3 высечки из свежего корнеплода свеклы;
- 5-я пробирка: 4 мл 30% раствора уксусной кислоты и 3 высечки из свежего корнеплода свеклы.

Пробирки незамедлительно встряхнуть и отметить окрашивание раствора в соответствии с обозначениями сразу и через 15-20 минут: «←» – жидкость бесцветная, «+» – жидкость слабо окрашена, «++» – жидкость достаточно окрашена, «+++» – жидкость сильно окрашена.

Результаты работы занести в таблицу 1.7.

Таблица 1.7 – Проницаемость протопласта для клеточного сока

№ пробирки	Вариант опыта	Окраска жидкости	
		начальная	через 15-20 минут
1	Вода + свежий корнеплод		
2	Вода + свежий прокипяченный корнеплод		
3	Вода + замороженный корнеплод		
4	50% спирт + свежий корнеплод		
5	30% уксусная кислота + свежий корнеплод		

Проанализировать полученные результаты. Сформулировать вывод о проницаемости протопласта для клеточного сока в зависимости от степени повреждения растительной ткани различными агентами.

Работа 5. Влияние температуры на проницаемость клеточных мембран для бетацианина

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.

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

Объекты: корнеплод столовой свеклы.

Реактивы и оборудование: 0,5М раствор сахарозы, сверло диаметром 5 мм, лезвие или скальпель, линейки, ступки, пробирки, пипетки, термостаты с температурой 35⁰С и 45⁰С, спектрофотометр.

Ход работы

Из свежего корнеплода свеклы нарезать пластинку толщиной 0,5–08 мм, затем с помощью сверла вырезают высечки диаметром 5 мм, лезвием или

скальпелем разрезают их на миллиметровые кусочки по толщине, отбирая одинаковые по цвету.

Отсчитывают 18 высечек, которые для удаления остатков клеточного сока в течение 15–20 минут промывают водопроводной водой в ступке.

Берут шесть чистых пробирок. В три пробирки наливают по 10 мл воды, в три другие – по 10 мл сахарозы. В каждую пробирку помещают по 3 высечки корнеплода свеклы.

Берут по две пробирки (одна с водой и одна с сахарозой), оставляют их при комнатной температуре, две другие такие же пробирки помещают на водяную баню с температурой 35⁰С, две оставшиеся пробирки также помещают на водяную баню при 45⁰С и фиксируют время.

В течение 1 часа через каждые 15 минут в пробирках измеряют выход бетацианина в раствор (проводят три-четыре измерения). Для этого из каждой опытной пробирки пипеткой отливают раствор в чистую пробирку и после измерения оптической плотности раствора на спектрофотометре выливают раствор в ту же опытную пробирку, стараясь не терять жидкость. Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при длине волны $\lambda = 535$ нм.

Полученные результаты заносят в таблицу 1.8.

По данным необходимо построить график зависимости оптической плотности раствора от времени нахождения высечек при определенных температурных условиях.

Таблица 1.8 – Влияние температуры и сахарозы на проницаемость пограничных слоев цитоплазмы для бетацианина

Время	Оптическая плотность					
	вода (контроль)			сахароза, 0,5М		
	22 ⁰ С	35 ⁰ С	45 ⁰ С	22 ⁰ С	35 ⁰ С	45 ⁰ С
15 минут						
30 минут						
45 минут						

Сформулировать вывод о влиянии температуры и концентрации раствора сахарозы на изменение проницаемости мембран для бетацианина.

Работа 6. Определение жизнеспособности семян по окрашиванию цитоплазмы

Метод определения жизнеспособности семян основан на свойстве живой протоплазмы не пропускать красящие вещества в клетку. У мертвой и поврежденной ткани изменяется структура протоплазмы и увеличивается ее сродство с красителями. Жизнеспособность семян гороха, фасоли, льна, тыквы, люпина определяется методом Нелюбова, семян пшеницы – методом Иванова.

Цель: определить жизнеспособность семян однодольных и двудольных растений.

Объекты исследования: семена гороха, фасоли и тыквы, пшеницы.

Реактивы и оборудование: дистиллированная вода, термостат, бюксы, термометры, лезвия, чашки Петри или ступки, стеклянные стаканчики, пробирки, фильтровальная бумага, водяная баня, держатели для пробирок, 0,2% раствор индигокармина, 0,2% раствор кислого фуксина или 0,1% раствор индигокармина.

Ход работы

Метод Нелюбова (для двудольных культур).

Необходимо взять две партии семян гороха (фасоли или тыквы), каждая по 10 штук. Первую партию из 10 семян, предварительно убивают кипячением (кипятить в пробирках с водой 2-3 минуты на водяной бане).

Затем обе партии семян, предварительно замачивают в воде в течение 10–18 часов при 20°C. После этого снимают семенную кожуру и помещают семена в 0,2% раствор индигокармина на 2–3 часа при 30°C. Краску сливают, промывают семена водой и устанавливают их жизнеспособность.

Семена с неокрашенными корешками и слабо окрашенными семядолями относят к жизнеспособным. Семена с полностью окрашенными корешками и семядолями признают нежизнеспособными.

Метод Иванова (для однодольных культур).

Берут две партии семян пшеницы, каждая по 10 штук. Первую партию, предварительно убивают кипячением (кипятить в пробирках с водой 2–3 минуты на водяной бане). Затем обе партии семян предварительно замачивают в воде в течение 10 часов при комнатной температуре.

После замачивания семена разрезают бритвой вдоль бороздки пополам и помещают на 15 минут в стаканчик или бюкс с 0,2% раствором кислого фуксина или 0,1% раствором индигокармина. Краску сливают, промывают семена водой, размещают пинцетом в чашке Петри или на фильтровальной бумаге и определяют их жизнеспособность.

У жизнеспособных семян зародыши не окрашены, у мертвых или сильно поврежденных окрашены более или менее интенсивно.

Определение жизнеспособных и нежизнеспособных семян.

Формула для вычисления жизнеспособности семян:

$$\text{ЖСС} = (a - 100/v) \cdot 100, \text{ где}$$

ЖСС – жизнеспособность семян, %; а – число семян, у которых зародыш (у злаков), корешок и семядоли (двудольные) не окрашены; в – общее число семян, взятых для анализа.

Результаты опыта занести в таблицу 1.9.

Таблица 1.9 – Жизнеспособность семян однодольных и двудольных растений

Объект исследования	Количество семян, взятых для анализа	Количество семян, у которых окрашены зародыш или корешок и семядоли	ЖСС, %

Сформулировать выводы о годности семян для посева, если известно, что жизнеспособность семян должна быть не ниже, чем 95–98% для тыквенных, 90–95% для бобовых и зерновых.

Работа 7. Определение потенциального осмотического давления клеточного сока методом плазмолиза

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*.

Цель: определить осмотическое давление клеточного сока клеток растительной ткани плазмолитическим методом.

Объекты: луковица синего лука с чешуями.

Реактивы и оборудование: 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.

Ход работы

Подготовка растворов сахарозы для эксперимента.

В бюксах готовят по 10 мл растворов следующих концентраций: 0,1М; 0,2М, 0,3М; 0,4М; 0,5М; 0,6М; 0,7М. Для этого необходимо взять 1М сахарозу (или KNO_3) и с помощью разбавления дистиллированной водой получить нужную концентрацию, используя таблицу 1.10. Растворы тщательно перемешивают, бюксы закрывают крышками, чтобы предотвратить испарение, и ставят на лабораторном столе в ряд по убывающей концентрации.

Таблица 1.10 – Приготовление растворов сахарозы или KNO_3

Концентрация раствора, моль/л	На 10 мл раствора	
	1М раствора сахарозы или KNO_3 , 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

Подготовка срезов растительной ткани.

Лезвием безопасной бритвы делают тонкие срезы с выпуклой поверхности пигментированной чешуи луковицы размером примерно 25 мм² из среднего хорошо окрашенного участка.

Проведение эксперимента.

В каждый бюкс, начиная с высокой концентрации, с интервалом 3 минуты опускают по 2–3 среза. Через 30 минут после погружения срезов в первый бюкс их исследуют под микроскопом. Затем через каждые 3 минуты наблюдают срезы из последующих бюксов. Таким способом достигается равная продолжительность пребывания срезов в растворах плазмолитиков.

Срезы рассматривают под микроскопом в капле раствора из того бюкса, откуда они были взяты. Определяют стадию плазмолиза клеток (смотреть рисунок 1.1) 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 1.11.

Таблица 1.11 – Осмотическое давление в клетках эпидермиса синего лука

Концентрация раствора, моль/л	Наступление выпуклого плазмолиз	Изотоническая концентрация, моль/л
0,7		
0,6		
0,5		
0,4		
0,3		
0,2		
0,1		

Определение осмотического давления в клетках синего лука при комнатной температуре (20°С).

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

Потенциальное осмотическое давление определяется по формуле:

$$\pi = R \cdot c \cdot T \cdot i, \text{ где}$$

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

Коэффициент Вант-Гоффа характеризует ионизацию растворов:

$$I = I + \alpha \cdot (n - 1), \text{ где}$$

α – степень диссоциации раствора данной концентрации; n – число ионов, на которое диссоциирует соль.

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

Степень диссоциации KNO_3 разной концентрации составляет:

Концентрация	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Коэффициент Вант-Гоффа	0,71	0,74	0,76	0,79	0,83

Проанализировать полученные результаты. Сформулировать вывод о величине осмотического давления в клетках эпидермиса синего лука.

Работа 8. Определение сосущей силы (водного потенциала) тканей растений по изменению их размеров (метод Уршпрунга)

Сила, с которой клетка в данный момент поглощает воду, называется *сосущей*. Сосущая сила клетки (S) 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 π и тургорного давления P , которое в свою очередь зависит от эластичности клеточной оболочки и содержания воды в клетке.

Осмотическое давление окружающего раствора (π) равно: $\pi = i \cdot C \cdot R \cdot T$.

Сосущая сила клетки обычно равна разности осмотического давления клеточного сока и тургорного давления: $S_{кл.} = \pi_{кл.сока} - P$.

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 π окружающего раствора, клетки всасывают воду и кусочек ткани увеличивается. При равенстве сосущей силы ткани и π 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 равнялось бы сосущей силе

клеток ткани. Зная, что $S_{кл.} = \pi_{p-ра}$, находим $\pi_{p-ра}$. Осмотическое давление раствора ($\pi_{p-ра}$) 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 ($\Psi_{H_2O} = 0$), а для любого раствора – меньше нуля. При замене осмотических показателей ($S_{кл.} = \pi_{кл.сока} - P$) термодинамическим уравнение примет следующий вид: $-\Psi_{H_2O_{кл}} = -\Psi_{\pi} + \Psi_p$, где $\Psi_{H_2O_{кл}}$ – водный потенциал клетки; Ψ_{π} – осмотический потенциал клеточного сока; Ψ_p – гидростатический потенциал.

Из уравнения видно, что осмотический потенциал понижает водный потенциал клетки, а потенциал давления повышает его. Как правило, Ψ_{H_2O} клетки отрицателен, и лишь при полном насыщении клетки водой, когда $\Psi_p = \Psi_{\pi}$, 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 низкого водного потенциала, т.е. в сторону большей сосущей силы.

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

Объекты: свежие и подвявшие клубни картофеля, корнеплоды сахарной или столовой свеклы.

Реактивы и оборудование: растворы сахарозы от 0,1 до 0,9М, вода, мерные пробирки, стеклянные стаканчики алюминиевые бюксы, разделочная доска, ножи, лезвия, пинцеты, линейки.

Ход работы

Проведение эксперимента.

Приготовить растворы сахарозы следующих концентраций: 0,1М; 0,2М; 0,3М; 0,5М; 0,7М; 0,9М как указано в таблице 1.10.

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 подготовленную пластинку на ряд одинаковых полосок величиной 3x40 мм (нарезать полоски следует быстро, не допуская подвядания). Излишки клеточного сока, вытекающие при разрезании ткани, удалить фильтровальной бумагой.

Погрузить по 3 полоски ткани в растворы сахарозы (погружение должно быть полным). Через 30 минут извлечь полоски из растворов и измерить.

Данные повторностей опыта и средние значения записывают в таблицу 1.12.

Таблица 1.12 – Изменение длины полосок ткани клубня картофеля

		Концентрация сахарозы, М					
		0,9	0,7	0,5	0,3	0,2	0,1
Длина полосок, мм	исходная (l_u)						
	через 30 минут (l_o)	повторность	1				
			2				
			3				
			среднее				
	разность до и после погружения в раствор (Δl), мм						
Δl , %							

Используя формулу рассчитать Δl , определить изменения длины полосок в каждом растворе (данные также заносятся в таблицу 1.12):

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

На основе полученных результатов, построить график зависимости изменения длины полосок от концентрации наружного раствора (на оси абсцисс откладывают концентрации растворов (C), на оси ординат – Δl , %).

Определение величины сосущей силы.

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: $\pi = i \cdot C \cdot R \cdot T$.

Определить раствор, сосущая сила которого равна сосущей силе данной ткани. Для этого необходимо рассчитать сосущую силу ткани по сосущей силе раствора. 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. $S_{тк.} = \pi_{р-ра}$ поэтому ее легко вычислить по формуле: $S_{тк.} = i \cdot C \cdot R \cdot T$.

Полученные результаты заносят в таблицу 1.13.

Таблица 1.13 – Величина сосущей силы, осмотического и тургорного давления растительной ткани

Концентрация сахарозы, М	L (длина полосок ткани через 30 минут), мм	S (сосущая сила клеток), Па $S = c \cdot R \cdot T$	π (осмотическое давление клеточного сока), Па	$P = \pi - S$ (тургорное давление), Па

Определение значения π клеточного сока.

В растворах меньшей концентрации полоски ткани будут иметь более низкие значения π , которые уменьшаются обратно пропорционально длине полосок ткани. Принимаем, что для самой короткой полоски $P = 0$ (характерно полное отсутствие тургора), тогда, исходя из формулы $S = \pi - P$, $\pi_1 = S_1$. Для остальных полосок: $\pi_1 \cdot L_1 = \pi_n \cdot L_n$, откуда $\pi_n = \pi_1 \cdot L_1 / L_n$.

Полученные результаты заносят в таблицу 1.13.

Определение тургорного давления.

Имея все значения S и π , можно рассчитать значения P для исследованных полосок ткани по формуле: $P = \pi - S$. Результаты заносят в таблицу 1.13.

Построение графика, отражающего зависимость между осмотическим давлением, сосущей силой и тургорным давлением ткани.

Используя образец рисунка 1.4, на оси абсцисс (в масштабе 1см : 1мм) откладывают значения длины полосок ткани в порядке возрастания; на оси ординат – значения π , а затем P для соответствующих полосок. Откладывать значения S нет необходимости, так как на графике они представляют собой отрезки $\pi_n - P_n$. Соединив точки π и P линиями, получаем график зависимости π , S и P .

Проанализировать полученные результаты. Сформулировать выводы:

а) объяснить причину изменения длины полосок в растворах разных концентраций;

б) на основании графика определить концентрации растворов, где клетки находятся в состоянии полного тургора, частичного тургора и его отсутствия (т.е. необходимо отметить гипертонические, гипотонические и изотоническую концентрацию наружного раствора по отношению к концентрации клеточного сока растительной ткани);

в) определить взаимозависимость трех величин (сосущей силы, осмотического и тургорного давления) и объяснить, от какого показателя, π или P , зависит в большей степени изменение сосущей силы отрезков ткани.

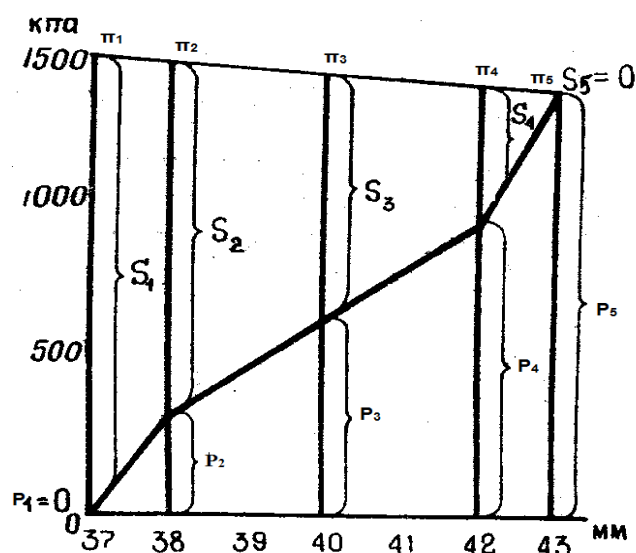


Рисунок 1.4 – График зависимости между сосущей силой, осмотическим и тургорным давлением растительных клеток, по-разному насыщенных водой

Работа 9. Определение водного потенциала растительных тканей по изменению концентрации внешнего раствора методом «струек» (по Шардакову)

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, 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 (ψ_{H_2O}) которого ниже водного потенциала ткани (ψ_{TK}), вода из ткани начинает поступать в раствор и его водный потенциал возрастает. Если же водный потенциал ткани (ψ_{TK}) выше водного потенциала (ψ_{H_2O}) 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.

Цель: определить водный потенциал (сосущую силу) кусочков растительной ткани, имеющих различную степень оводненности.

Объекты: корнеплоды свеклы, клубни картофеля, листья пеларгонии или бегонии.

Реактивы и оборудование: 1М раствор NaCl, из которого готовят 0,9, 0,7, 0,5, 0,2 и 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.

Ход работы

Определение водного потенциала свежих и подвявших клубней картофеля (или свежих и подвявших корнеплодов столовой свеклы); тургесцентных и подвявших листьев пеларгонии (или бегонии).

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 (разведение см. таблицу 1.10). 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 высечки из листьев, не захватывая крупных жилок. При использовании мясистой ткани клубней и корнеплодов их нарезают поперек продольной оси на тонкие пластинки (около 2 мм толщиной) и из них высекают сверлом диски. Желательно подложить под растительную ткань пробку или кусок толстого картона.

После этого в пробирки 2-го ряда («маленькие») опускают по 2 диска растительной ткани на 20–30 минут и закрывают пробками, следя, чтобы диски были погружены в растворы. Затем приступают к определению удельного веса растворов. Для этого в каждую пробирку второго ряда, удалив растительные ткани, 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, следят за направлением ее движения. Прежде чем набирать жидкость из следующей пробирки, пипетку следует вытереть фильтровальной бумагой.

Результаты заносят в таблицу 1.14, указав стрелкой (\uparrow , \downarrow) направление движения окрашенной струйки. Выявить раствор, в котором $-\psi_{H_2O} = -\psi_{TK}$.

Общие результаты записать в таблицу 1.15.

Таблица 1.14 – Направление движения «струек» раствора

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

Таблица 1.15 – Величина водного потенциала в клетках листьев

Объект исследования	Вариант опыта	Водный потенциал, кПа

Проанализировать полученные результаты. Сделать вывод о зависимости водного потенциала растительных тканей от степени их оводненности.

ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

ПО ТЕМЕ «ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ»

1. Отличительные особенности растительной клетки от животной клетки.
2. Строение и функции органоидов растительной клетки.
3. Особенности строения и функции мембран растительной клетки.
4. Клеточная стенка: химический состав, структурная организация, физические свойства, функции. Образование и рост клеточной стенки.
5. Особенности структуры и функции цитоплазмы, свойства цитоплазмы растительных клеток.
6. Осмотические свойства клетки. Понятие об осмосе, осмотическом давлении, тургоре и сосущей силе. Методы определения сосущей силы клеток.
7. 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?
8. Почему у растений жарких сухих мест обитания вязкость цитоплазмы, как правило, выше, чем у мезофитов?
9. Кусочки одной и той же растительной ткани погружены в 1М растворы сахарозы и $NaCl$. В каком из них будет более сильный плазмолиз? Пояснить расчетом.
10. 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?
11. 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?
12. Два кусочка эпидермиса синего лука соответственно с живыми и убитыми нагреванием клетками поместили в гипертонический раствор

сахарозы. Какая картина будет наблюдаться? Почему?

13. Клетки листа перезимовавшей озимой пшеницы поместили в гипертонический раствор сахарозы. Плазмолиз наступил только в 20% клеток. Как растения перенесли зимовку?

14. 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?

15. При погружении листочка элодеи в гипертонический раствор оказалось, что в клетках верхушки листа плазмолиз наступил на 20-й минуте, основания – только через час. Почему?

16. 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?

17. Живые клетки эпидермиса лука выдержали 10 минут 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?

18. Где концентрируется эозин после проникновения в клетку: в цитоплазме или в вакуоли?

19. Семена фасоли перед посевом обработали раствором индигокармина, при этом около 70% зародышей окрасились в синий цвет. Какие выводы относительно всхожести семян можно сделать?

20. Чему равно осмотическое давление 0,1М раствора глюкозы при 22°C?

21. Клетка погружена в раствор. Осмотическое давление клеточного сока 7 кПа, среды – 5 кПа. Куда пойдет вода? Рассмотрите три возможных случая.

22. 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?

23. 0,3 М раствор сахарозы, 0,15 М раствор NaCl и 0,1М раствор CaCl₂ обладают одинаковым осмотическим давлением. Почему?

24. У какого раствора и почему больше осмотическое давление у 5% сахарозы (C₁₂H₂₂O₁₁) или 5% глюкозы (C₆H₁₂O₆)?

25. Найти осмотическое давление клеточного сока при 17⁰, если известно, что 0,3 М и 0,4 М растворы сахарозы плазмолиза не вызывают, а в 0,5М растворе наблюдается плазмолиз?

26. 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?

27. 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?

28. 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?

29. Найти осмотическое давление 0,2 М раствора KCl при 0⁰C (изотонический коэффициент его – 1,8).

30. Равны ли сосущая сила раствора и клетки, если концентрация клеточного сока и раствора одинаковы?

31. Клетка находится в состоянии полного насыщения водой. Чему

равны ее сосущая сила и тургорное давление, если осмотическое давление клеточного сока составляет 8 кПа?

32. Клетка, осмотическое давление клеточного сока которой 5 кПа, погружена в раствор KCl, где осмотическое давление 9 кПа. Что произойдет с клеткой? Объяснение подтвердить расчетом.

33. 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?

34. Какова сосущая сила раствора, изотоничного клеточному соку ткани, если осмотическое давление последнего 7 кПа?

35. 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?

36. После погружения 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?

37. Чему равна сосущая сила и тургорное давление клетки при насыщении ее водой, недонасыщении, плазмолизе и циторризе?

38. 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?

39. Сосущая сила клетки 0,5 МПа. Рассчитайте тургорное давление этой клетки, если ее осмотическое давление равно 1,2 МПа.

40. 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.

41. 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.

42. В живой протоплазме растительной клетки содержится 75% воды. Раствор NaCl какой концентрации будет гипертоническим, а какой гипотоническим относительно протоплазмы этой клетки.

43. Несмотря на то, что жиры обладают гидрофобными свойствами, в воде происходит набухание семян масличных культур. Как это можно объяснить?

44. 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.

45. В 4 емкости с раствором NaCl 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. Почему?

46. Куски корня свеклы были измерены и погружены на 30 минут в растворы сахарозы разной концентрации. Оказалось, что в 0,3М растворе длина куска не изменилась, в 0,4М растворе уменьшилась, а в 0,2М растворе увеличилась. Как объяснить полученные результаты?

47. 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.

48. Чему равна сосущая сила клеток, если известно, что при погружении в 0,3 М раствор сахарозы размеры клеток увеличились, а в 0,4М растворе остались без изменения? Опыт проводился при температуре +27°C.

49. 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.

50. 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).

51. Корни одинаковых семян 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

Работа 1. Определение поглощения воды растением потометрическим методом

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, с помощью верхнего двигателя – пассивным, а с участием нижнего и верхнего концевых двигателей – общим.

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

Цель: оценить влияние различных условий на общее и активное поглощение воды растениями.

Объекты: проростки фасоли, бобов, тыквы или др. растений.

Реактивы и оборудование: 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.

Ход работы

1) Определить общее и активное поглощение воды у растений фасоли, освещаемой лампой 200 Вт и при естественном освещении; у фасоли, тыквы, бобов при обычных условиях и при движении воздуха (под вентилятором).

Выкапывают растение, стараясь не повредить корни, отмывают их от почвы, вставляют в предварительно подготовленный прибор ПВВК (смотреть рисунок 2.1а). Прибор представляет У-образную изогнутую стеклянную трубку, состоящую из широкого и узкого колена. На узком колене закреплена полоска миллиметровой бумаги.

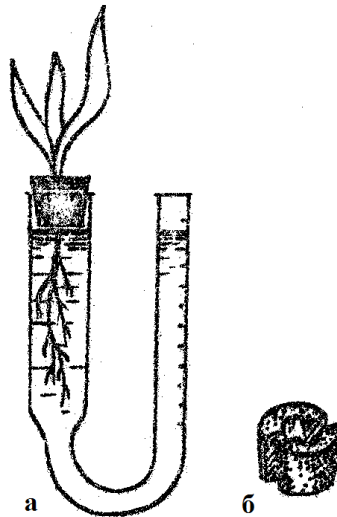


Рисунок 2.1 – Прибор для демонстрации всасывания воды корнем:
а – смонтированный прибор, б – пробка для прибора

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 (рисунок 2.1б). Предварительно определяют совпадение ширины отверстия и диаметра стебля; края пробки фиксируются 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 широком колене отсутствуют пузырьки воздуха, продолжают работу. В противном случае все собирают заново.

2) Определить поглощение воды целым растением.

Закрепляют потометр в штативе, отмечают уровень воды в узком колене и следят за его изменением через каждые 3 минуты. Для этого отмечают среднюю скорость смещения мениска (мм/мин) и заносят данные в таблицу 2.1.

Таблица 2.1 – Поглощение воды растением _____
(указать вид растения)

Вариант опыта	Поглощение воды											Активное поглощение, %		
	целым растением						корнями							
	положение мениска через интервалы времени, мм/мин					Средняя скорость, мм ³ /мин	Общее поглощение, мм ³ /дм ² ·ч	положение мениска через интервалы времени, мм/мин					Средняя скорость, мм ³ /мин	
	0	3	6	9	среднее (L)			0	3	6	9			среднее

3) Определить поглощение воды корнями.

После определения поглощения воды целым растением с помощью лезвия удаляют его наземную часть, место среза смазывают вазелином или пластилином и следят за поглощением воды только корнями, отмечая положение мениска каждые 3 минуты, и заносят полученные результаты в таблицу 2.1. На основании полученных данных рассчитать среднюю скорость смещения мениска (в мм/мин).

4) Рассчитать общее поглощение воды растительными объектами.

Затем следует определить среднюю скорость общего поглощения воды (в мм³/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:

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

Рассчитывая общее поглощение воды растительными объектами, необходимо учитывать площадь их листьев. При этом общее поглощение воды выражается в $\text{мм}^3/\text{дм}^2$, а поглощение с площади листьев в час – $\text{мм}^3/\text{дм}^2 \cdot \text{ч}$.

Площадь листьев можно определить следующим способом:

- а) листья, срезанные с растения, раскладывают на бумаге, обводят по контурам и взвешивают (P_1),
- б) взвешивают бумажный квадрат (P_2) из этой же бумаги $10 \times 10 \text{ см} = 1 \text{ дм}^2$ (S_2),
- в) площадь листьев S_1 находят из пропорции:

$$S_1 = \frac{P_1 \cdot S_2}{P_2}$$

5) Рассчитать активное поглощение воды.

На основании полученных результатов рассчитывают среднюю скорость поглощения воды корнями ($\text{мм}^3/\text{мин}$) и долю активного поглощения (в % от общего). Полученные данные записывают в таблицу 2.1.

б) Сравнить интенсивность общего и активного поглощения воды при различных условиях и общие результаты записать в таблицу 2.2.

Таблица 2.2 – Влияние внешних условий на поглощение воды растениями

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

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

Работа 2. Изучение состояния устьичного аппарата растений

Процесс испарения воды надземными органами растения называют *транспирацией*. Транспирация происходит через устьица (устьичная), кутикулу (кутикулярная) и чечевички (перидермальная), 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, из внутренних – парциальное давление 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 растений в воде для установления сроков полива.

Цель: определить состояние устьиц растений различными методами.

Объекты: листья фасоли, традесканции, ячменя, пеларгонии.

Реактивы и оборудование: раствор 5% хлоркобальта, петролейный эфир, ксилол, этиловый спирт в капельницах, бесцветный маникюрный лак; полоски фильтровальной бумаги предметные стекла, резиновые кольца, пинцет,

микроскоп, лезвие бритвы, препаровальные иглы, спиртовка, спички, вентилятор, лампа 200 Вт.

Ход работы

1) Определить состояние устьичного аппарата хлоркобальтовым методом (по Шталю).

Метод 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 CoCl_2) в розовую (цвет $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), судят о транспирации растений.

Готовят хлоркобальтовую бумагу. Полоски фильтровальной бумаги, держа пинцетом, погружают в 5% раствор хлоркобальта. Когда бумага пропитается раствором, ее достают. Она приобретает розовую окраску. Затем бумагу подсушивают над спиртовкой до появления голубого окрашивания.

Изучить интенсивность транспирации с обеих сторон листа у фасоли, традесканции, ячменя, пеларгонии в обычных условиях и в темноте.

Приложить с двух сторон к листу две полоски хлоркобальтовой бумаги. Для устранения действия атмосферной влаги лист осторожно зажать вместе с бумагой между предметными стеклами, перевязать резиновыми кольцами. Наблюдать изменение окраски бумаги. По скорости изменения окраски с голубой на розовую можно приблизительно судить об интенсивности транспирации и состоянии устьиц.

Результаты наблюдений занести в таблицу 2.3.

Таблица 2.3 – Определение интенсивности транспирации листьев хлоркобальтовым методом

Объект исследования	Вариант опыта	Интенсивность транспирации листа	
		верхняя сторона	нижняя сторона

2) *Определить состояние устьичного аппарата методом инфильтрации (по Молишу).*

Метод основан 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 петролейный эфир, труднее – ксилол или 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 – через слабо открытые устьица, бензол и ксилол – средне открытые, этиловый спирт – широко открытые устьица.

Изучить состояние устьиц листьев: а) фасоли, ячменя, традесканции, пеларгонии в обычных условиях и выдержанных сутки в темноте; б) фасоли и ячменя под влиянием движения токов воздуха.

На нижнюю поверхность листа нанести поочередно маленькие капли эфира, ксилола, спирта. Держать лист в горизонтальном положении до полного исчезновения капель, которые могут либо испариться, либо проникнуть внутрь. Рассмотреть лист на свет.

Результаты наблюдений записать в таблицу 2.4. Знаком «+» отметить проникновение жидкости, знаком «-» – отсутствие инфильтрации.

Таблица 2.4 – Определение состояния устьиц методом инфильтрации

Объект исследования	Вариант опыта	Петролейный эфир	Ксилол	Спирт	Состояние устьиц

3) Определить состояние устьичного аппарата методом 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.

Изучить количество и состояние устьиц в нижнем и верхнем эпидермисе листьев: а) фасоли, ячменя, традесканции, пеларгонии в обычных условиях и после нахождения в темноте; б) фасоли, ячменя под влиянием движения воздуха и при освещении лампой 200 Вт.

На поверхность листа нанести тонкий мазок раствора бесцветного лака в ацетоне и дать лаку хорошо высохнуть. После испарения растворителя образуется пленка, на которой отпечатывается эпидермис с устьицами. Отпечаток аккуратно снять с листа, поместить в каплю воды на предметное стекло, покрыть покровным, рассмотреть под микроскопом и определить количество и состояние устьиц. Метод также позволяет при использовании окуляр- и объект-микрометров измерять размеры устьица, ширину и длину устьичной щели.

Полученные данные занести в таблицу 2.5.

Таблица 2.5 – Определение состояния устьиц методом отпечатков

Объект исследования	Вариант Опыта	Число устьиц в эпидермисе		Процент открытых устьиц в эпидермисе	
		верхнем	нижнем	верхнем	нижнем

Сформулировать вывод о состоянии устьичного аппарата изученных растений и его изменениях под влиянием меняющихся условий среды. Оценить эффективность каждого из используемых методов для изучения состояния устьиц.

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

Интенсивность транспирации – это количество воды, испаряемой растением (в г) за единицу времени (ч) единицей поверхности листа (в дм^2). Эта величина колеблется в пределах 0,15–1,47 г/ $\text{дм}^2 \cdot \text{ч}$. 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 используется 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.

Цель: определить интенсивность транспирации по уменьшению массы листьев растений.

Объекты: небольшие листья растений.

Реактивы и оборудование: торсионные весы, технические весы, миллиметровая или писчая бумага, лезвие безопасной бритвы, вазелиновое масло, электролампа на 200-500 Вт, вентилятор, фильтровальная бумага, чашка Петри.

Ход работы

1) Проведение эксперимента.

Лист срезают с растения и, удалив черешок, место среза макают в растопленный парафин для предотвращения испарения с его поверхности и делают первое взвешивание (P_1). Затем лист быстро вынимают и помещают в исследуемые условия. С интервалом 3 минуты взвешивание повторяют еще три раза (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 определений желательно иметь трехкратную повторность по каждому варианту опыта, т.е. исследовать по три листа. Результаты эксперимента заносят в таблицу 2.6.

Таблица 2.6 – Определение интенсивности транспирации

Объект исследования	Вариант опыта	Вес испаренной воды (в мг) через интервалы времени, минуты				P, г	Площадь листа, см ²	И тр., г/см ² ·ч	И св.ис., г/см ² ·ч	И от.
		0	3	6	9					
		P_1	P_1-P_2	P_2-P_3	P_3-P_4					

2) **Определить площадь поверхности листа** – см. работу 1 этого раздела.

3) Определить интенсивность свободного испарения (И св.ис.).

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 минут, сделать второе взвешивание и найти количество испарившейся воды (P_5). Определить испаряющую поверхность (S_2), измерив внутренний диаметр чашки (R): $S_2 = \pi \cdot R^2$.

$$\text{И св.ис.} = \frac{P_5 \cdot 60}{S_2 \cdot t}, \text{ г/см}^2 \cdot \text{ч.}$$

Результаты записать в таблицу 2.6.

4) Определить интенсивность транспирации (И тр).

$$\text{И тр.} = \frac{P \cdot 60}{2S_1 \cdot t}, \text{ г/см}^2 \cdot \text{ч.}$$

Результаты записать в таблицу 2.6.

5) Найти относительную транспирацию (И от.).

$$\text{И от.} = \text{И тр.} / \text{И св.ис.}$$

Величина относительной транспирации менее 0,5 считается низкой.

Результаты записать в таблицу 2.6.

б) Сравнить интенсивность транспирации:

а) у листьев на свету и в темноте;

б) у листьев при нормальном и интенсивном движении воздуха.

Общие результаты записать в таблицу 2.7.

Таблица 2.7 – Определение интенсивности транспирации различных растений

Вид растения	Вариант опыта	Интенсивность транспирации, г/дм ² ·ч	Относительная транспирация

Сформулировать вывод о величине интенсивности транспирации и относительной транспирации изученных растений и о регуляции листом процесса транспирации, их изменениях под влиянием меняющихся условий среды. Может ли быть относительная транспирация больше 1?

Работа 4. Значение пробки для защиты растений от потери воды

На стеблях древесных растений в конце первого лета возникает вторичная покровная ткань – пробка, толщина которой с каждым годом увеличивается. В клеточных стенках пробковой ткани откладывается суберин – жироподобное вещество, непроницаемое для воды и газов, вследствие чего протопласты опробковевших клеток отмирают, клетки пробки воздухо- и водонепроницаемые. Многослойная пробка образует своеобразный чехол

стебля, надежно предохраняющий растение от неблагоприятных воздействий окружающей среды. Для газообмена и транспирации живых тканей, лежащих под пробкой, в последней имеются особые образования – *чечевички*; это разрывы в пробке, заполненные рыхло расположенными клетками.

Цель: установить роль покровной ткани (пробки) в жизни растений.

Объекты: безлистные побеги древесных растений.

Реактивы и оборудование: скальпель или лезвия, технические весы, чашка с парафином, электроплитка, линейки.

Ход работы

Вырезать из побега исследуемого древесного растения два одинаковых отрезка длиной 10–12 см и осторожно с помощью скальпеля (лезвия) соскоблить у одного побега пробку до зеленой паренхимы (феллодермы). Залить концы обоих отрезанных побегов расплавленным парафином (для предотвращения процесса испарения в поверхности срезов), после чего взвесить побеги с точностью до 0,01 г. Через два часа повторить взвешивание.

Данные записать в таблицу 2.8.

Таблица 2.8 – Роль пробки в регуляции перидермальной транспирации

Объект исследования	Вариант опыта	Масса, г		Уменьшение массы	
		исходная	через 2 часа	г	% от исходной
	С пробкой				
	Без пробки				

Сформулируйте вывод о значении пробки, указав, во сколько раз изменяется потеря воды побегом после удаления пробковой ткани.

ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ «ВОДНЫЙ ОБМЕН РАСТЕНИЙ»

1. Физические и химические свойства воды, значение в жизни растений.
2. Понятие о работе нижнего концевого двигателя (корневое давление).
3. Понятие о работе верхнего концевого двигателя (транспирация).
4. Кутикулярная и устьичная транспирация. Механизмы работы устьиц. Методы наблюдения за движением устьиц. Суточный ход транспирации.
5. Интенсивность транспирации и методы ее определения.
6. Особенности водного обмена различных групп растений: ксерофиты, мезофиты, гидрофиты.
7. Сколько воды испарится из растения за 5 мин, если интенсивность транспирации $120 \text{ г/м}^2\cdot\text{ч}$, а поверхность листьев 240 см^2 ?
8. На лист пеларгонии нанесли каплю спирта, бензола и ксилола. В двух последних случаях на листе появились прозрачные пятна. Почему?
9. С листовой поверхности древесного растения площадью 12 м^2 за 2 ч испарилось 3 кг воды. Чему равна интенсивность транспирации?
10. 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°C стала весить 4,8 г.
11. Как изменится процент активного поглощения от общего при помещении растения в темноту, в условия повышенной влажности, интенсивного движения воздуха? Почему?
12. 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 см^2 за 2 ч испарилось 0,6 г воды. Определить относительную транспирацию.

13. 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?

14. Почему в жаркий день растения, несмотря на достаточное количество влаги в почве, подвядают, а в ночные часы тургор восстанавливается?

15. 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?

16. Транспирационный коэффициент равен 125 мл/г. Найти продуктивность транспирации. К какому экотипу по характеру водообеспеченности относится данное растение?

17. Почему при помещении букета в вазу рекомендуется обновлять срез под водой?

18. Продуктивность транспирации растения равна 4 г/л. Найти транспирационный коэффициент.

19. Какая почва называется физиологически сухой? Какие это виды почв?

20. Одно из двух одинаковых растений в глиняных горшках поставлено в кристаллизатор с водой 20°C, другое – с водой при 30°C. Какое из них будет более интенсивно поглощать воду, почему?

21. Опытами установлено, что растением за 1 ч испаряется 5 г воды, а поглощается 4,5 г. Какими условиями могло быть вызвано такое несоответствие?

22. Какие листья, верхнего или нижнего яруса, быстрее завядают при недостатке влаги в почве, почему?

23. 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, бензола 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.

24. 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?

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

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

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

28. Побег, взвешенный сразу после срезания, имел вес 10,26 г, а через 3 минуты – 10,17 г. Площадь листьев побега равна 240 см². Определить интенсивность транспирации.

29. 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.

30. 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)?

31. 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.

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

33. 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?

34. Охарактеризуйте механизм транспирации воды растением, его этапы, механизм регуляции. Значение транспирации.

35. Назовите показатели транспирации и объясните их биологический смысл.

36. 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?

37. 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)?

38. На нижнюю поверхность листьев лещины в разные часы ясного летнего дня наносили капли петролейного эфира, ксилола 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 петролейного эфира, в 9 часов пятна дали все 3 жидкости, а в 13 часов пятен на листе не оказалось. Как объяснить эти результаты?

39. 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?

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

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

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

43. 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?

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

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

46. Вес побега сразу после срезания составил 10,54 г, а через 3 минуты 10,45 г. поверхность листьев равна 200 см². Определить интенсивность транспирации.

47. Чему равна интенсивность транспирации, если дерево с листовой поверхностью 10 м² испарило за 2 часа 4 кг воды?

48. Чему равна листовая поверхность дерева, если при интенсивности испарения (транспирации) 50 г/м²·час, дерево за 30 минут испарило 10 кг воды?

49. Определить экономность транспирации по следующим данным: интенсивность транспирации 25 г/м² в час, площадь листьев 550 см² сырая масса 20 г, абсолютно сухая масса 9 г.

50. Интенсивность транспирации растения составляет 40 г/м^2 в час, площадь листьев равна 80 см^2 , сырой вес растения – 40 г, сухой вес – 10 г. Определите экономность транспирации.

51. Продуктивность транспирации равна 5 г/литр. Найти транспирационный коэффициент.

52. При наличии листовой поверхности площадью $1,5 \text{ дм}^2$ побег испарил за 5 минут 0,08 г воды. При тех же условиях со свободной поверхности площадью 25 см^2 за 2 часа испарилось 0,6 г воды. Определить относительную транспирацию.

ТЕМА 3. МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ

Работа 1. Микрохимический анализ золы

О минеральном составе растений обычно судят по анализу золы, остающейся после сжигания растительных тканей.

При сжигании растений 4 элемента (С, Н, О, N) улетучиваются в виде газообразных соединений. Оставшуюся несгораемую часть называют **зола**. Элементы, которые в ней содержатся, называются зольные; на их долю приходится около 5%.

Органы растений отличаются по количественному составу золы. Зольные элементы сосредоточены в тех органах, уровень жизнедеятельности которых достаточно велик. Так, в семенах – около 3%, в корнях и стеблях травянистых растений – 4–5, листьях – 10–15% золы. Меньше всего ее содержится в древесине (около 1%), состоящей почти из одних мертвых клеточных стенок.

Больше всего золы в живых активно функционирующих тканях, например в мезофилле листа, в клетках которого имеется хлорофилл и множество ферментов, содержащих такие элементы, как магний, железо, медь и др. В связи с высокой метаболической активностью живых тканей в них также обнаруживается значительное количество калия (около 80% сосредоточено в вакуолях), фосфора (входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов) и других элементов.

Отличаются органы растений и по качественному составу золы. Семена богаче фосфором и калием, стебли и листья – кальцием и магнием, клубни и корни – калием. В старых органах накапливается кальций, в то время как калий сосредоточен в молодых растущих тканях.

Содержание золы зависит и от состава почвы, на которой произрастает растение, от его возраста и генетических особенностей, обуславливающих потребность в элементах минерального питания. Вследствие этого растения разных видов, растущие на одинаковой почве, накапливают различное

количество зольных элементов. Например, вегетативные органы злаков накапливают большое количество кремния, клевера и гречихи – калия и кальция.

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.

Цель: ознакомиться с методами обнаружения калия, кальция, фосфора, магния и железа в золе растений.

Объекты: зола, полученная при сжигании листьев, семян, древесины.

Реактивы и оборудование: 10% растворы HCl и NH₃, 1% растворы следующих солей в капельнице: H₂SO₄, Na₂HPO₄, NaHC₄H₄O₆, K₄[F(CN)₆], (NH₄)₂MoO₄ в 1% HNO₃, пробирки, предметные стекла, пипетки, стеклянные палочки, бумажные фильтры, полоски фильтровальной бумаги, стаканчики с дистиллированной водой, световые микроскопы, спиртовки, спички.

Ход работы

Приготовление препарата:

На предметное стекло тупым концом стеклянной палочки (пипеткой) нанести каплю вытяжки и на расстоянии 2 см от нее – каплю соответствующего реактива. Каждый реактив наносится отдельной пипеткой. Соединить стеклянной палочкой (препаровальной иглой) две капли (смешение двух капель нежелательно, так как вследствие быстрой кристаллизации образуются мелкие нетипичные кристаллы, кроме того, при высыхании капли могут образоваться кристаллы исходных солей) (рисунок 3.1).

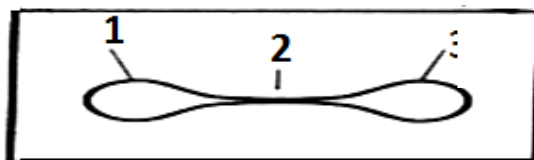


Рисунок 3.1 – Микрохимический анализ золы:

1 – капля зольной вытяжки, 2 – «мостик» между раствором и реактивом,
3 – капля реактива

В месте соединения растворов произойдет реакция и образование характерных кристаллов (иногда для увеличения скорости реакции предметное стекло слегка нагревают на спиртовке). После этого капли оставшихся растворов убрать со стекла кусочком фильтровальной бумаги и рассмотреть кристаллы под микроскопом без покровного стекла.

Стеклянные палочки после нанесения каждого реактива необходимо вымыть и вытереть насухо фильтровальной бумагой.

Обнаружение кальция:

Реактивом на ион кальция служит 1% раствор H_2SO_4 . При этом хлорид кальция, содержащийся в зольной вытяжке, реагирует с серной кислотой, и образуются крупные кристаллы гипса игольчатой формы одиночные или в виде сросшихся пучков (рисунок 3.2Б):

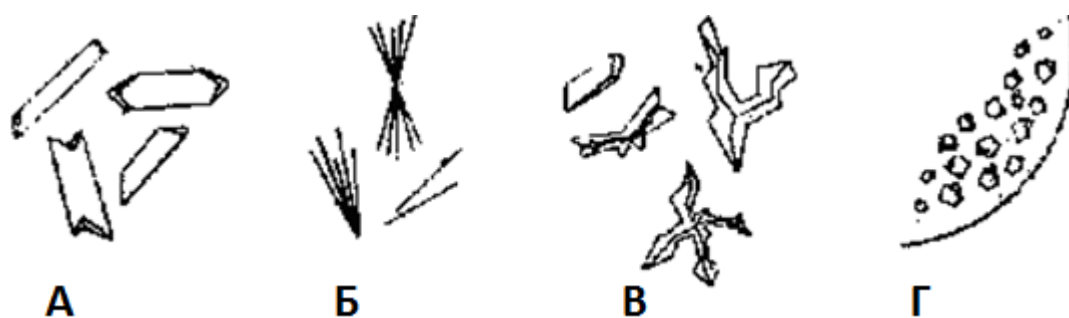
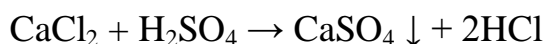
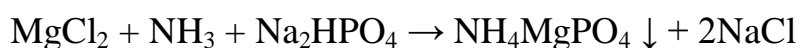


Рисунок 3.2 – Типичные формы кристаллов:

А – кислого виннокислого калия, Б – гипса, В – фосфорно-аммиачно-магнезиальной соли,
Г – глыбки фосфорно-молибденового аммиака

Обнаружение магния:

К капле зольной вытяжки вначале добавить каплю 10% раствора аммиака, а затем соединить полученный раствор с каплей 1% фосфорнокислого натрия. В результате реакции образуется фосфорно-аммиачно-магнезиальная соль в виде плоских бесцветных кристаллов в форме прямоугольников, крыльев, звездочек (рисунок 3.2В):



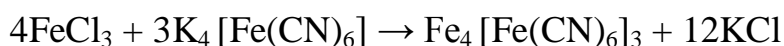
Обнаружение фосфора:

Соединить каплю вытяжки с 1% раствором молибдата аммония в азотной кислоте. Образуется зеленовато-желтый осадок фосфорно-молибденовокислого аммония в виде мелких глыбок (рисунок 3.2Г):



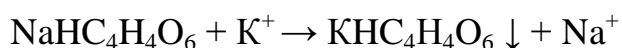
Обнаружение железа:

На предметное стекло в каплю зольной вытяжки добавить каплю 1% желтой кровяной соли. В результате реакции образуется синий осадок (берлинская лазурь):



Обнаружение калия:

К капле зольной вытяжки добавить 1% раствор кислого виннокислого натрия. При медленном выпаривании выпадают кристаллы кислого виннокислого калия $\text{KHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, имеющие вид крупных призм и пластинок (рисунок 3.2А):



Результаты работы оформить в виде таблицы 3.1. Записать уравнения реакций. Количество кристаллов в поле зрения микроскопа оценить по 3-х балльной шкале.

Проанализировать полученные результаты, указав роль кальция, магния, фосфора, железа и калия в жизни растений.

Таблица 3.1 – Химический состав золы

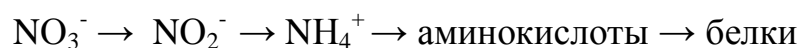
Элемент	Форма полученных кристаллов	Количество в баллах (максимум 3)		
		зола древесины	зола листьев	зола семян
Ca				
Mg				
P				
Fe				
K				

Сделать выводы о:

- 1) наличии в составе золы того или иного химического элемента,
- 2) причине различного содержания указанных элементов в органах растений.

Работа 2. Обнаружение нитратов в растениях

Соли азотной кислоты – нитраты – одни из главных соединений, из которых растения усваивают азот. Нитраты, поглощаемые корнями из почвы, восстанавливаются в растении до аммиака, используемого на синтез органических азотистых 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 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 дает представление о нитратредуктазной активности этих органов.

Главная причина избыточного накопления нитратов в овощах – нарушение технологий применения удобрений: внесение повышенных доз азотных удобрений, неравномерное их распределение по поверхности поля.

Нитратный азот способен накапливаться в растениях в значительных количествах, не причиняя им вреда. Однако содержание нитратов в кормах, овощах и других продуктах растительного происхождения выше определенного уровня вредно для человека и животных.

Для обнаружения нитратов можно использовать реактив с дифениламином, который в присутствии иона NO_3^- дает синюю окраску. По интенсивности посинения можно судить о количестве нитратов в исследуемом объекте.

Цель: сравнить содержание нитратов в растениях.

Объекты: овощные и зеленные культуры (кочан капусты, клубень картофеля, корнеплод моркови и свеклы, плоды огурца и томата, зелень петрушки, укропа, листья салат, лука); различные органы растений (корни, стебли, листья, плоды) и их части; овощи без и подвергнутые кулинарной обработке (механической очистке, вымачиванию в холодной воде в течение 1, 2 и 24 часов, варке в кожуре и в очищенном виде, термической обработке в микроволновой печи).

Реактивы и оборудование: 1% раствор дифениламина в концентрированной серной кислоте в капельнице, вода в химических стаканах, чашки Петри, стеклянные палочки, ножи, доски для нарезки овощей, глазная пипетка, шкала интенсивности окрашивания дифениламином, фильтровальная бумага.

Ход работы

Из исследуемых объектов отрезать небольшие, одинаковые по размерам кусочки, поместить их в чашки Петри, растереть стеклянной палочкой до однородной массы (палочку после каждого варианта ополоснуть водой и промокнуть фильтровальной бумагой). К полученной массе добавить 3–4 капли раствора дифениламина. Через 1,5 минуты определить окраску ткани, оценив ее по 4-х балльной шкале и по шкале интенсивности окрашивания дифениламина (мг/кг сырой массы).

Результаты оформить в виде таблицы 3.2.

Таблица 3.2 – Содержание нитратов в органах растений

Объект исследования	Орган растения	Часть органа растения	Повторность	Содержание нитратов	
				балл	мг/кг сырой массы

Проанализировать полученные результаты, объяснив разницу в накоплении нитратов различными культурами, разными органами и их частями, воздействием кулинарной обработки. Сформулировать выводы о закономерностях накопления нитратов.

ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ 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, запасующих тканях – больше зольных элементов и 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 и 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?
24. В каких частях растения более высокое содержание зольных элементов – в древесине или в листьях, в старых или молодых листьях? Как объяснить эти различия?
25. У каких листьев, молодых или старых, раньше появится хлороз при недостатке в почве растворимых солей железа?
26. Охарактеризуйте пути транспорта органических и минеральных веществ.
27. 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.
28. 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.
29. Как объяснить уменьшение содержания нитратов в листьях при выставлении растения на яркий свет?

Тема 4. ФОТОСИНТЕЗ

Работа 1. Извлечение пигментов из листьев

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.

Цель: экстрагировать пигменты из листа различными растворителями.

Объекты: свежие листья различных растений.

Реактивы и оборудование: ацетон, этанол, бензин или петролейный эфир ($t_{\text{кип.}}$ 40–60°C), мел в порошке или углекислый кальций, кварцевый песок или толченое стекло, дистиллированная вода; фарфоровые ступки с пестиком, штатив для пробирок, пробочные сверла диаметром 0,8–1 см, стеклянные палочки.

Ход работы

С помощью пробочного сверла 0,8–1,0 см из листа (между жилками) высекают по 4–5 дисков, 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), приливают несколько капель растворителя, тщательно растирают ткань до получения однородной кашицы. Затем 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 через воронку со складчатым фильтром в пробирку. Так поступают несколько раз, пока остаток ткани не станет бесцветным. Все экстракты фильтруют в одну пробирку. 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. Данные записать по форме таблицы 4.1.

Таблица 4.1 – Экстрагируемость пигментов листа различными растворителями

Растворитель	Цвет экстракта пигментов	Степень экстракции *

* В скобках указать, какие пигменты экстрагируются данным растворителем.

Оценить полноту экстракции пигментов этими растворителями (полная, частичная, отсутствует) и объяснить причину, исходя из особенностей локализации пигментов в фотосинтетической мембране.

Сделать выводы об эффективности экстракции тем или иным растворителем. Каким(и) растворителями экстрагируют полностью хлорофиллы, а какими – каротиноиды? Чем обусловлен желтовато-зеленый цвет бензинового экстракта?

Работа 2. Разделение пигментов листа хроматографическим методом

К основным фотосинтетическим пигментам листа относятся хлорофиллы и желтые пигменты — каротиноиды, которые в соответствии с их химическим

строением разделяются на две группы: каротины ($C_{40}H_{56}$) и более окисленные ксантофиллы ($C_{40}H_{56}O_n$). Те и другие представляют собой смесь нескольких пигментов близкого строения, которую можно разделить на отдельные компоненты с помощью хроматографии.

Метод бумажной хроматографии был предложен русским ученым М.С.Цветом в 1906 г. и сейчас широко используется для качественного разделения смеси пигментов.

Все хроматографические системы состоят в основном из двух фаз: неподвижной и подвижной. Обычно подвижная фаза перемещается по неподвижной или пропускается через нее.

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. Хроматографическое разделение на бумаге проводят в восходящем или нисходящем направлении. 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.

Цель: разделить пигменты с помощью метода бумажной восходящей хроматографии.

Объекты: свежие листья различных растений.

Реактивы и оборудование: ацетон, этанол, бензин или петролейный эфир ($t_{\text{кип.}} 40\text{--}60^\circ\text{C}$), 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.

Ход работы

1. На полоску хроматографической или фильтровальной бумаги (2x12 см) карандашом нанести стартовую линию (от края полоски 1–1,5 см), погрузить этим концом в вытяжку пигментов на глубину 1–1,5 см, затем высушить на воздухе. Операцию повторить несколько раз 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. Закрывать 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 (рисунок 4.1а). 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.

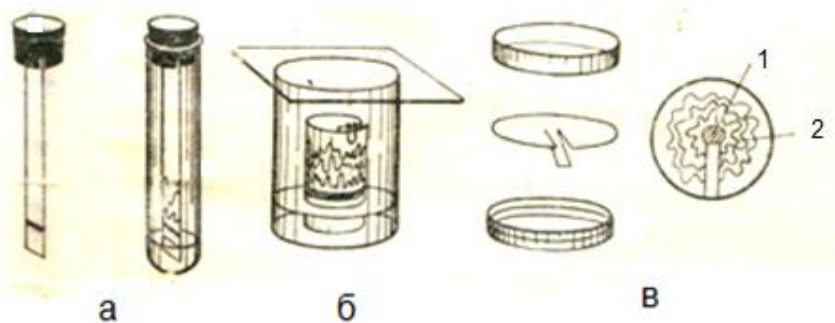


Рисунок 4.1 – Схема бумажной восходящей хроматографии:
а – узкая полоска, б – цилиндрическая хроматограмма,
в – круговая хроматограмма (1 – стартовое пятно, 2 – разделенные пигменты)

2. На лист фильтровальной или хроматографической бумаги (15x15 см) нанести пипеткой с оттянутым концом полосу пигментов на расстоянии 1,5 см от края. Ширина полосы должна быть около 1 см, цвет – *интенсивно зеленый*. Хроматограмму свернуть трубочкой, склоть скрепкой и опустить нижним концом в банку, на дно которой налит слой бензина высотой около 1 см (рисунок 4.1б). Стартовая полоса не должна касаться бензина. Если разделение пигментов происходит медленно и нечетко, 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 (рисунок 4.1в).

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 b* желтовато-зеленого цвета, над ним – *хлорофилл a* 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. Расшифровать хроматограмму и вклеить в лабораторную тетрадь. Стрелкой указать направление движения растворителя.

Сделать вывод, какие пигменты можно выделить с помощью данного метода хроматографии. Объяснить расположение пигментов на хроматограмме, исходя из их химического строения и растворимости.

Какой из способов пригоден для демонстрации состава пигментов листа в средней школе?

Какой пигмент ближе всего оказался к старту и почему? Какой пигмент ближе всего оказался к финишу и почему? Почему хлорофилл *a* оказался ближе к финишу по сравнению с хлорофиллом *b*? Какие каротиноидные пигменты после разделения были ближе к старту и почему?

Работа 3. Физические свойства пигментов листа

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 (рисунок 4.2).

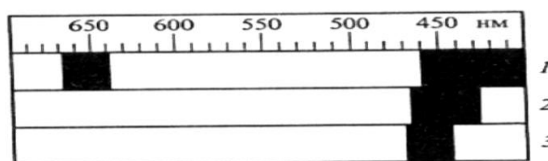


Рисунок 4.2 – Спектры поглощения пигментов листа:

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 такому 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 разверткой спектра. 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, раствор хлорофиллов и каротиноидов будут иметь различные полосы поглощения (рисунок 4.2).

Хлорофилл обладает способностью к флуоресценции. При поглощении света молекулами хлорофилла *a* реакционных центров (РЦ) фотосистемы I и II переходят в возбужденное состояние, а возврат их к обычному состоянию сопровождается излучением ранее поглощенной энергии в виде тепла, миграции энергии, химической энергии и красной флуоресценции. Флуоресценция обнаруживается по красному цвету раствора хлорофилла, рассматриваемого в отраженном свете на темном фоне.

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

В живом листе основным флуоресцирующим пигментом является хлорофилл *a*. 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.

Цель: изучить физические свойства фотосинтетических пигментов.

Объекты: свежие листья фуксии и бальзамина, концентрированная ацетоновая вытяжка пигментов (хлорофиллов, каротиноидов).

Реактивы и оборудование: плоские флаконы или кюветы, спектроскопы, настольная лампа, ступка с пестиком, пробирки, воронка, бумажный фильтр, медицинский шприц, дистиллированная вода, пинцеты.

Ход работы

1. Спектры поглощения фотосинтетических пигментов

Раствор ацетоновой вытяжки хлорофилла наливают в пузырек (или кювету) с плоскопараллельными стенками и помещают его перед щелью спектроскопа. Источник света при этом должен находиться за кюветой. В спектроскопе наблюдаются две полосы поглощения.

Следующим спектроскопируют живой лист (инфильтрованный лист – с заполненными водой межклетниками). Инфильтрация листа необходима для того, чтобы сделать лист прозрачным.

Затем спектроскопируют пузырек с желтыми пигментами.

Зарисовать цветными карандашами видимый спектр, соблюдая ширину отдельных участков (таблица 4.2). Спектры поглощения хлорофилла в ацетоне и живом листе, каротиноидов закрасить черным карандашом.

Таблица 4.2 – Спектр поглощения пигментов листа

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. Флюоресценция

Для наблюдения красной флюоресценции хлорофилла бюкс с концентрированным раствором хлорофилла и свежий лист рассмотреть в отраженном свете.

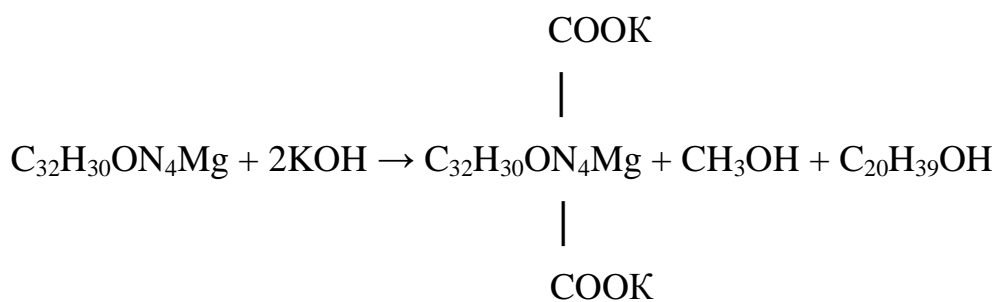
Сделать вывод, с чем связано видимое отсутствие флюоресценции в живом листе по сравнению с раствором.

Работа 4. Химические свойства пигментов листа

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.

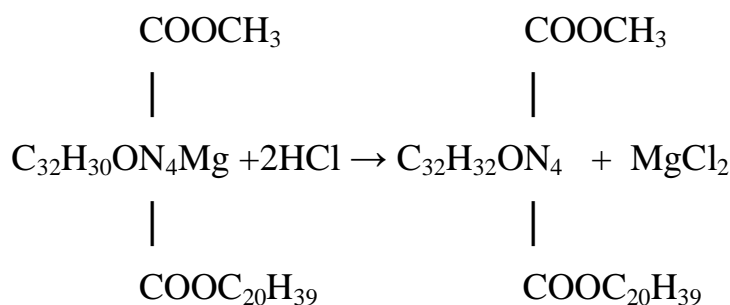
Ксантофиллы можно отделить *по методу Крауса*. Они, будучи по химической природе двухатомными спиртами, обладают более высокой гидрофильностью и поэтому значительно хуже других пигментов растворимы в бензине.

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:

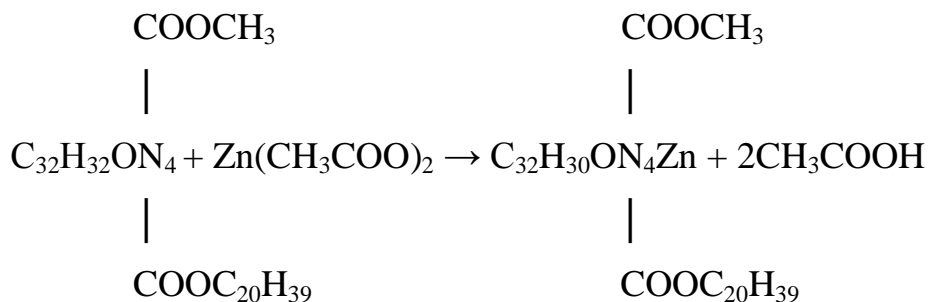


Соли хлорофилла, как и хлорофилл, имеют зеленую окраску, поскольку при омылении не затрагивается структура порфиринового ядра, придающего молекуле зеленый цвет. Способность хлорофилла к реакции омыления показывает, что он является сложным эфиром и, как другие сложные эфиры (например, жиры), способен 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 безмагниевое 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.

Цель: изучить химические свойства пигментов листа.

Объекты: свежие листья фуксии и бальзамина, спиртовая вытяжка пигментов.

Реактивы и оборудование: бензин, вода, этиловый спирт, 20% КОН или NaOH, 10% HCl, уксуснокислый цинк в порошке, пробирки, скальпели или металлические шпатели, спички, спиртовка.

Ход работы

1. *Разделение пигментов по методу Крауса*

Данный метод 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 (сильное встряхивание нежелательно, так как образуется стойкая эмульсия и раствор становится мутным) и дают отстояться. 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* (содержит ксантофиллы).

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.

2. Реакция омыления

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.

3. Реакция феофитинизации

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. Для этого 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 пигментов оформить в виде таблицы 4.3.

Таблица 4.3 – Химические свойства пигментов

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.

Какие пигменты можно отделить от других по методу Крауса? Что доказывает реакция омыления? Как можно отделить каротины от других пигментов? Что доказывает реакция феофитинизации?

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

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 как можно быстрее. Пигменты извлекают последовательно несколькими порциями растворителя, фильтруя каждый раз раствор через стеклянный фильтр. При растирании листьев добавляют небольшое количество 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:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3) в 96%-ом растворе спирта (Wintermans, de Mots, 1965):

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

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

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

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

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

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

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

где $C_{\text{хла}}$, $C_{\text{хлб}}$, $C_{\text{хла+хлб}}$ 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.

Цель: определить спектрофотометрически количественное содержание основных фотосинтетических пигментов в исследуемом материале.

Объекты: 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.

Реактивы и оборудование: 100% раствор ацетона, 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.

Ход работы

Провести экстракцию пигментов. Для этого навеску растительного материала (100–200 мг) размельчают ножницами, помещают в маленькую ступку, добавляют на кончике скальпеля немного CaCO_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 ацетоном объем вытяжки в 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* (662 и 644 нм). Для определения содержания каротиноидов определяют оптическую плотность вытяжки при $\lambda=440,5$ нм. Результаты измерений заносят в таблицу 4.4.

Таблица 4.4 – Оптическая плотность растворов

Объект исследования	Масса навески, мг	Оптическая плотность (D) при длине волны		
		662 нм	644 нм	440,5 нм

Рассчитать концентрации пигментов в растворе (100%-ом ацетоне) (C).

Вычислить содержание пигментов (хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, сумму хлорофиллов, каротиноидов) в растительном материале (A) по формуле:

$$A = VC/1000P, \text{ где}$$

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

Результаты расчетов записать в таблицу 4.5.

Таблица 4.5 – Количественное определение фотосинтетических пигментов

Объект исследования	Количество пигментов, мг/л раствора			Количество пигментов в сыром листе, мг/г			Соотношение пигментов	
	хл. <i>a</i>	хл. <i>b</i>	каротиноиды	хл. <i>a</i>	хл. <i>b</i>	каротиноиды	хл <i>a</i> /хл <i>b</i>	$\Sigma(\text{хл}a+\text{хл}b) / \text{каротиноиды}$

Рассчитать процентное соотношение пигментов. 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.

Работа 6. Образование крахмала в зеленых листьях на свету

Наиболее простой метод обнаружения фотосинтеза – крахмальная проба. Она состоит в том, что лист, выдержанный на свету, обесцвечивают спиртом, а затем обрабатывают раствором йода, 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 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.

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

Объекты: проростки фасоли, комнатные растения (пеларгония, колеус, примула).

Реактивы и оборудование: этиловый спирт, раствор йода в йодистом калии, лампа мощностью 200 Вт, ножницы, пинцет, лезвие бритвы, штатив с пробирками, водяная баня, электроплитка, держатели пробирок, чашки Петри, препаровальные иглы, сверла.

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, чтобы убить клетки. Воду сливают, приливают 2–3 мл спирта 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 высечку в чашку Петри и добавляют раствор йода в йодистом калии.

Через 3–5 мин раствор сливают и оценивают 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.

Изучить влияние различных факторов на процесс образования крахмала у:

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

Полученные результаты внести в таблицу 4.6.

Таблица 4.6 – Содержания крахмала в различных растениях

Объект исследования	Вариант Опыта	Содержание крахмала в листьях, балл

Проанализировать полученные результаты, объяснив причины обескрахмаливания листьев в темноте. Отметить степень накопления крахмала при разной экспозиции на свету, различной интенсивности освещения в целом растении и срезанных листьях.

Сделать вывод о необходимости света для образования крахмала в 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

Углеводы – обширный класс органических соединений, образование которых связано с процессом фотосинтеза.

У всех растений – от низших до некоторых высших растений, главным образом двудольных, углеводы, образовавшиеся в хлоропластах в процессе фотосинтеза, немедленно превращаются в крахмал, называемый ассимиляционный. Однако ассимиляционный крахмал представляет собой достаточно лабильную форму и может довольно быстро использоваться в процессах метаболизма или превращаться в ряде органов (семенах, плодах, стеблях, корнях, корневищах) в запасной крахмал.

Однако в сахаристом листе однодольных растений, например, злаков, крахмал почти не обнаруживается. Сахара здесь представлены в основном сахарозой и различными моносахаридами. Они транспортируются в другие части растений и превращаются здесь в запасной крахмал.

Таким образом, крахмал – наиболее важный и накапливающийся в наибольшем количестве запасной полисахарид растений.

Определить сахара можно с помощью Фелинговой жидкости, в которой содержится окись меди $\text{Cu}(\text{OH})_2$; сахар отнимает от нее кислород, а сам окисляется в глюкуроновую кислоту. $\text{Cu}(\text{OH})_2$ превращается в закись меди Cu_2O , который выпадает в виде кирпично-красного осадка.

Цель: оценить способность различных растений накапливать сахар в листьях.

Объекты: листья лука, чеснока, свеклы столовой, пеларгонии, проростки фасоли, колеуса, примулы.

Реактивы и оборудование: этиловый спирт, раствор йода в йодистом 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 (см. работу б раздела 4) и приступают к определению редуцирующих сахаров.

Нарезают на мелкие кусочки листья, заполняют ими пробирку на $\frac{1}{4}$, заливают небольшим количеством воды и нагревают в кипящей водяной бане не менее 5 мин. Полученную вытяжку фильтруют. Приливают к фильтрату реактив Фелинга (в количестве равном фильтрату) и кипятят 5–7 мин. При наличии моносахаров в пробирке выпадает кирпично-красный осадок оксида меди, количество которого оценивают по 4-балльной системе.

Полученные данные занести в таблицу 4.7.

Таблица 4.7 – Содержания крахмала в различных растениях

Объект исследования	Повторность	Содержание крахмала, балл	Содержание редуцирующих сахаров, балл

Выявить сахаробразующие растения, изучив содержание крахмала и моносахаров в листьях растений (лук, чеснок, свекла, пеларгония, проростки фасоли, колеус, примула), выдержанных в течение 72 ч около лампы 100 Вт.

Объяснить механизм образования органических веществ в зеленых листьях на свету.

Сделать вывод об образовании различных углеводов в листьях растений. Обсудить возможность использования результатов данной работы для постановки школьного эксперимента.

Работа 8. Значение хлорофилла для образования в листьях крахмала

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

крахмалообразующее пестролистное растение, содержащее безпигментные участки.

Цель: выяснить необходимость хлорофилла для образования крахмала.

Объекты: листья пестролистных растений (колеуса Блюме, хлорофитума, пеларгонии, традесканции).

Реактивы и оборудование: реактивы и оборудование см. в работе «Образование крахмала в зеленых листьях на свету».

Ход работы

В листьях, предварительно выдержанных на свету растений, определить содержание крахмала (см. работу 6 раздела 4).

В синий цвет окрашиваются только высечки с хлорофиллом, но это наблюдается у крахмалообразующих растений. Поэтому, если крахмальная проба не удастся, проверяют наличие моносахаров.

Результаты занести в таблицу 4.8.

Таблица 4.8 – Значение хлорофилла для образования крахмала

Объект Исследования	Содержание крахмала по зонам, балл	
	без хлорофилла	с хлорофиллом

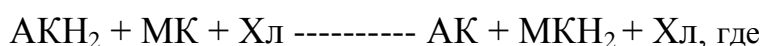
Проанализировать результаты. Сделать вывод о роль хлорофилла в процессе образования крахмала в листьях на свету.

Обсудить возможность использования изученных объектов для соответствующего демонстрационного опыта в школе.

Работа 9. Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла на реакцию переноса водорода (по А. А. Гуревичу)

В 1948 г. академик А. А. Красновский простым опытом доказал, что хлорофилл в фотосинтезе является участником и инициатором окислительно-

восстановительных реакций, т.е. выполняет роль фотосенсибилизатора окислительно-восстановительной реакции переноса электрона от первичного донора к первичному акцептору. Эту реакцию можно наблюдать в модельных системах с использованием искусственных доноров и акцепторов электронов. В качестве донора электронов чаще всего используется аскорбиновая кислота (АК), а в качестве акцептора – какой-нибудь краситель, который в восстановленном состоянии переходит в лейкоформу, например метиловый красный (МК):

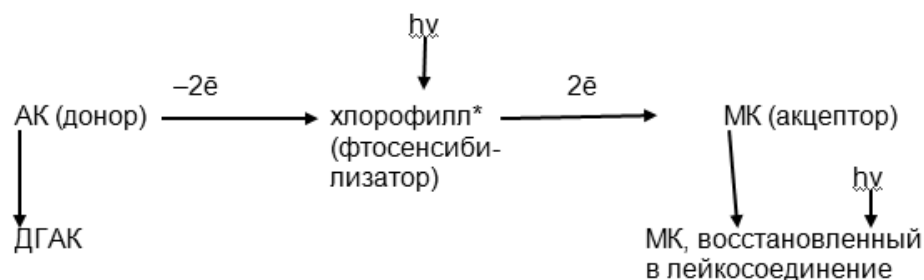


AKH₂ – аскорбиновая кислота; М – метиловый красный; МКН₂ – лейкоформа метилового красного; Хл – хлорофилл.

АК способна к необратимой окислительно-восстановительной реакции с образованием дигидроаскорбиновой кислоты (ДГАК), что сопровождается переносом электрона к акцептору.

В этом заключается важнейшая функция АК в клетках живых организмов, где она выступает в качестве источника энергии, отдавая электроны и протоны в дыхательную электрон-транспортную цепь (ЭТЦ). Окислительно-восстановительный потенциал (E₀) АК равен 0,1эВ (при pH 5,75). АК является восстановителем, а в данной реакции – донором электронов.

МК также обладает окислительно-восстановительными свойствами, его E₀=0,8эВ. Являясь окислителем, МК в силу большой разницы потенциалов (ΔE₀=0,7эВ) не может окислить АК спонтанно. Однако осуществить восстановление может с помощью фотосенсибилизатора, т.е. вещества, использующего энергию света и стимулирующего химическую реакцию, но не участвующего в ней. Транспорт ē в окислительно-восстановительной реакции с участием фотосенсибилизатора (возбужденного хлорофилла) можно представить в виде схемы:



В тилакоидной мембране хлоропласта благодаря высокоэнергетическому электрону (e) хлорофилл обладает свойствами сильного восстановителя и может восстанавливать редокс-системы с большим отрицательным потенциалом. Отдаваемый при этом электрон остается высокоэнергетичным и может свою энергию потратить на последующие окислительно-восстановительные реакции, направленные на переброс протонов с наружной стороны мембраны тилакоида на внутреннюю для последующего синтеза АТФ.

Цель: с помощью модельного опыта продемонстрировать фотосенсибилизирующую активность хлорофилла.

Объекты: зеленые листья любых растений.

Реактивы и оборудование: лампа 100W, штатив, пробирки, ступка, пестик, черная бумага, этанол, кристаллическая аскорбиновая кислота, насыщенный спиртовой раствор метилового красного.

Ход работы

Приготовить спиртовой раствор хлорофилла (см. работу 5 раздела 4).

Если окраска раствора окажется слишком темной и потому плохо различимой, то его следует разбавить спиртом, чтобы зеленый цвет хлорофилловой вытяжки стал прозрачным. Общий объем вытяжки должен быть около 15 мл.

Опыт закладывают в пяти вариантах (смотреть таблицу 4.9).

Таблица 4.9 – Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла

Вариант опыта	Компоненты среды и освещенность	Первоначальный цвет	Изменение цвета	Причины изменения цвета или их отсутствия
1	Хл + МК + АК + $h\nu$			
2	Хл + МК + АК + темнота			
3	Хл + МК + $h\nu$			
4	Хл + АК + $h\nu$			
5	Этанол + МК + АК + $h\nu$			

Берут 5 пробирок. В первые 4 пробирки наливают по 3 мл спиртовой вытяжки хлорофилла, а в 5-ую – 3 мл этанола. Затем в пробирки 1, 2, 3 добавляют одинаковое количество спиртового раствора метилового красного (МК), пока зеленая окраска не приобретет бурый цвет. В пробирку 5 добавляют такое количество МК, пока зеленая окраска не приобретет красный цвет (много добавлять МК не следует).

В пробирки 1, 2, 4 и 5 добавляют по 30 мг (на кончике скальпеля) кристаллической аскорбиновой кислоты (АК) и встряхивают. Во 2 варианте пробирку закрывают черной бумагой.

Штатив с пробирками ставят непосредственно перед яркой лампой, поместив между ними сосуд с водой с плоскопараллельными стенками, чтобы предотвратить нагрев растворов.

Через 20 мин от начала экспозиции в одной пробирке происходят изменения, и раствор снова приобретает зеленую окраску, так как метиловый красный восстанавливается в лейкосоединение, и только хлорофилл обеспечивает зеленый цвет раствора. В остальных вариантах опыта красная и красно-бурая окраски не изменяются.

Зарисуйте пробирки в конце опыта, после изменения окраски в одном из вариантов. Сделайте выводы о фотосенсибилизирующей активности хлорофилла, роли АК, МК и света.

Работа 10. Накопление первичного крахмала в клетках C_3 - и C_4 -растений

Растения, у которых первым стабильным продуктом фотосинтеза является трехуглеродное соединение – 3-фосфоглицериновая кислота (3-ФГК), называют C_3 -растениями. Растения, у которых первыми продуктами фотосинтеза являются четырехуглеродные органические кислоты – щавелевоуксусная и яблочная, называют C_4 -растениями.

Анатомическая структура листьев C_3 -растений представлена мезофиллом (либо клетками столбчатой и губчатой паренхимы, либо несколькими слоями столбчатой паренхимы). У них во всех фотосинтезирующих клетках функционирует цикл Кальвина и поэтому во всех клетках листа образуется первичный крахмал.

Для C_4 -растений характерна особая структура листа. В нем структурно и функционально различают клетки мезофилла и обкладки проводящих пучков. В клетках мезофилла проходит цикл Хэтча-Слэка, в клетках обкладки – цикл Кальвина. Поэтому первичный крахмал у таких растений образуется только в клетках обкладки.

Цель: на срезах листовых пластинок C_3 - и C_4 -растений выявить клетки, в которых находятся хлоропласты, накапливающие первичный крахмал.

Объекты: листья C_4 -растений (кукурузы) и C_3 -растений (хлорофитума, традесканции), зафиксированные в солнечный день в 70% этаноле (перед фиксацией материал растения выдержать несколько часов на ярком свете).

Реактивы и оборудование: раствор Люголя, 30% раствор NaOH или KOH, покровные и предметные стекла, лезвие безопасной бритвы, стакан с водой, препаровальные иглы, пипетки, фильтровальная бумага, микроскопы.

Ход работы

Сделать продольные и поперечные срезы листьев C_3 - и C_4 -растений и поместить их на предметное стекло в каплю 30% раствора NaOH или KOH для просветления. Через 10–15 мин щелочь удалить фильтровальной бумагой, промыть препарат водой и капнуть раствор Люголя. Накрыть срезы покровным стеклом и исследовать их под микроскопом.

У кукурузы крахмал локализуется в клетках обкладки проводящих пучков и в клетках устьиц; в клетках между жилками (клетках мезофилла) крахмала нет. Поэтому на продольном срезе проводящие пучки с обкладкой четко выделяются как темные полосы, а на поперечном срезе клетки обкладки выглядят в виде темной короны, окружающей неокрашенные ткани ксилемы и флоэмы.

В листьях C_3 -растений крахмал находится во всех клетках мезофилла и в замыкающих клетках устьиц. Неокрашенными остаются только клетки эпидермы и сосудистые пучки.

Сделать выводы о локализации первичного крахмала в клетках листьев C_3 - и C_4 -растений, объяснить причину разной локализации крахмала.

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 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 *a* находится выше хлорофилла *b*?

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 *a* и *b* 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 *a* и *b*?

16. Как доказать необходимость света, углекислого газа для процесса фотосинтеза?

17. Каково положение главного максимума поглощения хлорофилла *b* 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 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 CO_2 , листья дуба выделяют его, у листьев ивы не

наблюдается ни его выделения, ни поглощения. 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 мг/дм²-ч, а поверхность листьев равна 2,5 м²?

25. За 20 мин побег, листовая поверхность которого равна 240 см², поглотил 16 мг СО₂. 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 СО₂, отмечается флюоресценция, тогда как в присутствии СО₂ флюоресценция прекращается. Как можно объяснить это явление?

31. За 30 мин. растение, листовая поверхность которого составляет 250 см² поглотило 20 мг СО₂. Рассчитайте интенсивность фотосинтеза.

32. За 40 минут побег с листовой поверхностью 300 см² выделяет 10 мг О₂. Определите интенсивность фотосинтеза.

33. Чему равна интенсивность фотосинтеза, если побег с листовой поверхностью 3 дм² за 45 минут накопил 15 мг сухого вещества.

34. Сколько органического вещества вырабатывает растение за 15 мин., 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 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 мг CO_2 за 3 часа.

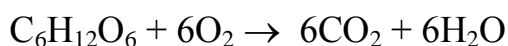
Тема 5. ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ

Работа 1. Определение дыхательного коэффициента

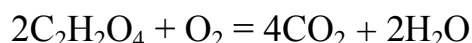
Дыхательный коэффициент (ДК) – отношение выделенного при дыхании количества углекислого газа к количеству поглощенного кислорода:

$$\text{ДК} = \frac{V_{\text{CO}_2}}{V_{\text{O}_2}}$$

Величина ДК в значительной мере зависит от природы окисляемого субстрата, а именно от степени его окисленности. При окислении углеводов она равна единице, что очевидно из уравнения ($\text{ДК} = 6\text{CO}_2/6\text{O}_2 = 1$):



Если дыхательным материалом служат вещества более окисленные, чем углеводы, например органические кислоты, то кислорода поглотится меньше, чем выделится углекислого газа, и ДК будет больше 1 ($\text{ДК} = 4\text{CO}_2/\text{O}_2 = 4$):



Если же вещества окислены меньше углеводов (жиры, жирные кислоты, некоторые белки и аминокислоты), ДК будет меньше 1. Перечисленные соединения более восстановленные, эффективнее углеводов и органических кислот в энергетическом отношении:



$$(\text{ДК} = 18\text{CO}_2/26\text{O}_2 = 0,7).$$

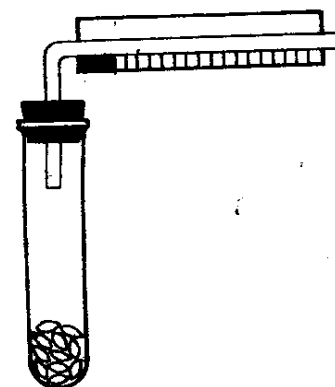
Величина ДК зависит также от количества кислорода, поступающего к тканям, от состояния организма и фазы онтогенеза, от вида растения и характера запасных веществ (таблица 5.1).

Удобным объектом для определения ДК являются прорастающие семена, содержащие в преобладающем количестве белки, жиры или углеводы. Однако следует иметь в виду, что в процессе прорастания изменяется химическая природа субстратов дыхания и ДК не останется постоянным.

Таблица 5.1 – Примерные величины ДК семян различных растений

Вид растения	ДК
Кукуруза	0,73
Пшеница	0,61
Ячмень	0,74
Подсолнечник	0,55
Горох	0,85
Бобы	0,35
Люпин	0,76
Лен	0,33
Тыква	0,64
Гречиха	0,47

Определение ДК в других органах из-за наличия в них разнообразных субстратов дыхания не дает четких результатов. ДК определяется с помощью несложного прибора, состоящего из пробирки с каучуковой пробкой, в которую вставлена изогнутая под прямым углом капиллярная трубка.



Если на трубке нет делений, то к ней с помощью двух резиновых колечек прикрепляют полоску миллиметровой бумаги (рисунок 5.1). Прибор должен находиться в стабильных температурных условиях.

Рисунок 5.1 – Прибор для определения ДК

Цель: определить субстрат дыхания прорастающих семян различных растений по величине дыхательного коэффициента.

Объекты: наклюнувшиеся семена бобовых, масличных, злаковых культур.

Реактивы и оборудование: концентрированный раствор КОН или NaOH, стеклянные пробирки с каучуковыми пробками, в которые вставлены капиллярные трубки, изогнутые под прямым углом, полоски фильтровальной и миллиметровой бумаги, резиновые колечки, пинцеты, пипетки с оттянутым носиком, шприцы.

Ход работы

Наполнить пробирку на 2/3 проросшими семенами, плотно закрыть пробкой с измерительной трубкой и поместить в условия с постоянной температурой. Через 10 мин, когда температура в пробирке стабилизируется, в горизонтальную трубку пипеткой с оттянутым носиком ввести каплю воды на расстоянии 1–1,5 см от края трубки.

Изменение положения капли зависит от изменения объема газа в пробирке, т.е. от соотношения выделенного CO_2 и поглощенного O_2 . Если их количества равны, капля останется на месте ($\text{ДК} = 1$). Если CO_2 больше, чем O_2 , капля будет двигаться вправо, к концу трубки ($\text{ДК} > 1$). Если же CO_2 меньше O_2 , капля будет двигаться в сторону пробирки ($\text{ДК} < 1$).

Как только капля начнет двигаться, отметить начальное положение мениска и засечь время. Каждые 3 мин отмечать положение мениска и рассчитать среднюю скорость движения капли. Если она смещается к концу трубки, то скорость ее движения (**A**) соответствует разнице объема выделенного CO_2 и поглощенного O_2 : $A = V_{\text{CO}_2} - V_{\text{O}_2}$ (1).

Если капля движется в сторону пробирки, то скорость соответствует разнице: $A = V_{\text{O}_2} - V_{\text{CO}_2}$ (2).

Определив **A**, открыть пробирку, проветрить ее, удалить каплю воды из трубки (выдуть с одного конца и впитать фильтровальной бумагой с другого).

После этого полоску фильтровальной бумаги свернуть в кольцо, равное диаметру пробирки, и, держа его пинцетом, смочить в концентрированном растворе щелочи. Вложить кольцо в верхнюю часть пробирки так, чтобы оно не касалось семян и пробки. Затем в горизонтальное колено трубки снова ввести каплю воды и определить среднюю скорость ее движения. Теперь образованный при дыхании семян CO_2 поглощается щелочью и средняя скорость движения капли (**B**) равна: $B = V_{\text{O}_2}$ (3).

Преобразуя уравнения 2 и 3, находим, что $V_{\text{CO}_2} = B - A$ (4).

Отсюда соотношение объемов выделенного CO₂ и поглощенного O₂, выраженное через значение скоростей движения капли, т.е. ДК, равно:

$$DK = \frac{V_{CO_2}}{V_{O_2}} = \frac{B - A}{B} \quad (5).$$

Результаты определения записать в таблицу 5.2.

Таблица 5.2 – Определение ДК семян _____
(указать вид растения)

Скорость движения капли, мм /мин								B – A	ДК
без щелочи (A)				со щелочью (B)					
1	2	3	среднее	1	2	3	среднее		

Сводную таблицу по величине дыхательного коэффициента семян различных растений записать по образцу таблицы 5.3.

Таблица 5.3 – Дыхательный коэффициент и субстраты дыхания семян различных растений

Вид растения	Преобладающее запасное вещество семян	ДК семян	Субстрат дыхания

Проанализировать полученные результаты. Изменяется ли химическая природа субстратов дыхания в процессе прорастания семян?

Сделать вывод о зависимости ДК от вида дыхательного субстрата исследуемых семян.

Работа 2. Органические вещества растений и их превращения при прорастании семян

При прорастании семян сложные запасные вещества (белки, жиры, углеводы) под действием соответствующих ферментов превращаются в более простые. Последние легче вовлекаются в различные химические процессы и

используются на дыхание, рост и развитие проростка. Так как метаболическая взаимосвязь белков, жиров и углеводов осуществляется через цикл Кребса или глиоксилатный цикл, то при прорастании семян можно обнаружить, что одни вещества превращаются в другие, например, жиры, белки – в углеводы, полисахара – в моносахара и т.д.

Чтобы установить, каким превращениям подвергаются запасные вещества при прорастании семян, необходимо определить их химический состав до и после прорастания. Проращивание семян следует проводить в темноте для исключения образования новых органических веществ.

Цель: установить, каким превращениям подвергаются запасные вещества при прорастании семян.

Объекты: сухие и проросшие семена злаковых (пшеница, ячмень, рожь), бобовых (фасоль, люпин, горох) и масличных (лен, подсолнечник) культур.

Реактивы и оборудование: реактив Фелинга, раствор I в KI, раствор краски судан III, пробирки, пипетки на 5 мл с делениями, цилиндры на 10 мл, воронки, фарфоровые ступки, бумажные фильтры, штативы для пробирок, водяная баня.

Ход работы

Взять 2–3 г проросших семян различного состава (крахмалистые, белковые, маслянистые) растереть в фарфоровой ступке, залить 10 мл теплой воды и нагреть на кипящей водяной бане в течение 10 мин.

Непроросшие (сухие) размолотые семена насыпать в сухие пробирки (на 1,5 см), залить 10 мл теплой водой и также нагреть на кипящей водяной бане в течение 10 мин. При этом происходит экстракция редуцирующих сахаров.

По истечении указанного времени профильтровать через увлажненный складчатый фильтр в чистые пробирки так, чтобы количество фильтрата во

всех было одинаковым. Добавить к фильтрату равное количество реактива Фелинга и нагреть на кипящей водяной бане (5 мин).

По количеству образовавшейся закиси меди дать оценку (в баллах) содержания в материале *редуцирующих сахаров*.

К оставшемуся на фильтре материалу (мезга) добавить 5–6 капель йода и оценить (в баллах) содержание *крахмала* или продуктов его расщепления.

Оценку содержания *липидов* в проросших и непроросших семенах исследуемых растений можно проводить несколькими способами. Первый способ основан на окрашивании каплей жира краской судан III. Для этого необходимо сделать срезы непроросших и проросших семян маслянистых растений, поместить на предметные стекла в капли раствора краски судан III, накрыв покровными стеклами. Через 5 минут промыть срезы водой, рассмотреть в микроскоп и дать оценку содержания жира – по количеству и размеру каплей, окрашенных в красный или оранжевый цвет.

Можно использовать и более простой способ оценки содержания липидов. Сухие и проросшие семена поместить на куски фильтровальной бумаги, раздавить их пестиками, подсушить бумагу и рассмотреть на свет масляные пятна.

Результаты записать в таблицу 5.4.

Таблица 5.4 – Органические вещества растений и их превращения при прорастании семян

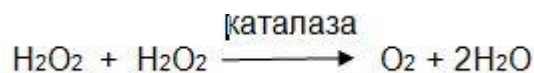
Вид семян	Содержание, балл					
	непроросшие семена			проросшие семена		
	крахмал	редуцирующие сахара	жиры	крахмал	редуцирующие сахара	жиры
Крахмалистые						
Белковые						
Маслянистые						

Обратить внимание на наличие в непроросших семенах разных видов (крахмалистых, белковых, маслянистых) углеводов и их появление (исчезновение) в проросших семенах. Объяснить возникновение углеводов в прорастающих семенах, которые ранее не содержались в сухих семенах. Объяснить превращения веществ исходя из взаимосвязи углеводного, белкового и жирового обменов.

Сделать вывод о характере запасных веществ в исследуемых семенах.

Работа 3. Обнаружение активности каталазы в растительном материале

Фермент каталаза относится к классу оксидоредуктаз. Он представляет собой железопротеид. Небелковая часть, как у пероксидазы, представлена железопорфирином. Деятельность каталазы в живой клетке сопряжена с активностью флавопротеидов – важнейшего звена ЭТЦ дыхания. Каталаза расщепляет токсичную для живой клетки перекись водорода, образующуюся как побочный продукт деятельности флавопротеидов в пероксисомах. Реакция идет согласно уравнению:



Полагают, что в очень мясистых тканях, лишенных достаточного доступа кислорода, каталаза играет роль поставщика последнего, генерируя его из перекиси водорода.

Цель: обнаружить и сравнить активность каталазы в различном растительном материале.

Объекты: листья комнатных растений разного возраста; сухие, набухшие и наклюнувшиеся семена ячменя; проростки различных двудольных растений; клубни и корнеплоды.

Реактивы и оборудование: 3% H_2O_2 , песок для растирания ткани, пробирки, цилиндры на 10 мл, фарфоровые ступки с пестиком, воронки, пробочные сверла, держатели и штативы для пробирок.

Ход работы

Из листа растения пробочным сверлом диаметром 1 см сделать 5 высечек, не захватывая крупные жилки. При работе с мясистыми органами растений (клубни, корнеплоды) перед тем как делать высечки, следует нарезать ткань пластинками толщиной 4–5 мм. Диски растереть в ступке с добавлением небольшого количества воды (до 1 мл). Если ткань жесткая, добавить немного песка. К растертой кашице прилить 5 мл воды тщательно перемешать и профильтровать в чистую пробирку через увлажненный складчатый фильтр. Для работы достаточно 3–4 мл вытяжки фермента.

Добавить к вытяжке 2 мл 3% перекиси водорода. В результате разложения перекиси водорода ферментом выделяются пузырьки кислорода, дающие хорошо заметную пену. Для сравнения активности каталазы в различных объектах следует брать равное по сухой массе количество материала.

Активность фермента оценить в баллах: интенсивное образование пены – 4 балла, умеренное – 3, слабое – 2, очень слабое – 1 балл, отсутствие активности – 0 баллов.

Результаты записать в таблицу 5.5.

Таблица 5.5 – Определение активности каталазы в различных растительных объектах

Объект исследования	Вариант опыта	Активность каталазы, балл

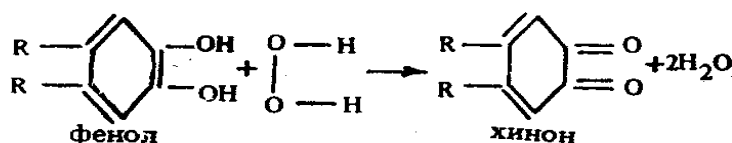
Сравнить активность каталазы в различных растительных образцах:

- 1) в молодых, зрелых и старых листьях;
- 2) в зрелых листьях различных видов растений (хлорофитум, узумбарская фиалка, пеларгония);
- 3) в различных органах растения (корень, стебель, лист);
- 4) в наружных и внутренних частях мясистых органов растений (клубни, корнеплоды);
- 5) в сухих, набухших и наклюнувшихся семенах ячменя.

Используя активность каталазы как косвенный показатель интенсивности дыхания, сделать вывод о зависимости активности каталазы и (косвенно) интенсивности дыхания от изучаемых внутренних и внешних факторов.

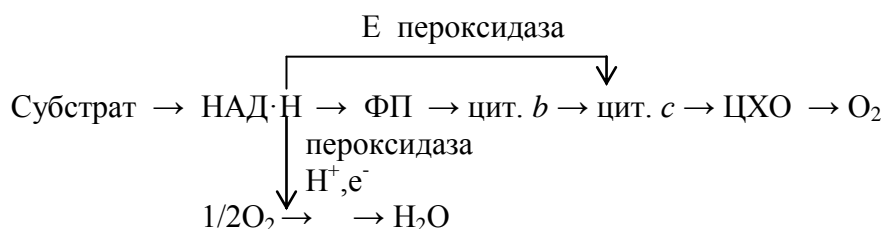
Работа 4. Обнаружение активности пероксидазы

Пероксидаза является протеидом, состоящим из белка и простетической группы – железопорфирина. Установлено, что пероксидаза катализирует окисление различных циклических (фенолы, ароматические амины) и гетероциклических соединений кислородом перекиси водорода. Реакция идет согласно уравнению:



Перекись водорода образуется в клетке как побочный продукт каталитической деятельности флавиновых дегидрогеназ в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) дыхания. Таким образом, деятельность пероксидазы по утилизации токсичной для клетки перекиси водорода косвенно связана с ЭТЦ дыхания.

Вместе с тем установлено, что пероксидаза способна функционировать как типичная оксидаза, катализируя окисление субстрата кислородом воздуха:



Так, пероксидаза с одной стороны, может окислять кислородом воздуха НАД·Н, с другой – передавать электроны, полученные от него, на различные акцепторы (например, на цитохром *c*). В обоих случаях пероксидаза является звеном ЭТЦ дыхания.

Пероксидаза обнаружена практически во всех органоидах клетки и в цитоплазме. Ее легко выделить растиранием растительной ткани в воде или ацетатном буфере (рН 5,4). Обнаружение активности пероксидазы основано на ее способности в присутствии H_2O_2 окислять бесцветные фенольные соединения до окрашенных хинонов.

Цель: обнаружить и сравнить активность пероксидазы в различных растительных объектах

Объекты: листья разного возраста, проростки растений, клубни, корнеплоды, сухие и наклюнувшиеся семена.

Реактивы и оборудование: 0,3% H_2O_2 , 1,5% раствор бензидина, пробирки, воронки, пипетки на 2 мл, штативы для пробирок, ступки фарфоровые, лезвия, фильтровальная бумага.

Ход работы

При определении активности пероксидазы растительную ткань (около 200 мг) растереть в ступке с 5 мл воды. Полученную смесь профильтровать в пробирку через увлажненный складчатый фильтр. Для сравнения активности пероксидазы в различных объектах следует брать равное по сухой массе количество материала. Количество фильтрата (вытяжки) должно быть около 2 мл.

К этой вытяжке добавить 2 мл 0,3% перекиси водорода и 2 мл 1,5% раствора бензидина. Встряхнуть пробирку и через 30 секунд определить интенсивность посинения по 4-балльной шкале: интенсивное – 4 балла, умеренное – 3, слабое – 2, очень слабое – 1 балл, отсутствие посинения – 0 баллов.

Результаты записать в таблицу 5.6.

Таблица 5.6 – Определение активности пероксидазы в различных растительных объектах

Объект исследования	Вариант опыта	Активность пероксидазы, балл

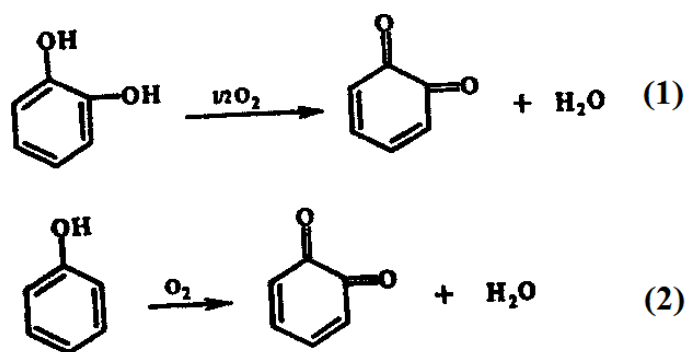
Изучить активность пероксидазы в зависимости от:

- 1) степени прорастания семян (сухие, наклюнувшиеся);
- 2) видовой специфики запасующей ткани разных видов растений (мякоть картофеля, яблока, моркови);
- 3) типа ткани определенного органа (кожура, глазки, мякоть клубня картофеля);
- 4) возраста листа (молодой, зрелый, старый).

Сделать вывод об активности пероксидазы в исследуемых объектах.

Работа 5. Определение активности полифенолоксидазы в растительных тканях (по А.Н. Бояркину)

Полифенолоксидаза (ПФО), известная также как катехолоксидаза, фенолоксидаза или о-дифенол: кислород оксидоредуктаза катализирует окисление о-дифенолов до о-дихинонов (дифенолоксидазная, или катехолазная, активность; уравнение 1), а также о-гидроксилирование монофенолов (монофенолгидроксилазная, или крезолозная, активность; уравнение 2).



Только ПФО способна осуществлять о-гидроксилирование фенолов. Обычно в норме дифенолоксидазная активность значительно превышает монофенолгидроксилазную активность этого фермента. Гидроксилирование и окисление составляют две главные реакции в синтезе и расщеплении фенолов растения

Полифенолоксидаза – медьсодержащий фермент, субстратами которого могут быть катехол, хлорогеновая, галловая кислоты, пирокатехин и другие о-дифенолы. Полагают, что ПФО осуществляет окисление по одноэлектронному механизму. Это сопряжено с образованием свободных радикалов субстратов реакции, а также, возможно, с возникновением активированных форм кислорода. Оптимум активности рН лежит в довольно широких пределах (рН 5,0–7,0). Характерной особенностью фермента является низкое сродство к кислороду, поэтому для выявления максимальной активности фермента необходима хорошая аэрация субстратов.

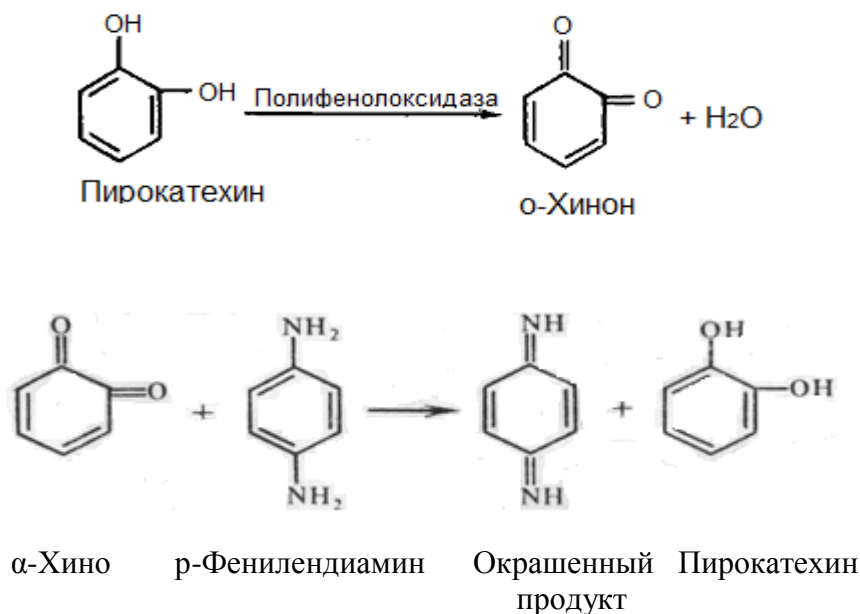
Катехолоксидаза – наиболее изученная и превалирующая форма фенолоксидазы в растениях. В клетках высших растений ПФО локализована в основном в пластидах всех типов и находится в латентном состоянии (прополифенолоксидаза). Активация латентной формы ПФО происходит при действии детергентов, жирных кислот, протеаз и некоторых других воздействиях.

Физиологическая роль ПФО остается недостаточно ясной. Показано изменение ее активности в онтогенезе растений (активация ПФО при старении), при повреждениях и патогенезе.

Активность ПФО может быть определена измерением скорости окисления фенолов (в ультрафиолетовой области спектра) или по образованию окрашенных продуктов. Однако механизм реакции сложен; он связан с образованием ряда последующих полимерных продуктов, поэтому определение активности фермента по скорости развития окраски в реакционной смеси возможно лишь на коротком начальном этапе реакции.

Более удачным является определение активности ПФО по развитию окраски в окислительно-восстановительных реакциях, сопряженных с окислением фенолов. С этой целью используют систему пирокатехин-р-фенилендиамин или пирокатехин-диэтил-о-фенилендиамин.

Реакция протекает следующим образом:



Цель: определить активность полифенолоксидазы в различных частях растений и изменение ее активности с возрастом растительных тканей.

Объекты: листья и корни проростков гороха различного возраста.

Реактивы и оборудование: 0,07М фосфатный буфер, рН 7,0–7,4, свежеприготовленный 1% раствор пирокатехина, свежеприготовленный 0,02% раствор диметил-о-фенилендиамина в воде, фарфоровые ступки с пестиком, мерные колбы объемом 25 мл, стеклянные стаканы объемом 50 и 100 мл,

средние стеклянные воронки, пипетки объемом 2 и 5 мл, автоматические пипетки, бумажные фильтры, ФЭК или спектрофотометр, стеклянные кюветы.

Ход работы

Навеску растительного материала (250–500 мг) растереть в ступке с небольшим количеством (10–15 мл) фосфатного буфера. Растертую массу перенести количественно в мерную колбу, довести буфером точно до метки, хорошо перемешать и оставить на 10–15 мин. Затем раствор отфильтровать через двойной бумажный фильтр или отцентрифугировать в течение 10 мин при 4000 об/мин. Фильтрат (или надосадочную жидкость) использовать для определения активности фермента.

Активность фермента исследуют фотометрически на ФЭКе ($\lambda = 590$ нм). Об активности фермента судят по времени развития окраски до определенной оптической плотности (значение оптической плотности (D) выбирают в зависимости от скорости образования окраски в пределах от 0,025 до 0,4).

Для анализа каждой биологической пробы используют три одинаковые кюветы для ФЭКа: одну контрольную и две опытные (две аналитические повторности из одной биологической пробы). Во все три кюветы вносят 2 мл вытяжки, 2 мл буферного раствора и 2 мл диметил-о-фенилендиамина.

Затем в контрольную кювету приливают 2 мл воды, устанавливают ее в контрольную (дальнюю) подставку ФЭКа и вводят в световой луч. Закрывают кюветную камеру и ручками грубой и тонкой регулировки устанавливают ноль на шкале оптической плотности по контрольному образцу.

Одну из опытных кювет ставят в держатель и вводят ее в световой луч. Автоматической пипеткой добавляют в опытную кювету 2 мл раствора пирокатехина и *одновременно* включают секундомер. Пробу хорошо перемешивают стеклянной палочкой. Затем закрывают кюветную камеру и следят за развитием окраски по шкале оптической плотности. Замечают по секундомеру время достижения необходимой оптической плотности.

Аналогичные изменения производят и для второй опытной кюветы.

Расчет активности ведут по формуле:

$$A = \frac{D\alpha\beta\gamma}{td}, \text{ где}$$

A – активность фермента (относительные единицы на 1 г сырой массы за 1 с); D – зарегистрированная в опыте оптическая плотность; t – время, с; d – толщина кюветы, см; α , β , γ – факторы разведения: α – отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки (мл к массе навески, г); β – степень дополнительного разведения вытяжки после центрифугирования (если это требовалось); γ – степень постоянного разведения вытяжки в кювете (в наших условиях равна 4).

Результаты записать в таблицу 5.7.

Таблица 5.7 – Активность полифенолоксидазы в растительных тканях

Объект исследования	Вариант опыта	Оптическая плотность (D)	Активность фермента, ед/г·с

Проанализировать полученные результаты.

Сделать вывод об активности полифенолоксидазы в различных растительных объектах.

Работа 6. Обнаружение активной амилазы в растительном материале

Запасные вещества растений (крахмал, белки, жиры и другие высокополимерные соединения) обладают относительно низкой химической активностью. При прорастании семян, корневищ, клубней они гидролизуются до простых и более активных веществ. Этот процесс осуществляется с участием специфических ферментов – гидролаз.

Гидролитический распад запасного крахмала может протекать при участии четырех видов гидролаз: α -амилазы, β -амилазы, глюкоамилазы и амилопектин-1,6-глюкозидазы. Фосфоролитический распад ассимиляционного крахмала осуществляется ферментом α -глюканфосфорилазой. По мере набухания сухих семян в период прорастания активность гидролитических

ферментов возрастает, при этом содержание крахмала снижается, а сахаров возрастает.

Крахмал состоит из остатков глюкозы $(C_6H_{10}O_5)_n$ и представляет собой смесь двух полимеров: амилозы и амилопектина. Амилоза – линейный полимер, амилопектин – полимер с многократно разветвленной цепью. В связи с особенностями строения гидролиз этих соединений под действием амилазы протекает по-разному. Амилоза сразу расщепляется на молекулы дисахара мальтозы, амилопектин – постепенно, через декстрины (ряд промежуточных продуктов со все более укороченной цепью). Дальнейшее расщепление мальтозы до глюкозы осуществляется уже другим ферментом – мальтазой.

Степень гидролиза крахмала определяется по реакции декстринов с йодом. Крахмал при этом дает синий цвет, а продукты его начального расщепления – амилодекстрины – фиолетовый, эритродекстрины – красный, ахродекстрины – оранжевый, продукты же глубокого гидролиза – мальтодекстрины и мальтоза – не дают реакции с йодом и принимают цвет его раствора.

В покоящихся семенах и других запасующих органах (клубни, корнеплоды) активность амилазы незначительна. При их прорастании она во много раз возрастает. Причем высокая активность фермента обнаруживается там, где в качестве запасного вещества откладывается крахмал. В органах, содержащих другие запасные вещества, этот фермент менее активен или вовсе не обнаруживается.

Цель: обнаружить активную амилазу в растительном материале.

Объекты: сухие и проросшие семена злаков, бобовых и масличных культур.

Реактивы и оборудование: 0,1, 0,5 и 2% крахмальный клейстер, 20% HCl, стандартный разбавленный раствор I_2 в KI, подогретая вода (35–40⁰C),

глицерин, пробирки, воронки, пипетки на 1 мл, штативы для пробирок, цилиндры на 10 мл, ступки фарфоровые, пипетки на 5 мл, бумажные фильтры.

Ход работы

Для обнаружения активности амилазы используют проросшие семена. В качестве контроля берут сухие семена тех же растений. Для лучшей экстракции фермента желательно пользоваться размельченным материалом.

Для приготовления вытяжки фермента в одну ступку берут 4 г размельченных проросших семян, в другую – 2 г непроросших (сухих) семян. Заливают в каждую по 20 мл теплой воды (35–40°C), добавляют 1–3 капли глицерина, перемешивают, встряхивают содержимое и настаивают 30 мин. Затем смесь фильтруют в чистые пробирки через складчатый фильтр, смоченный водой.

Пока извлекается фермент, в штатив ставят 2 ряда пробирок по 8 шт. В первые пробирки каждого ряда наливают по 10 мл 0,5% крахмального клейстера, в остальные семь пробирок – по 5 мл раствора йода.

В первые пробирки обоих рядов добавляют по 3 мл экстракта амилазы из проросших и непроросших семян, тщательно перемешивают, встряхивают и получают *реакционную смесь*.

Затем по 1 мл реакционной смеси переносят пипеткой в первую пробирку с йодом соответствующего ряда. Пипетки оставляют в пробирках с реакционной смесью. Далее через каждые 2 мин по 1 мл реакционной смеси вносят в следующие пробирки с йодом соответствующего ряда (по возможности одновременно).

Степень гидролиза крахмала прямо пропорциональна продолжительности действия на него фермента. Однако, в зависимости от активности последнего в проросших и непроросших семенах получают различные продукты

расщепления крахмала, что видно по окраске содержимого одинаковых по счету пробирок в каждом ряду.

Если окажется, что активность фермента невелика, то для получения полного набора продуктов расщепления крахмала необходимо увеличить количество вытяжки фермента или время взаимодействия его с крахмалом (до 5 мин). При низкой активности фермента изменение окраски реакционной смеси в пробирке под действием йода может маскироваться синим цветом, вызванным избытком нерасщепленного крахмала. В этом случае вместо 0,5% крахмального клейстера берут 0,2%.

Если гидролиз за время опыта (например, 12 мин) не прошел до конца, что определяется по окраске декстринов, в последней графе отмечают низкую активность фермента.

Провести гидролиз и полученные данные записать в таблицу 5.8.

Таблица 5.8 – Определение активности амилазы в семенах _____
(указать вид растения)

Вариант опыта	Окраска продуктов гидролиза через интервалы времени, мин						Время гидролиза, мин		
	0	2	4	6	10	12	начало	конец	полный

Проанализировать полученные результаты, сравнив активность амилазы в сухих и проросших семенах.

Сделать вывод об активности амилазы в исследуемых объектах.

Работа 7. Влияние температуры на активность амилазы

Зависимость активности ферментов от температуры обычно выражается одновершинной кривой с максимум в пределах 40–60°C. Эти температуры оптимальны для большинства ферментов, хотя температурный оптимум для каждого в отдельности лежит в более узком пределе. Восходящий отрезок кривой свидетельствует о том, что с увеличением температуры скорость

ферментативной реакции, как и любой химической реакции, возрастает. Причиной этого является увеличение кинетической энергии молекул субстрата и фермента, а, следовательно, числа их соударений и взаимодействий. Но если для обычной химической реакции при увеличении температуры на 10°C скорость возрастает примерно в 2 раза, то для ферментативных реакций не существует постоянного значения Q_{10} , так как в данном случае эта зависимость несколько сложнее. При нагревании свыше 60°C наступает постепенная денатурация пространственной структуры белковой части фермента, в связи с чем, он теряет активность. Вместе с тем, имеются очень устойчивые к нагреванию ферменты, например рибонуклеазы, пероксидаза корней хрена, ферменты термофильных сине-зеленых водорослей.

Обнаружение температурной зависимости активности амилазы и сахарозы основано на том, что равные количества реакционной смеси (вытяжка фермента и субстрат) выдерживаются одинаковое время при различных температурах. По характеру образованных продуктов гидролиза судят о глубине расщепления субстрата, которая находится в прямой зависимости от активности фермента.

Цель: изучить влияние температуры на активность амилазы в растительном материале.

Объекты: проросшие семена злаковых и бобовых культур.

Реактивы и оборудование: 0,2% крахмальный клейстер, раствор йода, разбавленный в 10 раз, пробирки, пипетки на 1 мл с делениями, пипетки на 5 мл, цилиндры на 10 мл, ступки фарфоровые, воронки, штативы для пробирок, стаканы со снегом, стаканы с водой 45°C, термометры, бумажные фильтры, держатели для пробирок, спиртовки, водяная баня, кварцевый песок.

Ход работы

Приготовить вытяжку амилазы из проросших семян ячменя. Растереть в фарфоровой ступке примерно 5 г семян с небольшим количеством кварцевого песка, залить 30 мл теплой воды (35–40°C), смешать с 3–6 каплями глицерина, встряхнуть содержимое и настоять 30 мин. По истечении указанного времени вытяжку профильтровать через увлажненный складчатый фильтр в чистую пробирку.

Затем в 3 чистые пробирки налить по 5 мл 0,2% крахмального клейстера. Первую пробирку поставить в стакан со снегом (0°C), вторую оставить при комнатной температуре (22–23°C), третью поместить в водяную баню (40°C) на 10 мин.

Пока крахмальный клейстер приобретает температуру окружающей среды, в четвертую пробирку налить 3 мл вытяжки амилазы, прокипятить 3 мин на спиртовке (100°C), чтобы инактивировать фермент, и добавить 5 мл клейстера для получения реакционной смеси.

Через 10 мин в подготовленные ранее 3 пробирки с клейстером, выдержанные при различных температурах, добавить по 3 мл вытяжки фермента и встряхнуть для получения реакционной смеси.

Подготовить второй ряд пробирок – 4 пробирки и налить в каждую по 5 мл слабого раствора йода.

Из пробирок первого ряда с реакционной смесью через 5 мин после добавления фермента к крахмальному клейстеру, находящихся при разных температурах, взять по 1 мл и внести в пробирки второго ряда с йодом. Пробирки с реакционной смесью должны все время находиться в заданных температурных условиях. В связи с тем, что за исследуемое время полный гидролиз может не произойти, об активности фермента следует судить по окраске содержимого пробирок с раствором йода: фиолетовая – 1 балл, красная – 2, оранжевая – 3, желтая – 4 балла.

Полученные данные записать в таблицу 5.9.

Таблица 5.9 – Влияние температуры на активность амилазы семян _____
(указать вид растения)

Температура, °С	Окраска декстринов, балл
0	
22	
40	
100	

Используя данные таблицы, вычертить кривую зависимости активности фермента от температуры и сделать вывод о положении ее температурного оптимума.

Работа 8. Влияние рН среды на активность амилазы

Активность ферментов зависит от рН среды. Эта зависимость выражается кривой с максимумом, положение которого у разных ферментов существенно различается. Так, оптимум активности кислой фосфатазы лежит в пределах рН 3,0–4,0, хлорофиллазы – при рН 5,9, лиазы и рибонуклеазы – при рН 8,0. При значениях рН ниже или выше оптимума активность фермента падает. Это объясняется тем, что изменение соотношения концентрации ионов H^+ и OH^- (по сравнению с оптимальным) вызывает нарушение структуры белковой части фермента и, что особенно важно, его активного центра. Это приводит к частичной или полной инактивации фермента. Если же ионизирован и субстрат, то действие выражено еще сильнее.

Опыт по выяснению влияния рН на активность фермента заключается в том, что в реакционную среду, состоящую из субстрата и вытяжки фермента, вводится необходимое количество кислоты или щелочи для создания определенного рН. Можно пользоваться вытяжками фермента в буферных средах с разным значением рН. Через установленное время определяют активность фермента по характеру образующихся продуктов гидролиза.

Цель: изучить влияние рН среды на активность амилазы.

Объекты: проросшие семена ячменя.

Реактивы и оборудование: 0,1н растворы HCl и NaOH, 0,2% крахмальный клейстер, разбавленный раствор йода, пробирки, пипетки на 2 и 5 мл с делениями и без делений, водяная баня, штативы и держатели для пробирок.

Ход работы

Приготовить вытяжку амилазы из проросших семян ячменя (см. работу 7 раздела 5).

В штатив поставить в два ряда по 4 пробирки.

В четыре пробирки первого ряда налить по 4 мл 0,2%-ого крахмального клейстера. Создать необходимое значение pH, добавляя в первую пробирку 1 мл 0,1н HCl (pH 3), во вторую – 0,2 мл 0,1н HCl и 0,8 мл воды (pH 5,0), в третью – 1 мл воды (pH 7,0), в четвертую – 1 мл 0,1н NaOH (pH 9,0). Внести в каждую по 3 мл вытяжки фермента, перемешать и оставить на 15 мин при комнатной температуре.

Пока идет расщепление крахмала, в четыре пробирки второго ряда налить по 5 мл разбавленного раствора йода.

Через 15 мин из каждой пробирки с соответствующим значением pH взять по 1 мл реакционной смеси и внести в пробирки с йодом. По характеру продуктов гидролиза при различных значениях pH оценить активность фермента в баллах.

Результаты записать в таблицу 5.10.

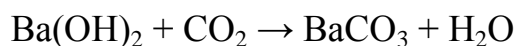
Таблица 5.10 – Влияние pH на активность амилазы семян _____
(указать вид растения)

pH	Продукты гидролиза (декстрины)		Активность амилазы, балл
	название	окраска	
3			
5			
7			
9			

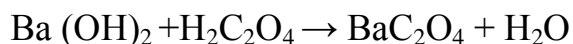
Построить график зависимости активности амилазы от pH и сделать вывод о значении pH, при котором амилаза максимальна активна.

Работа 9. Определение интенсивности дыхания семян в закрытых сосудах

Метод заключается в учете количества CO_2 , выделяемого сухими и проросшими семенами при дыхании. Процесс поглощения углекислого газа баритом можно записать в виде следующего уравнения:



Избыток барита, не прореагировавшего с CO_2 , оттитровывают щавелевой кислотой:



Цель: сравнить интенсивность дыхания сухих и прорастающих семян различных растений.

Объекты: сухие и проросшие семена различных растений.

Реактивы и оборудование: 0,1н раствор барита или $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 0,1н раствор щавелевой или соляной кислоты, 1% раствор фенолфталеина, 3 конические колбы на 0,5 л, 3 резиновые пробки с крючком, 3 стеклянных стаканчика на 50–100 мл, аналитические весы, марлевые мешочки.

Ход работы

В марлевые мешочки помещают по 4 г сухих и проросших семян. Прикрепляют мешочки к пробкам. Быстро отмеряют по 10 мл 0,1 н $\text{Ca}(\text{OH})_2$, наливают в 3 колбы и закрывают резиновыми крышками (рисунок 5.3).

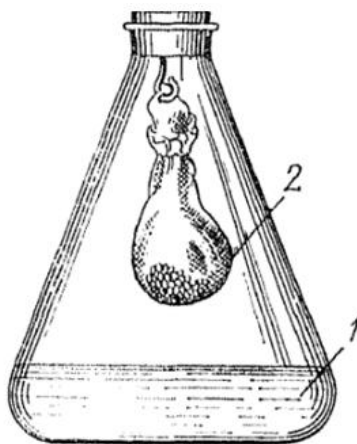


Рисунок 5.3 – Колба для определения интенсивности дыхания семян:

1 – раствор барита, 2 – марлевый мешочек с семенами

В первой колбе мешочка с семенами нет (контрольная колба). Во второй колбе к резиновой пробке прикрепляют мешочки с сухими семенами, в третьей – с проросшими. Выдерживают все три колбы в течение часа при комнатной температуре (20°C). В течение опыта колбы периодически аккуратно встряхивают, чтобы разрушить пленку CaCO₃, образующуюся на поверхности раствора и препятствующую полноте поглощения CO₂. Затем вынимают из колб мешочки с семенами, добавляют по 3 капли фенолфталеина. Закрывают и 20–30 мин встряхивают. После чего во всех трех колбах оттитровывают растворы 0,1н щавелевой или соляной кислотой до слабо-розового окрашивания, исчезающего от одной капли кислоты.

Интенсивность дыхания (мл CO₂ на 1 г сухих семян за 1 ч), рассчитывают по формуле:

$$I = \frac{(a - b) \cdot 2,2}{n}, \text{ где}$$

a и b – количества 0,1н щавелевой кислоты, израсходованной на титрование барита соответственно в контрольном и опытных вариантах, мл, 2,2 – количество CO₂, соответствующее 1 мл 0,1н раствора щавелевой или соляной кислоты, n – масса сухих семян, г.

Результаты опыта записывают в таблицу 5.11:

Таблица 5.11 – Определение интенсивности дыхания семян _____
(указать вид растения)

Вариант опыта	Масса семян, г	Объем барита, мл	Количество HCl, пошедшей на титрование, мл	Интенсивность дыхания, мг CO ₂ /г семян за 1 ч

Проанализировать результаты. Есть ли отличия между дыханием сухих и проросших семян? Сделайте вывод о том, чем обусловлены отличия.

Работа 10. Интенсивность дыхания прорастающих семян

Процесс прорастания очень энергоемкий. Необходимая энергия выделяется в результате клеточного дыхания при разложении питательных веществ (углеводов, жиров и др. органических молекул), запасенных в семенах. При дыхании потребляется кислород и выделяется CO_2 .

Интенсивность дыхания сухих семян очень низкая. Добавление к сухим семенам воды сначала приводит к выделению газов, хранящихся в семенах, что никак не связано с дыханием. По мере повышения содержания воды в семенах, интенсивность дыхания существенно увеличивается.

Наблюдая за потреблением кислорода при прорастании семян, можно отметить несколько стадий: сначала семена набухают от проникающей в них воды. На этой стадии потребление кислорода растет очень быстро.

При набухании в семенах начинают развиваться корни и побеги. На этой стадии потребление кислорода стабилизируется. По мере развития ростка и удлинения корней и побегов оно снова усиливается.

Наконец, когда на ростке начинают развиваться листья, потребление кислорода уменьшается, так как на этой стадии энергетические запасы семени истощены.

Скорость прорастания и интенсивность дыхания зависят от абиотических факторов, включая температуру, уровень содержания кислорода и CO_2 , освещенность.

В этом эксперименте с помощью датчиков давления будет сравниваться скорость потребления кислорода сухими, набухшими и прорастающими семенами.

Едкий калий (KOH) используется для связывания CO_2 , выделяемого при дыхании. Так как CO_2 тяжелее воздуха, он оседает на дно пробирки и вступает в реакцию с KOH. Таким способом предотвращается накопление CO_2 в пробирке. Следовательно, единственной причиной изменения давления в ней при дыхании семян будет изменение содержания кислорода.

Цель: изучить интенсивность дыхания прорастающих семян различных растений.

Объекты: сухие, набухшие и проросшие семена различных растений.

Реактивы и оборудование: сухой КОН, ноутбук с регистратором данных Nova Link, датчик давления 150–1150 мбар, трехходовый кран, силиконовые трубки, пробирки на 50 мл, резиновые пробки, медицинские иглы №20, стеклянные бусинки (битое стекло).

Ход работы

1. Запустите программу MultiLab. Подсоедините датчики давления ко входам регистратора данных Nova Link: Вход 1 (1/ 0–1), Вход 2 (1/ 0–2) и Вход 3 (1/ 0–3).

2. Смонтируйте оборудование, как указано на схеме экспериментальной установки (рисунок 5.4). Медицинскую иглу №20 пропустите сквозь пробку так, чтобы ее острие немного выступало снизу. К верхнему концу иглы присоедините посредством короткой силиконовой трубки трехходовой кран. Датчик давления присоедините к крану через другую силиконовую трубку. Поверните кран так, чтобы его отверстие было расположено вертикально. В таком положении через кран будет проходить воздух. Чтобы перекрыть воздушный поток, поверните кран так, чтобы его отверстие стало горизонтальным.

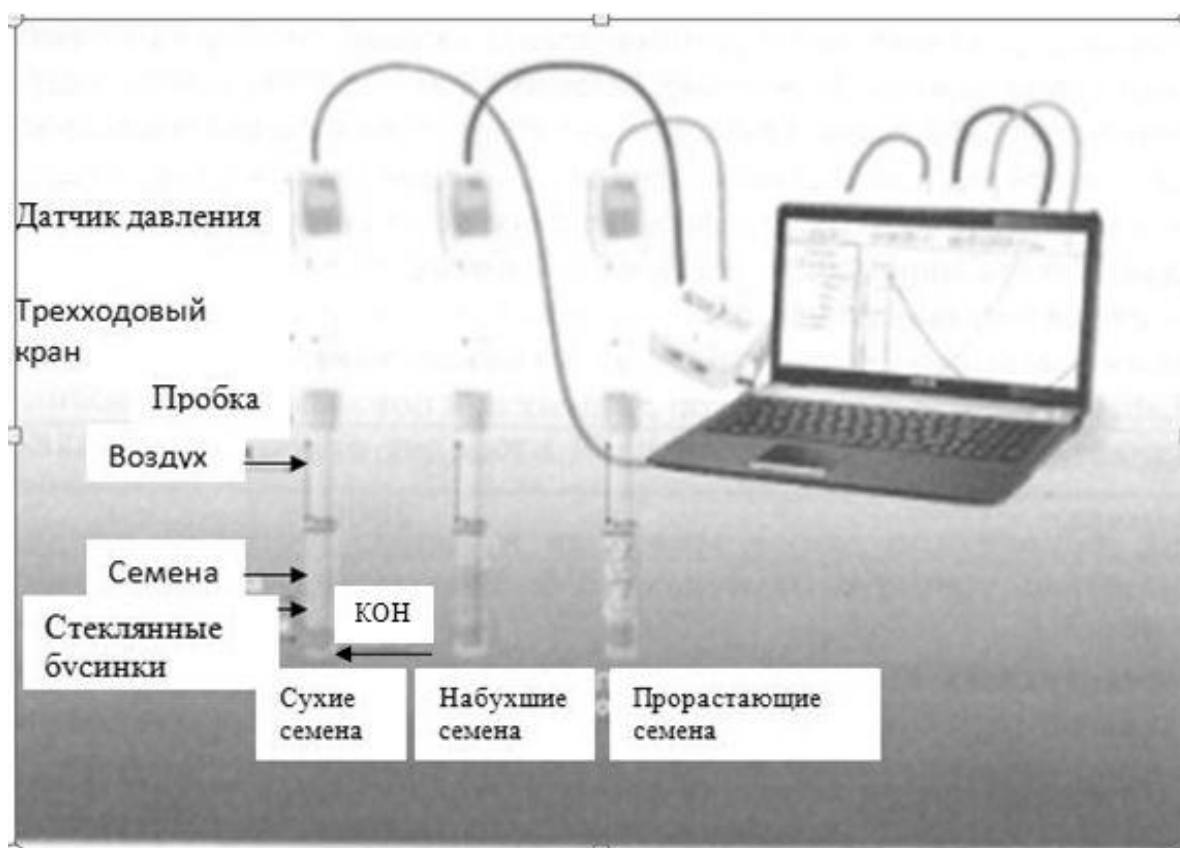


Рисунок 5.4 – Схема экспериментальной установки

Нажмите кнопку **Настройка** на основной панели инструментов программы MultiLab. Настройте регистратор данных как показано ниже:

Частота:	Каждую секунду
Замеры:	2000

Замеры производятся в течение 30 минут.

4. Пронумеруйте пробирки. Отметьте линией уровень 5 см от верха пробирок.

5. Поместите 3 г КОН на дно каждой пробирки. Насыпьте сверху на КОН достаточное количество стеклянных бусинок для полного исключения соприкосновения КОН и семян и взвесьте пробирки (M_1).

7. Поместите в одну пробирку сухие семена, во вторую – набухшие семена, в третью – проросшие семена до отмеченного на пробирках уровня. Подсчитайте количество семян в каждой пробирке и взвесьте пробирки (M_2).

8. Плотно закупорьте пробирки пробками с вставленными в них иглами во избежание утечки воздуха из пробирок и попадания в них воздуха извне.

9. Подсоедините к иглам краны и датчики. Если давление в пробирках меняется после закупоривания пробирок пробками, откройте кран и впустите в пробирки воздух, чтобы давление внутри пробирки сравнялось с атмосферным (около 100 кПа). Для прекращения доступа воздуха в пробирки закройте край. Перед началом эксперимента убедитесь, что давление внутри пробирок поддерживается на уровне атмосферного.

10. Для начала регистрации данных нажмите кнопку **Старт** на основной панели инструментов программы MultiLab. Следите за регистрируемыми данными давления в MultiLab.

11. Нажав кнопку **Стоп** в верхней панели инструментов, остановите запись данных.

12. После начала эксперимента, по мере того как давление в пробирках стабилизируется, остановите запись данных и начните сначала для нового варианта. Наблюдайте за изменениями давления в пробирках во время эксперимента.

13. Сохраните свои данные, нажав кнопку **Сохранить**.

14. Используйте линейное приближение для анализа каждой полученной прямой:

- ▶ с помощью кнопок **Первый курсор** выберите график,
- ▶ нажмите на кнопку **Линейное приближение** на основной панели инструментов. Уравнение аппроксимирующей прямой появится в информационном окне внизу окна графика,
- ▶ наклон прямой дает измерение значения скорости изменения давления из-за потребления кислорода (кПа/секунду). Для определения скорости изменения давления (кПа) в минуту умножьте полученное значение на 60.

15. Вычислите скорость изменения давления на грамм массы семян.

Результаты опыта занесите в таблицу 5.12.

Таблица 5.12 – Определение интенсивности дыхания семян _____
(указать вид растения)

Вариант опыта	М _{пробирки + КОН + стеклянные бусины} (M ₁)	M ₁ + семена (M ₂)	M _{семян} (M ₂ – M ₁)	Скорость изменения давления	
				в минуту	на г семян
Семена: сухие					
набухшие					
проросшие					

В какой пробирке потребление кислорода было самым интенсивным? Самым медленным? Объясните причину в скорости поглощения кислорода в разных пробирках. Как повлияет увеличение или снижение температуры на скорость поглощения кислорода в каждой из пробирок?

Сделайте выводы.

ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ

«ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ»

1. В две пробирки налили одинаковое количество вытяжки растительной ткани. Во вторую пробирку добавили немного 20% HCl и прокипятили. Затем в обе пробирки внесли столько же реактива Фелинга, сколько и вытяжки, и вновь прокипятили. Какие выводы о содержании в материале редуцирующих и нередуцирующих сахаров можно сделать, если:

- а) в обеих пробирках цвет жидкости не изменился и не появился осадок;
- б) в первой пробирке осадок отсутствует, а во второй появился;
- в) в первой и второй пробирках выпало в осадок одинаковое количество закиси меди;
- г) в первой пробирке количество осадка соответствует 2 баллам, во второй – 4 баллам.

2. Водный экстракт белков из клубней картофеля дал более четкую биуретовую реакцию, чем экстракт с помощью слабых нейтральных солей. Почему?

3. В непроросших семенах льна не обнаружены углеводы. При их прорастании появляется крахмал и растворимые сахара. Каково их происхождение?

4. В непроросших семенах фасоли много крахмала (4 балла). В прорастающих семенах количество его снижается почти вдвое, но содержание редуцирующих сахаров оказывается незначительным. Почему?

5. Какие запасные вещества преобладают в семенах большинства видов растений, почему?

6. Почему подмороженные клубни картофеля приобретают сладкий вкус?

7. В три пробирки налили одинаковое количество крахмального клейстера, добавили по 0,5 мл вытяжки амилазы и выдержали в течение 15 мин

при 0°C, 35°C и 100°C. После добавления йода продукты в первой пробирке дали фиолетовую окраску, во второй – желтую, в третьей – синюю. Объяснить полученный результат.

8. Изучали зависимость глубины гидролиза крахмала от времени действия фермента. Однако вместо ожидаемого последовательного изменения окраски образующихся под действием йода декстринов (от фиолетовой через красную, оранжевую к желтой) во всех пробирках был голубовато-желтый цвет. В чем причина неудачи опыта? Играет ли роль качество крахмала, а именно – соотношение составляющих его полимеров?

9. На пластинку из крахмально-желатиновой смеси поместили срезы сухих и набухших семян кукурузы и подсолнечника. Через 40 мин семена убрали и пластинку залили разбавленным раствором йода. Каков ожидаемый результат опыта, почему?

10. В каких органах дыхание протекает более интенсивно: листьях, цветах, стеблях, почках или в запасающей паренхиме?

11. В каких тканях интенсивность дыхания выше: в тапетуме пыльников или мякоти яблока; в кожуре, глазках или запасающей паренхиме клубней картофеля? Почему?

12. 15 г почек выделили за 30 мин 3 мг CO₂. Определить интенсивность дыхания на 1 г сухого веса в час, если известно, что сухое вещество в почках составляет 40%.

13. Сколько CO₂ выделяет 1 кг семян за 10 суток, если известно, что интенсивность дыхания этих семян равна 0,1 мг CO₂ на 1 г сухого вещества в час (сухое вещество в семенах составляет 63%)?

14. Вредно ли в помещении содержать декоративные растения, поглощающие кислород, необходимый человеку? Какое количество кислорода поглотят растения общим весом 2 кг в комнате объемом 45 м³ за 10 ч, если известно, что средняя интенсивность их дыхания 12 мл O₂ на 1 г в сутки? Доказательство подтвердить расчетом.

15. На свету при 25°C растение интенсивно поглощало CO₂. При повышении температуры до 40°C поглощение CO₂ сменилось его интенсивным выделением. Объясните причину изменения газообмена.

16. Почему для лучшей сохранности овощей в хранилище поддерживается низкая температура?

17. Каков будет состав запасных веществ семян, если их дыхательный коэффициент равен 0,3; 0,8; 1,0?

18. В наклюнувшихся семенах ячменя ДК был равен 0,8. При дальнейшем прорастании семян он поднялся до 1,4. Почему?

19. Почему зерно, заложенное на хранение, должно иметь влажность не выше 12–14%? Что произойдет, если влажность зерна будет выше?

20. Какую роль играет кислород в процессах дыхания?

21. Какое минимальное содержание кислорода во внешней среде не оказывает отрицательного влияния на продуктивность дыхания?

22. Объясните причины накопления спирта в плодах?

23. При каких условиях в семенах накапливается спирт?

24. Может ли накапливаться спирт в корневой системе?

25. Почему растения не могут длительное время находиться в среде бедной кислородом, хотя и не погибают сразу после попадания в анаэробные условия?

26. Как влияет повышение влажности семян на интенсивность их дыхания?

27. Некоторые растения (фикусы, орхидеи и др.) формируют воздушные корни. Какова их роль в жизни растений?

28. Является ли отсутствие высокой ферментативной активности в гомогенате растительной ткани доказательством того, что этот фермент малоактивен и в самом растении?

29. Почему после первых морозов становятся более сладкими и вкусными ягоды рябины, калины и некоторых других растений?

30. Как влияет температура на интенсивность дыхания растений?
31. С какой целью в пивоварении используют гиббереллин?

Тема 6. РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ

Работа 1. Определение содержания хлорофилла в семядолях

Прорастание семян сопровождается активизацией в них метаболизма. В семядолях при прорастании происходит активация и новообразование ферментных систем, необходимых для обеспечения использования запасных веществ и перехода с гетеротрофного питания на автотрофное. Эти процессы протекают под контролем осевых частей зародыша. Большая роль в этом контроле принадлежит фитогормонам (интегративная функция). При прорастании семян фитогормоны поступают в семядоли из осевых частей зародыша и влияют на развитие активности ферментов, участвующих в распаде запасных веществ. Образующиеся при этом продукты распада поступают в осевые части зародыша и обеспечивают их рост.

Высокой чувствительностью к экзогенным фитогормонам обладают изолированные семядоли тыквы, так как после изоляции в них происходит быстрое истощение запаса эндогенных гормонов.

В работах О.Н. Кулаевой было показано, что экзогенный цитокинин значительно активизирует рост семядолей. При этом влияние цитокинина распространяется на все стороны формирования внутриклеточных структур и обмен веществ семядолей. Цитокинин резко повышает использование в клетках семядолей запасных веществ, ускоряет и усиливает формирование мембранного аппарата хлоропластов – гран и ламелл стромы, рост хлоропластов и их деление. Цитокинин стимулирует формирование митохондриального аппарата клеток семядолей, развитие эндоплазматического ретикулама (в основном шероховатого).

В соответствии с активизацией роста семядолей и процессов внутриклеточной дифференциации, связанной с их превращением в зеленый лист, цитокинины запускают в семядолях синтез самых разных ферментов, необходимых для развертывания указанных физиологических программ.

Цитокинин увеличивает в семядолях активность эндопептидазы, участвующей в гидролизе белков, щелочной и кислой пирофосфатаз, которые разрушают пирофосфат, образующийся при синтезе различных биополимеров, и тем самым способствуют протеканию этих синтезов. Цитокинин активирует малик-энзим, участвующий в обмене органических кислот, и рибулезобисфосфаткарбоксилазу – ключевой фермент фотосинтеза. Ферменты по степени их активации цитокинином можно разделить на две группы: одна по своему ответу на фитогормон коррелирует с ростом семядолей, другая – с накоплением в них хлорофилла. Ферменты первой группы более тесно связаны с программой роста, второй – с биохимической дифференциацией хлоропластов.

Цитокинин стимулирует синтез белка в клетках, действуя на разных уровнях этого процесса. Гормон активирует синтез РНК, увеличивает число рибосом в клетке, повышает их активность в синтезе белка.

Антагонистом цитокинина во всех описанных выше процессах является АБК. Она прекращает рост изолированных семядолей тыквы, ингибируя как рост клеток, так и их деление, подавляет процессы внутриклеточной дифференциации, формирование мембранного аппарата хлоропластов, угнетает синтез ферментов, связанных как с ростом семядолей, так и с дифференциацией в них хлоропластов. Между АБК и цитокинином проявляется четкий антагонизм: цитокинин снижает ингибирующее действие АБК, АБК подавляет вызванную цитокинином стимуляцию перечисленных процессов.

Угнетение синтеза белка в изолированных семядолях тыквы под действием АБК происходит как за счет подавления синтеза-РНК, так и путем торможения формирования полисом. АБК тормозит синтез хлорофилла, действуя на образование и транспорт δ -аминолевулиновой кислоты и на ферменты, участвующие в ее синтезе. Действие и цитокинина, и АБК, как любого фитогормона, зависит от их концентрации.

Цель: определить влияние различных концентраций фитогормонов на содержание хлорофилла в изолированных семядолях отдельных видов растений.

Объекты: проростки с хорошо сформированными семядолями (тыква, фасоль, горох, рапс и др.).

Реактивы и оборудование: CaCO₃, раствор АБК в концентрации 1 мг/л, 6-БАП – 10 мг/л, 6-БАП – 100 мг/л, 80% раствор этанола, ступки с объемом 25 мл, колба Бунзена, пробирки, пипетки, сверло диаметром 0,5 см, фототермокамера с температурой 28°C, термостат, технические и торсионные весы, спектрофотометр.

Ход работы

Навеску семядолей (200 мг) растирают в ступке с небольшим количеством песка и CaCO₃ (на кончике скальпеля), экстрагируют пигменты раствором этанола, фильтруют экстракт через стеклянный фильтр и доводят объем в мерной колбе до 25 мл.

Оптическую плотность (D) измеряют на спектрофотометре ($\lambda = 665$ и 649 нм). Количество хлорофилла ($a + b$) определяют по формуле:

$$C_{a+b} = 6,45 \cdot D_{665} + 17,72 \cdot D_{649}, \text{ мг/л}$$

Пересчитывают количество хлорофилла на 1 г сырой массы.

Результаты измерений заносят в таблицу 6.1.

Таблица 6.1 – Содержание хлорофилла в семядолях _____
(указать вид растения)

Вариант опыта	Оптическая плотность, ед		Количество хлорофилла, мг/л
	649нм	665нм	
контроль			
АБК, 1 мг/л			
6-БАП, 10 мг/л			
6-БАП, 100 мг/л			

Сводную таблицу по содержанию хлорофилла в семядолях записать по образцу таблицы 6.2.

Таблица 6.2 – Содержание хлорофилла в семядолях различных видов растений

Вариант опыта	Количество хлорофилла, мг/л			
	тыква	фасоль	горох	рапс
контроль				
АБК, 1 мг/л				
6-БАП, 10 мг/л				
6-БАП, 100 мг/л				

Проанализировать полученные данные.

Сделать вывод об особенностях ростовых процессов в семядолях различных растений в зависимости от содержания в них фотосинтетических пигментов при воздействии на них регуляторами роста.

Работа 2. Периодичность роста древесных растений

По определению Д.А. Сабина, рост – это процесс новообразования элементов структуры организма, к которым относятся макромолекулы, органеллы, клетки, органы и системы органов.

Рост побега, как и отдельных его частей, происходит неравномерно. Вначале наблюдается медленный рост, затем его скорость увеличивается, достигая максимума, потом снова наступает замедление роста и, наконец, он прекращается. Эта периодичность роста получила название *большой кривой роста*, или кривой Ю. Сакса. В соответствии с этим законом происходит рост органелл, клеток, тканей, органов и организма в целом.

Периодичность роста побегов проявляется в том, что междоузлия, образующиеся по мере нарастания побега, имеют неодинаковую длину – она увеличивается от его основания к середине, где достигает максимальной величины, а по направлению к верхушке опять уменьшается. Эта закономерность может быть нарушена внешними факторами. Например, под влиянием засухи формируются более короткие междоузлия.

Цель: изучить периодичность роста древесных побегов.

Объекты: однолетние побеги деревьев и кустарников (ива, береза, ольха, сирень, чубушник, тополь и др.).

Реактивы и оборудование: линейка, калькулятор.

Ход работы

С помощью линейки у 3 побегов с одинаковым числом междоузлий измерить длину каждого междоузлия. Рассчитать среднюю длину каждого междоузлия. Результаты записать в таблицу 6.3.

Таблица 6.3 – Длина междоузлий побегов _____
(указать вид растения)

№ побега	Порядковый номер междоузлия											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	и т.д.
Средняя длина, см												

Оформить сводную таблицу 6.4.

Таблица 6.4 – Средняя длина междоузлий различных видов растений

Объект исследования	Порядковый номер междоузлия										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ольха											
Береза											
Ива											
Тополь											

Используя данные таблицы 2, построить кривую Сакса. Для этого отложить на оси абсцисс порядковый номер междоузлия, а по оси ординат его длину (см). Обратить внимание на форму полученной кривой. Сравнить характер кривой Сакса у различных видов растений.

Сделать вывод об особенностях роста побегов различных древесных растений.

ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ «РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ»

1. Почему низкорослые фенотипы растений (горох, кукуруза, фасоль и др.) сильно реагируют на обработку гиббереллином, а высокорослые слабо?
2. Почему при удалении верхушки побега трогаются в рост ниже расположенные боковые почки и снимается апикальное доминирование?
3. Как объяснить появление и быстрый рост поросли после спиливания дуба, тополя, осины и других лиственных деревьев и почему нет такой поросли у сосны и ели?
4. Почему при обрезке деревьев и кустарников они становятся гуще, т.е. количество боковых ветвей увеличивается?
5. Как селекционеры добиваются быстрого роста листьев в начале вегетации растений?
6. Из семян обычных растений (яблони, сливы, вишни, дуба и других) можно вырастить карликовые деревья высотой всего 50-80 см, имеющих возраст десятки и даже сотни лет, способных цвести и формировать плоды. Передаётся ли их карликовость по наследству?
7. Когда растения растут быстрее днём или ночью?
8. Одинакова ли оптимальная температура для роста растений в течении дня и ночи?
9. Если перенести цветы (маки, тюльпаны и другие) из холодного помещения в более теплое, то они распускаются. Почему это происходит?
10. Какие анатомические изменения происходят в черешке листьев перед их опадением?
11. Какие физиологические изменения происходят в листьях при их опадении?
12. Почему вблизи уличных фонарей опадение листьев осенью замедляется?
13. Можно ли искусственным путём затормозить опадение листьев?

14. Можно ли искусственным путём ускорить опадение листьев?
15. Почему вблизи подземных теплотрасс листья на деревьях дольше сохраняют зелёную окраску и опадают позже?
16. Оказывает ли влияние продолжительность освещения на зацветание различных видов растений?
17. Хризантемы – цветы осени. Можно ли вызвать цветение хризантем летом?
18. Почему опытные овощеводы затеняют (прикрывают) грядки с редисом тёмной плёнкой или светонепроницаемыми ящиками и укорачивают их световой день?
19. Растение длиннодневной рудбекии, растущей на коротком дне, обработали вытяжкой листьев длиннодневного растения (озимой пшеницы), растущего на длинном дне, а второе растение рудбекии, обработали вытяжкой растения, растущего на коротком дне. Как это отразилось на цветении растений?
20. Одни длиннодневные растения (рожь) выращивали на длинном, другие – на коротком дне. У одних растений гиббереллина было значительно больше, чем у других. У каких растений гиббереллина было больше?
21. Одни короткодневные растения (просо) выращивали на длинном, другие – на коротком дне. Оказалось, что содержание гиббереллина у них разное. Как это отразилось на цветении этих растений?
22. В растениях ингибирован синтез триптофана. На содержании какого гормона и на интенсивности каких физиологических процессов это может отразиться?
23. Одну группу черенков растений обработали раствором индолилуксусной кислоты (ИУК), другую – гиббереллином. У какой группы черенков процесс корнеобразования пойдёт активнее?
24. Одни проростки гороха обработали ИУК, другие – гиббереллином. У каких проростков рост в высоту пойдёт интенсивнее?

25. Одни цветущие растения (розы, гвоздики, хризантемы) поставили в сосуд с водой, другие – в раствор цитокинина (кинетина). Опытные растения (в кинетине) значительно дольше сохраняли свежесть. Объясните результаты опыта.

26. Как увеличить количество женских цветков на растениях огурца?

27. Как увеличить количество мужских цветков на растениях огурца?

28. Почему окуривание растений семейства тыквенных дымом перед цветением увеличивает урожай плодов?

29. В герметически замкнутый сосуд или отсек, где находятся свежесобранные зелёные плоды томатов, поставлена чашка с этиловым спиртом, куда добавлена концентрированная серная кислота. Какие результаты опыта можно ожидать на томатах?

30. Можно ли вызвать одновременное созревание плодов перед их уборкой?

31. Можно ли предотвратить преждевременное опадение цветков и плодов?

32. Какова максимальная продолжительность жизни семян?

33. Как получить бессемянные (партенокарпические) плоды томатов, груш, винограда и др. растений?

34. Можно ли затормозить рост в высоту и предотвратить полегание зерновых культур?

35. Можно ли изменить продолжительность вегетации растений и ускорить созревание урожая с помощью химических веществ?

36. Приготовили и высадили черенки от цветущей и вегетирующей бегонии. Какие черенки зацветут быстрее? Поясните.

37. Как правильно отобрать черенки для укоренения?

38. Как усилить корнеобразование у черенков?

39. Зависит ли проявление окраски антоцианов у растений от кислотности среды?

40. Можно ли использовать антоцианы в качестве индикатора кислотности среды?
41. Можно ли вырастить голубую розу?
42. Чем отличается состояние глубокого покоя от вынужденного?
43. В опыте с семенами белой акации одним из них прокололи оболочку, другие посеяли с неразрушенной оболочкой. Какие семена быстрее прорастут?
44. Срезанная в октябре веточка сирени, помещённая в оптимальные условия для роста, не распустилась. Чем это можно объяснить?
45. Какие условия требуется создать, чтобы срезанная в январе веточка сирени расцвела?
46. Глубина покоя клеток растений положительно коррелирует с их морозоустойчивостью. В молярный раствор сахарозы поместили срезы почек двух сортов яблонь. У первого сорта в клетках образовался вогнутый плазмолиз, у второго – выпуклый. Какой сорт находится в состоянии более глубокого покоя и является более устойчивым к морозу?
47. Происходят ли биохимические изменения у растений под снегом в связи с подготовкой к выходу из состояния покоя?
48. Почему луковицы лука или клубнелуковицы гладиолуса следует хранить в зимнее время в тёплом месте и особенно опасно чередовать температурные воздействия?
49. Меняется ли количественный и качественный состав сахаров корнях сахарной свёклы в процессе зимнего хранения?
50. С какой целью вентилируют овощехранилища?
51. Почему раннеспелые сорта яблок не рекомендуется хранить рядом с позднеспелыми?
52. Можно ли продлить срок жизни срезанных цветов?
53. Каков механизм физиологического действия этилена на плоды, ускоряющее их созревание?
54. Как затормозить созревание плодов во время их хранения?

55. Как продлить состояние покоя, уменьшить прорастание клубней, корнеплодов и другой овощной продукции во время зимнего хранения и тем самым сократить потери в овощехранилищах?

56. Можно ли использовать свежееубранные клубни картофеля для посадки и получения второго урожая?

57. Как вывести семена из глубокого покоя?

58. Как вывести семена из вынужденного покоя?

59. Анализ углеводов показал, что в одном растении содержится больше сахаров, в другом – крахмала. Какое растение было более приспособлено к перенесению зимних условий?

60. Сеянцы сосны выращивали в трех вегетационных сосудах с почвой, влажность которой составила: 1) 30%; 2) 60%; 3) 90% от полной влагоемкости. Через 3 месяца была измерена длина главного побега сеянцев, которая оказалась в соответствующих сосудах равной: 1) 3,9 см; 2) 11,5 см; 3) 6,4 см. Как объяснить полученные результаты?

61. Почему не прорастают семена некоторых растений при наличии всех необходимых внешних условий (влаги, тепла, доступ кислорода).

62. Перечислите приемы, при помощи которых можно: а) ускорять переход растений в состояние покоя; б) задерживать распускание почек; в) вывести почки из состояния покоя.

63. Каковы физиологические причины осеннего листопада у деревьев умеренной зоны.

64. Как определить, находятся ли почки в состоянии глубокого покоя или покой их вынужденный?

65. У двух растений подсолнечника были срезаны верхушки стеблей, после чего на поверхность среза одного из этих растений нанесли пасту, содержащую индолилуксусную кислоту. Распустятся ли у этих растений пазушные почки. Какой вывод можно сделать на основании этого опыта?

66. Почему озимые сорта злаков не цветут, если их посеять весной?

67. Длиннодневное двудольное растение выращивалось на коротком (10-ти часовом) дне, а короткодневное растение – на длинном (18-ти часовом) дне. Как будет происходить рост этих растений? Зацветут ли они?

68. На побеге яблони удалены все листья. Будут ли нормально развиваться плоды, оставшиеся на нем? Почему?

69. Часть побегов, не отделенных от растения, изолировали от света, остальные оставили в условиях нормального освещения. Что произойдет с побегами, лишенными света? Игруют ли роль в их жизни побеги, оставшиеся на свету?

70. Почему при любом положении семян в почве корни растут вниз? В каком направлении будут расти корешки проростков в состоянии невесомости?

71. К каким категориям ростовых движений относятся следующие явления: раскрытия соцветий одуванчика в солнечный день и закрывание в пасмурный; поворачивание корзинки подсолнечника к солнцу; поднятие стебля злака после полегания; рост пыльцевой трубки по направлению к семяпочке, корней – к воде и в обратном направлении от раствора NaCl, рост спорангиеносцев гриба мукора в сторону от влажного субстрата?

72. Из побега взрослой яблони нижних и средних ярусов приготовили черенки. Какие из них лучше укоренились, а развившиеся растения быстрее зацвели.

Тема 7. ВТОРИЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ РАСТЕНИЙ

Работа 1. Определение содержания суммарной фракции флавоноидов

Флавоноиды являются одним из самых больших классов фенольных соединений. В зависимости от степени окисления трехуглеродного участка флавоноиды разделяют на флавоны, антоцианы, флавонолы и изофлавонолы. Из флавоноидов также синтезируются танины. В разных сочетаниях и количествах флавоноиды присутствуют почти во всех растениях.

Флавоноиды локализуются в различных органах и частях растения: бутонах (софора японская), цветках, обуславливая окраску лепестков (василек синий, пижма обыкновенная), листьях и стеблях (хвощ полевой, горец птичий), плодах (боярышники, софора японская), корнях (шлемник байкальский). В клетках растений флавоноиды накапливаются в форме гликозидов, как правило, в вакуолях, в свободном состоянии – в специальных образованиях (смоляных и эфиромасличных ходах, канальцах, вместилищах, железках и др.). В надземных частях растений более 85% суммы флавоноидов локализуется в клетках эпидермы и только 15% – в остальных тканях.

Цель: определить содержание суммарной фракции флавоноидов в вегетативных и/или генеративных органах различных видов растений.

Объекты: сухие навески отдельных частей различных растений.

Реактивы и оборудование: 70% этанол, 96% этанол, раствор 2% $AlCl_3$ в этаноле, 30% Na_2CO_3 , 30% уксусная кислота, стандартный раствор кверцетина 0,5%, электронные весы, спектрофотометр, обратный холодильник, вата, колбы на 50 мл, мерные колбы и цилиндры, пробирки, шпатель, штативы для пробирок, фильтровальная бумага, карандаш по стеклу.

Ход работы

Получение экстракта.

0,25 г измельченного растительного сырья поместить в колбу вместимостью 100 мл, прибавить 10 мл 70% спирта. Колбу с содержимым соединить с обратным холодильником и нагреть на кипящей водяной бане в течение 30 мин, затем охладить до комнатной температуры и отфильтровать через вату в мерную колбу вместимостью 50 мл. Вату промыть небольшим количеством 70% этанола и добавить к полученному экстракту, после чего довести общий объем экстракта до метки. Полученный экстракт можно использовать для определения суммарной фракции фенолов и флавоноидов.

Количественное определение суммарной фракции флавоноидов.

К 0,1 мл полученного экстракта добавить 0,4 мл раствора 2% алюминия хлорида в этаноле, 1 каплю 30% уксусной кислоты. Раствор довести 96% спиртом до 5 мл.

Приготовление контрольного раствора: к 0,1 мл 96% спирта добавить 0,4 мл раствора 2% алюминия хлорида в этаноле, 1 каплю 30% уксусной кислоты, довести до 5 мл 96% спиртом.

Через час измерить оптическую плотность контрольного, а затем опытных растворов на спектрофотометре при длине волны 410 нм.

Результаты опыта занести в таблицу 7.1.

Таблица 7.1 – Содержание флавоноидов

Объект исследования	Вариант (орган растения)	Оптическая плотность раствора, ед.	Количество флавоноидов в навеске, мл/г

Содержание суммы флавоноидов (X) в пересчете на гликозиды кверцетина в абсолютно сухом сырье вычислить по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{V_3 \cdot m \cdot (100 - W) \cdot E_{1\text{cm}}^{1\%}}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность исследуемого раствора; V_1 – общий объем экстракта, мл; V_2 – объем раствора для спектрофотометрирования, мл; V_3 – объем экстракта, взятый для определения, мл; $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения гликозидов кверцетина в комплексе с алюминия хлоридом в этаноле при длине волны 410 нм, равный 330; m – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Потери массы при высушивании различных органов составляют для соцветий – 70–80%, листьев – 55–90%, корней и корневищ – 60–80%. Сушка считается законченной при содержании в сырье 10–15% свободной (гигроскопической) влаги.

Сделать вывод об особенностях накопления флавоноидов в различных растительных объектах.

Тема 8. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Работа 1. Определение жаростойкости растений (по Ф. Ф. Мацкову)

Жаростойкость – это способность растений переносить высокую температуру. При повышении температуры окружающей среды выше оптимальной в растениях нарушается обмен веществ и, как следствие этого, накапливаются ядовитые вещества. При более высоких температурах резко повышается проницаемость протоплазмы за счет разрушения белково-липидного комплекса цитоплазматических мембран, а затем наступает коагуляция белков и отмирание клеток. Жаростойкие растения в большинстве случаев имеют более вязкую, а, следовательно, и более устойчивую протоплазму и способны сохранять при высоких температурах нормальный обмен веществ.

Если подвергнуть лист действию высокой температуры, а затем погрузить в слабый раствор соляной кислоты, то поврежденные и мертвые клетки побуреют вследствие свободного проникновения в них кислоты (мембраны клетки, в том числе и мембраны хлоропластов, теряют свойство полупроницаемости). Ионы H^+ , присутствующие в клетке, замещают ион Mg^{2+} в молекуле хлорофилла, который превращается в феофитин, имеющий бурый цвет, т.е. протекает реакция феофитинизации. Неповрежденные клетки остаются зелеными. Чем больше остается неповрежденных участков тканей, тем выше жаростойкость растения.

У растений с кислым клеточным соком феофитинизация может произойти и без обработки соляной кислотой, т.к. при нарушении полупроницаемости тонопласта органические кислоты проникают из клеточного сока в цитоплазму и вытесняют магний из молекулы хлорофилла.

Цель: оценить жаростойкость различных видов растений.

Объекты: свежие листья растений.

Реактивы и оборудование: 0,2н HCl, водяная баня, термометр, пинцет, чашки Петри, стакан с водой, карандаш по стеклу.

Ход работы

Налить в химический стакан воды (водяная баня), нагреть ее до 40⁰С, погрузить в нее по 5 листьев исследуемых растений и выдержать их в течение 30 мин., поддерживая температуру на уровне 40⁰С. Затем взять первую пробу (по одному каждого вида) листьев и поместить их в чашку Петри с холодной водой. Поднять температуру в водяной бане до 50⁰С, и через 10 мин. выдерживания при данной температуре взять вторую пробу листьев и перенести их в новую чашку Петри с холодной водой. Постепенно температуру довести до 80⁰С, беря пробы через каждые 10 мин. при повышении температуры на 10⁰С.

После этого заменить холодную воду в чашках 0,2н раствором соляной кислоты и через 20 мин. учесть степень повреждения листьев по количеству появившихся бурых пятен.

Результаты исследований записать в таблицу 8.1, обозначив отсутствие побурения знаком «-», слабое побурение – «+», побурение более 50% площади листа – «++» и сплошное побурение – «+++»:

Таблица 8.1 – Жаростойкость различных видов растений

Объект исследования	Степень повреждения листьев при t, ⁰ С				
	40	50	60	70	80

Проанализировать полученные результаты.

Сделать вывод о степени жаростойкости различных видов растений.

Работа 2. Влияние сахарозы на морозоустойчивость растительных клеток

Морозоустойчивость – способность растений переносить действие отрицательных температур.

При замерзании растительных тканей в межклетниках образуются кристаллы льда, которые оттягивают воду от клеток. Если цитоплазма недостаточно морозоустойчива, то она, не выдержав обезвоживания, а также механического давления кристаллов льда, коагулирует, а мембраны утрачивают полупроницаемость.

Кристаллы льда, образующиеся непосредственно в клетках, оказывают механическое воздействие, в результате нарушается внутренняя структура протоплазмы, резко повышается ее проницаемость, а при длительной экспозиции на морозе наступает отмирание. Скорость отмирания протоплазмы клеток зависит как от температуры и времени экспозиции, так и от водоудерживающей способности самой клетки.

Увеличение количества растворимых сахаров в зимующих органах растений повышает водоудерживающую способность тканей, предохраняет белковые вещества от свертывания при промораживании. Сахароза образует связи с гидрофильными группами белков и способствует сохранению их нативной структуры при повреждающем воздействии низких температур.

Таким образом, морозоустойчивость клеток может быть повышена защитными веществами, среди которых важная роль принадлежит сахарозе и другим олигосахаридам.

Цель: установить значение сахарозы в повышении устойчивости клеток к отрицательным температурам.

Объекты: клубень картофеля, корнеплод красной свеклы.

Реактивы и оборудование: 0,5М и 1М растворы сахарозы, соль поваренная, снег или толченый лед, термометр до -25°C , стаканы химические,

пипетки градуированные на 5 мл, пробирки, штативы для пробирок, карандаш по стеклу, нож.

Опыт 1: терка, тарелка, марлевые салфетки.

Опыт 2: 8% раствор NaCl, пробочное сверло диаметром 5-6 мм (диаметр сверла должен быть меньше диаметра пробирок), фарфоровая чашка, лезвие бритвы, предметные и покровный стекла, пинцет, световой микроскоп, фильтровальная бумага.

Ход работы

Опыт 1. Определение защитного действия сахарозы на белки при отрицательных температурах

Опыт заключается в замораживании и оттаивании отжатого из растительной ткани сока с добавлением сахарозы и без нее. Выпадение хлопьевидного осадка белков из сока, отжатого из растительной ткани, служит показателем повреждения.

Очищенный клубень картофеля натереть на терке, отжать сок в стакан через двойной слой марли, дать отстояться (или отфильтровать). Налить по 2,5 мл надосадочной жидкости в 4 пронумерованные пробирки. В первую пробирку добавить 2,5 мл 0,5М раствора сахарозы, во вторую – 2,5 мл 1М раствора сахарозы, в третью и четвертую – по 2,5 мл воды и перемешать.

Первую, вторую и третью пробирки поместить в охлаждающую смесь снега или толченого льда с солью (3:1 по объему), четвертую пробирку оставить при комнатной температуре (контроль). Проверить температуру смеси, которая должна быть около -20°C . Через 20-30 мин., когда сок в пробирках замерзнет, перенести пробирки в стакан с водой комнатной температуры для оттаивания.

После оттаивания определить, не встряхивая, по внешнему виду жидкости в пробирках, остались ли белки в состоянии золя или произошла их коагуляция (образование хлопьев).

Результаты записать в таблицу 8.2.

Таблица 8.2 – Состояние белков при действии различных температур

№ пробирки	Вариант опыта	Нахождение пробирок	Образование хлопьев
1	Сахароза 0,5 М	-20 ⁰ С	
2	Сахароза 1 М	-20 ⁰ С	
3	Вода	-20 ⁰ С	
4	Вода (контроль)	комнатная температура	

Опыт 2. Определение роли сахарозы в защите мембран при действии отрицательных температур

Вырезать из свежего (тургесцентного) корнеплода красной свеклы пластинку толщиной около 5 мм, из которой сделать 12–16 высечек с помощью пробочного сверла. Поместить высечки в фарфоровую чашку и тщательно промыть водопроводной водой до полного удаления сока, вытекшего из поврежденных клеток.

Перенести одинаковое количество высечек в 4 пронумерованные пробирки. В первую пробирку налить 5 мл 0,5М раствора сахарозы, во вторую – 5 мл 1М раствора сахарозы, в третью и четвертую – по 5 мл воды.

Первую, вторую и третью пробирки поместить в охлаждающую смесь снега или толченого льда с солью (3:1 по объему), четвертую пробирку оставить при комнатной температуре (контроль). Проверить температуру смеси, которая должна быть около -20⁰С.

Через 15–20 мин. пробирки поставить в стакан с водой комнатной температуры для оттаивания. После полного оттаивания пробирки встряхнуть. Отметить окраску жидкости в пробирках и окраску высечек.

Проверить жизнеспособность клеток. Для этого приготовить из высечек тонкие срезы, поместить их на предметные стекла в капли 8% (гипертонического) раствора NaCl и закрыть покровными стеклами. Через 20

мин. рассмотреть в микроскоп не менее трех полей зрения и подсчитать процент плазмолизированных клеток.

Результаты занести в таблицу 8.3.

Таблица 8.3 – Проницаемость мембран при действии различных температур

№ пробирки	Вариант опыта	Нахождение пробирок	Окраска наружного раствора	Окраска высечек	Количество плазмолизированных клеток, %
1	Сахароза 0,5 М	-20 ⁰ С			
2	Сахароза 1 М	-20 ⁰ С			
3	Вода	-20 ⁰ С			
4	Вода (контроль)	комнатная температура			

Проанализировать полученные результаты, ответив на вопросы:

1. Как влияет замораживание на состояние клеток (проницаемость мембран, белки)?

2. В чем проявляется защитное действие сахарозы на клетку?

Сделать вывод о значении сахарозы как защитного вещества при действии отрицательных температур.

Работа 3. Определение засухоустойчивости растений

Засухоустойчивость – это способность растений переносить длительные засушливые периоды, значительный водный дефицит. Наиболее чувствительны к недостатку влаги процессы роста: фаза роста (растяжения) клеток резко тормозится, клетки отличаются малым размером.

Определяя количество проросших семян на растворах с высоким осмотическим давлением, имитирующих условия физиологической сухости почвы, можно установить относительную засухоустойчивость видов и сортов растений на ранних этапах онтогенеза.

Цель: определить засухоустойчивость различных видов растений.

Объекты:

Опыт 1: семена растений различных видов (сортов).

Опыт 2: листья растений одного вида (сорта), но получивших различную обработку (например, микроэлементами).

Реактивы и оборудование:

Опыт 1: 15%, 20% и 25% растворы сахарозы, чашки Петри, фильтровальная бумага, термостат, линейка.

Опыт 2: раствор йода в йодистом калии, спирт, пробочное сверло диаметром 0,7-1 см, водяная баня, пробирки, чашки Петри, препаровальные иглы.

Ход работы

Опыт 1. Определение засухоустойчивости растений проращиванием семян на растворах сахарозы

В пронумерованные чашки Петри положить по кружку фильтровальной бумаги и разложить на одинаковом расстоянии друг от друга по 30 семян различных видов (сортов) растений.

Смочить фильтровальную бумагу 15%, 20% и 25% растворами сахарозы с соответствующими осмотическими давлениями 1000, 1400 и 1800 кПа. Закрыть чашки Петри крышками и оставить при комнатной температуре. Каждый день проветривать чашки, открывая крышки на несколько секунд; при необходимости бумагу смачивать соответствующими растворами сахарозы.

На третий и седьмой день подсчитать количество проросших семян. Чем устойчивее к засухе растение, тем выше число проросших семян на высоких концентрациях сахарозы, тем больше длина корешков и проростков.

Результаты записать в таблицу 8.4.

Таблица 8.4 – Количество проросших семян

Объект исследования	Вариант опыта	Количество проросших семян									
		на 3-ий день					на 7-ой день				
		повторение			ср., шт.	%	повторение			ср., шт.	%
		1	2	3			1	2	3		
	1. Сахароза 15%										
	2. Сахароза 20%										
	3. Сахароза 25%										

Проанализировать полученные результаты, отметив способность растений на первых этапах развития экономно использовать влагу в условиях недостаточного водоснабжения, что служит одним из важных биологических и хозяйственно полезных характеристик сорта.

Сделать вывод о засухоустойчивости различных видов (сортов) растений на начальных этапах онтогенеза.

Опыт 2. Определение засухоустойчивости растений методом крахмальной пробы

Отделить от растения два находящихся рядом листа (если листья крупные, можно взять один).

Из одного листа (или его половины) пробочным сверлом высечь 3 диска (в основании, середине, верхушке) и убить ткань кипячением в воде в течение 2-3 мин., поместив пробирку с высечками на водяную баню (контрольные высечки).

Другой лист (или его половину) выдержать на воздухе в тени в течение 2 ч. до его завядания, после чего с ним поступить также, как с первым листом (опытные высечки).

Контрольные и опытные высечки обесцветить. Для этого поместить их в отдельные пробирки, долить по 2-3 мл спирта и кипятить на водяной бане в течение 2-3 мин. Спирт слить. Если высечки не обесцветились, обработку повторить (обычно 3-4 раза). Затем в пробирки налить по 2-3 мл воды (для размягчения ткани). Извлечь высечки в чашки Петри. Обработать раствором йода в йодистом калии.

Определить количество крахмала по 4-балльной системе. У более засухоустойчивых растений интенсивность синтетических процессов в условиях завядания сохраняется на более высоком уровне, чем у растений с низкой засухоустойчивостью. Убыль крахмала в образцах в результате завядания оценивается путем сравнения с контрольными значениями (до завядания).

Результаты записать в таблицу 8.5.

Таблица 8.5 – Содержание крахмала в листьях

Объект исследования	Повторность	Содержание крахмала, балл		Убыль крахмала	
		дозавядания	послезавядания	балл	%
	1				
	2				
	3				
	среднее				

Проанализировать полученные результаты.

Сделать вывод о засухоустойчивости видов (сортов) растений, получивших различную обработку микроэлементами.

Работа 4. Влияние засоления на растения

Солевыносливость – способность растения переносить повышенную концентрацию солей.

Засоление приводит к созданию низкого водного потенциала, что затрудняет поступление воды в растение. При ухудшении водоснабжения растений под воздействием солей происходит деструкция хлоропластов, нарушается синтез хлорофилла, снижается интенсивность ростовых процессов.

В природе чаще всего наблюдается засоление, вызванное накоплением сульфатов и хлоридов натрия. Особенно вредно действуют на растение катионы (натрий) и несколько менее ядовиты анионы (хлор, сульфатный ион).

Солеустойчивые растения называются галофитами.

Цель: установить влияние засоления на рост и развитие растений.

Объекты:

Опыт 1: побеги древесных растений.

Опыт 2: листья разных ярусов.

Опыт 3: семена злаковых культур (ячменя, пшеницы, ржи, тритикале, кукурузы и др.)

Реактивы и оборудование:

Опыт 1: 2,5%, 5%, 10% и 15% растворы NaCl, дистиллированная вода, сосуды (банки), фарфоровая чашка, скальпель, линейка, карандаш по стеклу.

Опыт 2: дистиллированная вода, 0,1M раствор NaCl, 0,1M раствор Na₂SO₄, 0,1M раствор Na₂CO₃, лезвие безопасной бритвы, фарфоровая чашка, колбы, вата, карандаш по стеклу.

Опыт 3: растворы 50, 100, 150, 200 мМ NaCl, дистиллированная вода, слабый раствор перманганата калия, химические стаканы, марлевые мешочки, этикетки, термостат, сушильный шкаф, пипетки на 10 мл, чашки Петри, фильтровальная бумага.

Ход работы

Опыт 1. Влияние засоления на степень «выцветания» хлорофилла

Берут не закончившие рост побеги березы, клена и других растений. Срезы обновляют под водой. Измеряют длину побегов, подсчитывают число листьев, измеряют длину верхних, растущих листьев. Побеги помещают в пять сосудов: один с чистой водой (контроль) и четыре с раствором NaCl (или Na₂SO₄) разной концентрации: 2,5%, 5%, 10% и 15%.

Банки с побегами на семь дней помещают в условия рассеянного света. На третьи и седьмые сутки учитывают изменения в окраске листьев, измеряют длину побега (обращая внимание на удлинение верхних междоузлий) и длину взятых под наблюдение верхних листьев, отмечают возможное появление

новых листьев при продолжающемся росте побега за счет разворачивания верхушечной почки.

Под влиянием солей, поступающих в листья, возможно разрушение хлорофилла. При сравнении с контрольным вариантом листья становятся менее зелеными (происходит их выцветание). Кроме того, на листьях появляются «солевые пятна», площадь которых со временем увеличивается.

Сделать рисунки листьев на третий и седьмой дни опыта, описать состояние побегов. Сформулировать выводы о влиянии засоления на степень разрушения (деструкции) хлорофилла в листьях и интенсивность ростовых процессов.

Опыт 2. Определение солевыносливости листьев растений

Берут листья разных ярусов (верхнего, среднего и нижнего).

4 колбы пронумеровать и залить в них по 50 мл следующих растворов: в первую – 50 мл воды (контроль), во вторую – 50 мл 0,1М раствора NaCl, в третью – 50 мл 0,1М раствора Na₂SO₄, в четвертую – 50 мл 0,1М раствора Na₂CO₃.

Срезы веток с листьями обновляются под водой, обкладываются ватой, ставятся в предварительно пронумерованные и заполненные растворами колбы. Все колбы с растениями выставить на хорошо освещенное место на 7 суток. Проследить за повреждением листьев в виде солевых ожогов, сравнить с контрольными листьями.

Результаты записать в таблицу 8.6.

Таблица 8.6 – Степень повреждения листьев

Объект исследования	Вариант опыта	Степень повреждения листьев, балл				Процент листьев		Средний балл повреждения
		H ₂ O	NaCl	Na ₂ SO ₄	Na ₂ CO ₃	поврежденных	погибших	
	Ярус: верхний							
	средний							
	нижний							

Балл повреждения площади листовых пластинок:

- 0 – совсем без повреждения;
- 1 – повреждение в пределах $\frac{1}{4}$ площади листа;
- 2 – повреждение до $\frac{1}{2}$ площади листа;
- 3 – повреждение до $\frac{3}{4}$ площади листа;
- 4 – повреждена вся площадь пластинки листа.

Проанализировать полученные результаты и сделать вывод об устойчивости растений к различным видам засоления.

Опыт 3. Определение солеустойчивости злаков по всхожести их семян

Показателем устойчивости служит сравнение числа проросших семян в растворах соли и в дистиллированной воде.

Здоровые семена растений помещают в разные марлевые мешочки с этикеткой внутри и обрабатывают слабым раствором марганцовки в течение 3–5 мин. Затем слегка просушивают и раскладывают по 10–20 семян в каждую чашку Петри (предварительно чашки прокаливают в сушильном шкафу при 150°C в течение 1 ч, на дно укладывают фильтровальную бумагу).

В каждую чашку наливают по 10 мл 50, 100, 150, 200 мМ раствора NaCl и 10 мл дистиллированной воды (контроль).

Чашки Петри с семенами помещают в термостат при температуре 26°C для проращивания. На дно термостата ставят кювету с водой. Через семь дней в каждом варианте подсчитывают число проросших семян. Определяют процент всхожести.

Результаты записывают в таблицу 8.7.

Таблица 8.7 – Всхожесть семян

Объект исследования	Вариант опыта	Число проросших семян	Всхожесть, %
Ячмень	контроль		
	50 мМNaCl		
	100 мМNaCl		
	150 мМNaCl		

	200 мМNaCl		
Пшеница	контроль		
	50 мМNaCl		
	100 мМNaCl		
	150 мМNaCl		
	200 мМNaCl		

Проанализировать полученные результаты и сделать вывод о солеустойчивости различных видов растений.

ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ «ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ»

1. Какие листья быстрее завядают при почвенной засухе – верхние или нижние? Поясните почему?
2. Чем объяснить накопление свободных аминокислот при засухе?
3. Как влияет повышение вязкости протоплазмы на жароустойчивость растений?
4. Как влияет подсушивание семян на свойства протоплазмы и жароустойчивость растений?
5. Тюльпаны относятся к группе растений, имеющих низкую засухоустойчивость. Как объяснить произрастание и цветение этих растений в пустыне?
6. Засуха и засоление в какой-то степени сходно влияют на поглощение воды растениями. Чем это объяснить?
7. Назовите основные физиологические отличия засухоустойчивых сортов от неустойчивых.
8. Многие овощеводы избегают проводить полив растений в жаркие дневные часы, мотивируя тем, что появившиеся капли воды на листьях вызывают их ожоги. Можно ли поливать растения в жаркое дневное время или следует ждать приближения вечера, когда действие солнечных лучей уменьшится?
9. Растения пшеницы погибают при температуре 49°C в течение 10 мин. Кактусы же переносят без ущерба более высокую температуру (до 65°C). Чем можно объяснить высокую жароустойчивость суккулентов?
10. Почему суккуленты плохо переносят обезвоживание?
11. Какая фаза роста клеток более заметно подавляется при засухе?
12. Листья двух видов растений были подвергнуты обезвоживанию. Листья первого растения погибли, листья второго сохранили

жизнеспособность. Какое свойство протоплазмы в этом опыте имело решающее значение?

13. Нагревание клетки до 50⁰С не повредило клеточную вакуоль. Остальное содержимое клетки погибло. Какой слой протоплазмы оказался более устойчивым?

14. При тепловом воздействии гибель листьев верхнего яруса наступила при 45⁰С, гибель нижнего – при 40⁰С. Каким свойством протоплазмы можно объяснить полученный результат?

15. Настоящие ксерофиты жароустойчивы и способны выносить обезвоживание. Чем объяснить подобную устойчивость?

16. Почему ксерофиты с глубоко проникающей корневой системой имеют низкую эластичность протоплазмы, не обладают высокой жароустойчивостью и не выносят сильного обезвоживания?

17. На одинаковой почве произрастают растения огурца и пшеницы. Устойчивое завядание наступает у огурца при влажности почвы 16,5% от сухой массы почвы, у пшеницы при 14,2%. Чем это объяснить?

18. Минеральные удобрения, особенно фосфорные и калийные повышают засухоустойчивость растений. Зная это, некоторые фермеры при наступлении засухи начинают вносить удобрения. Правильно ли они поступают?

19. Почему при регулярном орошении жароустойчивость растений снижается?

20. Как отличить живые и убитые клетки и определить степень повреждения растений высокой температурой?

21. Почему у растений в теплицах возникают ожоги листьев чаще, чем у растений в открытом грунте?

22. Чем объяснить, что одинаковая по силе засуха, действующая в разные периоды вегетации растений, неодинаково снижает урожай зерна?

23. Ростовые процессы чутко реагируют на изменение влажности почвы. Все ли органы растений одновременно и в равной степени затормаживают рост при дефиците влаги в почве?

24. Почему загущение посевов усиливает полегание хлебов?

25. Назовите первичные механизмы повреждения растений морозом?

26. Что более опасно для растений: зимние морозы или поздние весенние заморозки?

27. На основании многочисленных опытов выявлено, что морозоустойчивость озимой пшеницы хорошо коррелирует с количеством ясных дней в осенний период и, наоборот, вымерзание ее усиливается при большом количестве пасмурных дней. Объясните результаты наблюдений.

28. Почему гербициды губят одни виды растений и относительно безопасны для других?

29. Предельный возраст древесных пород в крупных городах и промышленных центрах в несколько раз меньше, чем в парках или лесах. Какие физиологические процессы наиболее сильно угнетаются в городской среде, что сокращает долголетие древесных пород?

30. Листья какого яруса дольше сохраняются на ветвях деревьев в осенний период?

31. Как объяснить эфемерность (раннее и быстрое развитие) хохлатки, анемонов, пролесок, крокусов и других видов, произрастающих в лиственных лесах средних широт?

32. Каким образом обеспечивается устойчивость растений к действию высоких температур?

33. Каким образом обеспечивается устойчивость растений к действию низких температур?

34. Каким образом обеспечивается устойчивость растений к засолению почвы?

35. Каким образом обеспечивается устойчивость растений к засухе?

36. Роль воды в обеспечении устойчивости растений к неблагоприятным факторам?

37. Какими показателями структуры и физиологией процессов различаются засухоустойчивые растения от растений, неустойчивых к засухе?

38. Как объяснить, что хвоя сосны, выдерживающая зимой морозы до -43°C , летом гибнет при искусственном охлаждении до -8°C .

39. Почему белая акация вымерзает в С.-Петербурге, но благополучно зимует в Саратове несмотря на то, морозы в Саратовской области значительно сильнее, чем в Ленинградской?

40. Почему суккуленты отличаются медленным ростом?

41. Почему после обильного плодоношения и хорошего урожая яблони, груши, сливы и другие плодовые культуры становятся менее морозоустойчивыми и чаще вымерзают?

42. В опыте с семенами два варианта. В первом варианте содержание воды в семенах 12%, во втором – 30%. Какие семена лучше перенесут пониженные температуры до -10°C .

43. Анализ углеводов показал, что в одном растении содержится больше сахаров, в другом – крахмала. Какое растение было более приспособлено к перенесению зимних условий?

44. Чем опасен избыток влаги для растений?

45. Предельный возраст древесных пород в крупных городах и промышленных центрах в несколько раз меньше, чем в парках и лесах. Какие физиологические процессы наиболее сильно угнетаются в городской среде, что сокращает долголетие древесных пород?

46. Чем объяснить, что одинаковая по силе засуха, действующая в разные периоды вегетации растений, неодинаково снижает урожай зерна?

47. Ростовые процессы чутко реагируют на изменение влажности почвы. Все ли органы растений одновременно и в равной степени затормаживают рост при дефиците влаги в почве?

48. Листья двух видов растений были подвергнуты обезвоживанию. Листья первого яруса погибли, листья второго сохранили жизнеспособность. Какое свойство протоплазмы в этом опыте имело решающее значение?

49. При тепловом воздействии гибель листьев верхнего яруса наступила при 45°C , гибель нижнего – при 40°C . Каким свойством протоплазмы можно объяснить полученный результат?

50. Настоящие ксерофиты жароустойчивы и способны переносить обезвоживание. Чем объяснить подобную устойчивость?

51. Почему ксерофиты с глубоко проникающей корневой системой имеют низкую эластичность протоплазмы, не обладают высокой жароустойчивостью и не выносят сильного обезвоживания?

52. Как отличить живые и убитые клетки и определить степень повреждения растений высокой температурой?

53. Почему у растений в теплицах возникают ожоги листьев чаще, чем у растений в открытом грунте?

ПРИГОТОВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ РАСТВОРОВ И РЕАКТИВОВ

Кварцевый песок для растирания растительной ткани

Чистый речной песок промывают проточной водой для удаления илистых частиц. Заливают на сутки концентрированной HCl. Отмывают HCl, проверяя pH с помощью универсальной индикаторной бумаги. Прокаливают в муфельной печи в течение 2–3 ч до розового цвета.

Хлоркобальтовая бумага

Куски фильтровальной бумаги 5x10 см помещают на несколько минут в 5% раствор $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, затем аккуратно раскладывают на стекле, слегка обсушивают и помещают в сушильный шкаф при 40–45⁰С до появления голубого цвета. Пересушивать бумагу нельзя, т.к. она теряет при этом гигроскопичность. Хранят хлоркобальтовую бумагу в эксикаторе над хлористым кальцием. Под действием паров воды CoCl_2 превращается в $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Раствор для снятия отпечатков с эпидермиса

Нитроцеллюлозный клей «Аго», «Мекол» или БФ-6 растворяют в ацетоне в соотношении 1:4 до сиропообразного состояния и хранят в склянке с притертой крышкой.

Раствор йода в йодистом калии (I_2/KI)

2 г KI и 1 г кристаллического йода хорошо размешивают в 10 мл H_2O до полного растворения и доводят водой в цилиндре до 300 мл.

Реактив Фелинга

Готовить непосредственно перед употреблением путем смешивания в равных объемах двух растворов:

1) 40 г CuSO_4 (медный купорос) растворяют в небольшом количестве воды, доводят в мерной колбе до 1 л;

2) 200 г $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (сегнетова соль) растворяют в дистиллированной воде, добавляют 150 мг KOH или NaOH , доводят дистиллированной водой до 1 л.

Раствор бензидина

В мерную колбу на 200 мл наливают около 100 мл дистиллированной воды, добавляют 2,3 мл ледяной уксусной кислоты и 184 мг бензидина. Смесь нагревают на водяной бане при 60°C , постоянно взбалтывая, и после полного растворения бензидина добавляют 5,45 г уксуснокислого натрия. Перемешивают, охлаждают, и объем доводят до метки. Хранят в холодильнике не более 3 дней.

Крахмально-желатиновая смесь

Готовят 10% раствор желатины, поместив ее соответствующую навеску в холодную воду для набухания, и растворив на водяной бане. Теплый раствор желатины смешивают со свежеприготовленным 2% крахмальным клейстером в отношении 1:1 и тщательно перемешивают. Перед тем, как разлить в чашки Петри, подогревают.

Крахмальный клейстер (2%-ый)

2 г растворимого крахмала высыпать в стакан, прилить 20 мл воды и тщательно размешать стеклянной палочкой. Налить в колбу 80 мл воды, нагреть до кипения, вылить в нее содержимое стакана, взболтать, дать раствору закипеть и снять с огня.

Фенолфталеин

0,5 г фенолфталеина растворяют в 100 мл 96^0 этилового спирта. Индикатор изменяет окраску от бесцветной к малиновой в пределах pH 8,2–10,0.

Гетероауксин (0,01%-ый раствор)

100 мг гетероауксина растворяют в химическом стаканчике в 1 мл этилового спирта, добавляют 5–10 мл воды, переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки. Чтобы получить истинный 0,01% раствор

гетероауксина, необходимо данный раствор развести в 10 раз, внося 10 мл его в мерную колбу на 100 мл и доведя водой до метки.

Метиловый красный

0,01 г препарата растворяют в 30 мл этилового спирта 96⁰ и добавляют 20 мл воды, смесь размешивают. Хранят индикатор в темном месте под притертой пробкой.

Нейтральный красный

0,1 г препарата растворяют в 50 мл этилового спирта и доводят объем раствора водой до 100 мл.

Индигокармин

0,1 г препарата растворяют в 50 мл этилового спирта и доводят объем раствора водой до 100 мл.

Эозин

0,5 г препарата растворяют в 100 мл воды.

Дифениламин

1 г препарата растворяют в 100 мл серной кислоты.

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 Ca, Mg, P 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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воскресенская, О. Л. Физиология растений: Учебное пособие / О. Л. Воскресенская, Н. П. Грошева, Е. А. Скочилова. – Йошкар-Ола : Мар. гос. ун-т, 2008. – 148 с.
2. Дитченко, Т. И. Физиология роста и развития растений : метод. рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов / Т. И. Дитченко. – Минск : БГУ, 2009. – 35 с.
3. Еремин, В. М. Малый практикум по физиологии растений / В. М. Еремин, В. И. Бойко, Ю. Ф. Рой, С. В. Зеркаль. – Брест : Брест. Гос. ун-т, 2000. – 88 с.
4. Мазец, Ж. Э. Физиология растений: практикум. – Ч.1 / Ж. Э. Мазец, С. В. Судейная. – Минск : БГПУ, 2009. – 94 с
5. Мазец, Ж. Э. Физиология растений: практикум. – Ч.2 / Ж. Э. Мазец, С. В. Судейная, Е. Р. Грицкевич. – Минск : БГПУ, 2010. – 96 с.
6. Мазец, Ж. Э. Учебно-полевая практика по физиологии растений: практикум / Ж. Э. Мазец [и др.]. – Минск : БГПУ, 2012. – 124 с.
7. Медведев, С. С. Физиология растений: Учебник / С. С. Медведев. – СПб. : Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. – 336 с.
8. Пилильщикова, И. В. Физиология растений с основами микробиологии / И. В. Пилильщикова. – М. : Мир, 2004. – 182 с.
9. Практикум по физиологии растений / Н. Н. Третьяков, Л. А. Паничкин, М. Н. Кондратьев [и др.]. – М. : Колос, 2003. – 288 с.
10. Практикум по физиологии растений : Учеб. пособие для студ. высш. пед. учебн. заведен. / В. Б. Иванов, И. В. Плотникова, Е. А. Живухина [и др.]. – М. : Изд. центр «Академия», 2004. – 144 с.

11. Смашевский, Н. Д. Практикум по физиологии растений : учебное пособие / Н. Д. Смашевский. – Астрахань : Астраханский государственный университет, Издательский дом «Астраханский университет», 2011. – 77 с.

12. Тарасенко, С. А. Физиология и биохимия растений. Практикум : учебное пособие / С. А. Тарасенко, Е. И. Дорошевич. – Гродно : УО Гродненский гос. аграр. Университет, 2004. – 210 с.

13. Туманов, В. Н. Малый практикум по ФЗР / В. Н. Туманов, С. Л. Чирук. – Гродно : ГрГУ, 2008. – 139 с.

14. Физиология растений. Версия 1.0 [Электронный ресурс] : метод. указания по самостоятельной работе / сост. : В. М. Гольд, Н. А. Гаевский, Т. И. Голованова [и др.]. – Электрон. дан. (1 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2008.

15. Яковец, О. Г. Физиология растений: контрольные работы для студентов биол. фак. заоч. отд. / О. Г. Яковец, Г. Г. Филипцова, В. М. Юрин. – Минск: БГУ, 2011. – 32 с.

Учебное издание

Мазец Жанна Эмануиловна
Жукова Инна Ивановна
Деревинская Анастасия Александровна

ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ Учебно-методическое пособие

Издается в авторской редакции

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

Подписано в печать. Формат 60x84¹/₁₆ 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

ЛП № 02330/0131508 от

220050, Минск, Советская, 18.

*Отпечатано с оригинал-макета заказчика в Учебно-издательском центре
БГПУ.*

220007, Минск, Могилевская, 37.

E-mail: izdat@bspu.unibel.by.