

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
Кафедра экологии, ботаники и охраны природы

## ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

*Методические указания для студентов 3 и 4 курсов  
специальности "Биология"*

Издательство "Самарский университет"  
1999

Методические указания "Практикум по физиологии растений" представляют собой переработанное издание. В практикум включены новые задачи, апробированные в лаборатории физиологии растений кафедры экологии, ботаники и охраны природы СамГУ.

Методические указания служат для ознакомления студентов дневного и вечернего отделений биологического факультета с основными методами исследования физиологии растительного организма.

Практикум включает 7 разделов в соответствии с программой практического курса физиологии растений.

**Составители:** доц. Т.А.Овчинникова, асс.Т.А.Панкратов,  
лаб. Н.В. Авдеева

**Рецензент** ст. преп. кафедры биохимии Н.А. Кленова

**ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ***Работа 1***ВЫЯВЛЕНИЕ СОСТОЯНИЯ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН  
ПЛАЗМОЛИТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**

Состояние клеточных мембран, в частности, избирательность их проницаемости зависит от уровня биологической активности клетки, возраста, воздействия внешних факторов. В клетках с высоким уровнем биологической активности (в молодых, зрелых тканях) плазматические мембраны обладают высокой степенью избирательности по отношению к минеральным и органическим соединениям. При снижении активности растительной ткани (воздействии неблагоприятных условий, старении тканей) избирательность мембран снижается. Хорошим индикатором состояния мембран, избирательности их проницаемости является плазмолитический тест. Плазмолиз — процесс отставания протопласта от клеточной оболочки, его можно наблюдать, если погрузить клетку в гипертонический раствор. При этом происходит отсасывание воды из клетки: сначала клеточные стенки сокращаются до полной потери тургора, затем происходит плазмолиз. Протопласт начинает плазмолизировать в уголках клетки (уголковый плазмолиз), после чего образуются многочисленные вогнутые поверхности (вогнутый плазмолиз) и, наконец, протопласт полностью отрывается от клеточной оболочки и принимает округлую форму (выпуклый плазмолиз). Явление обратного плазмолиза называется деплазмолизом. Его можно наблюдать, погружая плазмолизованные клетки в гипотонический раствор, осмотическое давление которого меньше осмотического давления клеточного сока. В качестве плазмолитиков (веществ, вызывающих плазмолиз) используются неядовитые вещества, которые легко проникают через целлюлозную клеточную оболочку, но не проникают через плазматическую мембрану. При погружении поврежденной старых тканей в гипертонический раствор нарушается течение плазмолиза в погибших клетках плазмолиз не обнаруживается совсем.

*Материалы и оборудование.* Листья традесканции с окрашенными клетками или луковича синего лука; лезвие бритвы, препаровальная игла, предметные и покровные стекла, скальпель, пинцет, микроскоп, стеклянные палочки, фильтровальная бумага, спиртовка, вода в капельнице, 1-молярный раствор сахарозы в капельнице.

*Ход работы.* В каплю воды на предметном стекле помещают кусочек эпидермиса с окрашенными клетками, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом. Затем, не снимая покровного стекла, заменяют воду 1-молярным раствором сахарозы, для чего рядом с покровным стеклом помещают каплю сахарозы, а с противоположной стороны

отсасывают воду фильтровальной бумагой, и в течение некоторого времени следят за изменением формы плазмолиза. Когда наступит выпуклый плазмолиз, раствор плазмолитика заменяют водой.

Процессы плазмолиза и деплазмолиза характерны для живых клеток. Чтобы убедиться в этом, готовят второй срез эпидермиса с окрашенными клетками, помещают в каплю воды на предметном стекле, затем пламенем спиртовки убивают клетки. После этого заменяют воду на 1-молярный раствор сахарозы и рассматривают под микроскопом. При оформлении работы зарисовывают плазмолизованные клетки с различными типами плазмолиза и деплазмолизованные. Нарушение хода плазмолиза можно отметить по скорости появления уголкового плазмолиза, по количеству плазмолизованных клеток в поле зрения микроскопа. По результатам работы делают выводы.

### *Работа 2*

## **РАЗЛИЧНАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ ПЛАЗМАЛЕММЫ И ТОНОПЛАСТА**

Наружная цитоплазматическая мембрана (плазмалемма) обладает более высокой проницаемостью, чем тонопласт. В этом можно убедиться, наблюдая набухание цитоплазмы под влиянием накапливающихся в ней ионов калия.

*Материалы и оборудование.* Луковица обыкновенного лука, 1М раствор  $\text{KN}_3$  с эозином (50 мг в 100 мл) в капельнице; микроскоп, лезвие бритвы; препаровальная игла; предметные и покровные стекла; цветные карандаши.

*Ход работы.* Нанести на предметное стекло большую каплю 1М раствора  $\text{KN}_3$  с эозином, погрузить в неё 2—3 кусочка бесцветного эпидермиса мясистой чешуи лука и закрыть покровным стеклом. Через 3 минуты начать наблюдения под микроскопом плазмолизованных клеток. Не допускать подсыхания препарата, вводя время от времени свежие капли раствора.

Сначала цитоплазма окружает вакуоль тонким слоем, но вскоре начинается ее набухание (колпачковый плазмолиз), а затем постепенное отмирание и окрашивание под действием эозина, проникшего через плазмалемму. Увеличивается ли при этом объем вакуоли и окрашивается ли клеточный сок?

Описать наблюдаемые явления, зарисовать клетку в состоянии колпачкового плазмолиза и раскрасить цветным карандашом.

В выводах сопоставить проницаемость плазмалеммы и тонопласта для ионов калия и эозина и объяснить причины набухания цитоплазмы.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ СЕМЯН МЕТОДОМ ОКРАШИВАНИЯ (по Д. Н. Нелюбову)

Метод окрашивания семян для определения их всхожести основан на непроницаемости живой цитоплазмы для некоторых красок (индигокармин, кислый фуксин), тогда как мертвая цитоплазма легко прокрашивается. Бывают случаи, когда зародыш мертвый и тем не менее при погружении семени в раствор краски оно не окрашивается из-за того, что окружающие зародыш части семени не пропускают краску. В связи с этим необходимо предварительно обнажить зародыш: у семян с эндоспермом извлечь зародыш или разрезать семя вдоль, а у семян без эндосперма удалить семенные покровы.

*Материалы и оборудование.* Семена гороха, замоченные в воде; за 10—15 часов до занятия; 0,1%-ный раствор индигокармина (1г на 1 л дистиллированной воды); чашки фарфоровые (2 шт.); стакан химический; стакан фаянсовый с влажными опилками; белая тарелка; препаровальная игла; электроплитка; карандаш по стеклу.

Подготовленные описанным способом семена выдерживают в растворе краски от 1 до 3 часов (в зависимости от вида растения) и оценивают жизнеспособность семян; семена с полностью окрашенными зародышами или с окрашенными корешками считают невсхожими, семена неокрашенные или с частично окрашенными семядолями относят к числу жизнеспособных.

Данный метод используют для быстрой оценки всхожести семян гороха, фасоли, люпина, льна, конопли, тыквенных.

*Ход работы.* Отсчитать, не выбирая, две порции по 10 набухших семян гороха. Одну порцию поместить в стакан с водой и прокипятить в течение 5 минут (контроль). Осторожно, не повреждая семядоли, очистить препаровальной иглой семена обеих порций от кожуры, поместить в фарфоровые чашки, залить раствором индигокармина и выдержать 1 час, после чего слить краску обратно в бутылочку, а семена отмыть водой от избытка красителя.

Отметить окраску семян, убитых кипячением. В опытной порции подсчитать количество окрашенных, частично окрашенных и неокрашенных семян. Для проверки всхожести высадить все 10 семян в стакан с влажными опилками (перед набивкой стакана отжать из опилок избыток воды) поставить в темный шкаф и ежедневно поливать. Через несколько дней подсчитать количество проросших семян. Результаты записать в таблицу:

Сопоставить результаты, полученные методом окрашивания и методом проращивания.

## НАКОПЛЕНИЕ МЕТИЛЕНОВОЙ СИНИ В КЛЕТКАХ ЭЛОДЕИ

В предыдущих работах было продемонстрировано важнейшее свойство цитоплазмы — полупроницаемость, т. е. способность легко пропускать воду и задерживать растворенные вещества. Однако цитоплазма не обладает идеальной полупроницаемостью: она пропускает не только воду, но и многие вещества, причем некоторые из них со значительной скоростью. К числу таких веществ относится метиленовая синяя, которая довольно быстро проникает в растительные клетки. Ткани некоторых растений способны накапливать большое количество метиленовой синей вплоть до почти полного извлечения ее из наружного раствора вследствие химического связывания краски содержащимися в клетках дубильными веществами, причем нередко образуются небольшие синие кристаллы.

**Материалы и оборудование.** Побеги элодеи длиной около 10 см; раствор метиленовой синей 1:50000 (20 мг в 1 л водопроводной воды); 1М раствор  $\text{KNO}_3$  в капельнице; пинцет; штатив с пробирками (2 шт.); микроскоп; предметное и покровное стекла; полоски фильтровальной бумаги.

**Ход работы.** Заполнить две пробирки раствором метиленовой синей. Поместить в одну пробирку 2—3 побега элодеи, вторую оставить в качестве контроля. Через 2—3 часа (или через сутки) отметить изменение интенсивности окраски в сосуде с растениями по сравнению с контролем (рассматривать на светлом фоне). Поместить 1—2 интенсивно окрашенных листочка на предметное стекло в каплю 1М раствора  $\text{KNO}_3$ , накрыть покровным стеклом и через 15—20 минут рассмотреть в микроскоп при большом увеличении. Зарисовать плазмоллизированную клетку.

Ответить на следующие вопросы:

1. В какой части клетки накапливается метиленовая синяя?
2. Как объяснить отсутствие обратной диффузии поглощенной краски из клеток в наружный раствор?
3. Остаются ли клетки живыми после накопления в них метиленовой синей?

## Работа 5

### ПРИЖИЗНЕННОЕ ОКРАШИВАНИЕ КЛЕТОК НЕЙТРАЛЬНЫМ КРАСНЫМ

Подобно метиленовой синей краска нейтрального красного способна проникать в живые клетки и накапливаться в них в больших количествах. При непродолжительном пребывании клеток в растворе нейтрального красного цитоплазма не отмирает, в чем можно убедиться, вызвав плазмолиз окрашенных клеток (плазмоллизироваться могут только живые клетки). Нейтральный красный — двухцветный индикатор: в кислой среде ( $\text{pH} < 6$ ) он имеет малиновую окраску, в щелочной — желтую.

Для понимания результатов данной работы необходимо иметь в виду, что в растворе с рН около 7 нейтральный красный находится в форме недиссоциированных молекул, хорошо растворимых в липидах мембран, тогда как в кислой среде это вещество диссоциирует на ионы, плохо растворимые в липидах. Цитоплазма живой клетки имеет слабое сродство к красителю. Окрашивание цитоплазмы и ядра — признак повреждения клетки.

**Материалы и оборудование.** Луковица обыкновенного лука, листья разных растений; 0,02%-ный раствор нейтрального красного в капельнице; 1М раствор  $\text{KNO}_3$  в капельнице; 10%-ный раствор аммиака в капельнице с притертой пипеткой; скальпель; лезвие бритвы, препаровальная игла; микроскоп; предметные и покровные стекла; стеклянная палочка; стаканчик с водой; кусочки фильтровальной бумаги; цветные карандаши.

**Ход работы.** Приготовить 2—3 среза эпидермиса чешуи обыкновенного лука или листьев каких-либо других растений и поместить их на предметное стекло в большую каплю раствора нейтрального красного, не накрывая покровным стеклом (при хорошем доступе воздуха прокрашивание происходит быстрее). Через 10—15 минут (не более) отсосать раствор краски фильтровальной бумагой, перенести срезы в каплю воды, накрыть покровным стеклом и рассмотреть в микроскоп. Заменить воду 1М раствором  $\text{KNO}_3$  и ввести каплю 10%-ного аммиака, являющегося сильным ядом. Рассмотреть препарат под микроскопом, обратив внимание на микроскоп. Заменить воду 1М раствором  $\text{KNO}_3$  и продолжать наблюдения при большом увеличении. Зарисовать плазмолизированную клетку, отметив, какая часть окрашена красителем (клеточная стенка, цитоплазма или вакуоль) и в какой цвет (раскрасить цветным карандашом).

Отсосать из-под покровного стекла раствор  $\text{KNO}_3$  и ввести каплю 10%-ного аммиака. Рассмотреть препарат под микроскопом, обратив внимание на окраску цитоплазмы и ядра в погибших клетках. Зарисовать клетку. Ответить на следующие вопросы:

1. Велика ли проницаемость клеточных мембран для нейтрального красного?
2. В какой части живой клетки накапливается краситель и как это объяснить?
3. Каковы значения рН клеточного сока?

### *Работа 6*

## **ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛИЯ И КАЛЬЦИЯ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЦИТОПЛАЗМЫ**

Задача этой работы, являющейся продолжением предыдущей, показать, что проницаемость цитоплазмы зависит от ионов минеральных солей. Ионы, повышающие степень гидратации коллоидов, увеличивают проницаемость, тогда как ионы, проявляющие коагулирующее действие,

вызывают дегидратацию белков, уменьшение пор мембран и понижение скорости проникновения веществ в клетку.

*Материалы и оборудование.* Луковица обыкновенного лука; побеги элодеи; 0,02%-ный раствор нейтрального красного в капельнице, 1М раствор  $\text{KNO}_3$  в капельнице; 0,7М раствор  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  в капельнице; 1М раствор сахарозы в капельнице; лезвие бритвы; препаровальная игла; микроскоп; предметные и покровные стекла; фарфоровые чашечки (4 шт.), карандаш по стеклу; кусочки фильтровальной бумаги.

*Ход работы.* Налить раствор нейтрального красного в две фарфоровые чашки, добавив в одну из них 1/10 объема 1М раствора  $\text{KNO}_3$ , а в другую — 1/10 объема 0,7 М  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (18 капель раствора краски и 2 капли раствора соответствующей соли). Сделать на чашках надписи карандашом по стеклу.

Поместить в растворы по три среза эпидермиса лука или по три листочка элодеи. Через 5 минут вынуть по одному срезу (или листочку), обсушить фильтровальной бумагой, поместить на предметное стекло в каплю 1М раствора сахарозы и накрыть покровным стеклом, то же самое сделать с объектами, пролежавшими в растворе краски в течение 10 и 15 минут. Рассмотреть плазмолизированные клетки в микроскоп и сравнить скорость проникновения нейтрального красного в вакуоли (по интенсивности окраски).

Сделать вывод о влиянии ионов на проницаемость цитоплазмы.

### *Работа 7*

## **ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ВЫХОД ЭЛЕКТРОЛИТОВ ИЗ КЛЕТКИ**

Цитоплазматическая мембрана (плазмалемма) первой воспринимает информацию о внешней среде и передает ее внутрь клетки. Она выполняет защитную функцию, участвует в узнавании клетками друг друга, обмене информацией между ними, агрегации, адгезии, восприятию различных химических и физических воздействий, на ней протекают биоэлектрические реакции. Плазмалемма, как и мембраны других компартментов, отличается высокой лабильностью, ее полное обновление может произойти за несколько минут.

Плазмалемма обладает избирательной проницаемостью, она контролирует поступление веществ в клетку и выход их из нее. Определить влияние каких-либо веществ или условий на проницаемость клеточных мембран можно, измеряя выход различных метаболитов из клетки. Различными методами (электронного парамагнитного резонанса, ядерного магнитного резонанса, поляризацией флуоресценции) показано, что изменения в скорости выхода веществ связаны с изменениями свойств мембран.

Получаемый эффект может зависеть не только от свойств плазмалеммы и тонопласта, но и от структурно-функциональных особенностей цитоплазмы данной клетки.

Изменение проницаемости мембран под влиянием какого-либо фактора внешней среды можно определить по выходу электролитов из клеток в окружающий раствор. Метод основан на измерении удельной электропроводности раствора при помощи кондзтстометра. Используемый в данной работе метод широко применяют в практических исследованиях при изучении разнообразных воздействий на целые растения, кусочки тканей, отдельные органы, суспензии клеток и протопластов.

Одной из первых и неспецифических реакций растений на действие различных стрессов является повреждение клеточных мембран, которое ведет к изменению их проницаемости. Характер изменения проницаемости мембран зависит от устойчивости растения к действующему фактору. Этот показатель может служить тестом при отборе устойчивых форм в селекционной работе. Объектом могут быть растения, инфицированные разными патогенами; растения, выращенные в разных условиях снабжения водой; разные органы растений, подвергшиеся действию температурного стресса, и т. д.

**Цель работы.** Определить влияние заражения растения фитопатогеном на выход электролитов из клеток растения.

**Материалы и оборудование.** Бюксы объемом 10—20 мл; пипетки; лезвия; пинцеты; торсионные весы (смотри работу 1, тема 2); линейки; капрон или марля; термостат с температурой 25°C; водяная баня с температурой 100°C; кондуктометр.

**Объект исследования.** Листья хлопчатника здоровых и инфицированных вилтом растений.

**Ход работы.** Листья растений промывают водопроводной водой в течение 15 минут, обсушивают фильтровальной бумагой, удаляют крупные жилки и лезвием нарезают на кусочки 1,5x1,5 мм (размер кусочков может варьировать в зависимости от объекта). Навески по 200 мг помещают в бюксы, закрывают капроном, который укрепляют резинкой, и промывают под краном холодной водопроводной водой в течение 30 минут, затем три раза ополаскивают дистиллированной водой, сливают воду и слегка обсушивают навеску, переворачивая бюксы на чистую фильтровальную бумагу.

В бюксы приливают по 4 мл дистиллированной воды и помещают по три бюкса с листьями здорового и зараженного растения (варианты) в кипящую водяную баню на 15 минут, по три других бюкса — в термостат с температурой 25°C на 1 час. После термостатирования жидкость из бюксов фильтруют через капрон и измеряют электропроводность фильтрата. Все растворы должны иметь одинаковую температуру перед измерением, так как электропроводность раствора зависит не только от концентрации в

нем электролитов, но и от подвижности ионов, которая, в свою очередь, зависит от температуры. Определяют выход электролитов из клеток с помощью кондуктометра. Необходимо помнить, что для каждого нового объекта величина навески и объем приливаемой воды могут варьировать.

Определите коэффициент повреждаемости (КП) по формуле

$$\text{КП} = \frac{(L_0 - \text{Ц})}{(100 - 1^*)} \cdot 100\%$$

где  $L_0$  — выход электролитов из листьев зараженных (опытных) растений в процентах от полного выхода электролитов в этом варианте (после кипячения,  $t=100^\circ\text{C}$ );  $L_k$  — выход электролитов из тканей контрольных растений в процентах от полного выхода электролитов. Полный выход электролитов определите по электропроводности фильтрата после разрушения мембран кипячением и примите за 100%. Результаты представьте в виде таблицы. Сделайте выводы.

*Таблица*

| Варианты                    | Температура в опыте, °С | Электропроводность | КП |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------|----|
| Листья здорового растения   | 25                      |                    |    |
|                             | 100                     |                    |    |
|                             | 25                      |                    |    |
|                             | 100                     |                    |    |
| Листья зараженного растения | 25                      |                    |    |
|                             | 100                     |                    |    |
|                             | 25                      |                    |    |
|                             | 100                     |                    |    |

### *Работа 8*

## **ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ДЛЯ БЕТАЦИАНИНА**

Бетацанин - пигмент столовой свеклы - относительно большая, растворимая в воде молекула, находящаяся в клеточном соке. Чтобы попасть во внешнюю среду, молекула бетацанина должна пройти тонопласт, основной цитоплазматический кортекс и плазмалемму. Диффузия бетацанина из вакуоли в среду может происходить достаточно быстро при воздействии различных факторов или агентов, вызывающих изменение проницаемости мембран. Измеряя оптическую плотность инкубационной Среды через определенный промежуток времени, можно определить степень воздействия на проницаемость мембран. Этот простой и быстрый метод используется обычно в прикладных исследованиях при изучении действия какого-либо вещества или фактора на биологические объекты.

*Цель работы.* Определить действие температуры на проницаемость мембран для бетацанина по выходу его в различные инкубационные среды.

*Ход работы.* Из корня столовой свеклы пробочным сверлом вырезают столбики ткани диаметром 5 мм. С помощью лезвия и линейки разрезают их на миллиметровые кусочки, стараясь выбирать одинаковые по цвету. Отсчитывают 60 дисков, которые в течение 15-20 минут промывают водопроводной водой для удаления остатков клеток и клеточного сока.

В 3 пробирки наливают по 10 мл воды, в следующие - по 10 мл 0,5М сахарозы. В каждую пробирку помещают по 10 дисков свеклы. 2 пробирки (одна с водой, другая - с сахарозой) оставляют при комнатной температуре, две другие ставят в водяную баню при температуре 35°C, замечают время. Две оставшиеся пробирки (с водой и сахарозой) помещают в водяную баню при 45°C и также отмечают время.

В течение 1 часа через каждые 10-15 минут в пробирках замеряют выход бетацианина в раствор. Для этого из опытной пробирки пипеткой отливают раствор в пробирку и после измерения оптической плотности выливают раствор в пробирку и после измерения оптической плотности выливают раствор в ту же самую опытную пробирку, стараясь не терять жидкость. Измерение плотности проводят на КФК с зеленым светофильтром.

Оформление работы: строят график зависимости оптической плотности от времени и условий и делают выводы.

### *Работа 9*

## **ДВИЖЕНИЕ ЦИТОПЛАЗМЫ**

^ Быстрое или почти незаметное движение цитоплазмы, которое происходит в клетках в естественных условиях, называют первичным. Движение же, индуцированное каким-либо фактором внешней среды (светом, температурой), - вторичным. Скорость движения цитоплазмы увеличивается с повышением температуры до определенного предела последней (чаще 27-37°C). При дальнейшем увеличении температуры движение замедляется, а затем прекращается. Свет может либо ускорить движение (фотосинтез), либо замедлить и остановить его. Характер реакции зависит от количества световой энергии и качественного состава света. Различные химические агенты, физические факторы также влияют на движение цитоплазмы. I

Выделяют несколько типов движения цитоплазмы. Наиболее широко распространено колебательное движение. Его считают наименее упорядоченным, так как при этом одни частицы находятся в покое, другие скользят по периферии, третьи — к центру клетки. Движение имеет неустойчивый, случайный характер. Циркуляционное движение характерно для клеток, которые имеют цитоплазматические тязи, пересекающие центральную вакуоль. Направление и скорость движения частиц, находящихся внутри или на поверхности слоя цитоплазмы, а также в цитоплазматических тязях, непостоянны. При ротационном движении цитоплазма находится только на периферии клетки и движется подобно приводному рем-

ню. Движение этого типа, в отличие от циркуляционного, имеет более или менее постоянный и упорядоченный характер, поэтому удобно для количественного изучения. Оно часто встречается в клетках листьев водных растений (элодея, валлиснерия и др.).

В организации движения цитоплазмы участвуют белки, образующие цитоскелет клетки. Структуры цитоскелета подразделяют на микротрубочки, толстые, тонкие и промежуточные микрофиламенты и микротрабекулы.

Цитоскелет — очень лабильная, постоянно меняющаяся система. Его элементы способны быстро распадаться (деполимеризоваться) и вновь собираться в структуры (полимеризоваться).

Внутриклеточное движение или движение самой клетки зависит главным образом от скольжения одного структурного элемента по другому. Это скольжение происходит за счет взаимодействия белков. Два основных белка, ответственных за двигательную систему, существуют во всех клетках. Это актин и миозин.

Источником энергии для движения протоплазмы является АТФ. Поэтому свет может влиять на скорость этого движения, изменяя уровень АТФ, образованной в процессе фотосинтетического фосфорилирования.

Различные ингибиторы и разобщители дыхания тормозят движение цитоплазмы во многих растительных клетках, что также свидетельствует об энергозависимости процесса. Так, 2,4-динитрофенол (ДНФ) — широко применяемый разобщитель дыхания и фосфорилирования — тормозит движение цитоплазмы в концентрациях  $10^{-4}$ — $10^{-3}$  М. Его действие обратимо: после удаления реагента скорость движения восстанавливается.

Биологическое значение движения цитоплазмы состоит в том, что оно способствует переносу веществ от одной части клетки к другой. Движение цитоплазмы имеет большое значение для поглощения и выделения веществ путем эндо- и экзоцитоза. Перемещения в клетке окруженных мембраной пузырьков, образованных в результате деятельности эндоплазматической сети и аппарата Гольджи, видимо, также осуществляется с помощью движения цитоплазмы. Различные внешние воздействия способны изменять скорость движения цитоплазмы. Ускорение движения под влиянием химических веществ называют хемодинамизмом. Большой интерес представляет тот факт, что хемодинамизм возникает при действии минимальных физиологических концентраций метаболитов растительных клеток, гормонов, некоторых аминокислот. Следовательно, скорость передвижения цитоплазмы может регулироваться продуктами метаболизма клетки.

Движение цитоплазмы можно охарактеризовать, определив его скорость. Однако нельзя забывать о том, что последняя зависит не только от движущей силы, но и от вязкости цитоплазмы. Скорость движения цитоплазмы можно измерить под микроскопом, наблюдая за передвижением ее частиц.

**Цель работы.** Показать, что скорость движения цитоплазмы неразрывно связана с уровнем жизнедеятельности клетки, с затратой ее энергии. Изучить влияние различных концентраций 2,4 - динитрофенола и АТФ на скорость движения цитоплазмы.

**Материалы и оборудование.** 5-10<sup>15</sup>М раствор АТФ; 540<sup>4</sup>М раствор ДНФ, ножницы, лезвия, фильтровальная бумага, секундомеры, микропипетки, предметные и покровные стекла, пробирки, термостат с температурой 37°С, микроскопы, растения элодеи или валлиснерии, предварительно активированных двух часовым освещением.

**Ход работы.** Недалеко от верхушечной почки стебля отделяют лист (у элодеи) или отрезают кусок листа (у валлиснерии), кладут на предметное стекло в каплю воды, взятой из сосуда, в котором было растение. Через 10 минут, когда установится стационарный уровень движения цитоплазмы, клетки листа рассматривают под микроскопом. Выбирают наиболее легко просматриваемые участки (у элодеи это чаще всего клетки средней жилки) и по движению хлоропластов следят за движением цитоплазмы.

Определяют скорость движения хлоропластов, измеряя путь, который проходит органелла в единицу времени. Для большей точности измерения желательно взять относительно короткий участок пути, например, равный десяти делениям окуляр-микрометра. Подсчет проводят для пяти органелл в пяти клетках, полученные данные обрабатывают статистически, вычисляя среднее арифметическое  $M$ , среднее квадратичное  $a$  и среднюю ошибку  $\sigma$ :

$$M = \sum a/n,$$

где  $\sum a$  — сумма отдельных измерений,  $n$  — число измерений

$$a = \pm \sqrt{\frac{\sum (VM)^2}{n-1}}; \sigma = a/\sqrt{n}.$$

Каплю раствора АТФ помещают с одной стороны покровного стекла и одновременно оттягивают фильтровальной бумагой воду из под стекла с другой стороны. Через 10 минут определяют скорость движения цитоплазмы. Подобный опыт проделывают с раствором ДНФ.

Веточку элодеи (или лист валлиснерии) опускают в стакан с водой, который находится в термостате при 37°С, и оставляют там на 20 минут. Затем отделяют лист и, положив его на предметное стекло в каплю воды, быстро определяют скорость движения цитоплазмы.

Контрольное определение скорости движения цитоплазмы (без обработки) проводят так же, как описано выше.

Полученные результаты оформляются в виде таблицы. Необходимо сделать выводы.

| Варианты   | Скорость движения, мм/с (M+T) |
|--|-------------------------------|
| Н <sub>2</sub> О, 20°С<br>Н <sub>2</sub> О, 37°С<br>5-10 <sup>м3</sup> АТФ<br>5ЛО- *ЦФ |                               |

## Тема 2

## ВОДНЫЙ РЕЖИМ РАСТЕНИЙ

## Работа 1

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ТРАНСПИРАЦИИ  
 МЕТОДОМ БЫСТРОГО ВЗВЕШИВАНИЯ (по Иванову)**

Транспирация - это процесс испарения воды надземной частью растения. Под интенсивностью транспирации понимают количество воды, испаренное растением в единицу времени на единицу площади (мг/дм<sup>2</sup>-час, г/м<sup>2</sup>-час) или навески (мг/гсырого весачас).

Данный метод основан на изменении массы транспирирующего органа за короткие промежутки времени, если допустить, что в первые минуты после срезания листьев вода испаряется с такой же скоростью, как и у неотделенных от растения органов. Однако после срезания может резко повыситься интенсивность транспирации вследствие нарушения непрерывного натяжения водных нитей. Чтобы смягчить или полностью ликвидировать это нежелательное явление, транспирирующий орган (побег или лист) срезают не на воздухе, а под расплавленным парафином, который быстро проникает в сосуды, застывает и обеспечивает сопротивление движению водного тока.

*Материалы и оборудование.* Комнатные растения, весы технические, весы торзионные, разновес, ножницы, расплавленный парафин, скальпель, нитка, чашка Петри без крышки, фильтровальная бумага, миллиметровая бумага, вода комнатной температуры.

*Ход работы.* Торзионные весы устанавливают строго вертикально по уровню. Если интенсивность транспирации будет рассчитываться на единицу поверхности, а не на единицу навески, то чашку весов снимают и таким образом увеличивают нагрузку весов. Лист срезают под расплавленным парафином, черешок его привязывают к нитке, прикрепляют к крючку весов и взвешивают. Затем лист переносят на растение, с которого он был срезан, и через 5 минут производят повторное взвешивание.

Интенсивность транспирации (J) рассчитывают по формуле:

$$J = \frac{a-60-10000}{S \cdot t} \text{ — г/м}^2 \text{ -час}$$

где  $a$  - количество воды, испарившейся с поверхности листа за 5 минут, г.

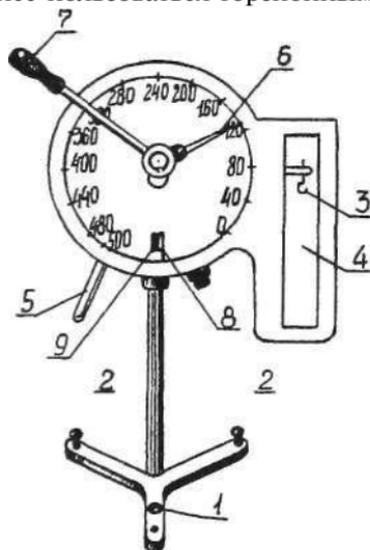
$S$  - площадь листа,  $\text{см}^2$ ; (площадь листа определяют с помощью миллиметровой бумаги весовым методом. Лист накладывают на бумагу, обводят контур листа карандашом, вырезают его и точно взвешивают. Затем из той же бумаги вырезают квадрат известной площади (например,  $1 \text{ дм}^2$ ) и тоже взвешивают. Площадь листа рассчитывают по формуле:  $a/B=c/S$ , где  $a$  - масса квадрата;  $b$  - масса бумажной фигурки,  $c$  - площадь квадрата;  $S$  - площадь листа.

$t$  - продолжительность опыта (в данном случае 5 минут), мин;

60 - коэффициент перевода минут в часы;

10000 - коэффициент перевода  $\text{см}^2$  в  $\text{м}^2$

При определении интенсивности транспирации отдельного листа удобнее пользоваться торзионными весами.



Торзионные весы - это пружинные микровесы с точностью до 1 мг. Максимальная нагрузка весов от 100 мг до 1 г. Принцип их работы основан на деформации очень тонкой металлической спиральной пружины, соединенной через рычаг (3) с крючком, к которому подвешивается чашечка для груза. Рычаг соединяется с указателем (8), который до взвешивания устанавливается на нуль.

Под действием груза рычаг опускается, растягивает пружину, и указатель отклоняется от нуля. Чтобы вернуть рычаг и указатель в исходное положение, нужно натянуть пружину с помощью рукоятки (7). Соединенная с рукояткой стрелка (6) покажет вес груза по шкале.

Перед работой весы устанавливают по уровню при помощи двух винтов в штативе (2). Весы должны быть арретированы пластинкой (5), кото-

рая при этом должна быть сдвинута влево. Правильность установки весов проверяют в их свободном положении (пластинка (5) должна быть отодвинута вправо): при положении стрелки (6) на нулевом делении шкалы указатель (8) должен совпадать с неподвижной чертой (9).

Приступая к взвешиванию, пластинку (5) отодвигают влево, открывают камеру (4), помещают на чашку весов груз, закрывают камеру. Движением пластинки (6) вправо освобождают весы и медленно передвигают рукоятку (7), соединенную со стрелкой, пока указатель не совпадет с неподвижной чертой. Стрелка укажет массу груза в мг.

Если хотят проследить за динамикой транспирации, лист срезают на воздухе, определяют его массу и затем в течение получаса (через определенные промежутки времени) производят повторные взвешивания. Чтобы убедиться в том, что транспирация не является простым физическим процессом испарения, параллельно определяют интенсивность испарения со свободной поверхности. Для этого в чашку Петри наливают воду почти до краев, взвешивают ее на технических весах с точностью до 0,01 г и через определенное время, например через час, проводят повторное взвешивание. Опыты по определению интенсивности транспирации и испарения со свободной поверхности должны проводиться *в одинаковых условиях*. Зная количество воды, испарившейся за определенное время, и площадь испаряющей поверхности, находят интенсивность испарения (Е). Площадь чашки Петри определяют по формуле  $S=7\pi r^2$ .

Отношение интенсивности транспирации к интенсивности испарения со свободной поверхности покажет величину относительной транспирации (К).

$$K = \frac{J - 100\%}{E}$$

*Таблица*

| Объект | Масса, г |          |             | Время опыта, мин | Площадь, см <sup>2</sup> | Интенсив, трансп., г/м <sup>2</sup> - час | Интенсив. физического испарения, г/м <sup>2</sup> -час |
|--------|----------|----------|-------------|------------------|--------------------------|---|--|
|        | исходная | конечная | потеря веса |                  |                          |   |  |
|        |          |          |             |                  |                          |   |  |

## ИЗУЧЕНИЕ УСТЬИЧНОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ

*Цель работы.* Проследить за движениями устьиц при воздействии на них осмотически активного вещества (глицерина) и вещества, влияющего на свойства мембран (АБК).

*Материалы и оборудование.* Листья традесканции, зебрины, сеткрезии, герани и других растений. 5%-й и 20%-й растворы глицерина, 10-5М раствор АБК, предметные и покровные стекла, безопасная бритва, микроскоп.

*Ход работы. Вариант 1.* С нижней стороны листа снимают кусочки эпидермиса, надрезая его бритвой, и помещают их в 5%-й раствор глицерина на 1,5-2 часа. Глицерин, проникая в вакуоли замыкающих клеток устьиц, повышает их осмотическое давление и соответственно способность насасывать воду. Затем срезы эпидермиса в этом же растворе просматривают под микроскопом, отмечают состояние устьиц и зарисовывают их.

Заменяют глицерин на дистиллированную воду: с одной стороны покровного стекла наносят каплю воды, с другой - оттягивают глицерин фильтровальной бумагой. Наблюдают раскрытие устьиц. После этого таким же способом заменяют воду 20%-м раствором глицерина и наблюдают закрытие устьиц. Зарисовывают устьица во всех наблюдаемых состояниях и делают вывод о причинах движения устьиц.

*Вариант 2.* С листа растения, предварительно обильно политого и хорошо освещенного, снимают кусочки эпидермиса, как описано выше, и в капле воды просматривают их под микроскопом. Для опыта берут эпидермис с достаточно раскрытыми устьицами. Отобранные кусочки эпидермиса помещают в раствор АБК. Через 30-40мин рассматривают срезы и отмечают изменение состояния устьиц. Исходное и конечное состояния устьиц зарисовывают и объясняют.

(Работы  $S'$ )

## СРАВНЕНИЕ ТРАНСПИРАЦИИ ВЕРХНЕЙ И НИЖНЕЙ СТОРОН ЛИСТА ХЛОРКОБАЛЬТОВЫМ МЕТОДОМ

Метод основан на способности безводного хлористого кобальта  $CoCl_2$  поглощать воду и превращаться в кристаллогидрат —  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ .

Фильтровальная бумага, пропитанная раствором хлористого кобальта и высушенная в шкафу, на поверхности транспирирующего листа меняет свой цвет с голубого на розовый. По скорости порозовения хлоркобальтовой бумажки можно судить об интенсивности транспирации.

*Материалы и оборудование.* Свежие листья традесканции или пеларгонии, хлоркобальтовые бумажки размером 8x6 см, сушильный шкаф, микроскоп, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, ка-

пельница с водой, лезвие бритвы, пинцет, скрепки, кусочки полиэтиленовой пленки.

*Ход работы.* Приготовление хлоркобальтовой бумаги. Фильтровальную бумагу или обеззолненные тонкие фильтры в течение нескольких минут выдерживают в растворе хлористого кобальта (на 100 мл воды растворяют 6,7 г  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  и 2,64 г поваренной соли) и высушивают в сушильном шкафу до появления ярко-голубого цвета. Хлоркобальтовую бумагу хранят в эксикаторе над прокаленным хлористым кальцием.

Просушенные в сушильном шкафу до ярко-голубого цвета кусочки хлоркобальтовой бумаги 2x3 см помечают простым карандашом, взвешивают на торзионных весах и прикладывают к нижней и верхней стороне одного листа. Снаружи их покрывают прозрачной полиэтиленовой пленкой, которую закрепляют к поверхности листовой пластинки скрепками за пределами прямоугольника бумаги. Хлоркобальтовую бумагу нельзя брать пальцами, так как влага пальцев может вызвать порозовение. Необходимо пользоваться пинцетом и кусочками пленки. Через 30-45 минут хлоркобальтовые бумажки снимают и повторно взвешивают. Определяют изменение веса аппликаций в пересчете на 1 см<sup>2</sup>. Делают вывод об интенсивности транспирации морфологически верхней и нижней стороны листа. Для того чтобы объяснить причину различной интенсивности транспирации, рассматривают под микроскопом верхний и нижний эпидермис листа и подсчитывают количество устьиц в поле зрения. Препараты зарисовывают. Делают вывод об устьичной и кутикулярной транспирации.

#### *Работа 4*

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТОЯНИЯ УСТЬИЦ МЕТОДОМ ИНФИЛЬТРАЦИИ (по Молищу)**

Метод основан на способности жидкостей, смачивающих клеточные оболочки, проникать в устьичную щель заполнять межклетники, вытесняя из них воздух. При этом соответствующие участки листа в проходящем свете становятся прозрачными. Если жидкость на проникает через устьица, она испаряется и никаких следов на листе не оставляет. Молищ подобрал жидкости, которые по-разному проникают в устьичные щели: спирт проходит только через широко открытые устьица, бензол - в среднеоткрытые, ксилол - в слабооткрытые.

*Материалы и оборудование* Пеларгония, традесканция или фуксия; ксилол, бензол, этиловый спирт в капельницах: кисточка, стеклянная палочка.

*Ход работы.* На поверхность листа, где имеются устьица, наносят с помощью кисточки или палочек небольшие капельки спирта, бензола, ксилола. Лист выдерживают в горизонтальном положении до полного исчезновения капель, а затем рассматривают его в проходящем свете. Про-

никновение жидкости обозначают в таблице знаком +, отсутствие инфильтрации - знаком —.

*Таблица*

| Назва-<br>ние рас-<br>тения | Состоя-<br>ние рас-<br>тения | Проникновение |         |         | Степень<br>открытости устьиц |
|-----------------------------|------------------------------|---------------|---------|---------|------------------------------|
|                             |                              | спирта        | бензола | ксилола |                              |
|                             |                              | —             | *       | •       |                              |

Исследуют листья, выдержанные в разных условиях: свежие и повядавшие, освещенные и затененные. Результаты опыта заносят в таблицу и на основании полученных данных делают вывод о влиянии внешних условий на степень открытости устьиц.

### *Работа 5*

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОГЛОЩЕНИЯ ВОДЫ РАСТЕНИЕМ ПОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**

Ток воды в растении определяется верхним и нижним концевыми двигателями. Присасывающее действие транспирации именуется верхним концевым двигателем, под нижним концевым двигателем понимают "активное" поступление воды в корень. Если при интенсивной транспирации отставание поглощения воды от ее расходования вызывает усиление натяжения водных нитей в сосудах, то при ослаблении или отсутствии транспирации давление в сосудах становится избыточным. Это обусловлено существованием корневого давления, действие которого наглядно проявляется в случае "плача" растений.

*Материалы и оборудование.* 10-14-ти дневные проростки подсолнечника, тыквы, кукурузы, бобов, выращенных на водной культуре, потометр, вакуумная смазка.

*Ход работы.* Потометр доверху наполняют водой (прокипяченной и охлажденной или отстоявшейся не менее 8 часом). Одно колено V-образной трубки закрывают каучуковой пробкой с разрезом, в которую вставляется стебель растения таким образом, чтобы вся корневая система была погружена в воду. Другое колено прибора представляет собой узкую капиллярную трубку, на которую натянуто резиновое колечко для прикрепления миллиметровой бумаги. В приборе не должно содержаться ни пузырька воздуха. Все щели необходимо замазать вакуумной смазкой. Для поддержания постоянной температуры прибор следует поместить в сосуд с ватой или в ультратермостат.

Отмечают исходное положение мениска в трубке, затем смещение за 3-5 минут. Определение проводят 3-4 раза. Скорость поглощения воды корневой системой высчитывают по числу делений, на которое перемещается мениск капилляра за единицу времени.

После определения поглощения воды целым растением надземную часть растения срезают и проводят определение поглощения воды изолированной корневой системой, которое будет идти теперь с меньшей скоростью, т.к. обуславливается лишь активным поглощением воды корнями.

Результаты представляют в виде таблицы:

*Таблица*

| Состояние растения | Среда |           | Положение мениска |       |       | Средняя скорость смещения мениска (делений в минуту) | Активное поглощение воды, в % от общего поглощения |
|--------------------|-------|-----------|-------------------|-------|-------|--|--|
|                    | вода  | р-р Кнопа | Исходное          | Через |       |  |  |
|                    |       |           |                   | 3 мин | 6 мин | 9 мин  |  |
|                    |       |           |                   |       |       |  |  |
|                    |       |           |                   |       |       |  |  |

### *Работа 6*

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО СОКА МЕТОДОМ ПЛАЗМОЛИЗА**

Осмотическое давление (осмотический потенциал) клеточного сока - важный физиологический показатель способности клетки поглощать воду из наружного раствора. Осмотический потенциал клеточного сока зависит от концентрации растворенных в соке органических и минеральных веществ и степени их диссоциации. Этот показатель можно определить плазмолитическим методом. Для этого подбирается такая концентрация наружного раствора, которая вызывает самое начало плазмолиза. Известно, что при погружении ткани в гипертонический раствор происходит плазмолиз клетки. При погружении клеток в изотонический раствор их тургор снижается до нуля, но плазмолиз еще не наступает. Искомая концентрация клеточного сока будет находиться между той концентрацией наружного раствора, которая вызывает самый начальный плазмолиз не менее чем у 50 процентов клеток, и следующей, которая не вызывает плазмолиза.,

Зная-кшцентрацию клеточного сока, осмотическое давление вычисляют по уравнению Вант-Гоффа  $\Pi = RTC_i$  где

$\Pi$  - осмотическое давление, атм;

R - газовая постоянная (равна 0,0821 л-атм/град-моль);

T - абсолютная температура (равна 273°C + 1 комнат);

C - изотоническая концентрация, моль/л

i - изотонический коэффициент Вант-Гоффа, который характеризует относительное количество частиц в растворе электролита;

i -  $1 + a(p - 1)$ , где a - степень диссоциации растворенного вещества, p - число ионов, на которое диссоциирует молекула.

Изотонический коэффициент неэлектролитов равен 1. В качестве плазмолитика можно использовать как электролиты, так и неэлектролиты. Значения i для раствора NaCl представлены в таблице

*Таблица*

|                           |                 |                  |                  |                  |                   |                  |                  |                  |       |      |
|---------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|-------|------|
| Концентрация NaCl, моль   | 1,0             | 0,8              | 0,7              | 0,6              | 0,5               | 0,4              | 0,3              | 0,2              | 0,1   | 0,01 |
| Изотонический коэффициент | 2 <sup>-y</sup> | 1,6 <sup>4</sup> | 1,6 <sup>6</sup> | 1,6 <sup>8</sup> | 1,7 <sup>0-</sup> | 1,7 <sup>3</sup> | 1,7 <sup>5</sup> | 1,7 <sup>8</sup> | 1,83. | 1,93 |

**Материалы и оборудование.** Луковица синего лука или листья традесканции, бюретки с воронками, стеклянные бюксы или солонки, кисточки, фильтровальная бумага, лезвие бритвы, стеклянная палочка, препаровальные иглы, микроскоп, предметные и покровные стекла, карандаш по стеклу, часы, стакан с кипяченой водой, дистиллированная вода, 1-молярный раствор NaCl.

**Ход работы.** Из 1-молярного раствора NaCl я дистиллированной воды готовят растворы следующих концентраций: 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 моля. По 10 мл каждого раствора помещают в стеклянные бюксы или солонки, накрывают крышками для предохранения от испарения и ставят в ряд в порядке убывания концентрации.

Затем лезвием безопасной бритвы готовят 15-18 тонких срезов с эпидермиса исследуемой ткани с окрашенным клеточным соком, промывают их кипяченой водой, потом слегка обсушивают на фильтровальной бумаге и по 3 штуки помещают в каждый раствор. Причем срезы погружают не одновременно, а с интервалом 3-4 минуты, чтобы обеспечить одинаковую продолжительность пребывания их в растворах.

*Таблица*

| Концентрация раствора NaCl, моль | Время погружения среза в раствор | Время наблюдения | Степень плазмолиза | Рисунок клетки | Изотоническая концентрация, моль | Осмотическое давление клеточного сока, атм |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------------------|--|
| 0,5                              | х б •:                           |                  |                    |                |                                  |  |
| 0,4                              |                                  |                  |                    |                |                                  |  |
| 0,3                              |                                  |                  |                    |                |                                  |  |
| 0,2                              |                                  |                  |                    |                |                                  |  |
| 0,1                              |                                  |                  |                    |                |                                  |  |

Через 30–40 минут после погружения срезов в первый раствор их рассматривают под микроскопом.

Через 3–4 минуты рассматривают срезы из второго раствора и т. д. Определяют степень плазмолиза в каждом растворе и находят изотоническую концентрацию. Данные опыта заносят в таблицу.

### *Работа 7*

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДНОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК ПО ИЗМЕНЕНИЮ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРА**

(методом Шардакова и рефрактометрическим методом)

Подбирают раствор, концентрация которого и, следовательно, удельный вес, не меняется при пребывании в нем растительной ткани. В этом случае водный потенциал клеток равен осмотическому давлению раствора.

*Материалы и оборудование.* Листья растений, бюретки с воронками, пробирки с пробками в штативе, пробочные сверла, стеклянные палочки, пипетки с делениями на 10 мл, пипетки на 0,5 мл, пинцет, часы, иглы препаровальные, метиленовая синь, 1-молярный раствор сахарозы, дистиллированная вода.

*Ход работы.* Опыт проводят в 6-ти пробирках, установленных в штативе, и специальных полиэтиленовых ячейках. В пробирках готовят по 5 мл раствора сахарозы следующих концентраций: 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 моля. Для приготовления этих растворов используют 1-молярный раствор сахарозы и дистиллированную воду в бюретках, смешивая их в определенных соотношениях. Содержимое пробирок тщательно размешивают и переносят по 2–3 капли каждого раствора в ячейки. Блоки с ячейками прикрывают полиэтиленом для предотвращения испарения. Из листьев растений (пеларгония, примула, гортензия) вырезают пробочным сверлом диски и по 2 диска помещают в каждую ячейку (рекомендуется делать высечки, не захватывая сосудисто-проводящих пучков).

Через 40 минут определяют изменение удельного веса растворов. Для этого высечки листьев извлекают стеклянной палочкой или препаровальной иглой, а растворы слегка подкрашивают очень небольшим количеством метиленовой сини, взятой на кончике иглы. Равномерно окрашенный раствор набирают в пипетку, конец которой опускают в раствор исходной концентрации (соответствующие пробирки в штативе) и жидкость *медленно* выпускают, наблюдая за направлением движения струйки.

Если концентрация раствора и его удельный вес возросли после пребывания в нем высечек листа, подкрашенная струйка направляется вниз. В противном случае струйка поднимается вверх. При равенстве концентраций и удельных весов обоих растворов вытекающий подкрашенный раствор остается на месте.

Проделав опыт, находим такой раствор, концентрация которого и удельный вес после экспонирования высечек листа не изменились. Вод-

ный потенциал этого раствора будет равна водному потенциалу растительных клеток. Водный потенциал раствора равен его осмотическому давлению.

*Таблица*

| Концентрация опытного раствора, моль | Время погружения высечек | Время извлечения высечек | Направление движения струйки | Концентрация раствора, в котором окрашенная струйка осталась на месте | Водный потенциал, атм |
|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|---|-----------------------|
| 0,6                                  |                          |                          |                              |   |                       |
| 0,5                                  |                          |                          |                              |   |                       |
| 0,4                                  |                          |                          |                              |   |                       |
| 0,3                                  |                          |                          |                              |   |                       |
| 0,2                                  |                          |                          |                              |   |                       |
| 0,1                                  |                          |                          |                              |   |                       |

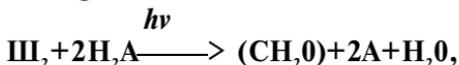
*Рефрактометрическая регистрация оптической плотности раствора.*

Рефрактометр - оптический прибор, с помощью которого определяют показатель преломления луча при прохождении его через призму с нанесенным на нее исследуемым раствором. Показатель преломления зависит от концентрации раствора и температуры. Основная часть рефрактометра - две стеклянные призмы, причем нижняя призма закреплена неподвижно, а верхняя может подниматься и опускаться. Между этими призмами нужно поместить испытуемый раствор, поднять верхнюю призму, нанести палочкой с оплавленным концом на нижнюю призму 2-3 капли исследуемого раствора сахарозы и немедленно опустить верхнюю призму до отказа. Сполоснуть палочку в воде и вытереть фильтровальной бумагой. Глядя в окуляр, направить с помощью зеркала свет в отверстие призмы, совместить границу светлой и темной частей поля зрения с пересечением линий креста (в рефрактометрах другого типа с пунктирной линией и сделать отсчет по шкале коэффициентов преломления. Определить концентрацию раствора в обоих рядах пробирок (исходных растворов и после пребывания в них дисков). Найти такой раствор, концентрация которого не изменилась. После каждого определения удалить с поверхности призм капли раствора сухой фильтровальной бумагой, затем дважды протереть бумагой, смоченной дистиллированной водой, и снова вытереть сухой фильтровальной бумагой.

## ФОТОСИНТЕЗ

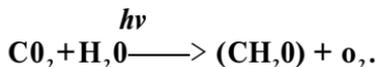
Фотосинтез — процесс синтеза органических веществ растениями и бактериями за счет энергии света.

Суммарное уравнение фотосинтеза:



где  $\text{H}_2\text{A}$  — донор водорода,  $(\text{CH}_2\text{O})$  — фрагмент молекулы углевода.

Источником водорода при фотосинтезе у высших растений, водорослей и цианобактерий служит вода, поэтому в результате фотосинтеза этих организмов выделяется кислород:



Фотосинтезирующие микроорганизмы в качестве донора водорода могут использовать как неорганические соединения (например,  $\text{H}_2\text{S}$ ), так и органические (например, органические кислоты). Фотосинтез у этих организмов бескислородный.

В химическом аспекте фотосинтез — процесс синтеза сложных органических веществ из простых соединений — воды и диоксида углерода, однако в отличие от других биохимических реакций синтеза источником энергии в этом случае является свет. С термодинамической точки зрения этот процесс идет с запасанием энергии ( $\Delta H$  «469 кДж/моль  $\text{CH}_2\text{O}$ ).

В основе фотосинтеза лежит окислительно-восстановительный процесс переноса электронов от воды к НАДФ против термодинамического градиента, при этом преодолевается разность потенциалов порядка 1,2В. Движущей силой при этом служит энергия света.

Преобразование энергии света при фотосинтезе осуществляется серией последовательных реакций и может быть подразделено на три этапа.

1. Поглощение света пигментами и образование возбужденных молекул.

2. Первичные фотохимические реакции, в которых принимают участие возбужденные молекулы пигментов. На этом этапе происходит трансформация энергии, преобразование энергии возбужденного состояния в химическую.

3. Химические темновые реакции, в которых участвуют продукты фотохимических реакций. На этой стадии осуществляется дальнейшая стабилизация первичных фотопродуктов и преобразование их в стабильные химические соединения.

Поглощение энергии света преобразование ее в форму НАДФ-Н и АТФ составляют *световую стадию фотосинтеза*. Дальнейшие реакции фиксации  $\text{CO}_2$  и синтеза органических соединений с использованием про-

дуктов световой стадии фотосинтеза (НАДФ-Н и АТФ) составляют темно-зеленую стадию фотосинтеза.

Организация и работа фотосинтетического аппарата растений находится под контролем эндогенных (генетических, гормональных) и экзогенных (освещенность, концентрации  $\text{CO}_2$  и  $\text{O}_2$ , температура и др.) факторов. Регуляция фотосинтеза затрагивает все уровни организации фотосинтетических реакций, начиная с молекулярного и кончая организменным уровнем и уровнем биогеоценоза. Важнейшим регуляторным фактором на уровне целого растения являются *донорно-акцепторные отношения*.

Характеристика организации и функционирования фотосинтетического аппарата и механизмов регуляции фотосинтеза включает как интегральные показатели (общая интенсивность фотосинтеза, накопление биомассы, содержание пигментов и их набор в листьях и др.), так и показатели активности отдельных реакций фотосинтеза (фотохимическая активность хлоропластов, активность фотофосфорилирования, образование фотоиндуцируемого электрохимического потенциала  $\text{F}_T$ , каталитическая активность отдельных ферментов и др.). Важным условием проведения исследований является учет физиологического состояния растений и условий их выращивания.

### *Работа 1*

## **ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПИГМЕНТОВ ЗЕЛЕННОГО ЛИСТА**

Синтез органических веществ из углекислого газа и воды под действием световой энергии происходит в зеленых пластидах-хлоропластах при участии пигментной системы. Пигментная система хлоропласта представлена двумя типами пигментов: зелеными хлорофиллами "а" и "б" и желтыми - каротинами и ксантофиллами. Основным функциональным пигментом является хлорофилл "а", так как он служит непосредственным донором энергии для фотосинтетических реакций, тогда как остальные пигменты лишь передают поглощенную ими энергию хлорофиллу "а".

По своей химической природе хлорофиллы - это сложные эфиры дикарбоновой кислоты хлорофиллина и двух спиртов - метилового и фитола.

**Хлорофилл "а"**  $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{ON}_4\text{Mg}(\text{COOCH}_3)(\text{COOC}_{20}\text{H}_{39})$

**Хлорофилл "б"**  $\text{C}_32\text{H}_{28}\text{O}_2\text{N}_4\text{Mg}(\text{COOH}_3)(\text{COOC}_{20}\text{H}_{39})$

Каротины - это непредельные углеводороды с эмпирической формулой  $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ . Основным каротином в зеленых листьях является Р-каротин.

Ксантофиллы - кислородосодержащие производные каротинов с эмпирической формулой  $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$ . Преобладающим ксантофиллом является лютеин.

Пигменты в воде нерастворимы, поэтому для извлечения их из растительных тканей используют органические растворители (спирт, ацетон и др.). Для получения пигментной вытяжки лучше использовать свежие зеленые листья, но можно и высушенные. В этом случае их предварительно обрабатывают горячей водой.

*Материалы и оборудование.* Свежие листья комнатных растений или сухие листья крапивы, кварцевый песок, воронка, стеклянная палочка, ступка с пестиком, коническая колба Бунзена, насос Камовского, стеклянный фильтр, штатив с пробирками, пипетка на 1мл, ножницы, спиртовка, держатели для пробирок, скальпель, вазелин, вакуумная смазка., фильтровальная бумага, стакан с водой, этиловый спирт, бензин, 10-процентная соляная кислота в капельнице, 20-процентный раствор NaOH или KOH, уксуснокислая медь, карбонат кальция (мел).

*Ход работы. 1. Получение спиртового раствора пигментов.*

Свежие листовые пластинки (2-3 шт.) пеларгонии нарезают на мелкие кусочки (5-10 мм) и помещают в ступку. Затем приливают 10-15 мл этилового спирта и добавляют небольшое количество кварцевого или промытого и прокаленного речного песка и карбонат кальция (на кончике ножа). Пестиком разрушают листья до однородной кашицы. Полученную вытяжку отфильтровывают, используя стеклянный фильтр, в колбу Бунзена с помощью насоса Камовского. Остатки суспензии смывают из ступки 10-ю мл этилового спирта в стеклянный фильтр и отфильтровывают. Полученный раствор пигментов сливают в герметичную посуду. Раствор должен быть прозрачным, не иметь осадка, цвет его - изумрудно-зеленый.

*2. Разделение пигментов по Краусу.*

В пробирку наливают 2-3 мл вытяжки пигментов, добавляют 4-5 мл бензина и несколько капель воды, чтобы предотвратить смешивание спирта с бензином. Пробирку закрывают пробкой, сильно встряхивают несколько раз, а затем отстаивают. Происходит расслоение эмульсии на 2 слоя: верхний (бензиновый) - окрашен в зеленый цвет, он содержит хлорофилл "а", хлорофилл "Б" и каротин, который маскируется зелеными пигментами; и нижний (спиртовой), который содержит ксантофилл и окрашен в желтый цвет.

Если пигменты разделяются нечетко, добавляют 3-4 капли воды и снова встряхивают. Помутнение нижнего слоя связано с избытком воды. В этом случае добавляют немного этилового спирта и пробирку вновь встряхивают.

*^Омыление хлорофилла щелочью.*

В пробирку наливают 2-3 мл спиртовой вытяжки пигментов, добавляют 1 мл 20-процентной KOH или NaOH и встряхивают. После этого доливают 2-3 мл бензина и несколько капель воды для лучшего разделения. Содержимое пробирки сильно встряхивают, а затем отстаивают. Верхний оранжево-желтый бензиновый слой содержит каротин, а нижний зеленый ксантофилл и соль хлорофиллиновой кислоты. Реакция омыления хлорофилла происходит по формуле:

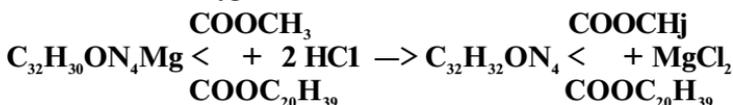


Образующаяся соль хлорофиллиновой кислоты сохраняет зеленую окраску и оптические свойства хлорофилла, но по сравнению с пигментом отличается большей гидрофильностью.

#### 4. Получение феофитина и обратное восстановление металлорганической связи.

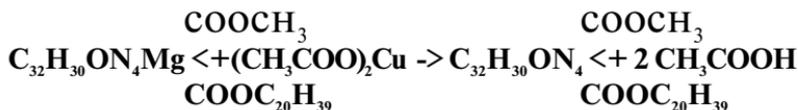
В две пробирки наливают 2-3 мл спиртовой вытяжки пигментов, добавляют 1-2 капли 10-процентной соляной кислоты. Атом магния в молекуле хлорофилла легко замещается водородом и образуется вещество буровато-оливкового цвета - феофитин.

Реакция идет по уравнению:



А чтобы вновь восстановить металлорганическую связь, в одну из пробирок с побуревшей вытяжкой прибавляют несколько кристалликов уксуснокислого цинка или уксуснокислой меди и осторожно нагревают над пламенем спиртовки. Наблюдают появление зеленой окраски, которая, однако, отличается от окраски хлорофилла.

Реакция идет по уравнению:



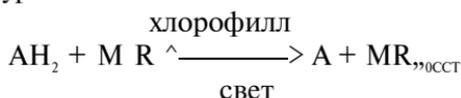
Обратное введение магния в феофитин происходит с большим трудом.

### Работа 2

## ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ХЛОРОФИЛЛА

Хлорофилл является фотосинтетическим сенсibilизатором, обеспечивающим процесс переноса водорода (электрона) к НАДФ в живом хлоропласте. Фотосенсибилизирующее действие пигмента проявляется также и в модельных системах, содержащих спиртовой раствор хлорофилла. Если в систему, состоящую из донора электрона (аскорбиновой кислоты) и акцептора электрона (метилового красного) поместить спиртовую вытяжку хлорофилла, то происходит обесцвечивание краски вследствие ее восстановления в лейкоформу.

Реакция идет по уравнению:



*Материалы и оборудование.* Раствор хлорофилла (спиртовая вытяжка из листьев), 0,04% спиртовой раствор метилового красного, аскорбино-

вая кислота, пробирки в штативе, градуированные пипетки на 10 мл, штатив с зажимами, электрическая лампа на 300 Вт.

*Ход работы.* В пробирку помещают 5 мл спиртовой вытяжки хлорофилла и добавляют кристаллическую аскорбиновую кислоту, постепенно растворяя ее до образования насыщенного раствора (избыток нерастворившейся кислоты оседает на дно сосуда). Затем прибавляют в пробирку по каплям 0,04% спиртовой раствор метилового красного до образования красного цвета.

Пробирку тщательно встряхивают и помещают на яркий свет (на расстоянии 2 см от электрической лампы на 30С8т). Через 15-20 минут метиловый красный обесцвечивается и раствор в пробирке вновь становится зеленым.

При исключении одного из условий опыта (свет, хлорофилл, аскорбиновая кислота) не происходит восстановления краски. Чтобы убедиться в этом, проводят аналогичный контрольный опыт с исключением света, аскорбиновой кислоты и хлорофилла (в последнем случае вместо спиртовой вытяжки хлорофилла наливают в пробирку 5 мл спирта). Результаты опыта вносят в таблицу и делают выводы о фотосенсибилизирующем действии хлорофилла.

*Таблица*

| Вариант      | Реакционная смесь   | Условия опыта | Результаты |
|--------------|---|---------------|------------|
| Опыт         | Спиртовой раствор хлорофилла + аскорбиновая кислота + метиловый красный | Свет          |            |
| 1-й контроль | Спиртовой раствор хлорофилла + аскорбиновая кислота + метиловый красный | Темнота       |            |
| 2-й контроль | Спирт + аскорбиновая кислота + метиловый красный                        |               | *          |
| 3-й контроль | Спиртовой раств. хлорофилла + метиловый красный                         |               |            |

### *Работа 3*

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОСНОВНЫХ ПИГМЕНТОВ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА В ЛИСТЯХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**

Для извлечения пигментов из растительных тканей и их разделения обычно используют полярные растворители' или смесь полярных (спирт, •

'Все работы с органическими растворителями и летучими веществами производить под тягой!

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

Количественное определение пигментов основано на их способности поглощать лучи определенной длины волны. Регистрацию оптической плотности раствора пигментов проводят на спектрофотометре. Определение концентрации хлорофиллов а 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 а 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 (С - концентрация, D - оптическая плотность):

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

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

$$C_b, \text{ мг/л} = 20,11 D_{649} - 5,18 D_{665};$$

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

$$C_a, \text{ мг/л} = 9,784 D_{665} - 0,990 D_{649},$$

$$C_b, \text{ мг/л} = 21,426 D_{649} - 4,650 D_{665};$$

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

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

$$C_b, \text{ мг/л} = 25,80 D_{649} - 7,60 D_{665};$$

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

$$C_a, \text{ мг/л} = 12,1 D_{665} - 2,81 D_{649}$$

$$C_b, \text{ мг/л} = 20,13 D_{649} - 5,03 D_{665}$$

$$C_{\text{каротин}} = \frac{1000 D_{470} - 3,27 C_a}{1000 D_{470} - 3,27 C_a} \cdot Q$$

дов.

*Материалы и оборудование.* Листья растения разных световых экотипов; листья или хвоя одного и того же растения, растущие при разном световом режиме (листья внутри кроны, на верхушке побегов и т. д.); листья разного возраста; 96%-й раствор этилового спирта или 80%-й раствор

ацетона;  $MgCO_3$  или  $CaCO_3$ ; 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 (см. работу 1, тема 2), спектрофотометр.

*Ход работы.* Для решения задачи необходимо провести экстракцию пигментов и определить на спектрофотометре их концентрацию. Навеску растительного материала (100-200 мг) размельчают ножницами, помещают в маленькую ступку, добавляют на кончике скальпеля немного  $MgCO_3$ , приливают 4-5 мл ацетона и тщательно растирают. Полученную вытяжку сливают по палочке на стеклянный фильтр, вставленный в колбу Бунзена. При помощи насоса жидкость отсасывают. После этого в ступку приливают еще немного ацетона, растирают, снова вливают на фильтр и отсасывают. Эту операцию повторяют несколько раз, пока раствор, стекающий из фильтра, не будет абсолютно бесцветным.

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

Концентрацию хлорофиллов а и в определяют на спектрофотометре. Для этого часть полученного экстракта наливают в кювету спектрофотометра. Вторую кювету, заполненную чистым растворителем (80%-й раствор ацетона), используют как контрольную. Кюветы помещают в кюветную камеру спектрофотометра и определяют оптическую плотность D вытяжки при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов а и в в 80%-м растворе ацетона, 663 и 646 нм. Для определения каротиноидов вытяжку промеряют при  $\lambda=470$  нм. Концентрацию хлорофиллов а, в и каротиноидов рассчитывают по формулам:

$$C_a, \text{ мг/л} = 12,21 \cdot 10^{-2} \cdot D_{663},$$

$$C_b, \text{ мг/л} = 20,13 \cdot 10^{-2} \cdot D_{663},$$

$$C_k = \frac{10 \cdot D_{470} - 3,27 C_a - 100 C_b}{229}$$

где  $C_a$ ,  $C_b$  и  $C_k$  - концентрация хлорофиллов а, в и каротиноидов, мг/л.

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

$$A = VC / 1000P,$$

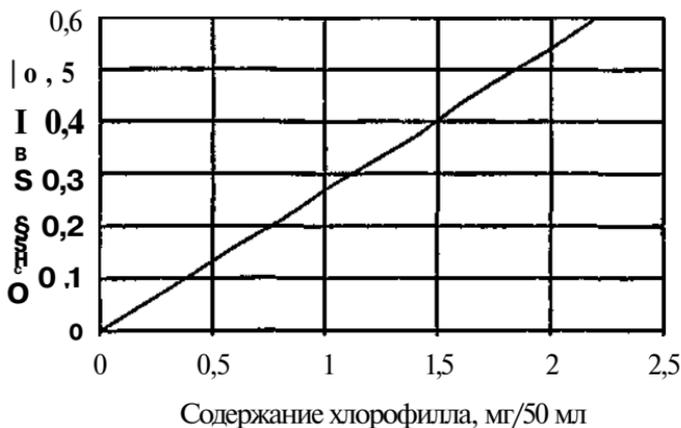
где С - концентрация пигментов, мг/л; V - объем вытяжки, мл (25 мл); P - навеска растительного материала, г (0,1- 0,2 г).

Определить концентрацию хлорофиллов можно на ФЭКе. Для этого за 20 мин до определения включить ФЭК, установить гальванометр на ну-

левое деление, поставить красный светофильтр, открыть шторы (предварительное освещение фотоэлементов необходимо, потому что в первые минуты после включения ФЭК дает неустойчивое показание). Определите оптическую плотность раствора относительно чистого растворителя (ацетона, используя кюветы с расстоянием между гранями 10 мм, для предотвращения испарения кюветы закрыть крышечками). Надежные результаты получаются при показаниях ФЭКа от 0,1 до 0,4, если оптическая плотность больше 0,5, то вытяжку следует разбавить, отмерив чистую сухую посуду определенный объем вытяжки ацетона; если же показания ФЭКа окажется ниже 0,08, то необходимо выполнить всю работу сначала взяв большую навеску. Повторить измерения и из полученных результатов взять среднее арифметическое. Определить концентрацию вытяжки по калибровочному графику: найти на оси ординат соответствующую оптическую плотность, провести от нее горизонтальную линию и от точки пересечения с калибровочным графиком опустить перпендикуляр на ось абсцисс. Вычислить процентное содержание хлорофилла в листьях в пересчете на сырую массу листа.

*Таблица*

| Объект | Навеска, мг | Объем вытяжки, мл | Оптическая плотность | Количество хлорофилла по калибровочному графику, мг/50мл | Содержание хлорофилла в листьях, % |
|--------|-------------|-------------------|----------------------|--|------------------------------------|
|        |             |                   |                      |  |                                    |



*Рис.* Калибровочный график для определения хлорофилла

## РАЗДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Пигментный аппарат фотосинтезирующих организмов может быть качественно охарактеризован с использованием метода хроматографии.

Разделение смеси пигментов на отдельные компоненты проводится с помощью хроматографии на различных носителях - адсорбентах (бумага, сахароза, еликагель, силуфол и др.). Чтобы пигменты разделились на сорбентах, используют систему неполярных растворителей с примесью определенного количества полярного растворителя. Пигменты, обладая неодинаковой растворимостью в данном растворителе и разной способностью к адсорбции, передвигаются по мере движения растворителя с различной скоростью и располагаются на адсорбенте отдельными зонами. Чем больше растворимость пигмента в растворителе и чем хуже он адсорбируется данным адсорбентом, тем быстрее этот пигмент будет передвигаться и тем дальше от старта будет располагаться зона этого пигмента

*Материалы и оборудование.* Хроматографическая бумага, стеклянные бюксы, стеклянные палочки, стеклянный цилиндр с пробкой, пинцет, ацетон, петролейный эфир или бензин с точкой кипения 80-110°C, углекислый кальций, оборудование для получения спиртовой вытяжки пигментов (см. работу 1, тема 3), фен или вентилятор для подсушки хроматограмм.

*Ход работы.* Подготовленную ацетоновую вытяжку пигментов переносят в бюкс на 10 мл. Затем подготавливают бюкс с чистым ацетоном. Из хроматографической бумаги вырезают полоску шириной 1,5-2 см и длиной 20 см. При строго вертикальном положении ее конец опускают на несколько секунд в пигментную вытяжку так, чтобы уровень пигментов поднялся не более чем на 1,5-2 см. Полоску высушивают и опять погружают в раствор пигментов. Эту операцию повторяют 5-7 раз до тех пор, пока у верхней границы распространения пигментов образуется темно-зеленая полоса.

После этого конец полоски помещают в чистый ацетон на несколько секунд для того, чтобы поднять пигменты к верхней границе. Затем полоску бумаги хорошо просушивают на воздухе до исчезновения следов ацетона и помещают ее в вертикальном положении в хроматографическую камеру, на дне которой налит петролейный эфир или бензин. Вместо хроматографической камеры можно использовать цилиндр, который герметически закрывается пробкой. В пробку вставляют крючок и приклеивают к нему полоску фильтровальной бумаги с вытяжкой пигментов.

Через 10-12 минут пигменты зеленого листа разделяется в следующем порядке: снизу - хлорофилл "Б", над ним - хлорофилл "а", затем ксанто-

филл, затем серое пятно феофетина. Каротин пройдет вместе с растворителем и расположится на значительном расстоянии от других пигментов.

Полученные хроматограммы подклеивают в лабораторную тетрадь и отмечают карандашом пигментные зоны, подписывают. По результатам работы делают выводы.

### *Работа 5*

## РАЗДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ НА СИЛУФОЛОВЫХ ПЛАСТИНКАХ

Хроматографическое разделение пигментов высших растений на силуфоловых пластинках позволяет выявить их более разнообразный состав.

*Материалы и оборудование.* 100%-й раствор ацетона; 96%-й раствор этилового спирта; петролейный эфир; этиловый эфир; гексан; бензин;  $MgCO_3$  ( $CaCO_3$ );  $Na_2SO_4$  безводный; кварцевый песок; фарфоровые ступки с пестиками; скальпель; ножницы; пинцет; стеклянные палочки; колба Бунзена со стеклянным фильтром № 3; мерные пробирки объемом 10 мл; мерный цилиндр объемом 25 мл; конические пробирки; центрифужные пробирки; пипетки объемом 2 и 5 мл; капилляры; силуфоловые пластинки; хроматографические камеры; фольга; весы торсионные; спектрофотометр; листья высших растений (гороха, пшеницы и др.).

*Ход работы.* Работа состоит из двух этапов.

### *1. Получение вытяжки пигментов.*

Для получения вытяжки пигментов из высших растений навеску листьев, равную 0,5 г, тщательно растирают в сухой фарфоровой ступке с 1–2 г безводного  $Na_2SO_4$  и небольшим количеством  $CaCO_3$  до сухого зеленого порошка. Измельченный растительный материал переносят на стеклянный фильтр № 3 и настаивают в течение 5 мин с 3–5 мл растворителя (смесь ацетона и этилового спирта в отношении 3:1). Небольшими порциями растворителя из растительного порошка на фильтре вымывают все пигменты в пробирку, вставленную в колбу Бунзена. Для окончательной экстракции пигментов порошок промывают порцией этилового эфира и общий объем экстракта в пробирке доводят растворителем до 10 мл. Экстракт содержит сумму зеленых и желтых пигментов.

### *2. Хроматографическое разделение пигментов.*

Разделение пигментов производят на пластинках силуфола размером 5x15 см. Эти пластинки предназначены для тонкослойной хроматографии. Они изготовлены из алюминиевой фольги, на которую в качестве сорбента нанесен силикагель; связывающим веществом здесь является крахмал.

Чтобы предотвратить окисление хлорофилла во время разгонки пигментов, пластинку предварительно обрабатывают  $10^{-2}M$  раствором аскорбиновой кислоты.

На пластинку силуфола с помощью капилляра наносят вытяжку пигментов (0,05-0,15 мл) полосой 1,5 см на расстоянии 2 см от нижнего края пластинки. В процессе нанесения вытяжки пластинку подсушивают струей воздуха.

7ZD

После нанесения нужного объема вытяжки пластинку подсушивают до полного испарения растворителя и помещают в хроматографическую камеру.

**С**

Камера предварительно насыщают смесью растворителей следующего состава: бензин, ацетон, петролейный эфир, гексан в объемном соотношении 10:10:3:10.



Разгонку проводят в сосудах с плотно закрытой крышкой, затемненных черной бумагой. После того, как фронт растворителя поднимется вверх (не доходя 2 см до края пластинки), хроматограмму вынимают и высушивают под струей воздуха. Идентифицируют пигментные зоны.

Распределение отдельных зон пигментов высших растений при разделении на силуфоле: 1 -  $\beta$ -каротин, 2 - феофетин, 3 - хлорофилл а, 4 - хлорофилл б, 5 - лютеин + зеаксантин, 6 - антраксантин, 7 - виолаксантин, 8 - неоксантин, 9 - старт.

Полученную хроматограмму наклейте в тетрадь. Отметьте зоны пигментов. Опишите различия пигментных систем двух исследованных групп фотосинтезирующих организмов.

### *Работа 6*

## **РАЗДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ КАРОТИНОИДОВ ЗЕЛЕННОГО ЛИСТА**

*Материалы и оборудование*, те же, что и в работе 5, листья высших растений (например, примулы).

*Ход работы.* Для решения задачи надо получить вытяжку пигментов, отделить каротин, лютеин и виолаксантин, а также определить концентрацию каротиноидов.

*1, Получение вытяжки пигментов.*

Методика получения вытяжки пигментов из листьев растений описана в работе 4 данной задачи. Смесь для экстракции пигментов содержит спирт и ацетон в отношении 1:3.

### 2. Хроматографическое разделение пигментов.

Разделение пигментов производят на силуфоловых пластинках размером 15x15 см. Пигменты наносят капилляром по всей ширине пластинки, отступая 2 см от нижнего края пластинки и по 1 см от боковых краев. Объем наносимой вытяжки: 0,5-0,8 мл. После тщательного подсушивания пластинки в токе воздуха проводят хроматографическое разделение пигментов. Условия проведения разгонки пигментов те же, что в работе 4 данной задачи. Порядок расположения отдельных зон пигментов представлен на рис. 1

Для количественного определения каротиноидов необходимо получить две - три хроматограммы.

### 3. Определение концентрации каротиноидов.

Окрашенные зоны, соответствующие каротину и ксантофиллам (неоксантин, виолоксантин, антероксантин, лютеин + зеаксантин) соскабливают скальпелем с 2-3 хроматограм.

Зоны одноименных пигментов соединяют и помещают в пробирки с притертыми пробками. Пигменты элюируют следующими растворителями: каротин - пет-ролейным эфиром, ксантофиллы - этанолом.

Элюцию производят при встряхивании проб, затем элюат фильтруют через бумажный фильтр в мерные пробирки с притертой пробкой, фильтр несколько раз промывают соответствующим раствором и объем доводят до 3 мл.

Пробы промеряют на спектрофото-метре: каротин - при 452 нм, лютеин - 445, виолоксантин - 442, неоксантин - при 438 нм.

1 С

3

4

6



Распределение пигментов на хроматограмме: 1 - Р - каротин, 2 - феофитин, 3 - хлорофилл а, 4 - хлорофилл Б, 5 - лютеин + зеаксантин, 6 - виолоксантин, 7 - неоксантин, 8 - старт

Концентрацию пигментов С рассчитывают по формуле

$$C, \text{ г/л} = P/a1,$$

где  $D$  - оптическая плотность при соответствующей длине волны;  $a$  - удельный коэффициент поглощения, л·г<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> (для каротина - 260, лютеина - 258, виолаксантина - 225, неоксантина - 227);  $l$  - толщина слоя раствора, см.

Содержание каротиноидов на 1 г сырой массы растительного материала  $A$  (мг/г) определяют по формуле  $A = CVK/P$ ,

где  $C$  - концентрация пигментов, г/л;  $V$  - объем вытяжки, мл (10 мл);  $K$  - отношение объема элюата к общему объему вытяжки, нанесенному на хроматограммы;  $P$  - навеска растительного материала, г (0,5г).

*Таблица*

| Пигмент | P, г | V, мл | Объем хроматографируемых проб | Объем элюата, мл | K | D, отн. ед. | C, г/л | A, мг/г сырой массы |
|---------|------|-------|-------------------------------|------------------|---|-------------|--------|---------------------|
|         |      |       |                               |                  |   |             |        |                     |

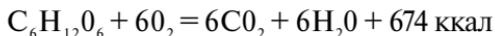
#### Тема 4

### ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ

#### *Работа 1*

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ДЫХАНИЯ ПО КОЛИЧЕСТВУ ВЫДЕЛЕННОЙ КИСЛОТЫ (по Бойсену-Иенсену)

Под дыханием подразумевают сложный комплекс окислительно-восстановительных процессов, в результате которых химическая энергия органических веществ (белков, жиров, углеводов) преобразуется в энергию макроэргических фосфорных соединений. Суммарная формула дыхания:

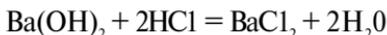


Дыхательный процесс сопровождается поглощением кислорода, выделением углекислого газа и расходом органических веществ. Следовательно, об интенсивности дыхания можно судить по изменению одной из трех величин.

Данный метод основан на измерении количества углекислого газа, выделенного растением при дыхании в закрытом сосуде. Содержание  $CO_2$  учитывают при поглощении его раствором барита



Избыток барита, не прореагировавший с углекислым газом, оттитровывают соляной кислотой

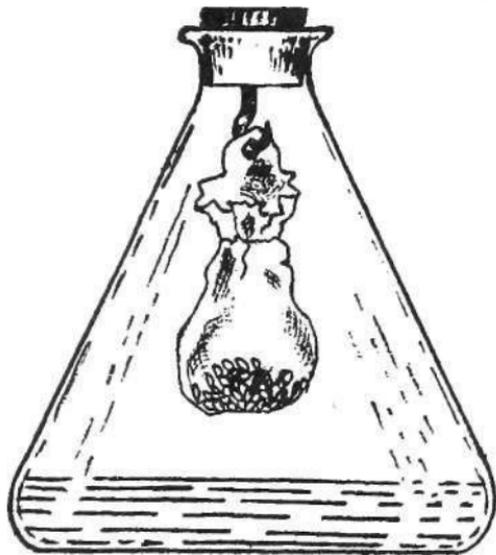


Параллельно определяют исходное содержание атмосферного  $\text{CO}_2$  в аналогичной колбе (контроль). По разности титрования в контрольной и опытной колбе судят о количестве выделенного при дыхании  $\text{CO}_2$ .

**Материалы и оборудование.** Проросшие и непроросшие семена или покоящиеся и набухшие почки, весы, разновес, конические колбы равного объема с резиновыми пробками, кусочки марли 10x10 см, 0,02-нормальный раствор  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  в бюретке, в пробку которой вставлена трубка с натронной известью, 0,02Н раствор соляной кислоты в бюретке, раствор фенолфталеина в капельнице.

**Ход работы.** Для опыта используют три одинаковых конических колбы на 250 мл с резиновыми пробками, причем с нижней стороны пробок вмонтированы крючки для подвешивания растительной навески .

В двух колбах определяют интенсивность дыхания сравнительных объектов, например листьев и стеблей, проросших и непроросших семян, покоящихся и набухших почек и т. д., а третья колба является контрольной и служит для определения исходного содержания  $\text{CO}_2$  в воздухе.



*Рис.* Колба для определения интенсивности дыхания

Перед началом опыта все три колбы без пробок выдерживают в одинаковых условиях 15-20 минут для равномерного их заполнения атмосферным воздухом. Помещают навеску 5-10 г (точно) проросших семян в марлевый мешочек, прикрепляют к крючку на пробке и предварительно проверяют, свободно ли проходит мешочек с навеской через горло колбы. Затем наливают в колбу строго 20 мл) 0,02Н раствора гидроокиси бария, вносят 2 капли фенолфталеина, быстро опускают растительный материал, плотно (вращательным движением) закрыв пробкой колбу, и отмечают

время начала опыта. Аналогичную операцию проводят с не проросшими семенами в другой колбе. В третью, контрольную, колбу (без растения) также наливают 20 мл барита и 2 капли фенолфталеина и плотно закрывают пробкой.

При работе с зелеными частями растений колбы следует помещать в темноту для исключения процесса фотосинтеза. В течение опыта колбы периодически покачивают, чтобы разрушить образовавшуюся на поверхности раствора плёнку  $\text{BaCO}_3$ . Через 40-50 минут мешочки с семенами быстро вынимают из колб и избыток барита во всех трех колбах оттитровывают, приливая через отверстие в пробке 0,02 нормальный раствор соляной кислоты до исчезновения розовой окраски. Результаты опыта вносят в таблицу.

*Таблица*

| Масса пробы, г | Количество 0,02N $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , мл | Время  |       |                              | Кол-во израсходованного 0,02N $\text{HCl}$ , мл |      | Поправка к титру $\text{HCl}$ | Интенсивность дыхания, $\text{mg CO}_2$ |
|----------------|--|--------|-------|------------------------------|---|------|-------------------------------|---|
|                |  | начало | конец | продолжительность опыта, час | контр.  | опыт |                               |   |
|                |  |        |       |                              |   |      |                               | -                                       |
|                |  |        |       |                              |   |      |                               |   |

Интенсивность дыхания растительной ткани вычисляют по формуле:

$$(A - B) \cdot 0,44$$

где  $A$  - количество 0,02N^бояльной кислоты, затраченное на титрование барита в контрольной колбе, мл;  $B$  - количество 0,02N соляной кислоты, использованной на титрование барита в опытной колбе, мл; 0,44 - количество  $\text{CO}_2$ , эквивалентное 1 мл 0,02N  $\text{HCl}$ , мг;  $P$  - масса пробы, г;  $t$  - продолжительность опыта, час.

### *Работа 2*

## **ПОТЕРЯ СУХОГО ВЕЩЕСТВА ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН**

Об интенсивности дыхания растительной ткани можно судить по расходованию органических веществ, затраченных на дыхательный процесс. Наиболее удобным для учета количества материала, израсходованного на дыхание, являются прорастающие семена. Чтобы исключить возможность как почвенного, так и воздушного питания, семена проращивают в темноте во влажных опилках. Через определенное время проростки высушивают

и взвешивают. Исходное содержание сухих веществ в непроросших семенах определяют в идентичной партии семян.

**Материалы и оборудование.** Семена гороха, весы с разновесом, промытые опилки, стаканы, бюксы, эксикатор с прокаленным хлористым кальцием, кристаллизатор, фильтровальная бумага, сушильный шкаф, термостат для проращивания семян.

**Ход работы.** Отбирают две партии здоровых, одинаковых по массе и количеству семян. Одну из них погружают в сосуд с небольшим количеством воды, чтобы вызвать набухание семян. Вторую колбу помещают в бюкс, высушивают при  $t=105^{\circ}\text{C}$  и определяют абсолютно сухую массу. Набухшие семена проращивают в сосудах с влажными опилкам'и в термостате при  $t=25^{\circ}\text{C}$ . Опыт проводят в темноте, чтобы исключить возможность фотосинтеза. Через неделю проростки осторожно вынимают из опилок, корни обмывают и обсушивают фильтровальной бумагой, определяют их сырую массу и помещают в бюкс для высушивания до абсолютно сухого состояния. Если проросли не все семена, то учитывают только проросшие, а пересчет делают на исходное количество семян. Результаты опыта вносят в таблицу

*Таблица*

| Непроросшие семена гороха, 10 шт |                    |                    | Проростки гороха, 10 шт |                    |                     | Потеря сухого вещества |                       |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|
| Воздушно-сухая масса, г          | Абс. сух. масса, г | Содержание воды, % | Сырая масса, г          | Абс. сух. масса, г | Содержание воды, %. | в г на 10 семян        | в % от исходной массы |
|                                  |                    |                    |                         |                    |                     |                        | за 7 суток            |
|                                  |                    |                    |                         |                    |                     |                        | за сутки              |

## Тема 5

### МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ

#### Работа 1

### ПОГЛОЩЕНИЕ АММОНИЯ РАСТЕНИЯМИ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КИСЛОТНОСТИ СРЕДЫ

Поглощение растением аммония можно проследить по изменению концентрации аммонийного азота в питательном растворе после экспозиции в нем растений. Для этого готовят питательную смесь определенного состава и помещают туда на определенное время растения. Определяют

концентрацию аммонийного азота до и после экспозиции. Рассчитывают изменение концентрации за 1 час на 1 г сырой массы корней.

*Цель работы.* Изучить влияние концентрации водородных ионов на поглощение иона аммония.

*Материалы и оборудование.* Растворы солей для питательной смеси, фосфатная буферная смесь, рН 12; фенолят натрия; 1%-й раствор нитропруссиды натрия (хранить в холодильнике не более 2 недель, из 1% раствора непосредственно перед употреблением готовят 0,5% раствор, который на свету быстро разлагается); гипохлорит натрия NaOCl (100 г хлорной извести растворяют в 170 мл воды при сильном перемешивании в течение 15 минут, затем приливают раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (70 г в 170 мл воды) и тщательно перемешивают, смесь фильтруют при отсасывании через двойной слой полотна, положенный в воронку Бюхнера, а затем через стеклянный фильтр № 3, получается зеленоватый раствор гипохлорита натрия); цилиндр объемом 500 мл; пипетки объемом 1 мл; колба объемом 3 литра, стаканы объемом 25 и 100 мл; рН-метр, весы технические; магнитная мешалка, ФЭК.

Растения кукурузы 10-20-дневного возраста, выращенные на видоизмененной среде Кнопа, разбавленной в 10 раз, и выдержанные в течение 1 суток до опыта на водопроводной воде. Во время выращивания поддерживают оптимальный для данного растения рН среды. Питательная смесь для выращивания растений имеет следующий состав, г/л:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  — 0,1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,025;  $\text{MgSO}_4$  — 0,012;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  — 0,01; KCl — 0,017.

*Ход работы.* Для изучения поглощения  $\text{NH}_4^+$  готовят питательную смесь того же состава, что и для выращивания растений, но концентрацию увеличивают вдвое. Для приготовления этой питательной смеси используют готовые исходные растворы нужных солей в более высокой концентрации:

| <i>Соль</i>                | <i>Исходные растворы, г/л</i> |
|----------------------------|-------------------------------|
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ | 100                           |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$   | 25,0                          |
| $\text{MgSO}_4$            | 12,5                          |
| $\text{NH}_4\text{NO}_3$   | 10,0                          |
| KCl                        | 17,0                          |

В цилиндр наливают 200-300 мл водопроводной воды, приливают туда 1 мл каждого исходного раствора соли. Объем раствора доводят водой до 500 мл, переливают в колбу и перемешивают. Готовую питательную смесь разливают поровну в 2 стакана. Измеряют рН смеси и доводят ее в одном стакане до 7,0, а в другом - до 5,0. Для этого помещают стаканы на магнитную мешалку, опускают в раствор электроды рН-метра, включают прибор и, добавляя в стакан по каплям кислоту или щелочь, доводят рН до нужного значения.

В четыре стакана объемом 100 мл наливают по 50 мл приготовленной питательной смеси: в два из них раствор с рН 5,0, в два других - с рН 7,0. Растения соединяют в пучки по 3-7 шт., промывают 2-3 раза в дистиллированной воде и удаляют остатки воды фильтровальной бумагой. Корни опускают в приготовленные растворы так, чтобы семена не попадали в раствор. Стаканы с растениями взвешивают, затем ставят на свет и подсоединяют к системе продувания раствора воздухом. Экспозиция длится 30 или 60 минут. За это время растения могут испарять и поглощать воду. Объем питательного раствора меняется. По окончании экспозиции стаканы с растениями взвешивают вновь, массу доводят до первоначальной, добавляя в питательный раствор по каплям воду. Растения вынимают из раствора, корни отрезают, сушат фильтровальной бумагой и взвешивают.

В растворах, на которых проводилась экспозиция растений, в исходном питательном растворе определяют концентрацию аммонийного азота методом Любошинского и Зальта.

#### *Определение аммония методом Любошинского и Зальта.*

При взаимодействии аммония, фенола и гипохлорита натрия образуются производные индофенола, окрашенные в синий цвет. Добавление в качестве катализатора нитропрусида натрия обеспечивает быстрое протекание реакции при комнатной температуре. Интенсивность синего окрашивания пропорциональна количеству аммонийного азота в пределах 0,02 — 0,4 мкг/мл.

Построение калибровочной кривой (8-10 точек). В мерные колбы объемом 25 мл приливают такое же количество испытуемого раствора, чтобы примерная концентрация азота в нем составляла 0,02-0,4 мкг/мл. В каждую колбу прибавляют в указанной последовательности следующие растворы: фенолят натрия — 2,5мл; фосфатную буферную смесь - 2,5 мл; 0,05%-й раствор нитропрусида натрия — 0,5 мл (готовят непосредственно перед употреблением из 1%-го раствора); гипохлорит натрия — 0,5 мл.

Колбы взбалтывают, доливают водой до метки и ставят в темноту на 30 минут. За это время интенсивность окраски достигает максимума и сохраняется в течение нескольких часов. Через 30 минут определяют оптическую плотность растворов на ФЭКе с красным светофильтром. Строят график зависимости оптической плотности от концентрации стандартных растворов.

Определение аммония в питательной среде. Исходя из того, что концентрация  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  в питательной смеси составляет 20 мг/л, рассчитывают концентрацию азота в аммонийной форме и разбавление, которое надо сделать для работы в пределах калибровочной кривой N. Соответствующий расчетам объем питательной смеси из опытных стаканов переносят в мерные колбы объемом 25 мл, добавляют нужные реактивы в строго определенной последовательности, объем раствора доводят дистиллированной водой до метки и проводят колориметрирование. По калибровочной кри-

вой находят концентрацию аммонийного азота в мерной колбе. Учитывая разведение, рассчитывают концентрацию его в питательной смеси и содержание в 50 мл смеси. По разности между исходным и конечным содержанием аммонийного азота в 50 мл питательной смеси находят величину поглощения его растением. Рассчитывают поглощение на 1 г сырой массы корней за 1 час. Сравнивают поглощение аммония при рН 5,0 и рН 7,0. Объясняют причину различий в поглощении аммония в разных условиях кислотности среды.

Результаты работы записываются в виде таблицы.

*Таблица*

| Вариант | Масса корней | Оптическая плотность раствора | Концентрация аммонийного азота в мерной колбе | Разбавление | Концентрация аммонийного азота | Содержание аммонийного азота в 50 мл питательной смеси | Поглощение аммонийного азота, мкг·г <sup>-1</sup> ·ч <sup>-1</sup> |
|---------|--------------|-------------------------------|---|-------------|--------------------------------|--|--|
|         |              |                               |   |             |                                |  |  |

## *Работа 2*

### **ОБНАРУЖЕНИЕ НИТРАТОВ В РАСТЕНИЯХ**

Нитраты (соли азотной кислоты) поглощаются из почвенного раствора корневой системой и в растительном организме восстанавливаются до аммиака. Аммиак может непосредственно включаться в реакции аминирования, образуя с кетокислотами (пировиноградной, щавелево-уксусной, α-кетоглutarовой) так называемые первичные аминокислоты (аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты). Из первичных аминокислот и кетокислот в результате реакций переаминирования образуются другие аминокислоты. Значительное количество NH<sub>3</sub> вступает в реакции амидирования, образуя аспарагин и глутамин.

Нитраты могут частично восстанавливаться в корневой системе. Основная часть их проходит через паренхиму корня, поднимается по проводящей системе корня и стебля в листья и здесь восстанавливается.

Содержание нитратов в различных частях растения можно определить по реакции с дифениламином, который в присутствии NО<sub>3</sub><sup>-</sup> образует синюю анилиновую окраску. По интенсивности окрашивания можно приблизительно судить о количестве нитратов в исследуемом материале.

*Материалы и оборудование.* Растения, выращенные в различных условиях, белая фарфоровая тарелка, стеклянная палочка, стакан с водой, ножницы, фильтровальная бумага, раствор дифениламина в крепкой серной кислоте (0,1 г в 10 мл кислоты).

*Ход работы.* На белую тарелку или кафельную плитку помещают кусочки черешка и листовой пластинки исследуемых растений. Разминают растительные ткани стеклянной палочкой и обливают раствором дифениламина. Для сравнительных исследований можно использовать различные виды растений, а также растения одного вида, выращенные в различных условиях внешней среды (на солнце и в тени, в увлажненных и засушливых условиях, с подкормкой минеральными солями и без нее и т.д.). Интенсивность окрашивания гомогената оценивают в баллах и результаты записывают в таблицу.

Результаты записывают в таблицу.

*Таблица*

| Объект | Условия выращивания растений | Содержание нитратов, баллы |          |        |
|--------|------------------------------|----------------------------|----------|--------|
|        |                              | лист                       | стебель. | корень |
|        |                              |                            |          |        |

### *Работа 3*

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЗОЛЫ В РАЗНЫХ ЧАСТЯХ РАСТЕНИЙ**

При сжигании растительной ткани углерод, кислород, водород и азот, образующие группу органогенов и составлявшие основу органических веществ, улетучиваются в виде паров воды и газообразных продуктов. А в нелетучем остатке (золе) содержатся неорганогены, которые называются минеральными или зольными элементами. Содержание зольных элементов в разных тканях одного и того же вида растения, а также в одной и той же ткани различных видов колеблется в широких пределах, что связано с характером обмена веществ, возрастом растения, почвенно-климатическими условиями выращивания и физиологическим состоянием клеток.

*Материалы и оборудование.* Древесина, листья и кора в воздушно-сухом состоянии, тигли (перед прокаливанием следует написать номер концентрированным раствором хлорного железа), эксикатор, тигельные щипцы, электроплитка, весы, разновес, ступка с пестиком, муфельная печь, скальпель, препаровальные иглы, градуированная пипетка, спички, этиловый спирт.

*Ход работы.* Перед началом работы фарфоровые тигли предварительно прокаливают в муфельной печи, охлаждают в эксикаторе и взвешивают с точностью до 0,01 г. Отдельно взвешивают 3-5 г тонких лучинок. Накальвают их препаровальной иглой и сжигают над тигельком. Затем тигелек со сгоревшими лучинами нагревают в течение 5-6 минут на электроплите, а после этого прокаливают в муфельной печи, нагретой до темно-красного каления, пока образовавшаяся зола не станет светло-пепельного цвета.

Для озоления листьев и коры растительный материал предварительно растирают в ступке, взвешивают 0,5-1,0 г и переносят в тигель. Сначала навеску сжигают вместе со спиртом, который небольшими порциями (по 1-2 мл) наливают в тигелек. Содержимое тигля во время сжигания перемешивают с помощью препаровальных игл. Затем навеску подогревают 5-6 минут на электроплитке и прокаливают в муфельной печи. По окончании озоления тигли переносят в эксикатор, охлаждают и взвешивают с точностью до 0,01 г.

*Таблица*

| Объект | Номер тигля | Масса тигля, г |            |         | Масса, г |      | Содержание золы, % |
|--------|-------------|----------------|------------|---------|----------|------|--------------------|
|        |             | пустого        | с навеской | с золой | навески  | золы |                    |
|        |             |                |            |         |          |      |                    |

Все студенты работают с различными объектами и полученные результаты вносят в общую таблицу.

#### *Работа 4*

### МИКРОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЗОЛЫ

В качестве материала можно использовать золу, полученную от сжигания древесины или листьев, или табачный пепел. Наличие некоторых зольных элементов в исследуемом материале можно определить микрохимическим методом.

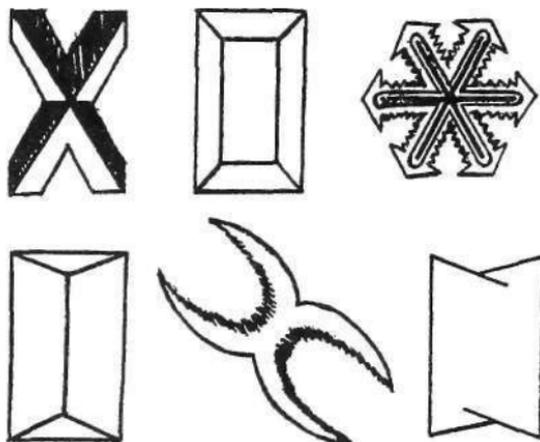
*Материалы и оборудование.* Табачный пепел или зола от сжигания листьев, пробирки в штативе, воронка малая, бумажный фильтр, стеклянные палочки с заостренным концом или препаровальные иглы, предметные стекла, микроскоп, фильтровальная бумага, дистиллированная вода, Ю-% раствор соляной кислоты, 1-% раствор серной кислоты, 1-% раствор молибденовокислого аммония в 1-% азотной кислоте, Ю-% раствор аммиака, 1-% раствор  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1-% раствор желтой кровяной соли.

*Ход работы.* Небольшое количество золы помещают в пробирку, заливают Ю-% раствором соляной кислоты в пятикратном объеме, настаивают 5 минут, отфильтровывают в сухую пробирку и полученный фильтрат исследуют на содержание в нем ионов кальция, магния, фосфора, железа и хлора.

На одном конце предметного стекла помещают небольшую каплю фильтрата, на другом - каплю соответствующего реактива и заостренным концом стеклянной палочки дугообразно соединяют их. В месте соединения образуются продукты реакции, которые при подсыхании выкристаллизовываются. Форму кристаллов рассматривают под микроскопом и зарисовывают.

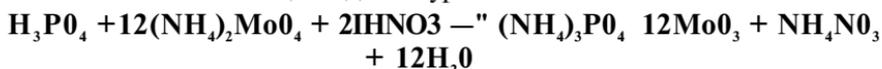
1. В качестве реактива на  $\text{Ca}^{2+}$  используют 1-процентную  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Реакция протекает по уравнению  $\text{CaCl}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{CaSO}_4 + 2\text{HCl}$  с образованием гипса, который осаждается в виде игольчатых кристаллов.

2. Для обнаружения  $\text{Mg}^{2+}$  каплю фильтрата сначала нейтрализуют каплей 10-% раствора аммиака, а затем соединяет ее с реактивом, которым служит 1-% раствор фосфорнокислого натрия. В результате химической реакции образуются характерные кристаллы фосфорно-аммиачно-магнезиальной соли, которые напоминают форму листьев папоротника, крышечек, звезд (смотри приложение 3). Реакция происходит по уравнению  $\text{MgCl}_2 + \text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_4\text{MgPO}_4 + 2\text{NaCl}$



*Рис.* Кристаллы фосфорноаммиачномагнезиальной соли

3. Для обнаружения фосфора используют 1-% раствор  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  в 1-% азотной кислоте. Реакция идет по уравнению:



с образованием зеленовато-желтого скрытокристаллического осадка аммонийно-фосфорного молибдата.

4. Для обнаружения  $\text{Fe}^{2+}$  используют 1-% раствор желтой кровяной соли. Реакцию проводят в фарфоровой чашке, доливая по каплям к остатку вытяжки раствор реактива до появления синей окраски (берлинская лазурь). Реакция идет по уравнению:  $4\text{FeCl}_2 + 3\text{K}_4[\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5)_6] \rightarrow \text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] + 12\text{KCl}$ .

## РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ

*Работа 1***ПРЕВРАЩЕНИЕ ВЕЩЕСТВ ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН**

Семена растений содержат разнообразные запасные питательные вещества. В семенах масличных культур накапливаются преимущественно жиры, в семенах злаковых - крахмал. При прорастании семян под влиянием ферментов происходит гидролиз сложных органических веществ на более простые. Чтобы узнать, каким превращениям подвергаются запасные питательные вещества, необходимо сравнить химический состав не проросших и проросших семян. Для исключения новообразований органических веществ при фотосинтезе семена проращивают в темноте.

*Материалы и оборудование.* Водяная баня, ступка с пестиком, пробирки в штативе, воронки малые, скальпели, спиртовка, держатели для пробирок, лезвие бритвы, предметные и покровные стекла, микроскоп, фильтровальная бумага, спички, фелингова жидкость, разбавленный раствор йода в йодистом калии, раствор краски Судан III в капельнице, дистиллированная вода.

Приготовление растворов:

1. Фелингова жидкость готовится непосредственно перед началом работы путем смешивания равных объемов двух растворов: Фелинг 1 и Фелинг 2.

2. Фелинг 1: 40 г медного купороса растворяют дистиллированной водой в колбе на 1 литр, объем раствора доводят до метки и фильтруют.

Фелинг 2: 200 г сегнетовой соли растворяют в дистиллированной воде, добавляют 150 г КОН или NaOH. Полученный раствор переливают в мерную колбу на 1 л, объем доводят до метки дистиллированной водой и фильтруют.

2. Раствор йода в йодистом калии ( $J_2$  в KJ). Растворяют 2 г KJ в 5 мл дистиллированной воды, добавляют 1 г кристаллического йода, после полного растворения доливают 295 мл воды. Полученный концентрированный раствор хранят в темной склянке с притертой пробкой. Для получения разбавленного раствора данный концентрированный раствор разбавляют в 3 раза дистиллированной водой.

3. Раствор краски Судан III. В фарфоровой чашке растворяют 0,2 г краски Судан III в 20 мл 96-% спирта, добавляют 20 мл глицерина, тщательно размешивают и фильтруют. Раствор хранят в холодильнике.

*Ход работы.* Растирают в ступках проросшие и не проросшие семена пшеницы по 10 штук и клешевины по 3-4 штуки. Растертую массу переносят в пробирки, доливают 5-7 мл воды и ставят в кипящую водяную баню на 10 минут для экстрагирования веществ. Содержимое пробирок от-

фильтровывают. Для определения количества редуцирующих Сахаров в пробирки с вытяжками доливают по 4-5 мл фелинговой жидкости и ставят в водяную баню. Моносахара при взаимодействии с фелинговой жидкостью восстанавливают ее в закись меди, которая выпадает на дно пробирки в виде красно-кирпичного осадка. По количеству образовавшегося осадка  $Cu_2O$  судят о содержании в растворе моносахаров. Необходимо следить за тем, чтобы жидкость Фелинга была в избытке и раствор над осадком  $Cu_2O$  оставался голубым. Наличие крахмала в оставшейся мезге определяют по йодной реакции. В пробирки с мезгой доливают небольшое количество раствора иода. По интенсивности окрашивания судят о содержании крахмала. Для определения содержания жира в проросших и не проросших семенах клещевины приготавливают тонкие срезы семян, помещают их в каплю раствора краски Судан Ш на предметном стекле и накрывают покровным стеклом. Через 5 минут срезы промывают водой и рассматривают под микроскопом. О количестве жира судят по числу и размерам оранжевых капель. Результаты заносят в таблицу и делают вывод о характере превращения веществ при прорастании крахмалистых и маслянистых семян.

*Таблица*

| Объект                        | Содержание веществ, баллы |     |                     |
|-------------------------------|---------------------------|-----|---------------------|
|                               | крахмал                   | жир | редуцирующие сахара |
| Семена пшеницы не проросшие   |                           |     |                     |
| Семена пшеницы проросшие      |                           |     |                     |
| Семена клещевины не проросшие |                           |     |                     |
| Семена клещевины проросшие    |                           |     |                     |

### *Работа 2*

## **ОБНАРУЖЕНИЕ АМИЛАЗЫ В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ**

Синтезированные в клетках ферменты легко диффундируют во внешнюю среду, где могут проявлять свои каталитические свойства.

*Материалы и оборудование.* Проросшие и не проросшие семена пшеницы, чашка Петри, крахмальный агар, стакан с водой, пинцет, скальпель, разбавленный раствор йода в йодистом калии (способ приготовления смотрите в работе).

Приготовление крахмального агара. Помещают в колбу 2 г мелко нарезанного агар-агара, доливают 100 мл воды и осторожно кипятят до полного растворения. Затем 2 г крахмала размешивают с 10 мл холодной воды к при помешивании стеклянной палочкой выливают в кипящий раствор агара, вновь доводят до кипения и разливают в чашки Петри.

*Ход работы.* В чашках Петри приготавливают пластинки из крахмального агара. Разрезают пополам несколько *проросших* семян пшеницы,

слегка смачивают их водой, и пинцетом осторожно раскладывают поверхностью среза вниз на одной половинке пластинки. Аналогичную операцию проводят с *не проросшими* семенами пшеницы, которые раскладывают на второй половине пластинки. Чашку Петри закрывают крышкой. Через час семена осторожно снимают и всю пластинку обливают разбавленным раствором йода. Результаты работы оформляют в виде рисунка и делают выводы о причинах различного действия эндосперма проросших и не проросших семян пшеницы на крахмальный агар.

### *Работа 3*

## **ЗНАЧЕНИЕ ЛИСТЬЕВ ДЛЯ УКОРЕНЕНИЯ ЧЕРЕНКОВ (по Руге)**

Ауксины образуются в верхушечных меристемах стеблей, в растущих зародышах, в верхушках coleoptилей, а также в листьях, причем из листьев они транспортируются в стебли, где и могут вызвать образование придаточных корней. Сравнительно немногие растения (тополь, некоторые виды ивы) содержат в стеблях большой запас ауксинов и способны к укоренению безлистных черенков. Для вегетативного размножения большинства растений используют зеленые (облиственные) черенки.

*Материалы и оборудование.* Традесканция (*Tradescantia viridis* или *T. discolor*); стаканы фаянсовые или стеклянные, обернутые черной бумагой; лезвие бритвы.

*Ход работы.* Срезать шесть по возможности одинаковых черенков традесканции с 5–6 листьями. У двух черенков удалить все листья, у двух других оставить два верхних листа, у третьей пары оставить все листья. Поставить черенки в стаканы с водопроводной водой и выставить на свет (в связи с тем, что свет тормозит корнеобразование, нужно использовать фаянсовые стаканы или обернуть стеклянные стаканы черной бумагой).

Через 1–2 недели осмотреть и зарисовать растения. Сделать вывод о значении листьев для образования придаточных корней.

### *Работа 4*

## **ВЛИЯНИЕ ИНДОЛИЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА УКОРЕНЕНИЕ ЧЕРЕНКОВ**

Природный фитогормон индолилуксусная кислота (ИУК) и некоторые синтетические вещества индуцируют заложение придаточных корней на стеблях черенков травянистых и древесных растений. Обработка стимуляторами роста широко используется в практике растениеводства при вегетативном размножении трудноукореняющихся растений.

Черенки фасоли способны укореняться и без обработки, однако корнеобразование (ризогенез) у них значительно усиливается под влиянием стимуляторов роста, вследствие чего этот объект можно использовать для определения физиологической активности еще не изученных веществ.

*Материалы и оборудование.* 10—14-дневные проростки фасоли. Выращенные на свету в сосудах с влажными опилками; побеги ивы корзиночной (*Salix viminalis*, но не *S. cargea*) или традесканции; 10 мг/л раствора ИУК (гетероауксина); ланолиновая паста с ИУК и контрольная (водная) паста; стаканы фаянсовые на 100—200 мл (2 шт.); вазоны или банки с влажным песком; лезвие бритвы; скальпель; карандаш по стеклу; толстая деревянная палочка (карандаш).

#### *Ход работы. Опыт 1.*

Взять два фаянсовых стакана (или стеклянных, обернутых черной бумагой), налить в один стакан водопроводную воду слоем 4—5 см, а в другой — раствор ИУК концентрации 70 мг/л, сделав на стаканах соответствующие надписи. Срезать бритвой несколько (не менее четырех) одинаковых проростков фасоли высотой 10—15 см (корневой шейки). Половину черенков поставить в стакан с водопроводной водой (контроль). Другие черенки выдержать в течение трех часов в растворе ИУК, после чего слить раствор, сполоснуть стакан и стебли черенков водой и поместить их в водопроводную воду, налитую в таком же количестве, как и в контроле. Оставить черенки на свету при комнатной температуре.

Через несколько дней, когда на стеблях отрастут придаточные корни, измерить длину зоны ризогенеза и подсчитать количество корней на каждом черенке.

#### *Опыт 2.*

Нарезать одинаковые черенки ивы или традесканции и удалить с них нижние листья. У одних черенков смазать нижнюю часть стебля ауксиновой пастой, у другие (контрольных) — водной пастой. Взять два сосуда с влажным песком и снабдить их соответствующими надписями. Сделать в песке лунки толстой палочкой, осторожно посадить черенки, прижав песок пальцами. Оставить растения на свету и ежедневно поливать.

Через 2—3 недели извлечь черенки из песка и установить стимуляцию корнеобразования.

### *Работа 5*

## АПИКАЛЬНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ

Верхушечная почка коррелятивно тормозит рост боковых почек (апикальное доминирование). В этом явлении участвует ауксин, вырабатываемый верхушечной почкой, передвигающийся базипетально (сверху вниз). Для объяснения механизма апикального доминирования предложено несколько гипотез: 1) ауксин, передвигаясь в сверхоптимальных количествах, задерживает рост боковых побегов; 2) верхушечная почка, наиболее богатая ауксином, является центром притяжения воды и питательных веществ (прежде всего азотистых), которых не хватает для боковых почек; 3) под действием ИУК синтезируется ингибитор роста, проникаю-

щий в боковые почки и тормозящий их распускание. По мнению большинства исследователей, справедливы вторая и третья гипотезы.

*Материалы и оборудование.* Растения гороха высотой 15—20 см, выращенные в плошках с почвой или песком; ланолиновая ластва с индолуксусной кислотой (ИУК) и контрольная (водная) паста; лезвие бритвы; стеклянные палочки (2 шт.).

**Ход работы.** Из шести одинаковых растений гороха у четырех срезать бритвой верхушки стеблей. Нанести на поверхность среза двух растений пасту с ИУК, на два других — водную пасту (для выяснения, не влияет ли на декапитированные растения нанесение ланолина). Два растения оставить без обработки. Выставить растения на свет и ежедневно поливать.

Через несколько дней рассмотреть растения и описать результаты, отметив, распустились ли пазушные почки. Зарисовать по одному растению всех трех вариантов опыта.

В выводах объяснить, почему в одних вариантах почки распускаются, а в других нет.

### *Работа 6*

## **ВЛИЯНИЕ ГИББЕРЕЛЛИНА НА РОСТ МЕЖДОУЗЛИЙ КАРЛИКОВОГО ГОРОХА**

Гиббереллины — естественные фитогормоны, влияющие на прорастание семян, рост стеблей в длину (на рост корней не действуют), фотосинтез, цветение растений и ряд других процессов. Наиболее удобным объектом для изучения действия гиббереллина на рост стеблей являются молодые растения карликового гороха.

По-видимому, карликовость — результат мутации одного гена, ответственного за синтез фермента, который участвует в образовании гиббереллина. Преодоление карликовости под действием гиббереллина доказывает взаимодействие в растении двух регуляторных систем — генной и гормональной.

*Материалы и оборудование.* Сосуды с выращенными в песчаной культуре (2—3-11 недель) растениями карликового гороха сорта Пионер: 0,01 %-раствор гиббереллина (гибберелловой кислоты): пульверизаторы (2 шт.), миллиметровая линейка; карандаш по стеклу.

**Ход работы.** Взять 2 сосуда с одинаковыми 2—3-недельными растениями карликового гороха и измерить длину междоузлия. Опрыскнуть из пульверизаторов растения одного сосуда 0,01%-ным раствором гибберелловой кислоты (около 1 мл на одно растение), а другого — водой, сделав на сосудах соответствующие надписи. Поставить сосуды в теплое светлое место и через 1—2 недели вновь измерить длину междоузлия, включая и вновь образовавшиеся. Вычислить средние приросты междоузлия, выразить их в процентах от контроля и заполнить таблицу:

В выводах отметить действие гиббереллина на рост растений и указать, у каких междоузлий стимуляция проявилась наиболее сильно.

### *Работа 7*

## **ВЛИЯНИЕ АУКСИНОВ НА РОСТ ОТРЕЗКОВ КОЛЕОПТИЛЕЙ ЗЛАКОВ**

Среди многочисленных эффектов, которые вызывают ауксины, наиболее изученным явлением является их действие на рост растяжением у отрезков coleoptилей или стеблей, что и используют как чувствительный биотест на этот гормон. Установлено, что ауксины вызывают выделение ионов  $H^+$  из клетки, гиперполяризацию мембранного потенциала, усиление поглощения  $K^+$ , повышение рН цитоплазмы, накопление малата или других органических кислот.

Во время растяжения в клетке появляется центральная вакуоль, занимающая большую часть ее объема. Образование вакуоли связано с увеличением поступления воды при понижении водного потенциала клетки, при этом осмотический потенциал поддерживается на постоянном уровне в результате гидролиза полимеров и накопления в клетке осмотически активных веществ. Потенциал давления снижается, так как под влиянием ауксина увеличивается растяжимость клеточной стенки.

Ряд исследователей объясняют действие ауксина на рост подкислением клеточных стенок. Это приводит к разрушению кислотлабильных связей компонентов стенки и активации кислых гидролитических ферментов, также разрыхляющих клеточную стенку. Такое представление подтверждают факты выброса  $H^+$  в окружающую среду под влиянием ауксина и существованием так называемого "кислого роста". Ауксинзависимый рост связан с синтезом РНК и белков. Первичным действием ауксина может быть активация генов. Действие ауксина на рост уже на первых этапах включает механизм восстановления клеточных стенок.

Действие ауксина, как и других фитогормонов, зависит от концентрации. Увеличение концентрации ауксина выше оптимальной приводит к замедлению роста. На некоторых объектах было показано, что увеличение количества ауксина стимулирует образование этилена, который вызывает задержку роста в длину.

*Материалы и оборудование.* Раствор индолилуксусной кислоты или ее соли (от  $10^{-7}M$  до  $10^{-3}M$ ), суточные проростки злаков (пшеницы, овса, ячменя), чашки Петри, леска диаметром 0,1-0,5 мм, лезвие бритвы, предметное стекло, фильтровальная бумага, пипетка на 10 мл, линейка или миллиметровая бумага.

*Ход работы.* Предварительно семена злаков замачивают на 18-20 часов. Наклонившиеся семена раскладывают зародышами вниз на увлажненные фильтры в чашки Петри на 2 суток ( $t=28^{\circ}C$ ). Затем отбирают проростки с прямыми coleoptилями длиной 14-15 мм. Из них с помощью лез-

вия бритвы отсекают отрезки длиной 5 мм. Отрезки по 5 штук насаживают на леску, кладут в чашки Петри по 3 лески. Затем увлажняют раствором ИУК в концентрации  $10^{-7}$ М до  $10^{-3}$ М по 5мл на чашку и оставляют на сутки. Затем измеряют суммарную длину отрезков колеоптилеи на каждой леске. Результаты оформляют в виде таблицы. Делают выводы о величине воздействия ИУК на растяжение отрезков колеоптилеи в вариантах, увлажненных препаратом по сравнению с контрольным вариантом, увлажненным водой.

## Тема 7

### **УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ФАКТОРАМ**

#### *Работа 1*

#### **ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ САХАРА НА ЦИТОПЛАЗМУ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ**

Неблагоприятные внешние воздействия, в частности отрицательные температуры, могут нарушить избирательную проницаемость цитоплазмы, о степени повреждения которой можно судить по выходу антоциана из клеточного сока и интенсивности окраски внешнего раствора. Устойчивость цитоплазмы к отрицательным температурам можно повысить раствором сахарозы. Цитоплазма клеток, выдержанных в растворах сахарозы, отличается повышенной морозоустойчивостью.

*Материалы и оборудование.* Корнеплод красной свеклы, нож кухонный с тонким лезвием, скальпель, бритва, фарфоровая чашка, термометр до  $-25^{\circ}\text{C}$ , пробирки, стакан, микроскоп, предметные и покровные стекла, маркер по стеклу, фильтровальная бумага, раствор сахарозы 0,5М и 1М концентрации, дистиллированная вода, 1М раствор сахарозы в капельнице, охлаждающая смесь в металлическом сосуде.

*Ход работы.* Из корнеплода красной свеклы вырезают три одинаковых кусочка длиной 2-3 см и сечением 0,2-0,5 см, промывают их водопроводной водой, подсушивают фильтровальной бумагой и помещают по одному кусочку в три пробирки. После этого в первую пробирку наливают 5 мл дистиллированной воды, во вторую - 5 мл 0,5М раствора сахарозы. Затем пробирки помещают в охлаждающую смесь, которая готовится из трех частей льда и одной части поваренной соли, с температурой  $-20^{\circ}\text{C}$ . Замерзание исследуемых растворов будет идти с разными скоростями. Быстрее замерзнет вода, позднее 1М раствор сахарозы. Необходимо наблюдать за ходом замерзания и обеспечить строго 10 минутную инкубацию замерзших растворов, ведя отсчет от момента замерзания раствора.

Через 20 минут пробирки помещают в стакан с водопроводной водой. После оттаивания содержимое пробирок встряхивают и отмечают интен-

сивность окраски растворов и окраску срезов. Оценку интенсивности окраски раствора можно провести, используя КФК.

*Таблица*

| Вариант                                       | Окраска<br>наружного раствора | Окраска среза | Количество<br>плазмолизированных<br>клеток, % |
|---|-------------------------------|---------------|---|
| 1. Вода<br>2. Сахароза 0,5М<br>3. Сахароза 1М |                               |               |   |

Делают срезы с трех кусочков корнеплодов, помещают их в каплю 1М раствора  $\text{KN}_3$  на предметном стекле и следят в микроскоп за изменениями в клетке. Подсчитывают количество плазмолизированных клеток в поле зрения. Результаты опыта записывают в таблицу и делают вывод о значении сахарозы как защитного вещества при замораживании клеток.

### *Работа 2*

## **ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ САХАРОЗЫ НА БЕЛКИ ЦИТОПЛАЗМЫ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ**

При повреждении клетки отрицательными температурами нарушается структура белка цитоплазмы и происходит его коагуляция, сопровождающаяся выпадением хлопьевидных осадков. Сахароза стабилизирует нативную структуру белка, тем самым защищает его от губительного влияния отрицательных температур.

*Материалы и оборудование.* Клубни картофеля, нож, терка, марля, химический стакан, пробирки, градуированные пипетки на 10мл, охлаждающая смесь в металлическом сосуде, термометр до  $t = -25^\circ\text{C}$ , дистиллированная вода, раствор сахарозы 0,5М и 1М.

*Ход работы.* Натирают клубень картофеля на терке, отжимают через марлю сок и после отстаивания крахмала наливают надосадочную жидкость по 3 мл в три пробирки. В первую пробирку доливают 3 мл дистиллированной воды, во Вторую - 3мл 0,5М раствора сахарозы, в третью - 3мл 1М раствора сахарозы.

Пробирки помещают в охлаждающую смесь (при температуре до  $-20^\circ\text{C}$ ). Через 15-20 минут растворы размораживают в стакане с водопроводной водой и следят за образованием хлопьев коагулирующих коллоидов цитоплазмы. Результаты опыта зарисовывают и делают вывод о защитном действии сахарозы на белки при замораживании цитоплазмы.

### *Работа 3*

## **ДИАГНОСТИКА СТОЙКОСТИ РАСТЕНИЙ**

Устойчивость растений к перенесению неблагоприятных условий обусловлена двумя принципиально различными механизмами. В одних случаях растение замедляет или прекращает рост, пассивно переживает

неблагоприятный период и легко возобновляет процессы жизнедеятельности при прекращении стресса. В других случаях она активно преодолевает неблагоприятные условия, обладая биохимическим аппаратом большой емкости и буферности, благодаря чему процессы жизнедеятельности в стрессовых условиях не нарушаются.

Растения, которые пассивно переносят неблагоприятные факторы среды, имеют меньшую оводненность тканей, более высокое содержание сухого вещества, в частности Сахаров, более высокое осмотическое давление клеточного сока, меньшую проницаемость протоплазмы, большую стойкость к завяданию, ксероморфную структуру и как следствие — повышенную устойчивость. Эти показатели являются критериями стойкости.

Для определения устойчивости, связанной с активным преодолением неблагоприятных условий, используют более сложные методы: определение активности ферментов, интенсивности фотосинтеза, фотохимической активности хлоропластов, интенсивности и качества дыхательного метаболизма, содержания пролина, диамина (путресцина), полиаминов (спермидина, спермина), поглощения веществ и пр.

Устойчивость растения связана также с прочностью его мембран, хлорофилл-белково-липидной связи, резистентностью ферментов фотосинтеза, дыхания, активностью антиоксидантной системы и др. Любой из этих показателей не может достаточно полно характеризовать устойчивость системы. Только комплекс данных показателей может свидетельствовать о резистентности растения. Разработка методов диагностики растений на устойчивость предполагает хорошее знание специфики действия неблагоприятных факторов и экологического типа исследуемого объекта.

Существуют быстрые методы диагностики устойчивости. Плазматический метод. Срезы тканей помещают на 1—2 часа в 10%-ный раствор сахарозы. Отсутствие плазмолиза свидетельствует о повреждении и гибели клеток.

Окрашивание. Раствор метиленового голубого (100 мг/л) в 2,5%-ном  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  через несколько минут окрашивает мертвые и нежизнеспособные клетки в синий цвет. Живые клетки окрашиваются значительно медленнее. При окрашивании акридиновым оранжевым (200 мг/л) через 6 — 10 минут живые клетки флуоресцируют, зелено-желтым светом, а поврежденные и мертвые — оранжево-красным.

*Метод В.Я.Александрова.* Для определения устойчивости клеток к действию температурного фактора исследуют скорость движения протоплазмы. Для этого анализируют движение пластид или сферосом в клетках. При воздействии неблагоприятных факторов скорость движения протоплазмы замедляется.

*Работа 4*  
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖАРОСТОЙКОСТИ РАСТЕНИЙ**  
**(по Ф. Ф. Майкову)**

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, которая вызовет превращение хлорофилла в феофитин, тогда как неповрежденные клетки останутся зелеными. У растений с кислым клеточным соком феофитинизация может произойти и без обработки соляной кислотой, так как при нарушении полупроницаемости тонопласта органические кислоты проникают из клеточного сока в цитоплазму и вытесняют магний из молекулы хлорофилла.

**Материалы и оборудование.** Свежие листья различных растений; 0,2N HCl; водяная баня; термометр; пинцет; чашки Петри (5 шт.); стакан с водой; карандаш по стеклу.

**Ход работы.** Нагреть водяную баню до 40°C, погрузить в нее по 5 листьев исследуемых растений и выдержать листья в воде в течение 30 минут, поддерживая температуру на уровне 40°C. Затем взять первую пробу: вынуть по одному листу каждого вида растений и поместить их в чашку Петри с холодной водой (на чашке необходимо сделать соответствующую надпись). Поднять температуру в водяной бане до 50°C, через 10 минут после этого извлечь из бани еще по одному листу и перенести их в новую чашку с холодной водой. Постепенно довести температуру до 80°C, беря пробы через каждые 10 минут при повышении температуры на 10°.

Заменить воду в чашках 0,2N HCl и через 20 минут учесть степень повреждения листа по количеству появившихся бурых пятен. Результаты исследования разных объектов записать в таблицу, обозначив отсутствие побурения знаком "—", слабое побурение — "+", побурение более 50 % площади листа — "++" и сплошное побурение — "+++".

Степень повреждения листьев при t, °C

|    |    |    |    |    |
|----|----|----|----|----|
| 40 | 50 | 60 | 70 | 80 |
|----|----|----|----|----|

*Работа 5*  
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТКИ МЕТОДОМ**  
**ПРИЖИЗНЕННОГО ОКРАШИВАНИЯ**

**Материалы и оборудование.** Листья традесканции или лука, 0,05%-й раствор нейтрального красного, скальпель, препаровальные иглы, кисточка, предметные и покровные стекла, микроскоп, спиртовка.

**Ход работы.** Если окрасить живые клетки при достаточном доступе кислорода (первое наблюдение за клетками нужно вести без покровного

стекла) раствором красителя нейтрального красного, то можно видеть, что краска диффундирует в клеточный сок. Интенсивность окраски в разных клетках эпидермиса будет различной вследствие неодинакового рН клеточного сока.

Через некоторое время в протоплазме клеток можно наблюдать мелкие, окрашенные в интенсивный красный цвет гранулы. Эти гранулы, постепенно увеличиваясь, находятся в постоянном беспорядочном движении. Сталкиваясь друг с другом, они сливаются и достигают иногда очень больших размеров.

По современным представлениям эти гранулы рассматриваются как органеллы клеток - лизосомы, основное назначение которых - локализовать попавшие в клетку посторонние вещества, не участвующие в обмене.

Появление в плазме ярко окрашенных нейтральным красным лизосом является критерием жизнеспособности клетки. При окраске мёртвых клеток нейтральным красным лизосомы не обнаруживаются. Протоплазма при этом окрашивается в желто-розоватый цвет, краску интенсивно поглощает ядро.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баславская С.С., Трубецкова О.М. Практикум по физиологии растений. М., 1964.
2. Гэлстон А., Девис П., Сэттер Р. Жизнь зеленого растения. М., Мир, 1987.
3. Де Дюв К. Путешествие в мир живых М., 1987.
4. Либберт Э. Физиология растений. М., 1976.
5. Малый практикум по физиологии растений. М., МГУ, 1994.
6. Методы биохимического анализа растений /Под. ред. Полевого В.В., Максимова Г.Б. 1978.
7. Полевой В.В. Физиология растений. М., 1989.
8. Практикум по физиологии растений. Воронеж, ВГУ, 1991. /Под. ред. Опритова В.Г.
9. Практикум по физиологии растений. М. Изд-во "Колос", 1972/ Под. ред. Гунара Г.И.
10. Саламатова Т.С. Физиология растительной клетки. Л., 1983.
11. Фотосинтез и биопродуктивность: методы определения. М., 1989/ Под. ред. Мокроносова А.Т.

2. Для области рН 5,8-8,0 (0,05М)

Основные растворы:

А: 0,2М раствор однозамещенного фосфата калия (27,22 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  в 1000 мл)

1:0,2М NaOH

50 мл А + у мл Б и разбавляют до 200 мл

| у   | рН  | у    | рН  | у    | <b>рН</b> | у    | рН  |
|-----|-----|------|-----|------|-----------|------|-----|
| 3,6 | 5,8 | 11,6 | 6,4 | 29,1 | 7,0       | 42,4 | 7,6 |
| 5,6 | 6,0 | 16,4 | 6,6 | 34,7 | 7,2       | 44,5 | 7,8 |
| 8,1 | 6,2 | 22,4 | 6,8 | 39,1 | 7,4       | 46,1 | 8,0 |

*Фосфатные буферные смеси*

1. Для области рН 5,7-8,0 (0,1М)

Основные растворы:

А: 0,2М раствор однозамещенного фосфата натрия (27,8 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  в 1000 мл)

Б: 0,2М раствор двузамещенного фосфата натрия (53,65 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  или 71,7 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в 1000 мл)

x мл А + y мл Б и разбавляют до 200 мл

| x    | y    | рН  | x    | y    | рН  | x    | y    | рН  |
|------|------|-----|------|------|-----|------|------|-----|
| 93,5 | 6,5  | 5,7 | 68,5 | 31,5 | 6,5 | 23,0 | 77,0 | 7,3 |
| 92,0 | 8,0  | 5,8 | 62,5 | 37,5 | 6,6 | 19,0 | 81,0 | 7,4 |
| 90,0 | 10,0 | 5,9 | 56,5 | 43,5 | 6,7 | 16,0 | 84,0 | 7,5 |
| 87,7 | 12,3 | 6,0 | 51,0 | 49,0 | 6,8 | 13,0 | 87,0 | 7,6 |
| 85,0 | 15,0 | 6Д  | 45,0 | 55,0 | 6,9 | 10,5 | 90,5 | 7,7 |
| 81,5 | 18,5 | 6,2 | 39,0 | 61,0 | 7,0 | 8,5  | 91,5 | 7,8 |
| 77,5 | 22,5 | 6,3 | 33,0 | 67,0 | 7,1 | 7,0  | 93,0 | 7,9 |
| 73,5 | 26,5 | 6,4 | 28,0 | 72,0 | 7,2 | 5,3  | 84,7 | 8,0 |

| Неорганические вещества                   | Молекулярная масса | Органические вещества   | Молекулярная масса |
|---|--------------------|-------------------------|--------------------|
| $\text{Ba(OH)}_2$                         | 171                | аскорбиновая кислота    | 176                |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 219                | глицерин                | 92                 |
| $\text{Ca(NO}_3)_2$                       | 164                | глюкоза                 | 180                |
| $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 172                | индигокармин            | 466                |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 238                | индолилуксусная кислота | 175                |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 250                | ксилол                  | 106                |
| $\text{HCl}$                              | 36,5               | лимонная кислота        | 192                |
| $\text{HNO}_3$                            | 63                 | метиленовая синяя       | 320                |
| $\text{H}_2\text{SO}_4$                   | 98                 | мелиловый красный       | 269                |
| $\text{KCl}$                              | 74,6               | мочевина                | 60                 |
| $\text{K}_2\text{SO}_4$                   | 136                | нейтральный красный     | 289                |
| $\text{KN03}$                             | 101                | сахароза                | 342                |
| $\text{KOH}$                              | 56                 | тимолфталеин            | 430                |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 246,5              | уксусная кислота        | 60                 |
| $\text{NaCl}$                             | 58,5               | фенолфталеин            | 318                |
| $\text{NaOH}$                             | 40                 | эозин                   | 648                |
| $\text{NH}_4\text{NO}_3$                  | 80                 | этанол                  | 46                 |

Атомные массы некоторых элементов

| Название элемента | Символ | Атомная масса | Название элемента | Символ | Атомная масса |
|-------------------|--------|---------------|-------------------|--------|---------------|
| азот              | N      | 14,01         | медь              | Си     | 63,54         |
| барий             | Ba     | 137,36        | молибден          | Mo     | 95,95         |
| бор               | B      | 10,82         | натрий            | Na     | 22,99         |
| водород           | H      | 1,008         | олово             | Sn     | 118,70        |
| железо            | Fe     | 55,85         | ртуть             | Hg     | 200,61        |
| йод               | I      | 126,91        | сера              | S      | 32,07         |
| калий             | K      | 39,10         | серебро           | Ag     | 107,88        |
| кальций           | Ca     | 40,08         | углерод           | C      | 12,01         |
| кислород          | O      | 16,000        | фосфор            | P      | 30,98         |
| кобальт           | Co     | 58,94         | хлор              | Cl     | 35,46         |
| магний            | Mg     | 24,32         | хром              | Cr     | 52,01         |
| марганец          | Mn     | 54,94         | цинк              | Zn     | 65,38         |

Молекулярные массы некоторых реактивов

## СОДЕРЖАНИЕ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Тема 1</b>  | <b>3</b>  |
| <b>ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ</b>  |           |
| Работа 1. Выявление состояния клеточных мембран плазмоли-<br>тическим методом  | 3         |
| Работа 2. Различная проницаемость плазмолеммы и тонопла-<br>ста  | 4         |
| Работа 3. Определение жизнеспособности семян методом ок-<br>рашивания (по Д.Н. Нелюбову)   | 5         |
| Работа 4. Накопление метиленовой сини в клетках элодеи   | 6         |
| Работа 5. Прижизненное окрашивание клеток нейтральным<br>красным   | 6         |
| Работа 6. Влияние ионов калия и кальция на проницаемость<br>цитоплазмы   | 7         |
| Работа 7. Влияние различных факторов на выход электролитов<br>из клетки  | 8         |
| Работа 8. Влияние температуры на проницаемость клеточных<br>мембран для бетацианина  | 10        |
| Работа 9. Движение цитоплазмы  | 11        |
| <b>Тема 2</b>  | <b>14</b> |
| <b>ВОДНЫЙ РЕЖИМ РАСТЕНИЙ</b>   |           |
| Работа 1. Определение интенсивности транспирации методом<br>быстрого взвешивания (по Иванову)  | 14        |
| Работа 2. Изучение устьичного аппарата растений  | 17        |
| Работа 3. Сравнение транспирации верхней и нижней сторон<br>листа хлоркобальтовым методом  | 17        |
| Работа 4. Определение состояния устьиц методом инфильтра-<br>ции по Молишу)  | 18        |
| Работа 5. Определение поглощения воды растением потомет-<br>рическим методом   | 19        |
| Работа 6. Определение осмотического давления клеточного<br>сока методом плазмолиза   | 20        |
| Работа 7. Определение водного потенциала клеток по измене-<br>нию концентрации раствора (методом Шардакова и рефрактомет-<br>рическим методом) | 22        |
| <b>Тема 3</b>  | <b>24</b> |
| <b>ФОТОСИНТЕЗ</b>  |           |
| Работа 1. Химические свойства пигментов зеленого листа   | 25        |
| Работа 2. Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла  | 27        |
| Работа 3. Определение содержания основных пигментов фото-<br>синтетического аппарата в листьях высших растений                                 | 28        |
| Работа 4. Разделение пигментов методом бумажной хромато-<br>графии   | 32        |
| Работа 5. Разделение пигментов высших растений на силуфо-<br>ловых пластинках  | 33        |

|  |    |
|--|----|
| Работа 6. Разделение пигментов методом хроматографии и количественное определение основных каротиноидов зеленого листа | 34 |
| <b>Тема 4</b>  | 36 |
| <b>ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ</b>  |    |
| Работа 1. Определение интенсивности дыхания по количеству выделенной кислоты (по Бойсену-Иенсену)                      | 36 |
| Работа 2. Потеря сухого вещества при прорастании семян   | 38 |
| <b>Тема 5</b>  | 39 |
| <b>МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ</b>   |    |
| Работа 1. Поглощение аммония растениями в разных условиях кислотности среды  | 39 |
| Работа 2. Обнаружение нитратов в растениях   | 42 |
| Работа 3. Определение содержания золы в разных частях растений   | 43 |
| Работа 4. Микрохимический анализ золы  | 44 |
| <b>Тема 6</b>  | 46 |
| <b>РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ</b>  |    |
| Работа 1. Превращение веществ при прорастании семян  | 46 |
| Работа 2. Обнаружение амилазы в прорастающих семенах   | 47 |
| Работа 3. Значение листьев для укоренения черенков (по Руге)   | 48 |
| Работа 4. Влияние индолилуксусной кислоты на укоренение черенков   | 48 |
| Работа 5. Апикальное доминирование   | 49 |
| Работа 6. Влияние гиббереллина на рост междуузлий карликового гороха   | 50 |
| Работа 7. Влияние ауксинов на рост отрезков coleoptилей злаков   | 51 |
| <b>Тема 7</b>  | 52 |
| <b>УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ<br/>К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ФАКТОРАМ</b>  |    |
| Работа 1. Защитное действие сахара на цитоплазму при замораживании   | 53 |
| Работа 2. Защитное действие сахарозы на белки цитоплазмы при замораживании   | 53 |
| Работа 3. Диагностика стойкости растений   | 53 |
| Работа 4. Определение жаростойкости растений (по Ф. Ф. Майкову)  | 55 |
| Работа 5. Определение жизнеспособности клетки методом прижизненного окрашивания  | 55 |
| <b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>   | 57 |
| <b>ПРИЛОЖЕНИЕ 1</b>  | 58 |
| <b>ПРИЛОЖЕНИЕ 2</b>  | 59 |
| <b>СОДЕРЖАНИЕ</b>  | 60 |