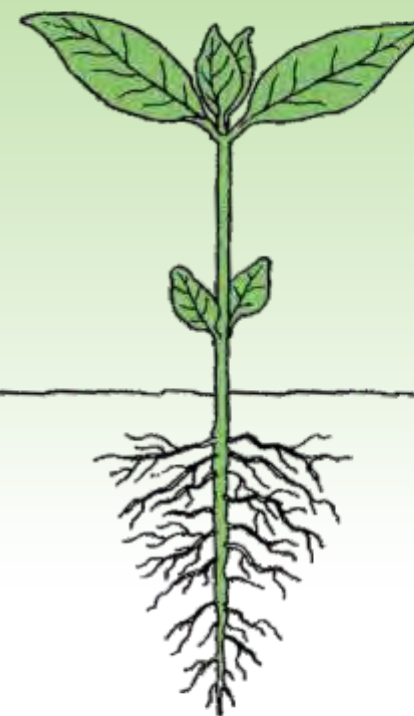


Т.А. Лушникова

ПРАКТИКУМ  
ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ



Курганский  
государственный  
университет



библиотечно-издательский  
центр  
46-31-07

Курган 2018

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Курганский государственный университет»

## **ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Учебное пособие

Курган 2018

УДК581.1

ББК28.57

П69

Рецензенты:

старший научный сотрудник лаборатории популяционной биологии древесных растений и динамики леса ФГБУН Ботанический сад УрО РАН, кандидат биологических наук О.Е. Черепанова;

начальник отдела охраны окружающей среды Управления охраны окружающей среды Департамента природных ресурсов и охраны окружающей среды Курганской области А.В. Зырянов.

*Печатается по решению методического совета Курганского государственного университета.*

Практикум по физиологии растений : учебное пособие для студентов-бакалавров направления подготовки 06.03.01 Биология, направленность : Общая биология / сост. Т. А. Лушникова. – Курган : Изд-во Курганского гос. ун-та, 2018. – 94 с.

Учебное пособие содержит подробное описание лабораторных работ по дисциплине «Физиология растений» для студентов направления подготовки 06.03.01 Биология, направленность: Общая биология квалификации бакалавр биологии. В каждой работе дано краткое теоретическое пояснение, указаны перечень материалов и оборудования, объекты исследования, приведен ход работы. Учебное пособие может быть полезным для учителей школ, преподавателей лицеев и гимназий.

ISBN 978-5-4217-0449-2

© Курганский  
государственный  
университет, 2018

## Содержание

Предисловие.....	6
1 Техника лабораторных работ. Требования к помещению лаборатории и технике безопасности.....	7
2 Микроскопирование клеток.....	8
2.1 Методы микроскопии.....	8
2.1.1 Световая микроскопия.....	9
2.1.2 Электронная микроскопия.....	11
2.1.3 Витальное (прижизненное) изучение клеток.....	12
2.1.4 Изучение фиксированных клеток.....	12
2.2 Устройство и правила работы с микроскопом.....	14
3 Лабораторные работы по теме «Физиология растительной клетки».....	16
3.1 Свойства клеточных мембран.....	16
3.1.1 Сравнение проницаемости мембран живых и мертвых клеток.....	18
3.1.2 Окрашивание живых и мертвых клеток нейтральным красным.....	19
3.2 Растительная клетка как осмотическая система.....	20
3.2.1. Явление осмоса. Перемещение воды по градиенту водного потенциала в искусственной «клеточке» Траубе.....	20
3.2.2 Явление плазмолиза и деплазмолиза.....	21
3.2.3 Сравнение проницаемости клеточных мембран для различных веществ. Стойкий и временный плазмолиз.....	22
3.2.4 Влияние ионов калия и кальция на форму плазмолиза.....	23
3.2.5 Наблюдение колпачкового плазмолиза в растворе роданида калия.....	24
3.2.6 Тургор растительной клетки. Поглощение воды и ее выход из клеток корнеплода моркови.....	24
3.3 Определение водного потенциала растительных тканей.....	25
3.3.1 Определение величины осмотического потенциала в клетках растительной ткани плазмолитическим методом.....	25
3.3.2 Определение водного потенциала растительных тканей методом Уршпрунга (по изменению длины брусочков ткани).....	27
4 Лабораторные работы по теме «Водный обмен».....	28
4.1 Определение относительной активности воды в растении методом потери воды.....	29
4.2 Определение динамики поглощения воды.....	31
4.3 Водообмен ветки сосны.....	32
4.4 Сравнение транспирации верхней и нижней сторон листа хлоркобальтовым методом.....	34
4.5 Наблюдение за движением устьиц.....	34
4.6 Наблюдение за перераспределением калия при движении устьиц.....	35

4.7	Определение интенсивности транспирации весовым методом.....	37
4.8	Определение водоудерживающей способности растений методом «завядания» (по Арланду).....	39
4.9	Определение содержания воды и сухого вещества в растительном материале.....	40
4.10	Определение относительной тургесцентности и водного дефицита .....	41
5	Лабораторные работы по теме «Минеральное питание растений».....	42
5.1	Изучение минерального питания растений с помощью вегетационных опытов.....	43
5.1.1	Постановка опытов с песчаными культурами.....	44
5.1.2	Постановка опытов с водными культурами.....	44
5.1.3	Постановка опытов с гравийными культурами.....	46
5.2	Микрохимический анализ золы растений.....	47
5.3	Обнаружение нитратов в растениях.....	50
5.4	Определение общей и рабочей адсорбирующей поверхности корневой системы методом Сабинина и Колосова.....	52
6	Лабораторные работы по теме «Фотосинтез».....	54
6.1	Пигменты фотосинтеза и их свойства.....	54
6.2	Разделение смеси фотосинтетических пигментов.....	56
6.3	Оптические свойства пигментов зеленого листа.....	57
6.3.1	Спектры поглощения пигментов листа.....	57
6.3.2	Наблюдение флуоресценции хлорофилла.....	58
6.4	Определение содержания пигментов.....	59
6.5	Обнаружение процесса фотосинтеза.....	61
6.5.1	Обнаружение выделенного при фотосинтезе O <sub>2</sub> с помощью метиленового синего.....	62
6.5.2	Поглощение зеленым растением углекислого газа из воздуха.....	62
6.5.3	Получение отпечатков на листьях с помощью крахмальной пробы....	63
6.5.4	Образование сахара в зеленых листьях на свету.....	64
6.6	Определение интенсивности фотосинтеза растений методом Бойсен-Йенсена.....	65
6.7	Влияние внешних условий на фотосинтез.....	66
6.7.1	Зависимость фотосинтеза от интенсивности света.....	66
6.7.2	Влияние спектрального состава света на фотосинтез.....	67
6.7.3	Влияние температуры на фотосинтез.....	68
6.8	Определение чистой продуктивности фотосинтеза.....	69
6.9	Определение продуктивности растений.....	70
7	Лабораторные работы по теме «Дыхание растений».....	72
7.1	Поглощение кислорода и выделение углекислого газа при дыхании	

органов растений.....	72
7.2 Определение расхода органического вещества растениями при дыхании	73
7.3 Ферменты дыхания.....	74
8 Лабораторные работы по теме «Устойчивость растений к неблагоприятным условиям среды».....	76
8.1 Определение защитного действия сахаров на протоплазму.....	76
8.2 Защитное действие сахара на белки протоплазмы при отрицательных температурах.....	77
8.3 Определение устойчивости растений к высоким температурам.....	77
8.4 Определение температурного порога коагуляции белков цитоплазмы клеток разных растений.....	78
8.5 Определение устойчивости растений к засолению.....	79
8.6 Влияние солей тяжелых металлов на плазмолиз протоплазмы растительной клетки.....	80
9 Лабораторные работы по теме «Рост и развитие растений».....	81
9.1 Определение зон роста в органах растений.....	82
9.2 Периодичность роста древесных побегов.....	83
9.3 Действие гетероауксина на рост корней.....	84
9.4 Апикальное доминирование у гороха.....	85
9.5 Изучение движения растений .....	86
9.5.1 Хемотропическая реакция наклюнувшихся семян на химические соединения.....	86
9.5.2 Нарушение геотропизма корней эозином.....	87
9.6 Оценка содержания фитогормонов с помощью биотестов.....	88
9.6.1 Оценка содержания цитокининов с помощью биотестов.....	88
9.6.2 Оценка содержания ауксинов с помощью биотестов.....	89
9.6.3 Оценка содержания гиббереллина с помощью биотестов.....	91
Список литературы.....	93

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Предлагаемое учебное пособие предназначено для оказания помощи при подготовке к занятиям и выполнении лабораторных работ по курсу «Физиология растений» для студентов, обучающихся по направлению: 06.03.01 Биология, направленность: Общая биология.

В предлагаемом методическом пособии даны методические рекомендации по выполнению лабораторных работ по физиологии растений. Для каждой работы приведены краткие сведения об изучаемых процессах, помещен перечень необходимого оборудования, реактивов, материалов и объектов, даны разъяснения по их выполнению. При выполнении лабораторных работ студенты знакомятся и осваивают классические и современные методы исследования клеток, тканей органов растений, методические приёмы, которые применяются в научных лабораториях. Методы, включенные в практикум, дают возможность изучить особенности физиологии растительной клетки, водного обмена, минерального питания, фотосинтеза, дыхания, устойчивости, роста и развития растений.

Все работы студенты выполняют самостоятельно, при этом неукоснительно соблюдая инструкции по технике безопасности. Перед началом работы необходимо освоить теоретические основы выполняемого практического задания. Выполняя лабораторные работы, каждый студент ведет рабочую тетрадь. Оформление рабочей тетради должно отвечать следующим требованиям: на титульном листе указывают предмет, по которому делаются записи, кем они делаются (курс, группа, подгруппа, фамилия, имя, отчество); каждое занятие отмечают порядковым номером, указывают его дату; при оформлении работы указывают её заглавие, цель, объект изучения; результаты фиксируют в виде рисунков с обязательными подписями к ним и описывают текстом или оформляют в виде таблиц (характер оформления работы указан в практикуме); рисунки должны быть размером с четверть тетрадного листа, иметь номер, название, выноски и подписи. Прорисовывание препаратов имеет очень большое значение в процессе его изучения. Процесс зарисовки учит студента «читать» препарат, понимать своеобразие и общность клеток и тканей, глубже осмысливать их морфологические, генетические и функциональные особенности. Все записи необходимо делать в лаборатории. На основании проведенных наблюдений, графиков, таблиц, диаграмм в конце каждой работы студенты делают вывод или заключение, которые обсуждаются при подведении итогов занятия. Для проверки академической активности и качества работы студента рабочую тетрадь периодически проверяет преподаватель, дает ей оценку.

Предложенные в практикуме методы могут быть использованы студентами в научно-исследовательской деятельности, при выполнении курсовых и вы-

пусковых квалификационных работ. Определение физиологических показателей осуществляют в нескольких биологических и аналитических повторностях. Полученные экспериментальные данные подвергают статистической обработке.

Ряд опытов могут быть использованы учителями школ, преподавателями лицеев и гимназий на уроках биологии и элективных курсах, организации исследовательской деятельности учащихся в средней общеобразовательной школе и в классах с углубленным изучением биологии.

При составлении методических указаний использована учебная литература, список которой помещен в конце учебного пособия. Материалы практикума по физиологии растений апробированы со студентами на лабораторных занятиях и при выполнении курсовых и выпускных квалификационных работ. Данное учебное пособие дополняет основную учебную литературу и способствует оптимизации учебного процесса и формированию компетенций у студентов.

## **1 ТЕХНИКА ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ. ТРЕБОВАНИЯ К ПОМЕЩЕНИЮ ЛАБОРАТОРИИ И ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ**

В лаборатории должны быть средства пожаротушения и индивидуальной защиты (огнетушители, емкости с песком, асбестовое одеяло, защитные очки, респираторы, резиновые перчатки и др.), емкости из полиэтилена для слива ненужных, отработанных реактивов.

На видном месте должна находиться аптечка с набором медикаментов, 3% раствор гидрокарбоната натрия (против кислотных ожогов), 1% раствор уксусной кислоты (от щелочных ожогов), этиловый спирт, настойка йода, жгут, пластырь, перевязочные средства, вода, мензурка для капель, нашатырь, сердечные средства.

Перед началом цикла работ в лаборатории студентам необходимо ознакомиться с общими для всех лабораторий правилами техники безопасности и расписаться в книге инструктажа.

### **Общие правила работы в лаборатории**

1. Работать тщательно, аккуратно, без спешки; соблюдать тишину.
2. Не загромождать рабочее место портфелями, свертками, сумками и т.п. Для них отведены специальные места.
3. Курение, прием пищи (и ее хранение), употребление напитков в лаборатории запрещены.
4. Желательно работать на одном и том же месте, иметь халаты.
5. Прежде чем приступить к работе по данной теме, необходимо тщательно ознакомиться с ее описанием.
6. Без указания и разрешения преподавателя не производить никаких дополнительных опытов.



7. Не брать приборы, аппараты, реактивы общего пользования на свое рабочее место.

8. Расходовать реактивы следует экономно. Если препарата приготовлено больше, чем необходимо, то его излишки надо сливать в определенную емкость, но не возвращать в склянку.

9. Пользоваться можно только маркированными реактивами.

10. Работы с вредными веществами проводить только под тягой. Концентрированные кислоты и щелочи наливать осторожно под вытяжным шкафом; не брать их на свои рабочие места.

11. Если случайно пролита кислота или щелочь, то необходимо быстро смыть раствор интенсивной струей воды из водопроводного крана, а потом обратиться к лаборанту и по его указанию привести в надлежащий порядок свое рабочее место.

12. Не выливать в раковину отработанные концентрированные кислоты и щелочи, а пользоваться для этого банками, установленными под тягой.

13. Никакие вещества в лаборатории нельзя пробовать на вкус. Если необходимо определить запах газа или паров жидкости, хранящейся в банке или сосуде, нельзя подносить их близко к лицу, следует легкими движениями руки направить воздух от горлышка или отверстия сосуда к носу.

14. В процессе каких-либо реакций на воздухе или при нагревании нельзя держать сосуд отверстием к себе или другим работающим.

15. Горячие приборы и посуду ставить только на специальные подставки, а не на открытый стол.

16. Нельзя пользоваться при проведении опытов грязной посудой.

17. Нельзя использовать стеклянную посуду, если на ней имеются трещины, сколы, щербинки.

18. После окончания работы нужно вымыть использованную посуду, выключить воду, электричество и приведенное в порядок место сдать лаборанту.

19. Тщательно вымыть руки теплой водой с мылом.

## **2 МИКРОСКОПИРОВАНИЕ КЛЕТОК**

### **2.1 Методы микроскопии**

В физиологии растений широко используются методы цитологии. Главным методическим приемом в цитологии остается визуальное наблюдение микрообъекта (микроскопия). При этом исследователь не просто изучает и описывает морфологию объекта, он может видеть степень его сложности, локализовать отдельные детали, получить сведения о химизме той или иной части клетки, визуальным и достаточно точно оценить ее метаболические свойства, выяс-

нить строение этой части на макромолекулярном уровне. Широко используются световая, электронная микроскопии.

### ***2.1.1 Световая микроскопия***

Световой микроскоп, главный прибор биологии, представляет собой оптическую систему, состоящую из конденсатора, объектива. Пучок света от источника освещения собирается в конденсаторе и направляется на объект. Пройдя через объект, лучи света попадают в систему линз объектива; они строят первичное изображение, которое увеличивается с помощью линз окуляра. Главная оптическая часть микроскопа, определяющая его основные возможности, - объектив. В современных микроскопах объективы сменные, что позволяет изучать клетки при разных увеличениях. Главной характеристикой микроскопа как оптической системы является разрешающая способность. Изображения, даваемые объективом, можно увеличить во много раз, применяя сильный окуляр или, например, путем проекции на экран (до  $10^5$  раз). Разрешение микроскопа зависит от длины волны – чем она меньше, тем меньшего размера деталь мы можем увидеть, и от нумерической апертуры объектива – чем она выше, тем выше разрешение. Обычно в световых микроскопах используются источники освещения в видимой области спектра (400-700 нм), поэтому максимальное разрешение микроскопа в этом случае может быть не выше 200-350 нм (0,2-0,35 мкм). Если использовать ультрафиолетовый свет (260-280 нм), то можно повысить разрешение до 130-140 нм (0,13-0,14 мкм). Это будет пределом теоретического разрешения светового микроскопа, определяемого волновой природой света. Таким образом, световой микроскоп повышает разрешающую способность глаза человека примерно в 1000 раз (невооруженный глаз человека имеет разрешающую способность около 0,1 мм, что равно 100 мкм). Но все же в световом микроскопе можно видеть частицы меньшей величины, чем 0,2 мкм. Это метод «темного поля», или, как его называли раньше, метод «ультрамикроскопии». Суть его в том, что подобно пылинкам в луче света (эффект Тиндаля) в клетке при боковом освещении светятся мельчайшие частицы (меньше 0,2 мкм), отраженный свет от которых попадает в объектив микроскопа. Этот метод успешно применяется при изучении живых клеток.

Если же необработанные живые или мертвые клетки рассматривать в проходящем свете, то в них различаются только крупные детали из-за того, что они обладают иным коэффициентом преломления и поглощения световых лучей, чем окружающая среда. Большая же часть клеточных компонентов мало отличается по этим свойствам как от среды (воды или тканевых растворов), так и друг от друга и поэтому мало заметны и не контрастны. Для их изучения приходится изменять освещенность (теряя при этом в четкости изображения) или применять особые методы и приборы.

Один из таких приемов – метод **фазово-контрастной микроскопии**, широко используемый для наблюдений за живыми клетками. Он основан на том, что отдельные участки прозрачной в общем клетки хоть мало, но все же отличаются друг от друга по плотности и по светопреломлению. Проходя через них, свет изменяет свою фазу, однако такое изменение фазы световой волны наш глаз не улавливает, так как он чувствителен только к изменению интенсивности света. Последняя зависит от величины амплитуды световой волны. В фазово-контрастном микроскопе в объектив вмонтирована специальная пластинка, проходя через которую луч света испытывает дополнительный сдвиг фазы колебаний. При построении изображения взаимодействуют уже лучи, находящиеся в одной фазе либо в противофазе, но обладающие разной амплитудой; тем самым создается светло-темное контрастное изображение объекта.

Сходный прием используется в **интерференционном микроскопе**. Он устроен так, что пучок параллельных световых лучей от осветителя разделяется на два потока. Один из них проходит через объект и приобретает изменения в фазе колебания, другой идет, минуя объект. В призмах объектива оба потока вновь соединяются и интерферируют между собой. В результате интерференции будет строиться изображение, на котором участки клетки, обладающие разной толщиной или разной плотностью, будут отличаться друг от друга по степени контрастности. В этом приборе, измеряя сдвиги фаз, можно определить концентрацию и массу сухого вещества в объекте.

С помощью **поляризационного микроскопа** изучают объекты, обладающие так называемой изотропией, т.е. упорядоченной ориентацией субмикроскопических частиц (например, волокна веретена деления, миофибриллы и др.). У такого микроскопа перед конденсором помещается поляризатор, который пропускает световые волны с определенной плоскостью поляризации. После препарата и объектива помещается анализатор, который может пропускать свет с этой же плоскостью поляризации. Поляризатор и анализатор – это призмы, сделанные из исландского шпата (призмы Николя). Если вторую призму (анализатор) повернуть затем на  $90^\circ$  по отношению к первой, то свет проходить не будет. В том случае, когда между такими скрещенными призмами будет находиться объект, обладающий двойным лучепреломлением, т.е. способностью поляризовать свет, он будет виден как светящийся на темном поле. С помощью поляризационного микроскопа можно убедиться, например, в ориентированном расположении мицелл в клеточной стенке растений.

При изучении живых клеток широко используют флуоресцирующие красители и метод **флуоресцентной микроскопии**. Суть его заключается в том, что целый ряд веществ обладает способностью светиться (флуоресцировать, люминесцировать) при поглощении ими световой энергии. Спектр флуорес-

ценции всегда смещен в сторону больших длин волн по отношению к возбуждающему флуоресценцию излучению. Так, например, выделенный хлорофилл при освещении в ультрафиолетовых лучах светится красным цветом. Этот принцип используется в флуоресцентной микроскопии: рассматривание флуоресцирующих объектов в зоне коротких длин волн. Обычно в таких микроскопах применяются фильтры, дающие освещение в сине-фиолетовой области. Существуют ультрафиолетовые люминесцентные микроскопы.

Для того, чтобы получить полную трехмерную реконструкцию объекта используют специальный **конфокальный сканирующий световой микроскоп**. С помощью этого прибора получают серии последовательных оптических срезов, взятых с различной глубины и изображения которых накапливаются в компьютере, и по специальной программе реконструируется трехмерное, объемное, изображение объекта. Обычно используются объекты, окрашенные флуорохромами.

### 2.1.2 Электронная микроскопия

По принципу конструкции электронный микроскоп очень сходен с оптическим: в нем есть источник освещения (катод электронной пушки), объектив (объективная линза), окуляр (проекционные линзы), только вместо глаза электроны попадают на люминесцирующий экран или на фотопластинку.

Первый электронный микроскоп сконструировал в 1934 г. немецкий ученый Е. Руска (разрешаемое расстояние этого микроскопа равнялось 500А), а уже через пять лет был начат выпуск электронного микроскопа с разрешением 25А. В настоящее время имеются микроскопы с разрешающей способностью 1А (0,1нм).

Принцип действия электронного микроскопа несложен. Источником электронов является раскаленная вольфрамовая нить - катод, нагреваемая электрическим током. Пучок электронов направляется к аноду. В аноде имеется отверстие, проходя через которое электроны формируют пучок, идущий вниз по колонке микроскопа, из которого откачен воздух, чтобы не было взаимодействия электронов с молекулами газов. Пучок электронов фокусируется одной или двумя магнитными катушками на объекте. Когда пучок электронов прошел через объект, изображение его увеличивается с помощью следующей магнитной катушки, которая действует как линза объектива, затем пучок электронов проходит через магнитные катушки (окуляры), увеличивающие уже полученное изображение. Изображение наблюдают на специальном фокусирующем экране или фотографируют. Изучение клеточных структур на молекулярном уровне при помощи электронного микроскопа проводят на предварительно фиксированных и подготовленных препаратах.

### **2.1.3 Витальное (прижизненное) изучение клеток**

Световой микроскоп позволяет видеть живые клетки. Для кратковременного наблюдения клетки помещают просто в жидкую среду на предметное стекло; если нужно длительное наблюдение за клетками, то используются специальные камеры. Это или плоские флаконы с отверстиями, закрытыми тонкими стеклами, или же разборные плоские камеры. В качестве объектов можно использовать свободноживущие клетки одноклеточных водорослей, тканевые клетки многоклеточных организмов. В любом из этих случаев клетки изучают в специально подобранных средах. Свободноживущие одноклеточные организмы рассматривают и изучают в тех же средах, в которых они живут в естественных условиях или культивируются в лаборатории. Наблюдения за живыми клетками обычно регистрируются в виде рисунков и фотографий, сделанных с помощью специальных фотонасадок к микроскопу или цифровых микроскопов. С развитием компьютерных технологий возможно получение изображения клеток прямо на мониторе компьютера, записывание их в памяти компьютера, обработка и получение отпечатков на принтерах. Компьютерную видеотехнику можно использовать для цейтраферной (замедленной) съемки подвижных объектов. Это позволяет подробно видеть протекание таких важных процессов, как деление клеток, плазмолиз и деплазмолиз, движение цитоплазмы и т.д.

При изучении живых клеток их окрашивают с помощью витальных красителей. Это красители кислой (нейтральный красный, трипановый синий, литиевый кармин) природы, применяемые при очень большом разведении (1:200000), следовательно, влияние красителя на жизнедеятельность клетки минимальное. При окрашивании живых клеток краситель собирается в цитоплазме в виде гранул, а в поврежденных или мертвых клетках происходит диффузное окрашивание цитоплазмы и ядра.

### **2.1.4 Изучение фиксированных клеток**

Несмотря на важность и достаточную простоту витальных наблюдений, большая часть сведений о структуре и свойствах клеток получена на фиксированном материале. Если клетку повредить, она начинает претерпевать ряд изменений, а после смерти клетки в ней активируются аутолитические ферменты, что приводит к грубым изменениям клеточной структуры. Следовательно, задачи фиксации – это убить клетку, прекратить активность внутриклеточных ферментов, предотвратить распад клеточных компонентов, а также избежать потери структур и веществ, препятствовать появлению структур, отсутствующих в живой клетке (артефактные структуры).

#### ***Фиксация биологических объектов***

*Фиксаторы, их состав и использование.* Под фиксацией материала понимают процесс быстрой гибели клеток в специально подобранных растворах

ядовитых веществ (реактивов), которые называются фиксаторами. Фиксация прерывает тот или иной процесс в клетке, вызывая необратимые изменения. При этом коллоиды протопласта переходят в нерастворимое состояние.

Известно много фиксаторов, но каждый из них имеет свое назначение. Очень важно выбрать такой фиксатор, который, убивая клетку, не сильно искажает ее прижизненную структуру и отвечает целям исследования. Для цитологических и эмбриологических исследований обычно используют ядерные фиксаторы (фиксатор О.Г. Навашина, Карнуа и др.), хорошо фиксирующее ядро. Некоторые фиксаторы хорошо фиксируют митохондрии и пластиды (фиксатор Г.А. Левитского).

В состав ядерных фиксаторов могут входить ледяная уксусная кислота, хромовая кислота, формалин, хлороформ, осмиевая кислота, спирт и др. Обычно фиксатор представляет собой смесь некоторых реактивов, каждый из которых редко используется для фиксации вследствие одностороннего действия. Особенности реактивов, наиболее часто используемых для фиксации материала, следующие.

*Фиксатор С.Г. Навашина* используется для фиксации корней (не слишком плотных и толстых) и мелких эмбриологических объектов. Продолжительность фиксации - 24 часа в темноте.

Состав фиксатора: хромовая кислота 1%-ная 10 частей; формалин 16%-ный (4 части 40 % продажного); уксусная кислота ледяная - 1 часть. Фиксатор готовят перед употреблением, т.к. он быстро портится. Это водный фиксатор, он действует очень мягко и хорошо сохраняет структуру хромосом.

*Фиксатор Карнуа* широко используется в цитологической и эмбриологической практике для использования постоянных микротомных и давленных препаратов. Продолжительность фиксации от 2 до 12 часов.

Состав фиксатора: абсолютный этиловый спирт 6 частей; хлороформ — 3 части; уксусная кислота (ледяная) 1 часть. Это спиртовой фиксатор: он быстро проникает почти в любые объекты, но действует не так мягко, как фиксатор Навашина.

*Уксусный алкоголь или фиксатор Кларка*, широко применяется в цитологических и эмбриологических исследованиях. Особенно для изготовления давленных препаратов. Материал выдерживают в фиксаторе от 2 до 12 часов.

Состав фиксатора: абсолютный (100% или 96 % этиловый спирт — 3 части; уксусная кислота ледяная - 1 часть. Действует подобно фиксатору Карнуа.

*Промывание и обезвоживание.* После водных фиксаторов материал промывают в проточной воде 1-3 часа, чтобы полностью удалить остатки фиксатора. Для этого объект помещают в марлевые мешочки.

Промыв материал в воде, его частично обезвоживают в этиловом спирте. Чтобы избежать сморщивания тканей, обезвоживание ведут постепенно, используя серии растворов спирта возрастающей концентрации. Марлевые мешочки вынимают по одному из стакана с водой и развязывают. Корни или бутоны вместе с этикеткой осторожно, но быстро, чтобы материал не подсох, переносят в пробирки с 20%-м раствором спирта, который затем заменяют 40,60 и 80%-ми его растворами. В каждой из пробирок материал находится по 30 минут. В 80%-м растворе спирта его можно хранить длительное время.

После спиртовых красителей, таких, как фиксатор Карнуа, материал промывают трижды по 1-2 часа в 80%-м растворе спирта до полного исчезновения запаха уксусной кислоты.

### ***Правила фиксации***

При приготовлении к фиксации и в процессе выполнения ее необходимо соблюдать некоторые общие правила, от которых зависит получение хороших результатов. Важнейшие из этих правил следующие:

1. Подобный фиксатор должен соответствовать цели исследования: выше отмечалось, что для цитозембриологических исследований необходимо использовать ядерные фиксаторы, водные или спиртовые в зависимости от объекта.

2. Объем фиксирующей жидкости должен значительно превышать объем материала в 50 - 100 раз.

3. Фиксируют только свежие корни и бутоны, стараясь это делать на месте выращивания растений. Чтобы уберечь обнаженные корни от действия лучей солнца, лучше проводить фиксацию в тени.

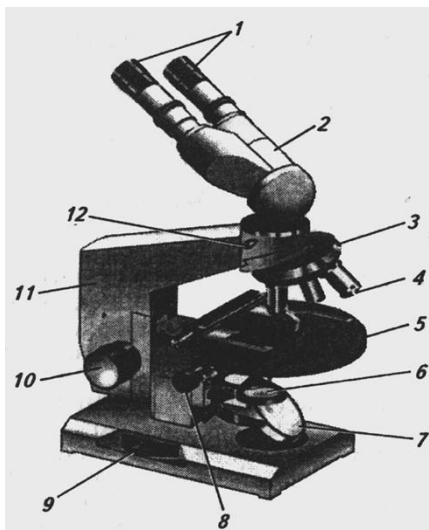
4. Крупные объекты перед фиксацией разрезают на части (например, корзинки сложноцветных), удаляя ненужные органы (листья чашелистики и т.д.), мешающие пропитыванию материала. Во время фиксации ножницами отрезают кончики корней длиной 6-7 мм и сразу помещают в фиксирующую жидкость. Бутоны обычно фиксируют целиком, а колосья предварительно разбивают на колоски. Реже фиксируют целиком.

5. Время фиксации в течение суток определяют в каждом конкретном случае. Корни лучше фиксировать в те часы, когда наблюдается максимум митозов. Эмбриологические объекты для изучения процесса оплодотворения фиксируют через определенные промежутки времени после нанесения пыльцы на рыльце.

## **2.2 Устройство и правила работы с микроскопом**

Микроскоп представляет собой оптический прибор, дающий увеличенное изображение мелких объектов и их деталей. Хотя различные марки световых микроскопов имеют конструктивные отличия, в каждом из них существуют оптические и механические узлы. Устройство микроскопа наглядно показано на

рисунке 1. Оптический узел составляют осветительная система (конденсор и зеркало), объективы и окуляры вместе с тубусом, все составные части строго центрированы одна в отношении другой. Механический узел микроскопа состоит из штатива, на котором крепятся оптические детали, предметного столика и механизмов фокусировки микроскопа.



1 – окуляры; 2 – бинокулярная насадка; 3 – револьверное устройство; 4 – объектив; 5 – предметный столик; 6 – конденсор; 7 – зеркало; 8 – рукоятка перемещения кронштейна конденсора; 9 – рукоятка тонкой фокусировки; 10 – рукоятка грубой фокусировки; 11 – тубусодержатель; 12 – винт для крепления насадки

**Рисунок 1 - Устройство микроскопа с зеркалом**

**Правила работы с микроскопом**

1. Поставьте микроскоп штативом к себе, на расстоянии 5 – 8 мм от края стола.
2. Смотри одним глазом в объектив, направляют зеркалом свет в отверстие предметного стекла, добиваясь равномерного освещения поля зрения микроскопа.
3. Приготовленный препарат поместите на предметный столик и закрепите его зажимами.
4. Пользуясь винтом, плавно опустите зрительную трубку так, чтобы нижний край объектива оказался на расстоянии 1 – 2 мм от препарата.
5. Смотри в окуляр, медленно поднимайте зрительную трубку, пока не появится четкое изображение предмета.
6. После работы наведите порядок на своем рабочем месте.
7. Микроскоп необходимо содержать в чистоте и предохранять от повреждений. В нерабочем состоянии микроскоп должен быть накрыт чехлом.



Особое внимание следует обращать на чистоту объективов и других оптических деталей.

**ВНИМАНИЕ!** Нельзя касаться пальцами поверхностей линз. Для предохранения оптических деталей визуальной насадки от пыли следует оставлять окуляры в тубусах или надевать на них колпачки.

Оптические поверхности окуляров, объективов и конденсора можно осторожно протирать чистой ватой, накрученной на деревянную палочку и смоченной специальной жидкостью для чистки оптических деталей. При загрязнении внутренних поверхностей линз объектива необходимо объектив отправить для чистки в оптическую мастерскую.

**ВНИМАНИЕ!** Запрещается самим разбирать объективы, окуляры, конденсор.

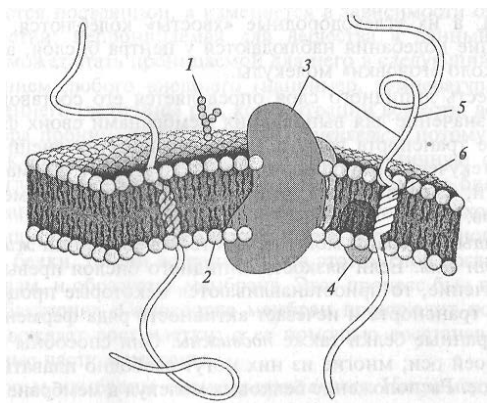
### **3 ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ «ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ»**

Все живые организмы на нашей планете состоят из клеток. Эта структурная единица всего живого претерпела наименьшие изменения с момента возникновения до наших дней. Каждая клетка обладает такими свойствами живого, как способность к самовоспроизведению и движению, метаболизм, раздражимость, рост, изменчивость и адаптация к внешней среде. Совершенство внутренней структуры клетки обеспечивает выполнение практически всех функций организма. Таким образом, клетка является структурной и функциональной единицей всего живого.

#### **3.1 Свойства клеточных мембран**

Способность живых клеток поддерживать постоянство внутренней среды (гомеостаз) хорошо известна, которая утрачивается с гибелью клеток. Эта способность связана с наличием мембран, ответственных за поглощение и выделение веществ в процессе жизнедеятельности. По современным данным, основой

клеточной мембраны является непрерывный бимолекулярный слой липидов, гидрофобные группы которых обращены друг к другу, а полярные – направлены наружу, так как окружающая среда – вода (рисунок 2).



**1 - гликолипид; 2 - фосфолипид; 3 - интегральный белок; 4 - полупогруженный белок; 5 - гидрофильная часть; 6 - гидрофобная часть**  
**Рисунок 2 - Строение универсальной мембраны**

Толщина липидного бислоя около 5 нм. Обе половины бислоя отличаются по своему липидному составу: в наружной половине бислоя находятся гликолипиды, сахарные группы которых ориентированы к клеточной стенке, а внутренний слой образован фосфолипидами. Помимо бислоя липиды в мембране организованы в глобулярные структуры — мицеллы, внутренняя часть которых образована гидрофобными остатками жирных кислот, а наружная — гидрофильными компонентами амфипатических липидов. Липидные мицеллы уменьшают стабильность мембраны, но дают ей возможность изменять конфигурацию. Кроме того, вокруг периферической гидрофильной зоны липидных мицелл возникают гидратные оболочки, облегчающие движение воды и растворенных в ней молекул.

Белковые глобулы располагаются на поверхности липидного бислоя (поверхностные белки) или пронизывают его (трансмембранные), или полупогружены в него. Такое строение мембраны получило название мозаичного. Основными силами, стабилизирующими мембрану, являются слабые водородные взаимодействия между гидрофильными радикалами белков и амфипатических липидов, а также гидрофобные связи Ван-дер-Ваальса в зоне углеводородных радикалов высокомолекулярных жирных кислот.

Химический состав мембран и особенности их молекул обуславливают свойства самих мембран. Главное свойство липидного бислоя — текучесть. Липидный бислой представляет собой жидкость, в которой отдельные молекулы без труда меняются местами со своими соседями в пределах одного монослоя. В бислое молекула липида остается в данном месте в среднем не более чем  $10^{-7}$  с. Очень редко, не чаще одного раза в две недели, молекула может перескочить из одного монослоя в другой. Такое перемещение получило название «флип-флоп». Одновременно молекулы липидов вращаются вокруг своих продольных осей, а их углеводородные «хвосты» колеблются, при этом наибольшие колебания наблюдаются у центра бислоя, а наименьшие — около «головки» молекулы. Текучесть липидного слоя имеет большое значение для выполнения мембранами своих функций (транспорт воды и ионов, восприятие внешних сигналов, активность связанных с мембранами ферментов). Структура мембраны динамична и упорядочена. Упорядоченность — это способность каждой молекулы в данный момент находиться в мембране на своем, строго определенном месте. В мембранах между молекулами существуют очень маленькие расстояния, т.е. молекулы плотно упакованы. Например, на  $1 \text{ мкм}^2$  бислоя расположено примерно  $5 \cdot 10^6$  молекул липидов. Плотная упаковка молекул достигается с помощью межмолекулярных взаимодействий. Разные вещества проходят через мембраны с различной скоростью, поэтому мембраны избирательно проницаемы. В живой клетке проницаемость мембраны для данного

вещества не остается постоянной, а изменяется в зависимости от потребностей клетки: непроницаемая для вещества в данный момент мембрана может стать проницаемой для него в следующий момент. Под влиянием любого внешнего (например, температуры, света) или внутреннего (величины рН, концентрации веществ, возраста и пр.) фактора проницаемость мембран изменяется, потому что действие на клетку любого фактора изменяет третичную структуру белковых глобул и, следовательно, их расположение в бислое. Мембраны способны к самосборке, которая происходит постоянно: она сопровождает рост клетки; с ее помощью восстанавливаются разрушенные части мембраны. Некоторые мембраны взаимопревращаются. Например, мембрана эндоплазматического ретикула со временем может превратиться в мембрану аппарата Гольджи, а последняя — в участок плазмалеммы.

### **3.1.1 Сравнение проницаемости мембран живых и мертвых клеток**

Типичным для всех клеток является наличие на поверхности протоплазмы тонкой невидимой в световой микроскоп структуры, плазматической мембраны, или плазмалеммы. Эта пограничная мембрана обладает замечательным свойством полупроницаемости, или избирательной проницаемости, т.е. выполняет барьерную функцию, не пропуская или почти не пропуская молекулы крупнее, чем молекулы воды. Однако такой барьер существует только в живых клетках. Когда клетка теряет свойство полупроницаемости, все растворенные вещества быстро выходят наружу и клетка гибнет.

*Цель работы: изучить функциональные особенности мембран живых клеток.*

*Материалы и оборудование: стеклянная палочка, препаровальная игла, лезвие безопасной бритвы, линейка, три пробирки, штатив для пробирок, держатель, спиртовка, 30 % раствор уксусной кислоты, вода.*

*Объекты: корнеплод столовой свеклы.*

*Ход работы.* В вакуолях клеток корнеплода столовой свеклы содержится пигмент, придающий ткани корнеплода окраску (бетацианин). Тонoplastы живых клеток непроницаемы для молекул этого пигмента.

Корнеплод свеклы после удаления покровных тканей нарезают на кубики (сторона кубика 5 мм) и тщательно промывают водой, чтобы удалить пигмент, вышедший из поврежденных клеток. Затем по одному кусочку опускают в три пробирки. В первую и вторую наливают по 3 – 5 мл воды, в третью 3 – 5 мл 30% раствора уксусной кислоты. Первую пробирку оставляют для контроля. Содержимое второй кипятят 2 – 3 мин. Во второй и третьей пробирках, где клетки были убиты кипячением или кислотой, вода окрашивается, т.к. после гибели клеток тонoplast теряет свойство полупроницаемости и становится проницаемым для молекул пигмента. В первой пробирке вода остается неокрашенной.

*Задание: выявить различия в проницаемости мембран живых и мертвых клеток и сделать вывод о причинах этих различий.*

### **3.1.2 Окрашивание живых и мертвых клеток нейтральным красным**

Молекулы нейтрального красного не задерживаются в цитоплазме живой растительной клетки, а с участием аппарата Гольджи и тонопласта активно выделяются в вакуоль. Поэтому у живых клеток краситель накапливается в вакуоли, а ядро и цитоплазма остаются неокрашенными. У мертвых клеток, наоборот, цитоплазма и особенно ядро адсорбируют краситель, а в вакуолярном соке он не задерживается. Поэтому у мертвых клеток ярко окрашивается ядро, в меньшей степени цитоплазма, а вакуоли остаются неокрашенными.

*Цель работы: ознакомиться с методами, позволяющими выявить состояние растительных клеток с помощью их окрашивания.*

*Материалы и оборудование: микроскоп, предметные и покровные стекла, лезвие безопасной бритвы, фильтровальная бумага, спиртовка, пинцет, препаровальная игла, для окрашивания используют водный раствор нейтрального красного в концентрации 0,01 % с реакцией среды, близкой к нейтральной (раствор готовят непосредственно перед употреблением: 0,1% раствор нейтрального красного, приготовленного в дистиллированной воде, разводят водопроводной водой).*

*Объекты: луковица лука репчатого.*

*Ход работы.* На вогнутой поверхности чешуи луковицы лезвием безопасной бритвы делают надрезы в виде небольших квадратиков. Уголок квадратика надрезанной эпидермы захватывают пинцетом, легко снимают ее с чешуи и помещают в раствор красителя на предметное стекло. Выдерживают в этом растворе 3 - 5 мин. Затем, накрыв препарат стеклом, рассматривают его при малом, а потом при большом увеличении. При малом увеличении отчетливо видны розовые и розовато-оранжевые вакуоли, накопившие краситель. Интенсивность их окраски в соседних клетках может быть разной, так как клетки различаются по скорости накопления красителя. Отсутствие окраски в цитоплазме и ядре этих клеток легко обнаружить при большом увеличении.

Окрашенные клетки «убивают», подержав предметное стекло над пламенем спиртовки до тех пор, пока под покровным стеклом не начнут появляться пузырьки. Затем снова рассматривают препарат под микроскопом. После гибели клеток окраска их изменяется: ярко окрашивается ядро, менее ярко — цитоплазма, расположенная тонким слоем вдоль стенок, а в вакуолях окраска исчезает. Препарат зарисовывают.

*Задание: сравнить окраску живых и мертвых клеток, сделать рисунки, сформулировать выводы о возможности использования витальных (прижиз-*

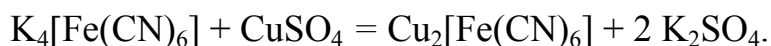
ненных) красителей для выявления живых и мертвых клеток.

### 3.2 Растительная клетка как осмотическая система

Вода растительными клетками поглощается по законам осмоса. Перемещение молекул воды из внешней среды в клетку, а также от клетки к клетке происходит по градиенту уровня свободной энергии молекул воды. За точку отсчета уровня свободной энергии молекул воды берется ее уровень у молекул чистой воды в стандартных условиях. Химический потенциал воды в водных растворах и клетках меньше, чем у чистой воды. Эта разница, называемая водным потенциалом, отражает способность воды в данной системе совершать работу в сравнении с работой, которую при тех же условиях совершала бы чистая вода. Молекулы растворенных в воде веществ снижают уровень свободной энергии молекул воды. Это снижение измеряется осмотическим потенциалом ( $\psi_{осм}$ ). Перемещение молекул воды в системе, состоящей из двух растворов с разными концентрациями, разделенных полупроницаемой мембраной, осуществляется по градиенту концентраций (из раствора с меньшей концентрацией, обладающего более высоким  $\psi_{осм}$ , в раствор с большей концентрацией, имеющего более низкий  $\psi_{осм}$ ).

#### 3.2.1. Явление осмоса. Перемещение воды по градиенту водного потенциала в искусственной «клеточке» Траубе

«Клеточка» Траубе — модель клетки, предложенная исследователем Траубе. Ее получают, помещая кристаллик гексоцианоферрата (II) калия  $K_4[Fe(CN)_6]$  в водный раствор  $CuSO_4$ . Вокруг кристаллика в результате взаимодействия солей образуется осадочная мембрана гексоцианоферрата (II) меди:



Эта мембрана проницаема только для молекул воды, но не для растворенных в ней веществ, т. е. обладает свойством полупроницаемости.

*Цель работы:* получить «клеточку» Траубе и пронаблюдать явление осмоса — перемещение воды через полупроницаемую мембрану по градиенту осмотического потенциала.

*Материалы и оборудование:* 0,5 % водный раствор  $CuSO_4$ , кристаллы гексоцианоферрата (II) калия, пробирки или цилиндры на 10 мл.

*Ход работы.* В небольшой цилиндр или пробирку наливают на  $\frac{3}{4}$  объема 0,5%-ный раствор медного купороса и затем на дно этого сосуда опускают кристаллик  $K_4[Fe(CN)_6]$ . Мембрана образует замкнутый мешочек, который автор опыта Траубе назвал искусственной клеточкой. Полупроницаемая пленка  $Cu_2[Fe(CN)_6]$  разделяет два раствора разной концентрации: внутри мешочка находится концентрированный раствор ферроцианида калия (образующийся при растворении кристаллика соли), а снаружи — раствор сульфата меди. Воз-

никает ток воды внутрь мешочка, объем раствора ферроцианида калия увеличивается, в результате чего мембрана растягивается. Будучи очень тонкой, мембрана в отдельных местах разрывается под действием гидростатического давления. В этих местах соли снова взаимодействуют, возникают новые участки мембраны, что приводит к неравномерному увеличению размера мешочка. Мешочек будет расти, пока весь кристаллик не растворится. Дальнейшее поступление воды в мешочек приведет к разрыву пленки, и она осядет в виде хлопьев на дно стаканчика.

*Задание: сформулировать вывод о механизме перемещения воды через полупроницаемую мембрану.*

### **3.2.2 Явление плазмолиза и деплазмолиза**

Растительная клетка похожа на искусственную «клеточку» Траубе, так как внутри нее в вакуоли находится водный раствор различных веществ, окруженный тонопластом, плазмалеммой и слоем цитоплазмы между ними. Все вместе они образуют полупроницаемую мембрану. Вода может поступать в клетку или выходить из нее в зависимости от величин водных потенциалов в клетке и в наружной среде. Снаружи от полупроницаемой мембраны находится клеточная стенка, которая проницаема для воды и растворенных в ней веществ и не препятствует перемещению воды. Процесс выхода воды из клетки и поступления ее в клетку через полупроницаемую мембрану можно проследить, наблюдая явления плазмолиза и деплазмолиза. При помещении клетки в водный раствор какого-либо вещества происходит *плазмолиз* — *отхождение протопласта от стенки клетки из-за уменьшения его объема вследствие выхода воды из клетки в наружный раствор*. После замены наружного раствора на чистую воду, последняя начинает поступать внутрь клетки. Объем протопласта при этом увеличивается и происходит деплазмолиз. После его завершения протопласт вновь заполняет весь объем клетки.

*Цель работы: доказать на основании явлений плазмолиза и деплазмолиза, что клетка — это осмотическая система.*

*Материалы и оборудование: микроскоп, предметные и покровные стекла, лезвие безопасной бритвы, фильтровальная бумага, спиртовка, пинцет, препаровальная игла, пинцет, 1 М раствор NaCl, вода.*

*Объекты: луковица лука репчатого.*

*Ход работы.* На предметное стекло наносят каплю 1 М раствора NaCl и помещают в нее срез, сделанный с выпуклой стороны чешуи луковицы. Препарат накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом. Наблюдают отхождение протопласта от клеточных стенок.

Затем, не снимая предметное стекло со столика микроскопа, удаляют раствор из-под покровного стекла, приложив к нему с одной стороны кусочек

фильтровальной бумаги. С другой стороны покровного стекла в непосредственной близости к нему наносят каплю чистой воды, которая проникает под стекло к рассматриваемой эпидерме. Наблюдают за изменениями, происходящими в клетках. Вода поступает в клетку, в сторону более концентрированного раствора. Это приводит к увеличению объема протопласта. В результате деплазмолиз сменяет плазмолиз сначала в клетках по краю среза, а затем и в остальных; постепенно протопласт занимает прежнее постенное положение.

Затем препарат нагревают на спиртовке, затем охлаждают и рассматривают под микроскопом. Меняют воду на 1 М раствор NaCl. Наблюдают за происходящими изменениями. Сделать рисунки.

*Задание: описать опыт, сделать рисунки и сформулировать выводы.*

### **3.2.3 Сравнение проницаемости клеточных мембран для различных веществ. Стойкий и временный плазмолиз**

Избирательная проницаемость мембран обеспечивает прохождение через них молекул воды, препятствует проникновению растворенных в воде веществ и обуславливает явление плазмолиза при действии на клетку гипертонического раствора. Если же молекулы растворенного вещества через мембрану проходят, но медленнее, чем молекулы воды, то начавшийся плазмолиз потом исчезает. Деплазмолиз происходит в результате постепенного проникновения растворенного вещества в клетку, выравнивания концентраций снаружи и внутри, а также поступления воды в клетку из наружного раствора по градиенту концентрации.

*Цель работы: изучить проницаемость клеточных мембран для хлорида натрия и карбамида.*

*Материалы и оборудование: микроскоп, предметные и покровные стекла, лезвие безопасной бритвы, пинцет, препаровальная игла, пинцет, 1 М раствор NaCl, 1 М раствор карбамида.*

*Объекты: луковица лука репчатого.*

*Ход работы.* На два предметных стекла наносят по капле раствора: на одно — 1 М раствор хлорида натрия, на другое — 1 М раствор карбамида. В каждую каплю помещают по срезу, сделанному с выпуклой стороны чешуи луковичцы, накрывают покровными стеклами и рассматривают под микроскопом. Находят участки листа, в которых хорошо видны плазмолизированные клетки. Отмечают время начала плазмолиза (начало наблюдения), зарисовывают плазмолизированные клетки.

Препараты оставляют на 30 мин и затем вновь их рассматривают. В растворе хлорида натрия плазмолиз в клетках сохраняется, а в растворе карбамида происходит деплазмолиз. В растворе хлорида натрия наблюдается стойкий плазмолиз, а в растворе карбамида — временный. Причиной деплазмолиза в растворе карбамида является проницаемость клеточных мембран для ее молекул. Так как

проницаемость для карбамида меньше, чем для воды, то вода из клетки выходит быстрее, чем в нее входит мочевины. Это и вызывает плазмолиз, который потом исчезает при увеличении в клетке концентрации карбамида и поступлении воды.

*Задание: описать работу, зарисовать плазмолизованные и деплазмолизованные клетки и сформулировать выводы.*

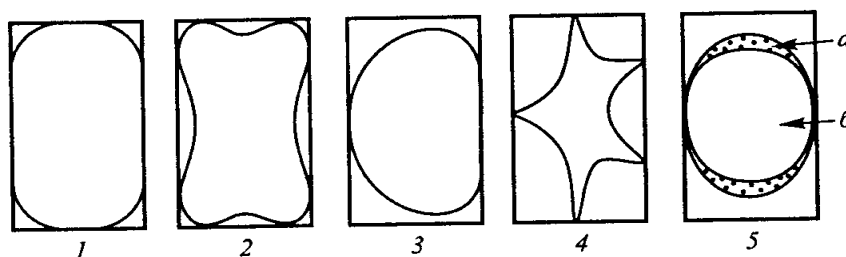
### 3.2.4 Влияние ионов калия и кальция на форму плазмолиза

В ходе плазмолиза форма плазмолизованного протопласта меняется. Вначале протопласт отстает от клеточной стенки лишь в отдельных местах, чаще всего в уголках. Плазмолиз такой формы называют *уголковым*. Затем протопласт продолжает отставать от клеточных стенок, сохраняя связь с ними в отдельных местах, поверхность протопласта между этими точками имеет вогнутую форму. На этом этапе плазмолиз называется *вогнутым*. Постепенно протопласт отрывается от клеточных стенок по всей поверхности и принимает округлую форму. Такой плазмолиз носит название *выпуклого*. Если у протопласта связь с клеточной стенкой в отдельных местах сохраняется, то при дальнейшем уменьшении объема в ходе плазмолиза протопласт приобретает неправильную форму. Такой плазмолиз носит название *судорожного* (рисунок 3). Время, в течение которого вогнутый плазмолиз переходит в выпуклый, позволяет оценивать степень вязкости цитоплазмы.

*Цель работы: изучить влияние различных катионов на форму плазмолиза.*

*Материалы и оборудование: микроскоп, предметные и покровные стекла, лезвие безопасной бритвы, пинцет, препаровальная игла, 1 М раствор  $KNO_3$ , 0,7 М раствор  $Ca(NO_3)_2$ .*

*Объекты: луковица лука репчатого.*



**1 - уголковый; 2 - вогнутый; 3 - выпуклый; 4 - судорожный; 5 - колпачковый (а - цитоплазма; б - вакуоль)**

**Рисунок 3 - Формы плазмолиза**

*Ход работы.* На одно предметное стекло наносят каплю 1 М раствора нитрата калия, на другое предметное стекло наносят каплю 0,7 М раствора нитрата кальция. В обе капли помещают по срезу, сделанному с выпуклой стороны чешуи луковицы, накрывают покровными стеклами. Через 5 - 10 мин препараты рассматривают под микроскопом.



Ионы калия, проникая в цитоплазму, повышают ее гидрофильность, уменьшают вязкость и способствуют ее быстрому отрыву от клеточной стенки. Поэтому в растворах солей калия плазмолиз быстро принимает форму выпуклого. Ионы кальция, наоборот, повышают вязкость цитоплазмы, увеличивают силы сцепления ее с клеточной стенкой, и плазмолиз принимает форму судорожного плазмолиза.

*Задание: зарисовать формы плазмолиза, описать работу и сделать выводы.*

### **3.2.5 Наблюдение колпачкового плазмолиза в растворе роданида калия**

При нахождении клеток в растворе роданида калия цитоплазма набухает в удлинённых клетках, и там, где протопласт не касается клеточных стенок, образуются так называемые колпачки цитоплазмы. Такой плазмолиз носит название *колпачкового* (рисунок 3).

*Цель работы: пронаблюдать колпачковый плазмолиз в соли калия.*

*Материалы и оборудование: микроскоп, предметные и покровные стекла, лезвие безопасной бритвы, пинцет, препаровальная игла, 1 М раствор KSCN.*

*Объекты: лист элодеи, валиснерии.*

*Ход работы.* На предметное стекло наносят каплю 1М раствора роданида калия, помещают в нее лист элодеи (валиснерии), накрывают покровным стеклом и сразу рассматривают под микроскопом. Колпачковый плазмолиз свидетельствует о разной проницаемости плазмалеммы и тонопласта для ионов калия. Ионы калия, проникая через плазмалемму в цитоплазму, вызывают ее набухание. В вакуоль через тонопласт они не проходят. Объем плазмолированной вакуоли не увеличивается и плазмолиз сохраняется.

*Задание: сделать рисунок и сформулировать вывод о причине появления колпачкового плазмолиза.*

### **3.2.6 Тургор растительной клетки. Поглощение воды и ее выход из клеток корнеплода моркови**

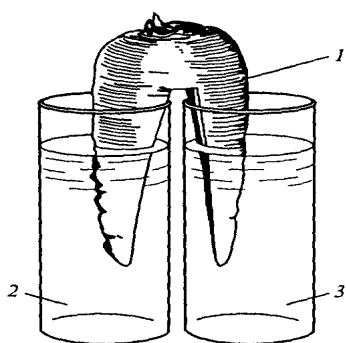
Поступление воды в растительную клетку, помещенную в чистую воду, ограничено клеточной стенкой, растяжение которой не может быть бесконечным. В клетке повышается гидростатическое (тургорное) давление. Это увеличивает свободную энергию молекул воды до уровня свободной энергии молекул чистой воды, и водный потенциал клетки становится равным нулю. Это полностью насыщенные водой клетки. Если клетки поместить не в воду, а в раствор какого-либо осмотика (поваренная соль, сахароза и др.), то вода выходит из клеток и они теряют тургор.

*Цель работы: продемонстрировать явление тургора на примере поступления и выхода воды в клетках корнеплода моркови.*

*Материалы и оборудование: 2 стакана, насыщенный раствор NaCl, вода, нож.*

*Объекты: корнеплод моркови.*

*Ход работы.* Из середины корнеплода моркови вырезают, начиная с кончика корня, продольную полосу ткани шириной 8 - 12 мм и удаляют ее. Две части корня остаются соединенными на протяжении примерно 1/5 всей его длины (рисунок 4). Обе части корнеплода помещают в два стакана, стоящие рядом, в одном — насыщенный водный раствор хлорида натрия, в другом — вода. Через 1,5 - 2ч корень извлекают из стаканов, сравнивают размер и тургор тканей в его



половинах и делают вывод о том, в каком из стаканов произошел выход воды из тканей корня, приведший к потере ими тургора.

**1 - корнеплод моркови; 2 - стакан с водой; 3 - стакан с раствором поваренной соли**

**Рисунок 4 - Поглощение и выход воды из клеток корнеплода моркови**

*Задание: сделать рисунок корнеплода моркови и сформулировать вывод о состоянии обеих его частей.*

### **3.3 Определение водного потенциала растительных тканей**

#### **3.3.1 Определение величины осмотического потенциала в клетках растительной ткани плазмолитическим методом**

Метод основан на подборе наружного раствора известной концентрации, осмотический потенциал которого равняется осмотическому потенциалу клеток. Такой раствор выбирают, наблюдая за степенью плазмолиза, вызываемого в клетках исследуемой ткани растворами разных концентраций. Чем больше осмотический потенциал наружного раствора по сравнению с осмотическим потенциалом клеток, тем сильнее выражен плазмолиз, и наоборот. Задача сводится к тому, чтобы найти два соседних по концентрации раствора, в одном из которых можно наблюдать едва заметный уголковый плазмолиз 50 % клеток, а в другом — отсутствие плазмолиза. Первый раствор будет гипертоническим по отношению к раствору внутри клеток, а второй — гипотоническим. Изотоническим по отношению к раствору внутри клеток следует признать раствор, концентрация которого будет средней между концентрациями двух указанных выше растворов. Осмотический потенциал этого раствора равен осмотическому потенциалу клеток. Тургорное давление в клетках, помещенных в этот раствор, равно нулю, поскольку они находятся в состоянии, предшествующем плазмолизу. Поэтому способность поглощать воду определяется только их

осмотическим потенциалом.

*Цель работы:* ознакомиться с плазмолитическим методом определения величины осмотического потенциала клеток.

*Материалы и оборудование:* 1М раствор хлорида натрия, дистиллированная вода, пробирки или стаканчики для приготовления растворов, предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага, лезвие безопасной бритвы, пинцет, стеклянная палочка, микроскоп, бюретки.

*Объекты:* луковица лука репчатого.

*Ход работы.* Готовят по 10 мл растворов хлорида натрия (или сахарозы) следующих концентраций: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 1 М. Для этого исходный 1 М раствор разбавляют дистиллированной водой по схеме (таблица 1). Для отмеривания воды и раствора пользуются пипетками. Приготовленные растворы взбалтывают. Стаканчики этикетировывают и ставят в один ряд по убывающей концентрации. Против каждого из стаканчиков кладут чистые и сухие предметные стекла и переносят на них с помощью стеклянной палочки капли растворов из соответствующих стаканчиков. Перед погружением стеклянной палочки в следующий раствор ее споласкивают дистиллированной водой, тщательно вытирают фильтровальной бумагой.

**Таблица 1 - Схема приготовления растворов NaCl**

Концентрация раствора, М	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
1 М исходный раствор NaCl, мл	1	2	3	4	5	6	7	8
Дистиллированная вода, мл	9	8	7	6	5	4	3	2

В приготовленные капли помещают кусочки верхней эпидермы чешуи луковицы. Для этого в средней части одной и той же чешуи на ее вогнутой стороне лезвием бритвы надрезают эпидерму небольшими квадратиками. Затем пинцетом снимают находящиеся рядом кусочки эпидермы, помещают их на предметные стекла в заранее приготовленные капли разных растворов и накрывают чистыми и сухими покровными стеклами. Вся процедура приготовления препаратов эпидермы должна проходить быстро, без задержек, чтобы избежать подсыхания капель растворов и кусочков ткани, так как это может привести к изменению их водных потенциалов. Через 10 мин препараты просматривают под микроскопом, отмечая наличие или отсутствие плазмолиза. Делают рисунки клеток с типичной для каждого раствора степенью плазмолиза.

Выбирают два соседних по концентрации раствора, в которых в одном из них наблюдается уголковый плазмолиз, а в другом плазмолиза нет. Раствор со

средней концентрацией между концентрациями этих двух растворов будет изотоничен раствору в клетке, т.е. его водный потенциал будет равен водному потенциалу клетки. Рассчитывают величину  $\Psi_{осм}$  этого раствора, используя уравнение Вант-Гоффа:

$$\Psi_{осм} = - R \cdot T \cdot C \cdot i,$$

где  $R$  - газовая постоянная 0,0821 (л·атм)/(град·моль);  $T$  - абсолютная температура, градусы;  $C$  - концентрация в молях;  $i$  - изотонический коэффициент, характеризующий степень гидролитической диссоциации растворенного вещества (таблица 2) и для неэлектролитов равный 1. Для перевода величины водного потенциала, рассчитанного в атмосферах, в кПа полученный результат нужно умножить на 101,3.

**Таблица 2 - Значение изотонического коэффициента  $i$  для растворов NaCl (20°C)**

NaCl, М	1,0	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,01
$i$	1,62	1,64	1,66	1,68	1,70	1,73	1,75	1,78	1,83	1,93

*Задание: определить величину осмотического потенциала в клетках эпидермы чешуи луковицы плазмолитическим методом, сделать вывод.*

### **3.3.2 Определение водного потенциала растительных тканей методом Уршпрунга (по изменению длины брусочков ткани)**

Метод основан на подборе внешнего раствора известной концентрации, водный потенциал которого окажется равным величине водного потенциала клеток тканей. Водный потенциал внешнего раствора определяется его осмотическим потенциалом. При погружении полосок исследуемой ткани в раствор,  $\Psi_{осм}$  которого меньше, длина полосок ткани уменьшается. Если меньше  $\Psi_{осм}$  раствора, то клетки поглощают воду из раствора, объем их увеличивается и длина полосок ткани тоже возрастает. Длина полосок ткани остается без изменения в том растворе, у которого  $\Psi_{осм}$  равен  $\Psi_{осм}$  клеток растительной ткани.

*Цель работы: познакомиться с методом определения водного потенциала ткани по Уршпрунгу.*

*Материалы и оборудование: 1 М раствор хлорида натрия, дистиллированная вода, бюретки, штативы для бюреток, пробирки, нож для вырезания полосок ткани, линейки или миллиметровая бумага.*

*Объекты: клубни картофеля, корнеплоды репы, моркови.*

*Ход работы.* В семи стакнчиках готовят по 10 мл растворов хлорида натрия убывающей концентрации: 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 М. Для приготовления растворов пользуются пипетками. Исходный 1 М раствор NaCl разбавляют дистиллированной водой (таблица 1).

Из органа растения нарезают пластины толщиной 5 мм и делят на одинаковые бруски шириной около 5 мм и длиной 20 мм. Длину каждого бруска точно измеряют с помощью линейки перед его погружением в раствор соли, и после выдерживания его в растворе в течение 40 - 50 мин. Результаты измерений записывают в таблице 3. Отмечают, как изменилась длина брусочка в каждом растворе. Выявляют тот раствор, в котором длина брусочка не изменилась;  $\Psi_{осм}$  этого раствора равен  $\Psi_{осм}$  клеток растительной ткани. Его величину рассчитывают, используя уравнение Вант-Гоффа.

**Таблица 3 - Влияние концентрации раствора на длину брусочков клубня картофеля**

Концентрация растворов, М	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
Первоначальная длина брусочков, мм								
Длина брусочков после пребывания в растворе, мм								
Изменение длины брусочков, мм								

Констатируют, как изменилась длина брусочка в каждом растворе. Выявляют тот раствор, в котором длина брусочка не изменилась;  $\Psi_{осм}$  этого раствора равен  $\Psi_{осм}$  клеток растительной ткани. Его величину рассчитывают, используя уравнение Вант-Гоффа:

$$\Psi_{осм} = - R \cdot T \cdot C \cdot i,$$

где  $R$  - газовая постоянная 0,0821 (л·атм)/(град·моль);  $T$  - абсолютная температура, градусы;  $C$  - концентрация в молях;  $i$  - изотонический коэффициент, характеризующий степень гидролитической диссоциации растворенного вещества (таблица 2) и для неэлектролитов равный 1. Для перевода величины водного потенциала, рассчитанного в атмосферах, в кПа полученный результат нужно умножить на 101,3.

*Задание: определить величину водного потенциала тканей растения методом Уришпрунга.*

#### **4 ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ «ВОДНЫЙ ОБМЕН»**

Для нормального функционирования клетка должна быть насыщена водой. Хорошо известно, что зеленые части растения содержат 80 - 95 % воды. Вода играет огромную роль в жизни растения. Она прямо или косвенно участвует во всех жизненных процессах, протекающих в клетке. Вода является эле-

ментом структуры мембран и цитоплазмы. Вода растворяет вещества лучше, чем другие жидкости. Хорошо растворяются в воде органические соединения, с карбоксильными, гидроксильными, карбонильными и другими группами, в которых вода образует водородные связи. Вода является основной средой, в которой происходят все реакции обмена веществ. Активность ферментов зависит от ее количества в клетке. Вода непосредственно участвует в фотосинтезе, дыхании, гидролитических процессах. При низком содержании воды, например, в семенах, обмен веществ в клетках почти прекращается, хотя в биохимических превращениях участвует не более 1 % воды. Поднимаясь по растению, вода помогает транспорту органических и минеральных веществ, связывает друг с другом клетки, ткани и органы. Пронизывая все тело растения, вода создает в нем непрерывную фазу и координирует работу органов. Насыщенность клеток водой определяет положение органов растения в пространстве, состояние устьиц. Испарение воды регулирует температуру растительных тканей. Содержание воды сильно варьирует у разных видов, зависит от типа ткани, возраста растения и его физиологического состояния, изменяется в течение суток и в течение сезона.

#### **4.1 Определение относительной активности воды в растении методом потери воды**

Вода содержится в живых клетках, в мертвых сосудах, в межклетниках. Выделяют две основных формы: связанная и свободная вода. Свободная вода сохраняет все свойства чистой воды. Она легко передвигается, вступает в химические реакции, испаряется и замерзает. Связанная вода подразделяется на осмотически связанную и коллоидно-связанную. Вода, связываемая молекулами биополимеров, называется коллоидно-связанной. Воду, связанную ионами или низкомолекулярными соединениями, называют осмотически связанной. Состояние воды в разных частях клетки неодинаково. В самой цитоплазме находится в основном коллоидно-связанная вода, но имеется свободная и осмотически связанная. В клеточном соке преобладает осмотически связанная и свободная вода.

Для биохимической активности цитоплазмы важно термодинамическое состояние воды, ее активность. Под активностью понимают способность вещества участвовать в химических реакциях, фазовых переходах, механических перемещениях и т.п., следовательно, активность показывает эффективную (реальную) концентрацию вещества, в частности воды, в системе. В живой клетке подвижность воды снижена вследствие межмолекулярных взаимодействий, гидратации, иммобилизации воды в микрокапиллярах между макромолекулами и внутри них, а также осмотического давления. Поэтому затруднено перемещение молекул, замерзание и испарение; связанная вода менее интенсивно участ-

вует в химических реакциях, т.е. обладает меньшей активностью. Положительно влияет на активность повышение температуры и давления. Определение относительной активности воды методом потери воды основано на том, что растение (или отдельные его части) будет терять воду, если его поместить в гипертонический раствор или в камеру с сухим воздухом. Определение потери воды в камере с сухим воздухом имеет то преимущество, что вода отнимается в парообразном состоянии, как и в естественных условиях. Испарение воды идет усиленно, так как давление водяного пара в межклетниках листа значительно выше, чем в сухом воздухе. Потеря воды вызывает снижение массы растения. Поступившая в воздух парообразная вода поглощается гигроскопическим веществом, например безводным  $\text{CaCl}_2$  или  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Количество воды, потерянной растением, зависит от водоотнимающей силы гигроскопического вещества и от активности воды в растении, обусловленной подвижностью ее молекул. На количество воды, теряемой растением, влияют строение ткани листа, свойства плазмалеммы, интенсивность обмена веществ, которая во многом зависит от внешних условий. Поэтому условия (температуру и освещенность) проведения опыта следует соблюдать постоянными.

*Цель работы: определить относительную активность воды в листьях растений.*

*Материалы и оборудование: эксикатор с хлористым кальцием, кюветы, электронные весы.*

*Объект исследования: листья растений.*

*Ход работы.* Срезать с растений по 3 листа для каждого варианта, пронумеровать их, взвесить на весах и поместить в эксикатор с хлористым кальцием. Одновременно с растительными пробами поставить в эксикатор кювету из фольги площадью  $4 \text{ см}^2$ , в которую налить 0,8 - 1 мл дистиллированной воды, чтобы дно кюветы было полностью покрыто водой. Перед помещением в эксикатор кювету с водой тоже нужно взвесить. Через 1 ч повторно взвесить листья и кюветы с водой. Рассчитать количество испарившейся воды.

Определить площадь использованных листьев весовым методом. Для определения поверхности листьев разложите листья на бумаге (лучше всего миллиметровой), тщательно обведите листья карандашом, вырежьте и взвесьте полученные бумажные фигуры. Кроме того, взвесьте вырезанный из той же бумаги квадрат известной площади (например,  $1 \text{ см}^2$ ) и найдите площадь листовых пластинок по пропорции:  $a/v = c/S$ , где  $a$  - вес квадрата;  $b$  - вес бумажных фигур;  $c$  - площадь квадрата;  $S$  - площадь листьев.

Рассчитать скорость потери воды листом и испарения чистой воды с единицы площади. Относительную активность воды листа рассчитать по формуле:

$A (H_2O) = U/U_0$ , где  $A (H_2O)$  – относительная активность воды,  $U$  – скорость потери воды растением,  $U_0$  – скорость испарения чистой воды. Результаты представляют в виде таблицы 4.

**Таблица 4 - Относительная активность воды**

Вариант (объект)	Масса, мг		Потеря воды, мг	Пло- щадь, см <sup>2</sup>	Скорость по- тери воды, мгН <sub>2</sub> О/см <sup>2</sup> ·ч	Относи- тельная активность воды
	исход- ная	через 1 час				

*Задание: определить относительную активность воды в листьях растений разных экологических групп.*

#### 4.2 Определение динамики поглощения воды

Приспособления растений к недостатку воды весьма разнообразны. В частности, чрезвычайно высокую устойчивость к условиям дефицита влаги проявляют лишайники и мхи. Именно их способность адаптироваться к неблагоприятным условиям, в том числе к засухе, определила их широкое географическое распространение. Эта эволюционно выработанная адаптация носит комплексный характер. При неблагоприятных условиях все процессы замедляются, становятся латентными, в то время как при благоприятных - быстро восстанавливаются. Одним из путей физиологической адаптации лишайников и мхов к ксеротическим условиям является быстрая потеря воды и отсутствие специальных приспособлений для предохранения от испарения. Способность быстро высыхать позволяет им без повреждений переносить нагревание солнечными лучами. При увлажнении физиологические функции лишайников и мхов быстро восстанавливаются.

*Цель работы: определить динамику поглощения воды воздушно-сухими талломами лишайников при увлажнении.*

*Материалы и оборудование: чашки с увлажненной фильтровальной бумагой; часы с секундомером; электронные весы.*

*Объекты: талломы лишайников, хранившиеся в лабораторных условиях в воздушно-сухом состоянии при слабом освещении.*

*Ход работы.* Три таллома лишайника взвесить на электронных весах и поместить во влажную камеру. В качестве камеры можно использовать чашку Петри, чашки с увлажненной фильтровальной бумагой, в которой установлен определенный режим влажности. Последующие взвешивания производят с интервалами 1, 3, 5, 10, 30, 40, 50 мин.



**Таблица 5 - Динамика поглощения талломом лишайника воды**

Время, мин	Масса таллома, мг			Масса поглощенной воды, мг								
				всего			на 1 г сухого таллома			сред няя		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			

*Задание: определите количество воды, поглощенной лишайником за определенные интервалы времени вычитанием исходной (сухой) массы таллома из очередного результата взвешивания, показывающего массу увлажненного таллома. Проведите расчет поглощения воды на 1 г сухого таллома. Результаты занесите в таблицу (таблица 5). В окончательном виде результаты представьте в форме графика, где по горизонтали отложено время, а по вертикали - масса поглощенной воды на 1 г сухого таллома (каждая точка представляет собой среднюю величину для трех определений).*

#### 4.3 Водообмен ветки сосны

Водообмен растения складывается из поступления воды в растение, передвижения воды по проводящим тканям и транспирации. Для этого растение помещают в банку с определенным количеством воды, принимают меры против испарения воды непосредственно из банки и взвешивают всю установку. Через неделю вторично взвешивают установку, учитывают количество оставшейся в банке воды и на основе полученных данных вычисляют количество поглощенной растением воды (по убыли воды в банке) и количество транспирированной воды (по уменьшению веса всей установки). Для получения ответа на вопрос, по какой части стебля идет восходящий ток, к воде добавляют небольшое количество краски, а также ставят второй опыт с окольцованным стеблем.

*Цель работы: провести количественный учет и изучить особенности трех основных процессов, из которых складывается водообмен веток сосны.*

*Материалы и оборудование: 0,003 % раствор эозина, весы технические, разновесы, полиэтиленовые бутылки на 500 мл с пробками (2 шт.), бритва, скальпель, кристаллизатор большой, вода кипяченая, парафин, электроплитка, вата, бумага, клей, цветные карандаши.*

*Объект: ветки сосны.*

*Ход работы.* Налить в банку примерно на  $\frac{3}{4}$  воду, подкрашенную эозином, наклеить этикетку и взвесить банку с водой. Взять 2-летнюю ветку сосны, очистить нижнюю часть стебля (до мутовки побегов) от хвои и вставить стебель в отверстие пробки. Если имеется резиновая пробка, то можно очень плот-

но зажать в ней ветку, для чего нужно просверлить в пробке отверстие немного меньше толщины стебля, вставить в отверстие с нижней стороны более крупное сверло, опустить в сверло с верхней стороны пробки стебель и, придерживая пробку и стебель пальцами, вытащить сверло из пробки. Если пробка корковая, то приходится делать отверстие немного больше толщины ветки, а затем закрыть ватой щели между веткой и пробкой. Вставив ветку в пробку, следует обновить срез стебля под водой: погрузить нижний конец стебля в кристаллизатор с кипяченой водой и отрезать наискось острой бритвой кусок стебля длиной 6 - 8 см. Продержав свежесрезанный конец стебля под водой не менее  $\frac{1}{2}$  мин, вставить пробку с веткой в банку так, чтобы нижний конец стебля не доходил до дна банки на 1-2 см. Залить пробку парафином (если пробка резиновая и плотно закрывает банку, то можно этого не делать) и взвесить всю установку с точностью до 0,1 г.

Поставить таким же способом опыт с другой веткой, у которой после закрепления ее в отверстии пробки окольцевать стебель. Для этого ниже пробки, но выше уровня жидкости сделать два круговых надреза коры на расстоянии 1 см один от другого и снять кольцо коры (до белой древесины).

Через неделю сделать второе взвешивание всей установки, вынуть пробку с веткой и взвесить банку с оставшейся в ней водой. Если пробку заливали парафином, то перед взвешиванием необходимо тщательно удалить весь оставшийся на стенках банки парафин. Оборвать всю хвою и взвесить.

Сделать бритвой продольные или поперечные разрезы стеблей и зарисовать, обозначив красным карандашом части, окрашенные эозином.

**Таблица 6 - Водный обмен ветки сосны**

Вариант	Вес банки с водой, г		Вес всей установки, г		Количество воды, г		Вес хвои, г	Поверхность, г	Интенсивность транспирации, г/м <sup>2</sup> ч
	исходный	через 7 дней	исходный	через 7 дней	поглощенной	испаренной			
Неокольцованная ветка									
Окольцованная ветка									

*Задание: запишите результаты в таблицу 6. Испаряющую поверхность вычислить исходя из того, что 1 г сырой хвои сосны соответствует поверхность в 33 см<sup>2</sup> (поверхностью стебля можно пренебречь). Интенсивность*

транспирации вычислить, деля количество испаренной воды на поверхность хвои и продолжительность опыта.

#### **4.4 Сравнение транспирации верхней и нижней сторон листа хлоркобальтовым методом**

Если прижать к листу предварительно высушенный кусок фильтровальной бумаги, пропитанной раствором хлорида кобальта, то бумага, поглощая выделяющиеся в процессе транспирации водяные пары, будет менять свою окраску из голубого (цвет сухого  $\text{CoCl}_2$ ) в розовый (цвет  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). По быстроте порозовения можно приблизительно судить об интенсивности транспирации.

*Цель работы: сравнить интенсивность транспирации верхней и нижней сторон листа.*

*Материалы и оборудование: куски хлоркобальтовой бумаги, одинаковые стеклянные пластинки, резиновые кольца для перевязывания стеклянных пластинок, пинцет, плитка, лезвие бритвы, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, стакан с водой.*

*Объекты: листья любых растений.*

*Ход работы.* Просушите над электроплиткой сложенный пополам кусок хлоркобальтовой бумаги до появления ярко голубого цвета и немедленно приложите его к двум сторонам листа. Хлоркобальтовые бумажки следует держать пинцетом, не дотрагиваться до них пальцами, от которых могут остаться розовые пятна. Для устранения действия атмосферной влаги осторожно зажмите лист вместе с наложенной на него бумагой между двумя стеклянными пластинками и перевяжите их резиновыми кольцами. Пронаблюдайте за изменением окраски хлоркобальтовой бумаги и запишите результат.

Сделайте срезы верхнего и нижнего эпидермиса исследуемого листа, рассмотрите их в микроскоп, зарисуйте.

*Задание: сравните интенсивность транспирации верхней и нижней сторон листа. Сделайте выводы о причинах разной интенсивности транспирации верхней и нижней сторон листа и о соотношении между устьичной и кутикулярной транспирацией.*

#### **4.5 Наблюдение за движением устьиц**

Движение устьиц обусловлено особенностями их анатомического строения. Они состоят из двух замыкающих клеток полулунной или бобовидной формы, внутренние стенки которых утолщены, а наружные — тонкие.

При насыщении замыкающих клеток водой наружные стенки сильно растягиваются, кривизна замыкающих клеток увеличивается и устьичная щель от-

крывается. В случае потери воды замыкающие клетки выпрямляются и устьичные щели закрываются. В основе изменений тургора замыкающих клеток лежит изменение их осмотического давления. Различают три типа устьичных движений: гидропассивные, гидроактивные, фотоактивные. Гидропассивные движения закрывания связаны с насыщением водой клеток, которые окружают устьица. Гидроактивное закрывание устьиц связано с увеличением в самих клетках устьиц водного дефицита и с повышением в них содержания абсцизовой кислоты, которая подавляет работу  $H^+$ -насосов на мембранах замыкающих клеток. Это приводит к снижению тургора замыкающих клеток и, следовательно, к закрыванию устьиц. Фотоактивное открывание устьиц состоит в увеличении ширины устьичной щели при повышении интенсивности.

*Цель работы: наблюдать за устьичными движениями в воде и в растворе глицерина.*

*Материалы и оборудование: растворы глицерина (5 %- и 20%), 1М раствор сахарозы, микроскопы, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, фильтровальная бумага, бюксы.*

*Объекты: листья любых растений.*

*Ход работы.* Приготавливают несколько срезов нижней эпидермы листа и помещают их в 5% раствор глицерина на предметное стекло. Наблюдают процесс плазмолиза. Глицерин проникает в вакуоли замыкающих клеток, понижает их водный потенциал и, следовательно, повышает их способность всасывать воду. Устьичные щели при этом закрываются. Через некоторое время (минут через 15) наступает деплазмолиз и устьица открываются вследствие того, что глицерин начинает проникать через цитоплазму в клеточный сок. Затем глицерин меняют на воду, оттягивая его из-под стекла фильтровальной бумагой. При этом наблюдается еще больше открывание устьичных щелей, т.к. вследствие проникновения глицерина в клеточный сок осмотическое давление в замыкающих клетках повышается. После этого воду заменяют сильным осмотиком 20% раствором глицерина или 1 М раствором сахарозы. Наблюдают закрывание устьиц.

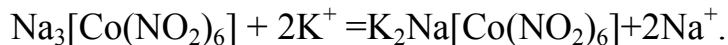
*Задание: зарисовать устьица в воде и в растворах глицерина. Объяснить причину устьичных движений.*

#### **4.6 Наблюдение за перераспределением калия при движении устьиц**

Ведущую роль в регуляции устьичных движений играет работа калиевых ионных насосов, обеспечивающих перераспределение калия между замыкающими клетками устьиц и соседними эпидермальными клетками. Увеличение осмотического давления в замыкающих клетках при открывании устьиц связано с поступлением в них калия, закрывание устьиц происходит при выходе ка-

лия из замыкающих клеток. Поэтому в открытых устьицах замыкающие клетки намного богаче ионами калия, чем в закрытых. Эти различия можно выявить гистохимически с помощью кобальтнитритного метода.

Метод основан на взаимодействии кобальтнитрита натрия с ионами калия в ткани:



При этом образуется желтый кристаллический осадок соли  $\text{K}_2\text{Na}[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ . Для более четкого обнаружения препарат обрабатывают сульфидом аммония, что приводит к образованию в местах локализации калия коричневого осадка сульфида кобальта.

*Цель работы: наблюдать перераспределение калия при движении устьиц.*

*Материалы и оборудование: микроскоп, предметные и покровные стекла, сосуды со снегом или льдом, лезвия безопасной бритвы, чашки Петри, бюксы, стеклянные палочки, среда инкубации, дистиллированная вода, 50 % раствор глицерина, насыщенный раствор сульфида аммония.*

*Приготовление среды инкубации. 20 г нитрата кобальта и 35 г нитрита натрия растворяют в 75 мл подкисленной бидистиллированной воды (10 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 75 мл бидистиллятом). Смесь фильтруют и доводят бидистиллятом до 100 мл. Работать лучше со свежеприготовленной смесью. При необходимости ее можно хранить в холодильнике в течение месяца.*

*Объекты: листья традесканции*

*Ход работы.* Удобным объектом для наблюдения является традесканция, листья которой имеют, хорошо развитый устьичный комплекс. Можно использовать также листья овса, кукурузы, бобов и других культур. Для работы необходимо иметь растения с широко открытыми и плотно закрытыми устьицами. Поэтому перед началом опыта часть растений поливают и выставляют, на яркий свет на 1,5 - 2 ч, другую часть растений выдерживают в темноте до полного закрывания устьиц.

Полностью открытые устьица можно также получить на листовых сегментах. Для этого за 1 ч до опыта нарезают полоски листа и помещают их в освещенные настольной лампой чашки Петри, с водопроводной водой.

На нижней стороне подготовленных к опыту листьев или сегментов острой бритвой под прямым углом к центральной жилке делают поверхностные надрезы через 2 - 3 мм и затем срезают в этом же направлении небольшие участки эпидермиса. Такой способ подготовки эпидермальных полосок предотвращает создание высоких натяжений в замыкающих клетках во время изоляции.

Подготовленные эпидермальные полоски помещают на 1 - 2 мин в чашки Петри с охлажденной дистиллированной водой, с тем чтобы удалить внеклеточный калий. Затем переносят на 5 мин в бюкс с охлажденной инкубационной средой и промывают в чашке Петри охлажденной дистиллированной водой в течение 2 - 3 мин.

Так как кристаллы натриево-калиевой соли кобальтоазотистой кислоты при комнатной температуре относительно растворимы, чашки Петри с водой и бюкс с инкубационной средой помещают в сосуд со снегом или льдом.

Подготовленные препараты просматривают под микроскопом в смеси 50% раствора глицерина и насыщенного раствора сульфида аммония (соотношение 1:1).

*Задание: зарисовать локализацию калия в замыкающих и прилегающих к ним клетках эпидермиса при открытом и закрытом состоянии устьиц.*

#### **4.7 Определение интенсивности транспирации весовым методом**

Транспирация – это процесс испарения воды в атмосферу надземными органами растений. Интенсивность транспирации – это количество воды, испаренной с единицы листовой поверхности в единицу времени (например, с 1 м<sup>2</sup> за 1 ч). Относительная транспирация – отношение интенсивности транспирации к интенсивности испарения со свободной водной поверхности при тех же условиях; этот показатель характеризует способность растений регулировать транспирацию и выражается в виде десятичной дроби или в процентах.

Весовой метод учета транспирации основан на определении количества испаренной воды по уменьшению веса целого растения или срезанного побега (или даже отдельного листа). Побег (лист) срезают и дважды взвешивают, причем интервал между взвешиваниями не должен быть больше 5 мин, так как при более длительной экспозиции может начаться завядание листьев, приводящее к уменьшению интенсивности транспирации. Для взвешивания используют торсионные весы.

*Цель работы: сравнить интенсивность транспирации листьев растений, относящихся к разным экологическим группам.*

*Материалы и оборудование: весы электронные, ножницы, скальпель, крышка чашки Петри, миллиметровая бумага, фильтровальная бумага, вода комнатной температуры.*

*Объекты: комнатные растения или свежесрезанные ветки древесных пород.*

*Ход работы.* Установите весы. Срежьте лист с растения и быстро взвесьте. Через 3 – 5 мин взвесьте лист повторно.

Для определения поверхности листьев разложите листья на бумаге (луч-

ше всего миллиметровой), тщательно обведите листья карандашом, вырежьте и взвесьте полученные бумажные фигуры. Кроме того, взвесьте вырезанный из той же бумаги квадрат известной площади (например, 1 см<sup>2</sup>) и найдите площадь листовых пластинок по пропорции:

$a/b = c/S$ , где  $a$  - вес квадрата;  $b$  - вес бумажных фигур;  $c$  - площадь квадрата;  $S$  - площадь листьев.

Интенсивность транспирации вычислите по формуле:

$I_{mp} = n \cdot 60 \cdot 10000 / S \cdot t$ , где  $I_{mp}$  - интенсивность транспирации, г/м<sup>2</sup>·ч;  $n$  - количество воды, испаренной пробегом за время опыта, г.;  $S$  - площадь листьев, см<sup>2</sup>;  $t$  - продолжительность опыта, мин;  $60$  - коэффициент перевода минут в часы;  $10000$  - коэффициент перевода см<sup>2</sup> в м<sup>2</sup>.

Чтобы убедиться в том, что транспирация не является простым физическим процессом испарения, поставьте одновременно с определением транспирации опыт по учету свободного испарения. Для этого взвесьте чашку, наполненную почти до краёв водой комнатной температуры (наружная поверхность чашки должна быть совершенно сухой), и через определенное время, например, через 30 мин, сделайте второе взвешивание. Между взвешиваниями сосуд с водой должен находиться в тех же условиях, при которых учитывалась транспирация. Определить испаряющую поверхность, измеряя внутренний диаметр чашки линейкой, и вычислите интенсивность испарения со свободной водной поверхности ( $E$ ), пользуясь той же формулой, по которой вычислялась интенсивность транспирации. Деля интенсивность транспирации на интенсивность свободного испарения, можно найти относительную транспирацию.

**Таблица 7 - Определение показателей транспирации**

Объект	Время		Продолжительность опыта, мин	Вес, г		Убыль в весе, г	Площадь, см <sup>2</sup>	Интенсивность испарения воды, г/м <sup>2</sup> ·ч	Относительная транспирация
	начало	конец		исходный	конечный				
Сосуд									
Лист									

*Задание: определите интенсивность транспирации растений, интенсивность свободного испарения и относительную транспирацию. Результаты запишите в таблицу 7.*

#### 4.8 Определение водоудерживающей способности растений методом «завядания» (по Арланду)

В регулировании водообмена растений значительную роль играют водоудерживающие силы, обусловленные в основном содержанием в клетках осмотически активных веществ и способностью коллоидов к набуханию. Водоудерживающая способность клеток зависит от условий выращивания растений. В частности, большое влияние оказывают условия питания. При оптимальных условиях водоудерживающая способность возрастает, водоотдача за 30 мин составляет лишь 4 – 6 % от исходной величины. Определение водоудерживающей способности по Арланду основано на учете потери воды завядающими растениями.

*Цель работы: сравнить водоудерживающую способность листьев растений разных экологических групп.*

*Материалы и оборудование: штативы, технические весы, ножницы, парафин, подкрашенный Суданом III.*

*Объекты: листья растений разных экологических групп.*

*Ход работы.* Листья растений осторожно отделяют от стеблей. Затем основание листа покрывают парафином, чтобы исключить его участие в испарении воды. Для этого основание листа опускают в расплавленный парафин, подкрашенный Суданом III, с температурой не выше 50°C. Листья взвешивают на весах, аккуратно расставляют их в штативы и через 20 мин, 40 мин, 60 мин взвешивают повторно. Убыль в массе показывает абсолютное количество воды, потерянной испытуемыми растениями за 20-минутные интервалы. Используя полученные данные, вычисляют количество испарившейся воды в процентах к испаряющейся массе за последовательные 20-минутные интервалы.

**Таблица 8 - Определение водоудерживающей способности листьев растений**

Объект	Масса листа, г				Масса испарившейся H <sub>2</sub> O, г			Потеря H <sub>2</sub> O, % к исходной массе		
	исходная	через 20 мин	через 40 мин	через 60 мин	через 20 мин	через 40 мин	через 60 мин	через 20 мин	через 40 мин	через 60 мин



*Задание: Изобразить графически динамику водоотдачи, сделать заключение о водоудерживающей способности листьев растений разных экологических групп. Результаты записать по форме таблицы 8.*

#### **4.9 Определение содержания воды и сухого вещества в растительном материале**

Степень оводненности растений является одним из существенных показателей их водного режима. С содержанием воды связаны концентрация клеточного сока, водный потенциал отдельных органов растения, отношение его к почвенной и атмосферной засухе. Определение содержания воды в листьях дает возможность выяснить эколого-физиологические особенности растений, вскрыть механизмы их адаптации к условиям среды. Содержание влаги в растительных тканях обычно вычисляют в процентах от их сухой или сырой массы. В листьях большинства растений средней полосы в зависимости от погодных условий и этапов онтогенеза содержится 65 - 82% воды от сырой массы. Различные по засухоустойчивости растения отличаются характером водного обмена. Влаголюбивые виды и сорта имеют высокое содержание воды при достаточном количестве ее в почве, но быстро теряют воду при понижении влажности почвы. У более устойчивых к засухоустойчивых форм содержание влаги в растениях, как правило, ниже, но ее количество более устойчиво.

*Цель работы: сравнить содержание воды и сухого вещества в листьях растений разных экологических групп.*

*Материалы и оборудование: штативы, электронные весы, ножницы.*

*Объекты: листья растений разных экологических групп.*

*Ход работы.* Количество воды и сухого вещества в листьях определяют весовым методом. Для опыта берут нормально развитые, зеленые, не имеющие явных следов повреждения и увядания листья. Каждое определение проводят в 3-кратной повторности при навеске сырых листьев не менее 5 г. (Следует точно установить, какие по счету листья будут относиться к нижнему и к верхнему ярусам. Это необходимо соблюдать на всех растениях, идущих в опыт).

Сначала определяют массу сырого растительного материала. Затем растительный материал помещают на 5 ч в шкаф, нагретый до 105°C, и высушивают до воздушно-сухого состояния. Затем взвешивают.

Вычитая из массы исходного растительного материала массу высушенного материала, получают количество воды во взятой навеске. Рассчитывают содержание воды в процентах от сырой и сухой массы материала, делают вывод о зависимости содержания воды в листьях от их месторасположения на растении и от варианта опыта.

Результаты опыта записывают в форме таблицы 9.

**Таблица 9 - Содержание воды и сухого вещества в листьях растений**

Вариант	Повторность	Масса листьев, г		Масса, г		Содержание, %	
		исходная	сухая	воды	сухого вещества	воды	сухого вещества

*Задание: определите содержание воды и сухого вещества в растениях различных экологических групп.*

#### **4.10 Определение относительной тургесцентности и водного дефицита**

Недостаток влаги в почве и воздухе нарушает водообмен у растений. Снижение оводненности тканей изменяет состояние биокolloидов клетки, что приводит к повреждению тонкой структуры протопласта, существенным сдвигам в состоянии и деятельности всех ферментных систем и как следствие к нарушению обмена веществ растения. Уменьшение содержания воды в растении вызывает резкое падение интенсивности фотосинтеза; интенсивность дыхания возрастает, одновременно нарушается сопряженность окисления и фосфорилирования, в результате чего сильно снижается энергетическая эффективность дыхания.

В качестве показателей напряженности водного режима растения используют водный дефицит и дефицит относительной тургесцентности ткани. В обоих случаях сравнивают содержание воды в растительной ткани с количеством ее в той же ткани, находящейся в состоянии полного тургора.

Для полного насыщения клеток влагой листья выдерживают в воде или увлажненной атмосфере. Общее содержание воды определяют высушиванием листьев при 100 – 105°C.

Под водным дефицитом понимают недостающее до полного насыщения клеток количество воды, выраженное в процентах от общего ее содержания при полном насыщении ткани.

В природных условиях полное насыщение листьев водой практически не наблюдается: В большинстве случаев водный дефицит у растений колеблется от 10 – 12 % до 30 – 35 %. Этот показатель хорошо коррелирует с водообеспеченностью растений и может быть использован для характеристики водного режима.

*Цель работы: сравнить показатели напряженности водного режима в листьях растений разных экологических групп.*

*Материалы и оборудование: штативы, электронные весы, ножницы,*

чашки Петри, вода.

*Объекты: листья растений разных экологических групп.*

*Ход работы.* Берут листья растений и немедленно их взвешивают. Затем листья помещают на поверхность воды в закрытые чашки Петри и оставляют для насыщения ткани водой на 2 ч.

Тургесцентные листья просушивают снаружи фильтровальной бумагой и взвешивают. Для контроля листья вновь помещают в воду и через 30 мин взвешивают. Если масса ткани не изменится, значит, она полностью насыщена водой. После этого определяют массу абсолютно сухой ткани (работа 4.9). На основании полученных данных вычисляют показатели водообеспеченности растений.

$$\text{Водный дефицит} = \frac{\text{масса воды, насыщающая орган} - \text{имеющаяся масса воды в органе}}{\text{масса воды, насыщающая орган}} * 100 \%$$

Относительная тургесцентность — величина, показывающая, какую долю в процентах составляет наличное количество воды от ее содержания, обеспечивающего полный тургор.

$$\text{Относительная тургесцентность} = \frac{\text{масса сырой ткани} - \text{масса сухой ткани}}{\text{масса тургесцентной ткани} - \text{масса сухой ткани}} * 100 \%$$

Величина, показывающая, сколько воды необходимо для достижения листьями растений тургесцентного состояния, называется дефицитом относительной тургесцентности.

$$\text{Дефицит относительной тургесцентности} = 100 - \frac{\text{масса сырой ткани} - \text{масса сухой ткани}}{\text{масса тургесцентной ткани} - \text{масса сухой ткани}} * 100 \%$$

*Задание: определите показатели напряженности водного режима в листьях растений различных экологических групп.*

## **5 ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ «МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ РАСТЕНИЙ»**

Минеральное питание, как и фотосинтез, является уникальным свойством растения, лежащим в основе автотрофности растительного организма, т.е. способности строить свое тело из неорганических веществ. Причем управление

корневым питанием растений значительно легче, чем регулирование воздушно-го питания — усвоения  $\text{CO}_2$ . Поэтому минеральное питание издавна привлекает внимание физиологов и постоянно находится в поле зрения агрономов. Растения способны поглощать из окружающей среды практически все элементы Периодической системы Д.И. Менделеева. Причем многие рассеянные в земной коре элементы накапливаются в растениях в значительных количествах и включаются в природный круговорот веществ.

Химический состав различных растений довольно сходен, в них содержатся почти все известные элементы. Особенно велико содержание углерода, водорода, кислорода и азота, на долю которых приходится до 95 % сухой массы растения. Эти элементы составляют основу сложных органических соединений растительного организма. Калий, кальций, фосфор, сера, магний, натрий, кремний и железо оказываются в составе золы. Они относятся к макроэлементам. В золе растений содержатся также многие другие элементы, но количество их незначительно, и потому их называют микроэлементами. Одни из них входят в состав органических веществ, таких как ферменты, витамины, пигменты, а другие находятся в цитоплазме в виде ионов, участвуя в метаболических процессах и превращении энергии.

Изучение минерального питания осуществляется различными методами: определяют элементарный химический состав целого растения или его отдельных органов; выращивают растения на искусственных питательных смесях, определяют величину поглотительной деятельности корневой системы.

### **5.1 Изучение минерального питания растений с помощью вегетационных опытов**

Опыты, в которых проводятся наблюдения за растениями от посева до получения урожая, т.е. в течение всего вегетационного периода, называются вегетационными опытами. Основное внимание в этих опытах обращается на реакцию растений на внешние условия.

В природной обстановке в процессе всей жизнедеятельности растение находится под воздействием комплекса внешних факторов: света, тепла, влаги и элементов питания. Для того чтобы изучить действие на растение каждого фактора в отдельности, растение помещают в такие условия, при которых все внешние факторы остаются по возможности постоянными, а изменяется только один из них. Методика вегетационных опытов дает возможность держать под контролем тот фактор внешней среды, действие которого на растение интересует исследователя.

Вегетационные опыты проводятся в полевых условиях на делянках — полевой метод; в сосудах, набитых почвой или песком, — почвенные или песчаные культуры; в водных растворах минеральных солей — водные культуры

растений. Полевой метод в большей степени соответствует естественным условиям обитания растений, но при этом не все внешние факторы можно строго контролировать; песчаные и водные культуры создают для растений искусственную обстановку, но зато дают возможность изолировать влияние отдельных внешних факторов. В сочетании все эти три метода служат хорошим дополнением друг другу, и помогают выяснить полную картину реакции растения на изменения того или другого компонента внешней среды.

### 5.1.1 Постановка опытов с песчаными культурами

Для песчаных культур берут крупный кварцевый песок, имеющий диаметр частиц 0,5 - 0,7 мм. Если песок содержит примесь органических частиц и ил, то его промывают, а затем прокаливают.

В вегетационные сосуды набивают песком, так чтобы песок не доходил на 3 см до верхнего края сосуда. Минеральные удобрения вносят в сухом виде или в растворе. В качестве основного фона минерального питания используется питательная смесь Гельригеля или питательная смесь Прянишникова.

Питательная смесь Гельригеля, г	Питательная смесь Пряниш- никова, г
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - 0,492	$\text{NH}_4\text{NO}_3$ - 0,240
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ - 0,136	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,172
$\text{KCl}$ - 0,076	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,600
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,060	$\text{KCl}$ - 0,150
$\text{FeCl}_3$ - 0,025	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,344
песок - 1кг	$\text{FeCl}_3$ - 0,025
	песок - 1кг

При опыте с песчаными культурами очень важно точно установить необходимую влажность песка. Влажность песка в сосудах в начале опыта следует поддерживать на уровне 60% от полной влагоёмкости. Начиная с вегетативной фазы, влажность в сосудах увеличивают до 80%.

К.А. Тимирязев предложил простой способ определения оптимальной влажности песка. В воронку с бумажным фильтром насыпается определенная навеска песка и наливается вода. Когда вода стечет, песок снова взвешивается и 0,6 от прибавки в его массе будет составлять 60% полной влагоемкости.

### 5.1.2 Постановка опытов с водными культурами

Выращивание растений в искусственных смесях минеральных солей, растворенных в воде, носит название водных культур. Для банок емкостью от 1 до 6 л (объем банок зависит от условий опыта или от растений) изготавливают деревянные крышки или берут корковые пробки. В крышке делают 3 отверстия: первое — в центре (для растения лучше не просто делать отверстие, а вырезать

узкий сектор, доходящий до середины), второе — для стеклянной трубки, которая будет служить для продувания воздуха, и третье — для деревянной палочки, к которой подвязывается растение. После этого пробки пропарафинируют. Делается это так: парафин растопляется на водяной бане, в него погружаются пробки на 2 - 3 минуты, затем их вынимают и ножом снимают лишний парафин. Затем банки красят: вначале покрасят банки с наружной стороны в черный цвет черным лаком (для затемнения корневой системы), после того как лак высохнет, банки сверху покрывают белой эмалевой краской (для отражения тепловых лучей). Сосуд можно смонтировать и по-другому: вначале его обертывают плотной темной бумагой, а потом белой.

В качестве среды на которой выращиваются растения используется питательная смесь Кноппа (таблица 10).

**Таблица 10 - Питательная смесь Кноппа**

Соль	Количество соли, г на 1 л смеси			
	Полная питательная смесь	Смесь с исключением азота	Смесь с исключением калия	Смесь с исключением фосфора
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,00	-	1,00	1,00
CaSO <sub>4</sub>	-	1,03	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25	0,25	-	-
KCl	0,125	0,125	-	0,255
MgSO <sub>4</sub>	0,25	0,25	0,25	0,25
FeCl <sub>3</sub>	5 капель 1%-ого раствора			
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	0,25	-
NaCl	-	-	0,09	-

Для большинства культур рН устанавливается 5,5 - 6,5. Подкисление или подщелачивание питательного раствора при изменении его реакции производят при помощи слабого раствора едкого натра (NaOH) или соляной кислоты (HCl). Вместо соляной кислоты желательнее вносить лимонную.

Для посадки в сосуды отбирают одинаковые по длине стебля, по числу и длине корней и листьев растения. Отобранные растения обертываются ватой и закрепляются в отверстиях пробки. В каждый сосуд высаживается по 2 - 3 растения. Повторность в опытах с водными культурами должна быть не меньше 3 - 4 раз. Через 10 - 15 дней, когда растения разовьются, делается прореживание (производится последний раз отбор одинаковых экземпляров), после которого в каждом сосуде оставляется по одному растению. В опытах с высокостебельными растениями к пробке банки прикрепляется одна или две деревянные палочки, к которым привязываются стебли растений.

Для доставки корням растений кислорода растворы водных культур ежедневно продуваются в течение 5 - 10 минут. Пятиминутного продувания достаточно для молодых растений. Десятиминутное продувание применяется в период наибольшего развития растений. Перед уборкой продувание сосудов прекращают. Продувание сосудов производят с помощью груши. Растворы в течение вегетационного периода меняют 4 - 5 раз, через каждые 15 - 20 дней.

### **5.1.3 Постановка опытов с гравийными культурами**

Во второй половине XX века в условиях закрытого грунта широко стали применяться методы выращивания растений без почвы — гидропоника. Из них наиболее распространен метод гравийной культуры. В качестве субстрата в этом случае используют гравий, который снизу периодически смачивается питательным раствором. Гравий считается лучшим субстратом потому, что он не изменяет состава питательного раствора, в частности его pH, и корни растений при таком субстрате обеспечиваются в достаточном количестве кислородом. Частицы субстрата не должны быть слишком мелкими, иначе снизится аэрация корневой системы. Лучший размер частиц 3 - 7 мм, хотя для разных культур оптимальные размеры частиц будут различными: например, огурцы и томаты могут расти и на крупном гравии (8 - 15 мм), а морковь дает лучшие результаты лишь на мелком гравии (2 - 5 мм). При постановке опыта гравий хорошо промывают водой, до тех пор, пока стекающая вода не станет прозрачной. В сосуды высаживают растения осторожно, стараясь не повредить корневую систему, заполняют горшок гравием, сосуд с растением помещают в другой сосуд большего диаметра, в который наливается питательный раствор. Уровень питательного раствора поддерживают так, чтобы его уровень не доходил до поверхности на 5 - 6 см. Уход за гравийными культурами, так же как и за водными, будет заключаться прежде всего в регулярной смене питательных растворов. Меняют растворы один раз в 7 - 10 дней, а между сменой растворов поддерживают необходимый уровень раствора путем доливания его водой. При смене растворов желательно осторожно промыть гравий водой, вымыть растения. Наполняя сосуды, новый раствор наливают через гравий. При выполнении необходимых условий, изложенных выше, растения в гравийных культурах растут лучше, чем в водной среде и в почве. В гравийной культуре растения бесперебойно снабжаются достаточным количеством всех необходимых им питательных веществ в легкодоступной форме; хорошая аэрация и благоприятно складывающийся тепловой режим в зоне корней — все это способствует быстрому росту растений, ускоряет и повышает урожайность, улучшает качество продукции. Кроме гравия, могут быть использованы и другие субстраты, например керамзит, вермикулит и сфагновый мох. Предложен ряд смесей для гравийной культуры.

Наибольшее распространение из них в производственных условиях получили следующие: смесь Чеснокова, смесь Герике:

<i>Смесь Чеснокова</i>		<i>Смесь Герике</i>	
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	- 0,2 г	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	- 13,5 г
$\text{KNO}_3$	- 0,5 г	$\text{MgSO}_4$	- 13,5 г
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	- 0,55 г	$\text{H}_2\text{SO}_4$	- 7,3 г
$\text{MgSO}_4$	- 0,3 г	$\text{KNO}_3$	- 54,2 г
$\text{ZnSO}_4$	- 0,002 г	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	- 9,5 г
$\text{CuSO}_4$	- 0,002 г	$\text{ZnSO}_4$	- 0,08 г
$\text{H}_3\text{BO}_3$	- 0,029 г	$\text{CuSO}_4$	- 0,06 г
$\text{MnSO}_4$	- 0,019 г	$\text{H}_3\text{BO}_3$	- 0,17 г
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	- 0,022 г	$\text{MnSO}_4$	- 0,2 г
		$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	- 1,4 г

*Указанные количества даются на 1 л воды*

Из этих солей готовят сухую смесь. Сначала хорошо перемешивают суперфосфат и магний сернокислый с серной кислотой, затем добавляется остальная смесь. Смесь хорошо перемешивается и хранится в сухом виде. При приготовлении питательного раствора берут 1 г этой смеси на 1 л воды.

## **5.2 Микрохимический анализ золы растений**

При сжигании растительных тканей всегда остается несгораемая часть, которую называют золой. Химический состав золы весьма разнообразен, что зависит от особенностей самого растения и от состава почвы, на которой растет исследуемое растение.

Среднее количество золы в растении составляет приблизительно 5%. Однако отдельные органы растений сильно различаются по содержанию золы, ее больше в тех органах, которые состоят преимущественно из живых клеток. Так, в среднем в древесине содержится около 1% золы, в семенах – около 3%, в стеблях и корнях – 5%, а в листьях – 15%.

Существует ряд методов, с помощью которых можно определить качественный состав золы. В основе микрохимического анализа лежит свойство некоторых солей образовывать характерной формы кристаллы, некоторым можно судить о наличии в составе золы того или иного элемента. Метод удобен, так как требует для исследования небольшого количества веществ, и прост при выполнении.

*Цель работы: выявить наличие некоторые ионов ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) в золе органов растений.*

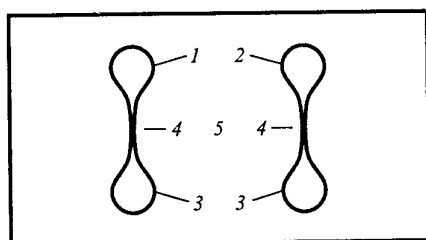
*Материалы и оборудование: микроскопы, стеклянные тонкие палочки с*



оттянутыми концами, предметные стекла, пробирки, воронки, фильтровальная бумага, бумажные фильтры, спиртовка, пинцет, спички, маркер для стекла, этанол, дистиллированная вода, 10%-ный раствор  $\text{HCl}$ , 1 %-ные растворы кислот  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ , 1 %-ные растворы солей  $\text{NaHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ,  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ,  $(\text{NH}_4)\text{MoO}_4$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ ,  $\text{Ti}_2\text{SO}_4$ , смесь следующего состава: 1 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 4 г  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 6 г  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 2 г лимонной кислоты в 250 мл воды (реактив на магний).

*Объекты:* зола из заготовленных летом высушенных листьев, стеблей, соцветий, плодов и кусочков древесины различных растений.

*Ход работы.* Из золы готовят в пробирках два раствора — водный для выявления  $\text{Cl}^-$  и  $\text{K}^+$  и солянокислый для определения всех остальных ионов. Часть золы заливают 10 мл дистиллированной воды, перемешивают и отфильтровывают в чистую пробирку. К оставшейся золе прибавляют 10 мл 10%  $\text{HCl}$ , перемешивают и отфильтровывают раствор в чистую пробирку. С растворами прodelывают все качественные реакции. Появление типичных кристаллов показывает наличие в золе соответствующих элементов. Техника проведения реакции показана на рисунке 5.



акции показана на рисунке 5.

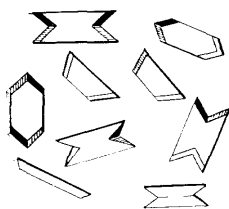
*1 - вытяжка из золы; 2 - раствор, содержащий обнаруживаемый элемент; 3 - реактив на обнаруживаемый элемент; 4 - «мостик» между раствором и реактивом; 5 - предметное стекло*  
**Рисунок 5 - Техника проведения реакции**

Для сохранения чистоты реактивов каждый из них берут отдельной стеклянной палочкой. После использования палочки следует тщательно мыть. На разные концы предметного стекла помещают по капле необходимого реактива на ион, который хотят выявить. Рядом с одной из них наносят каплю какой-либо соли, содержащей данный ион, а с другой — каплю солянокислого или водного экстракта золы. Чистой стеклянной палочкой с заостренным концом две соседние капли соединяют перемиычками. В результате взаимодействия растворов образуются продукты реакции, которые при медленном подсушивании препарата будут выпадать в осадок с образованием характерных кристаллов. Следует избегать полного перемешивания капель растворов: самые крупные и правильно сформированные кристаллы образуются в тонких перемиычках между каплями. Очень важно правильно подсушить препарат. Для этого его держат пинцетом высоко над пламенем спиртовки и подогревают до полного испарения воды, слегка перемещая из стороны в сторону. Подсушивание прекращают, как только исчезнет последняя капля жидкости.

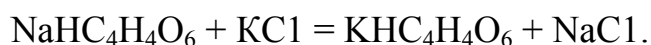
Кристаллы рассматривают под микроскопом на сухом препарате без покровного стекла, зарисовывают и сравнивают с контрольным вариантом.

Проделывают все качественные реакции с растворами и с экстрактами золы. Появление типичных кристаллов показывает наличие соответствующих элементов в золе.

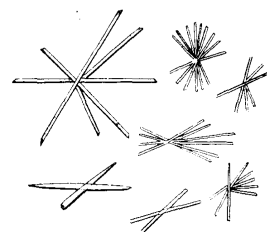
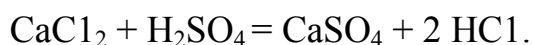
**Обнаружение ионов калия.** Реактивом на ионы калия является гидро-



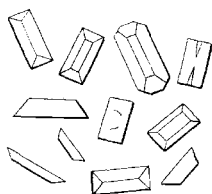
тартрат натрия  $\text{NaHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ , который с нейтральным раствором солей калия дает осадок гидротартрата калия  $\text{KHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$  в виде крупных призм и пластинок. Кристаллы гидротартрата хорошо растворяются в кислотах и щелочах, поэтому для определения иона калия берут водный экстракт:



**Обнаружение ионов кальция.** Более характерным реактивом на кальций является серная кислота. В результате этой реакции выпадают игольчатые кристаллы гипса  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , которые иногда могут располагаться группами, напоминающими снежинки:



**Обнаружение ионов магния.** Капли испытуемого раствора и контрольной соли соединяют с реактивом, состоящим из гидрофосфата натрия, хлорида аммония, лимонной кислоты и гидроксида аммония. При медленной кристаллизации выпадают кристаллы фосфата магния-аммония в виде трапеций, призм и октаэдров; при быстрой кристаллизации — в виде звезд, крестов и

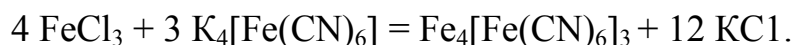


ветвящихся образований:



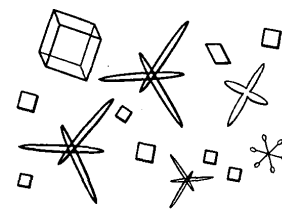
**Обнаружение ионов железа.** Присутствие в вытяжке ионов железа  $\text{Fe}^{3+}$  обнаруживают при взаимодействии с гексоцианоферратом (II) калия  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . В результате образуется интенсивно-синий осадок гексоцианоферрата (II) железа  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ .

Железа в некоторых образцах золы мало, поэтому исходную вытяжку следует нанести на стекло несколько раз и упарить. Наличие ионов железа выявляют по синей окраске:

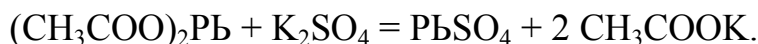


Реакцию на железо можно проводить в пробирке с частью солянокислого экстракта, к которому по каплям прибавляют раствор гексоцианоферрата (II) калия.

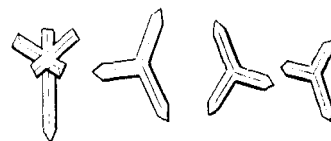
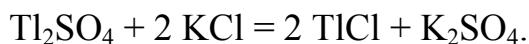
**Обнаружение фосфора.** Ионы  $\text{PO}_4^{3-}$  можно обнаружить в растворе при взаимодействии с молибдатом аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ . Каплю раствора фосфорной кислоты, слегка подкисленную азотной кислотой, соединяют с каплей раствора молибдата аммония. В результате выпадают зеленовато-желтые мелкие кристаллы сложной комплексной соли:



**Обнаружение ионов  $\text{SO}_4^{2-}$ .** в качестве реактива используют раствор ацетата свинца  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ . Выпадают очень мелкие кристаллы сульфата свинца в виде длинных игл, звезд и ромбов:



**Обнаружение ионов хлора.** Анионы хлора обнаруживают в водном растворе золы сульфатом или нитратом таллия. При взаимодействии хлора с одним из этих реактивов выпадают кристаллы хлорида таллия  $\text{TlCl}$ , в виде крестообразных мечевидных образований черного цвета:



*Задание: при оформлении работы записать уравнения реакций и зарисовать характерные формы кристаллов. В выводе отметить какие элементы обнаружены в золе исследованных растений.*

### 5.3 Обнаружение нитратов в растениях

Соли азотной и азотистой кислот, поглощаемые корнями из почвы, восстанавливаются в растении до аммиака, который используется для синтеза аминокислот и других соединений. Для восстановления нитратов требуется АТФ, образующаяся в процессе окислительного или фотосинтетического фосфорилирования. При достаточном содержании растворимых углеводов и высокой активности соответствующих ферментов перечисленные биохимические процессы происходят в клетках корня. Однако при неблагоприятных условиях часть нитратов (нередко весьма значительная) может пройти через паренхиму коры корня в неизменном виде. В этом случае нитраты попадают в сосуды ксилемы и поднимаются с восходящим током к листьям, где и происходит их восстановление. Определение содержания нитратов в соке, отжатом из стеблей, черешков и пластинок листа, позволяет судить о восстановлении нитратов в кор-

нях: чем меньше в них обнаруживается нитрат-ионов, тем активнее происходит этот процесс в клетках корня. Сопоставление содержания нитратов в различных органах растения, например в черешках, пластинках листа, корнях, дает представление о нитратредуктазной активности этих органов. Для обнаружения нитратов можно использовать реактив с дифениламином, который в присутствии иона  $\text{NO}_3^-$  дает синюю окраску. По интенсивности посинения можно судить о количестве нитратов в исследуемом объекте.

*Цель работы: познакомиться с простым и доступным способом определения нитратов в растительном сырье и грамотно оценить их количество.*

*Материалы и оборудование: раствор  $\text{KNO}_3$  или  $\text{NaNO}_3$  в концентрациях, мг/л: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 10 в небольших склянках; 1 %-ный раствор дифениламина в концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в капельнице (хранить в темноте на подставке), пинцет, стеклянные палочки, плоские белые фарфоровые тарелки, кусок стекла, фломастер, цветные карандаши, фильтровальная бумага, ножницы, нож, скальпель, бритва.*

*Объекты: растения.*

*Ход работы.* На белую фарфоровую поверхность тарелки или стеклянной пластинки наносят капли контрольных растворов  $\text{KNO}_3$  или  $\text{NaNO}_3$ , и добавляют одну каплю дифениламина. Заполняют концентрационную шкалу окраски, соответствующую определенному содержанию нитратов. С помощью этой шкалы количественно оценивают содержание нитратов в растительном материале, сравнивая с ней по цвету опытную пробу.

Взятые для исследования плоды, клубни, корнеплоды, луковицы и т.д. раскладывают на столе, отделяют ткани и части органов для анализа. Сок отжимают на поверхность стекла, под которым лежит лист белой бумаги, или на поверхность тарелки с помощью пинцета или стеклянной палочки. Образцы подписывают фломастером. Одновременно острой бритвой делают срезы изучаемой ткани, органа. На срез и выжатую порцию сока переносят каплю дифениламина. Оценивают количество нитратов согласно данным концентрационной шкалы окраски. Смывая по окончании работы ткани и сок, необходимо помнить о свойствах концентрированной серной кислоты оставлять ожоги при попадании на кожу.

**Таблица 11 - Оценка содержания нитратов в органах растений**

Растение (орган)	Количество нитратов в соке	Количество нитратов в срезе

*Задание: записать результаты анализа тканей и органов исследуемых растений в таблицу 11. Сделать вывод о возможности употребления этих растений в пищу.*

#### 5.4 Определение общей и рабочей адсорбирующей поверхности корневой системы методом Сабинина и Колосова

Одной из важнейших характеристик состояния корневой системы является ее масса и поглощающая поверхность. Считается, что в интервале между апикальной и базальной частями корня активное поглощение меняется и даже выделяется специальная поглощающая зона корня. Поэтому бывает необходимым определить как общую, так и рабочую поверхность корня. Д.А. Сабинин и И.И. Колосов, считавшие, что первичным актом поглотительного процесса является адсорбция, разработали метод определения общей поверхности корней, включающей рабочую и недействующую их поверхности.

Большинство поглощаемых корнем веществ не только адсорбируются, но и десорбируются с его поверхности. Поэтому размеры десорбции будут более значительными на тех участках корня, где отсутствует или замедлен процесс транспорта веществ внутрь корня. В качестве поглощаемого вещества, которое можно легко определить колориметрически, авторы метода выбрали метиленовую синь (МС). Было установлено, что 1 мг МС при мономолекулярной адсорбции покрывает  $1,05 \text{ м}^2$  поверхности адсорбента.

Зная исходную концентрацию раствора МС и после экспозиции в ней корней, по разности можно определить, какое количество миллиграммов сини адсорбировалось корневой системой. Умножение этого количества МС на  $1,05 \text{ м}^2$  дает величину поглощающей поверхности.

МС проникает в клетки эпидермиса в течение 90 с. При двукратном погружении корней (каждый раз по полторы минуты) в раствор МС происходит адсорбция красителя на деятельной и недействующей поверхности корней. При третьем погружении корня в раствор МС поглощается только деятельной (рабочей) поверхностью корня. Следовательно, по изменению концентрации МС в двух первых стаканах рассчитывается общая поверхность корневой системы, а результаты третьего определения дают представление о величине рабочей поглощающей поверхности.

Концентрацию МС определяют колориметрически на электрофотоколориметре. Калибровочную кривую для количественного определения МС готовят заранее.

*Цель работы: определить общую и рабочую адсорбирующую поверхность корневой системы.*

*Материалы и оборудование: 0,0003 н.раствор метиленовой сини (на 1 л 112,0 мг предварительно подсушенной при  $95 - 100^\circ\text{C}$  МС), 0,2 М раствор  $\text{CaCl}_2$  (22,2 г/л), химические стаканы на 25 – 50 мл, фильтровальная бумага, весы, калибровочная кривая на МС в интервале концентраций 1 – 12 мг/л..*

*Объекты: 10 - 14-дневные проростки растений.*

*Ход работы.* Для работы лучше использовать корни растений, выращенных в водной культуре. Вначале определяют объем корней. Затем в три стакана наливают 0,0003 н. раствор МС, объем которой должен быть примерно в 10 раз большим, чем объем корней. В четвертый стакан наливают раствор  $\text{CaCl}_2$ . Слегка обсушив корни фильтровальной бумагой, последовательно погружают их в три стакана с раствором МС на полторы минуты в каждый. После каждого погружения дают возможность раствору сини стечь в тот же бюкс, из которого были вынуты корни.

Уменьшение концентрации сини определяют путем сравнения найденной для каждого бюкса концентрации с исходной, т.е. с 0,0003 н. раствором (112 мг МС/л; молекулярная масса метиленовой сини с тремя молекулами воды равна 373,68 г), предварительно разбавленным, как и раствор МС в бюксах, в 10 раз. Разбавление МС перед установлением ее концентрации повышает точность определения. По учету количества поглощенной сини в первых двух стаканах определяют общую адсорбирующую поверхность корней. МС, поглощенная в третьем стакане, характеризует рабочую адсорбирующую поверхность. Разница между общей и рабочей адсорбирующей поверхностями дает представление о масштабе недействительной поверхности корней. Частное от деления величин общей и рабочей поверхности на объем корней (более грубо на их сырую массу в граммах) дает представление о соответствующих величинах удельной адсорбирующей поверхности корней.

Окрашенные корни после извлечения из третьего стакана промывают водой и помещают в стакан с  $\text{CaCl}_2$ . МС, несущая положительный заряд, в результате обменной адсорбции ионов  $\text{Ca}^{2+}$  выделяется из корней и окрашивает раствор в синий цвет.

**Таблица 12 - Определение адсорбирующей поверхности корней**

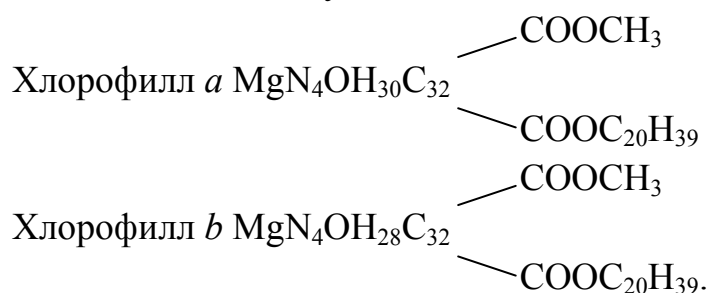
Вариант (объект)	Объем раствора МС в стакане	Количество МС в бюксе, мг			Адсорбирующая поверхность, м <sup>2</sup>					
		до погружения корней	после погружения корней	поглощенной	общая	рабочая	недействительная	удельная		
								общая	рабочая	недействительная

*Задание:* записать результаты определения общей и рабочей адсорбирующей поверхности корневой системы исследуемых растений в таблицу 12.

## 6 ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ «ФОТОСИНТЕЗ»

### 6.1 Пигменты фотосинтеза и их свойства

Пигменты фотосинтеза находятся в мембранах тилакоидов. У высших растений это хлорофиллы *a* и *b*, каротиноиды. Хлорофиллы по своей химической природе являются сложными эфирами дикарбоновой кислоты хлорофиллина и двух спиртов — высокомолекулярного одноатомного спирта фитола  $C_{20}H_{39}OH$  и метилового спирта  $CH_3OH$  и представляют собой фетилметилхлорофиллиды. Хлорофилл *a* отличается от хлорофилла *b* тем, что у третьего углеродного атома во втором пирольном кольце его молекулы метильная группа заменена на альдегидную.



Каротиноиды подразделяются на каротины (ненасыщенные углеводороды с эмпирической формулой  $C_{40}H_{56}$ ) и ксантофиллы, отличающиеся от каротиноидов присутствием кислорода ( $C_{40}H_{56}O_2$ ). Обычно пигменты из растительной ткани извлекают полярными растворителями (этанолом, этиловым эфиром, ацетоном), которые нарушают связь хлорофиллов и каротиноидов с липопротеидами пластид и обеспечивают их полное экстрагирование из живых листьев. Из сухого растительного материала экстракцию ведут с добавлением воды, чтобы нарушить связи с молекулами белка.

*Цель работы:* ознакомиться с методами экстракции пигментов и с их химическими свойствами.

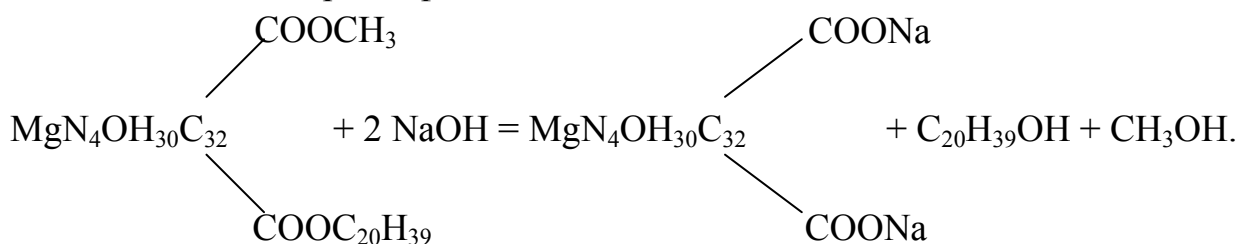
*Материалы и оборудование:* ступка с пестиком, воронка, фильтр, штатив с пробирками, стеклянные палочки, 2 колбы на 200 мл, электроплитка,  $NaOH$  или  $KOH$  в кристаллах, этанол.

*Объекты:* зеленые листья растений.

*Ход работы. Получение спиртовой вытяжки из листьев.* Для последующих работ с пигментами растений в основном используют спиртовой экстракт из листьев. Экстракт пигментов в количестве от 3 до 10 мл получают из живых листьев. Навеску листьев в 0,5 - 2 г размельчают и тщательно растирают в ступке с 10 мл спирта, добавляя его несколькими порциями. Осадок пропускают через складчатый бумажный фильтр для ускорения фильтрации. Экстракт пигментов используют в работе.

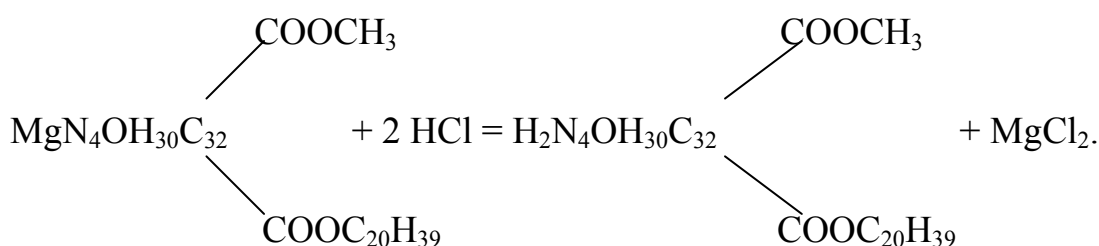
*Омыление хлорофилла щелочью.* В пробирку с 2 - 3 мл спиртовой вытяжки пигментов добавляют такой же объем бензина и 2 капли воды. Закрыва-

ют пробкой и сильно встряхивают содержимое в течение 15 – 20 с, после чего пробирку ставят в штатив до начала разделения слоев бензина и спирта. Хлорофилл находится в верхнем бензиновом слое, вследствие чего этот слой окрашивается в зеленый цвет, нижний спиртовой слой — желтый, так как там остается ксантофилл. Затем в пробирку бросают кусочек кристаллической щелочи (KOH или NaOH) и снова сильно встряхивают содержимое до ее растворения. Дают смеси жидкостей расслоиться, и полученная соль хлорофиллиновой кислоты переходит в нижний спиртовой слой, спиртовой слой становится зеленым. В верхнем бензиновом слое остается желтый пигмент каротин. Обработка хлорофилла щелочью вызывает омыление эфирных связей, т. е. отщепление остатков метилового спирта и фитола:



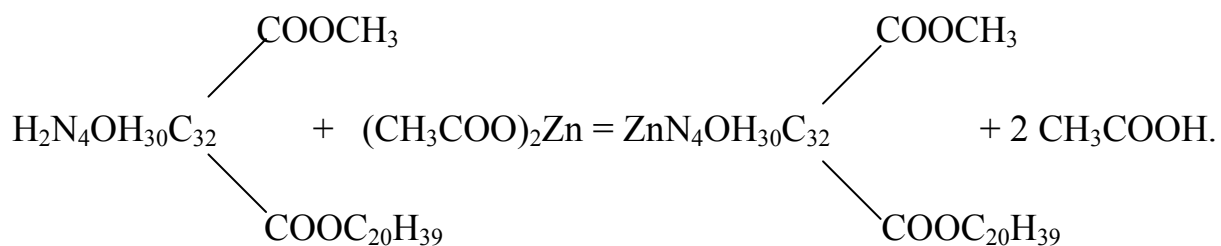
Образующаяся при этом соль хлорофиллиновой кислоты сохраняет зеленую окраску, но отличается от хлорофилла большей гидрофильностью.

**Получение феофитина и обратное замещение в нем водорода атомом металла.** В три пробирки отливают по 2 мл спиртовой вытяжки пигментов. Одну пробирку оставляют для контроля. В двух других готовят феофитин. Для этого в пробирки добавляют по 2 - 3 капли 10% соляной кислоты или в пробирки с растворами пигментов погружают стеклянные палочки, смоченные в концентрированной соляной кислоте. При этом окраска вытяжки становится бурой, так как хлорофилл превращается в феофитин:



Одну пробирку с феофитином оставляют для сравнения, а в другой феофитин переводят в металлозамещенный хлорофилл, добавляя в нее 2 - 3 кристаллика ацетата цинка или ацетата меди, затем подогревают. Зеленый цвет пигмента восстанавливается. В этом случае ионы металла (цинка или меди) вытесняют водород в молекуле феофитина и занимают центральное положение в его молекуле, образуя очень стойкое соединение — металлозамещенный хлорофилл:





*Задание: записать уравнения реакций получения щелочной соли хлорофиллина и металлозамещенного хлорофилла. Сравнить по цвету пробирки с растворами хлорофилла и металлозамещенного хлорофилла, закрыть их пробками, снабдить этикетками и оставить в штативе на свету. Через неделю сделать выводы о стойкости хлорофилла и металлозамещенного хлорофилла, отмечая изменения цвета раствора.*

### 6.2 Разделение смеси фотосинтетических пигментов

Один из первых методов разделения пигментов был предложен немецким ученым Краусом в 1860 г. Он основан на разной растворимости пигментов в спирте и бензине. Эти растворители не смешиваются при сливании и образуют два слоя: верхний — бензиновый, где растворены хлорофиллы и каротин, и нижний — спиртовой, где растворен ксантофилл.

*Цель работы: ознакомиться с методом Крауса, получить растворы каротина и ксантофилла.*

*Материалы и оборудование: штатив с пробирками, этанол, NaOH или KOH кристаллические, бензин, колба Бунзена со стеклянным фильтром, водоструйный насос, ступка с пестиком.*

*Объекты: листья любых растений или спиртовой экстракт из листьев, полученный в работе 5.1.*

*Ход работы.* В пробирку с 3 – 5 мл спиртового раствора пигментов добавляют такое же количество бензина и 2 каплю воды (для лучшего отделения спирта от бензина). Пробирку хорошо взбалтывают и дают смеси пигментов отстояться. Происходит расслоение жидкости: в верхний, бензиновый, слой, переходят оба хлорофилла и каротин, в нижнем, спиртовом, слое остается желтый пигмент — ксантофилл, так как он лучше, чем бензин, растворим в спирте.

Для отделения каротина от хлорофилла верхний бензиновый слой пипеткой переносят в чистую пробирку. В этой зеленой вытяжке каротин незаметен, так как его маскирует хлорофилл, преобладающий количественно. В пробирку добавляют 2 мл этилового спирта и 3 - 4 капли воды, вносят несколько кристалликов щелочи и сильно встряхивают. При взаимодействии щелочи с хлорофиллом происходит его омыление, образуется щелочная соль хлорофиллина, которая легко переходит из бензина в спирт. В результате в пробирке образуются два слоя: верхний, бензиновый, слой — желтого цвета с содержанием ка-

ротина и нижний, спиртовой, — зеленого цвета, содержащий щелочную соль хлорофиллина.

*Задание: зарисовать пробирки с разделенными пигментами; сделать выводы о растворимости пигментов в различных растворителях и способах выделения индивидуальных пигментов.*

### **6.3 Оптические свойства пигментов зеленого листа**

Для пигментов листа, как и для всех пигментов вообще, характерно избирательное поглощение лучей света. Хлорофилл поглощает красные и сине-фиолетовые лучи, каротиноиды поглощают только сине-фиолетовые лучи. Для определения того, какие лучи поглощает пигмент, пользуются спектроскопом. Он имеет три тубуса, расположенные в одной плоскости и сходящиеся в камере со стеклянной призмой. Один из тубусов с наружного конца имеет узкую щель, через которую луч света падает на призму, разлагающую его в спектр — набор лучей с разной длиной волн. Спектр рассматривают с помощью второго тубуса, в который вставлен окуляр. В третий тубус вставляется шкала с указанием длины волн в нанометрах — от 800 до 400 нм. При освещении щели спектроскопа лампой или другим источником через второй тубус можно наблюдать спектр излучения источника света. Чем уже щель спектроскопа, тем полнее происходит разделение света на составляющие его лучи. Однако при сужении щели интенсивность этих лучей уменьшается. Ее можно увеличить, расширяя щель, но при этом зоны разных лучей начинают накладываться друг на друга, снижая чистоту спектра.

Для определения, какие именно лучи поглощает пигмент, нужно кювету с раствором пигмента поставить перед щелью спектроскопа, через которую проходят лучи от источника света. На месте лучей, поглощаемых молекулами пигмента, в спектре излучения источника света появляются темные полосы. Чем полнее поглощаются лучи, тем темнее полоса. Этот спектр с темными полосами на месте поглощенных лучей и называется спектром поглощения пигмента. Наиболее темные полосы в зонах поглощения соответствуют максимумам поглощения. Ширина полос поглощения зависит от количества молекул пигмента в слое раствора, через который проходит луч света, попадающий в щель спектроскопа. Количество молекул увеличивается при увеличении концентрации раствора пигмента или при увеличении толщины слоя его раствора. Положение максимумов поглощения может смещаться и за счет взаимодействия отдельных молекул пигмента между собой или с белками.

#### **6.3.1 Спектры поглощения пигментов листа**

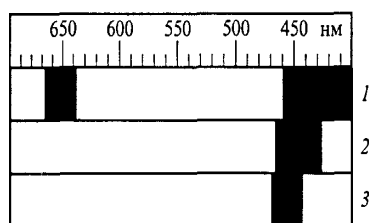
*Цель работы: исследовать оптические свойства пигментов листа.*

*Материалы и оборудование: концентрированная спиртовая вытяжка*

пигментов, растворы каротина и ксантофилла, этанол, спектроскоп, два осветителя, набор кювет разной ширины с плоскопараллельными стенками, ступка с пестиком, пробирки, воронка, бумажный фильтр, медицинский шприц, дистиллированная вода, пинцеты.

*Объекты:* листья комнатных растений.

*Ход работы.* Налаживают освещение щели и шкалы спектроскопа так, чтобы спектр излучения совпадал со шкалой длины волн. Этот спектр зарисовывают цветными карандашами и отмечают длину волны разных его участков. Затем наливают спиртовой раствор пигментов в кювету и устанавливают ее перед щелью спектроскопа. Спектр поглощения хлорофилла рассматривают и зарисовывают, точно указывая длины волн поглощаемых лучей. Полосы поглощения — более узкую в красной части спектра и довольно широкую в синефиолетовой части — заштриховывают черным карандашом. Рассматривают и зарисовывают спектры поглощения каротина и ксантофилла (рисунок 6). Для этого используют растворы пигментов, полученные в работе 5.2.



**1 — хлорофиллы а и б;**

**2 — каротин;**

**3 — ксантофилл**

**Рисунок 6 - Спектры поглощения пигментов**

*Задание:* сделать выводы о характере поглощения лучей пигментами.

### **6.3.2 Наблюдение флуоресценции хлорофилла**

Флуоресценция хлорофилла — испускание возбужденной молекулой хлорофилла света с длиной волны, большей, чем длина волны света, возбуждавшего флуоресценцию. Флуоресценция обнаруживается по красному цвету раствора хлорофилла, рассматриваемого в отраженном свете на темном фоне. Возбуждающий флуоресценцию свет значительно интенсивнее света флуоресценции. Поэтому раствор хлорофиллов выглядит зеленым. В отраженном свете в глаз наблюдателя попадает значительно меньше возбуждающего флуоресценцию света, поэтому становится видна сама флуоресценция (рис. 7). Независимо от длины волны возбуждающего света хлорофилл флуоресцирует только красным светом.

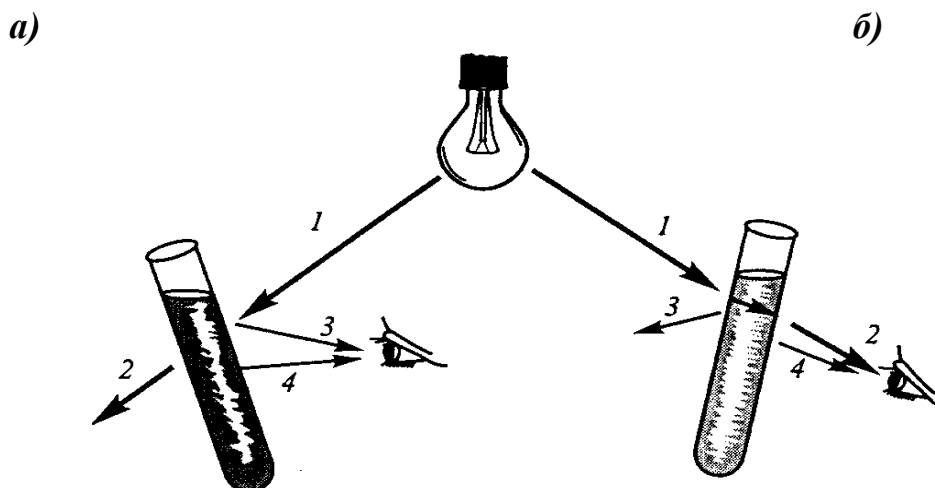
*Цель работы:* наблюдать флуоресценцию хлорофилла.

*Материалы и оборудование:* электрическая лампа, штатив, пробирка, ступка, пестик, 5 мл этанола.

*Объекты:* зеленые листья любых растений.

*Ход работы.* Листья растений (1 г) размельчают в ступке с 5 мл этилового спирта. Содержимое наливают в пробирку через воронку с бумажным фильтром.

Рассматривают раствор пигментов в пробирке или колбе в отраженном свете настольной лампы (рис. 7). Отмечают красную флуоресценцию спиртовой вытяжки листа, которая содержит все пигменты. Рассматривают спиртовую вытяжку листа в проходящем свете, отмечают ее зеленую окраску, обусловленную присутствием хлорофилла. В проходящем свете красная флуоресценция не видна, так как интенсивный проходящий свет маскирует ее.



*1 – свет лампы, освещающий пробирку с раствором хлорофилла и возбуждающий его флуоресценцию; 2 – свет лампы, проходящий через пробирку с раствором хлорофилла; 3 – свет лампы, отраженный от пробирки; 4 – флуоресценция хлорофилла*

**Рисунок 7-Спиртовая вытяжка хлорофилла в отраженных (а) и проходящих лучах (б)**

*Задание: сделайте вывод о наличии флуоресценции у хлорофилла. Опишите способ наблюдения флуоресценции и цвет раствора хлорофилла в проходящем и отраженном свете.*

#### **6.4 Определение содержания пигментов**

Содержание хлорофиллов и каротиноидов, зависит от жизнедеятельности организма, его генетической природы. Поэтому оно может быть использовано как физиологический показатель, характеризующий онтогенетические; возрастные и генетические особенности растений. Количество пигментов очень чутко отражает и реакцию растительного организма на условия произрастания. Количественный анализ пигментов включает экстракцию их из растительных тканей растворителями и фотометрирование.

*Цель работы: определить содержание пигментов фотосинтеза.*

*Материалы и оборудование: ступка, пестик, ножницы, фильтровальная бумага, воронка, цилиндр, 10 мл этанола.*

*Объекты: зеленые листья любых растений.*

*Ход работы.* Навеску листьев размельчают и тщательно растирают в

ступке с 10 мл 96% этилового спирта, добавляя его несколькими порциями. Осадок отделяют с помощью складчатого бумажного фильтра. Объем фильтрата замеряют. Фильтрат колориметрируют на фотометре КФК-3 при длинах волн 452,5 нм, 649 нм, 665 нм. Концентрацию и содержание пигментов рассчитывают по формулам (Wintermans, De Mots, 1965).

$$C_{Хл а} = 13,7 \cdot D_{665} - 5,76 \cdot D_{649}$$

$$C_{Хл в} = 25,8 \cdot D_{649} - 7,6 \cdot D_{665}$$

$$C_{Хл а+в} = 6,1 \cdot D_{665} + 20,04 \cdot D_{649}$$

$$C_{каратиноиды} = 4,75 \cdot D_{452,5} - 0,226 \cdot C_{Хл а+Хл в}$$

$$A = \frac{C \cdot V}{m \cdot 1000},$$

где  $C$  - концентрация пигмента, мг/л;  $D_{665}$ ,  $D_{649}$ ,  $D_{452,5}$  - оптическая плотность раствора при длинах волн 665, 649 и 452,5 нм соответственно;  $A$  - содержание пигмента в растительном материале, мг/г<sub>массы</sub>;  $V$  - объем вытяжки пигментов, мл;  $m$  - навеска растительного материала, г; 1000 - коэффициент перевода мл в л.

Если экстракцию пигментов фотосинтеза проводят 80 % ацетоном, то фильтрат колориметрируют при длинах волн 440,5 нм, 445 нм, 450 нм, 645 нм, 663 нм. Концентрацию и содержание пигментов фотосинтеза рассчитывают по формулам (Mac-Kinney, 1941).

$$C_{Хл а} = 12,7 \cdot D_{663} - 2,69 \cdot D_{645}$$

$$C_{Хл в} = 22,9 \cdot D_{645} - 4,68 \cdot D_{663}$$

$$C_{Хл а+в} = 8,02 \cdot D_{663} + 20,2 \cdot D_{645}$$

$$C_{каратиноиды} = 4,695 \cdot D_{440,5} - 0,268 \cdot C_{Хл а+Хл в}$$

$$C_{каротин} = D_{450}/236$$

$$C_{ксантофилл} = D_{445}/215$$

**Таблица 13 - Определение содержания пигментов**

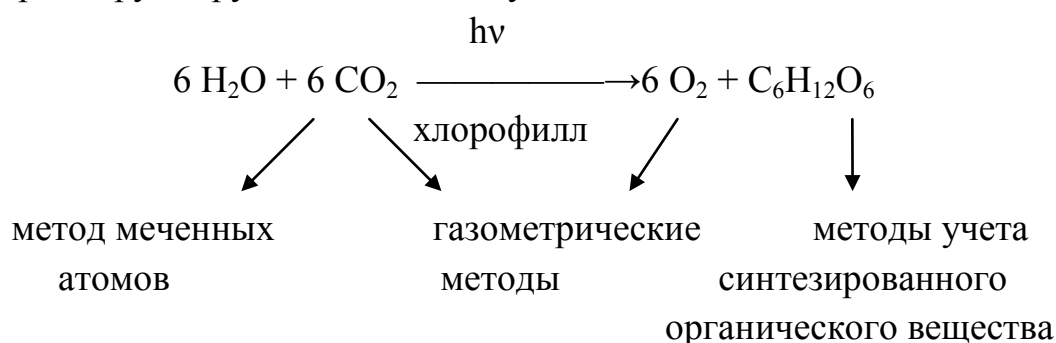
Условия	Объект	Масса листа, г	Объем вытяжки, мл	Оптическая плотность вытяжки			Концентрация пигментов, мг/л				Содержание пигмента, мг/г <sub>массы</sub>						
				$D_{665}$	$D_{649}$	$D_{452,5}$	Хлорофилл а	Хлорофилл в	Хлорофилл а+в	Каратиноидов	Хлорофилл а	Хлорофилл в	Хлорофилл а+в	Каратиноидов			

*Задание: определите содержание пигментов в растительном материале. Результаты запишите по форме таблицы 13.*

## 6.5 Обнаружение процесса фотосинтеза

Большинство методов обнаружения и определения интенсивности фотосинтеза может быть изучено на лабораторных занятиях, главным образом демонстрационным путем. Часть методов требует очень сложного оборудования и может применяться только в специальных лабораториях для научно-исследовательской работы. Однако, принцип этих методов должен быть известен студентам, а некоторые более простые методы могут быть использованы при выполнении практических заданий или курсовых работ по физиологии растений.

Все методы определения интенсивности фотосинтеза можно систематизировать, используя для этого суммарное уравнение фотосинтеза, по компонентам которого группируются соответствующие методы:



Методы учета интенсивности фотосинтеза по количеству поглощенной воды в практике почти не используются. Это объясняется тем, что очень трудно учесть в общем количестве поглощаемой и расходуемой растением воды ту ее часть, которая затрачивается на фотосинтез.

Наиболее распространены методы определения интенсивности фотосинтеза, основанные на учете изменения газового состава воздуха в замкнутом пространстве. Применение их требует очень строгого учета времени экспозиции и количества воздуха, используемого в опыте. Время экспозиции должно быть довольно коротким, иначе весь углекислый газ в замкнутом пространстве может израсходоваться на фотосинтез до окончания опыта.

Широкое распространение в научной работе получил изотопный метод определения интенсивности фотосинтеза. Для этого метода используют радиоактивный углерод  $\text{C}^{14}$ , особые камеры и счетчики, учитывающие количество радиоактивного углерода, поглощаемого растением из воздуха при фотосинтезе. Этот метод довольно точен и дает возможность изучить отдельные этапы процесса фотосинтеза, пути образования первичных продуктов фотосинтеза и их передвижение по растению. Более детально с этим методом можно познакомиться в специальных руководствах.

### **6.5.1 Обнаружение выделенного при фотосинтезе $O_2$ с помощью метиленового синего**

Известный краситель — метиленовый синий (МС) способен к окислительно-восстановительным превращениям, он может быть как акцептором ионов водорода, так и их донором.

В основе данного опыта лежит свойство метиленового синего давать бесцветное соединение при воздействии восстановителя  $Na_2SO_3$  и переходить снова в окрашенное соединение при воздействии окислителей  $H_2O_2$  или  $O_2$ .

*Цель работы: доказать, что растение на свету выделяет  $O_2$ .*

*Материалы и оборудование: высокие пробирки или цилиндры, концентрированный раствор метиленового синего в спирте, насыщенный раствор  $Na_2SO_3$ , 3%-ный  $H_2O_2$ , настольная лампа 100 W.*

*Объекты: элодея, валлиснерия, роголистник.*

*Ход работы.* В три пробирки наливают водопроводную воду и подкрашивают метиленовым синим до ярко-голубой окраски, а затем добавляют по каплям  $Na_2SO_3$  до обесцвечивания всех трех растворов. Во вторую пробирку наливают пероксид водорода до изменения цвета снова в ярко-голубой, а в третью помещают растение. Все пробирки выставляют на свет и наблюдают за тем, как изменяется в них цвет раствора. Температура среды  $26^\circ C$ .

*Задание: опишите опыт; зарисуйте пробирки; объясните причину изменения цвета в пробирках.*

### **6.5.2 Поглощение зеленым растением углекислого газа из воздуха**

Углекислый газ, содержащийся в воздухе, проникает в мезофилл листа через устьица. В хлоропластах он используется на построение органических веществ. Для установления факта поглощения углекислого газа зелеными листьями можно использовать пеларгонию, колеус и другие растения.

*Цель работы. Установить, что зеленые листья на свету поглощают углекислый газ.*

*Материалы и оборудование: гидроксид кальция (известковое молоко)  $Ca(OH)_2$ , фенолфталеин, мерный цилиндр или пипетка на 10 мл, две колбы на 250 мл с пробками, штатив металлический с лапками и муфтами, электрическая лампа.*

*Объекты: пеларгония или розан китайский, колеус.*

*Ход работы.* Подбирают две одинаковые колбы объемом 250 мл. В одну колбу помещают побег с несколькими листьями. Отверстие колбы закрывают пробкой (ватой). Вторая колба — контрольная, без побега. Колбы выставляют на яркий свет. Экспозиция длится 30 – 40 мин.

После опыта вынимают побег из колбы и обе колбы закрывают пробками. Затем осторожно приоткрывают пробки и вливают в каждую колбу по 10 мл

известкового молока, подкрашенного в розовый цвет фенолфталеином. Вращательными движениями руки растворы в колбах помешивают в течение 2-3 мин и наблюдают за уменьшением интенсивности их окраски. В контрольной колбе известковое молоко обесцвечивается, так как весь углекислый газ, находившийся в колбе, поглощается. В колбе, где находился побег, раствор будет окрашен более интенсивно, так как углекислого газа в ней меньше — он поглощен растением в ходе фотосинтеза.

*Задание: опишите опыт; зарисуйте колбы; объясните причину изменения цвета в них.*

### 6.5.3 Получение отпечатков на листьях с помощью крахмальной пробы

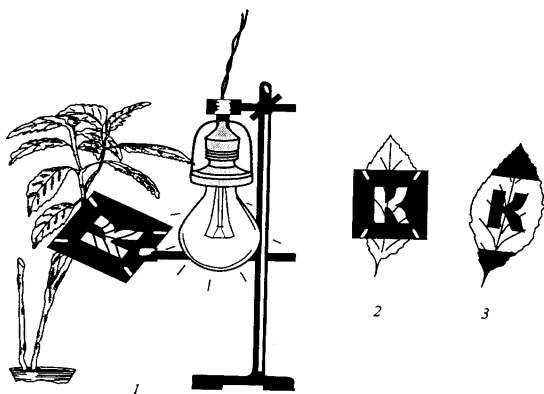
Работа наглядно показывает, что при фотосинтезе на свету в листе образуется органическое вещество в виде крахмала, а также доказывает необходимость света в этом процессе. Работу можно проводить в условиях открытого грунта и на комнатных растениях.

*Цель работы: показать, что в листьях на свету в процессе фотосинтеза синтезируется крахмал.*

*Материалы и оборудование: этанол, раствор йода в йодиде калия, водяная баня, электроплитка, химический стакан на 50 - 100 мл, тарелка, лампа на 100 - 200 W, плотная бумага, фольга, канцелярские скрепки, трафареты с вырезанными фигурами, пинцет.*

*Объекты: гортензия, пеларгония, колеус, герань, примула, подсолнечник, настурция, табак, сахалинская гречиха, одуванчик и т.д.*

*Ход работы.* При подготовке листьев к опыту комнатные растения переносят в темный шкаф на двое суток (не забывая о поливе), чтобы произошел отток крахмала из клеток листа или чтобы он был израсходован на процессы метаболизма. Через 2 суток на листьях прикрепляют трафарет с вырезанным отверстием. Трафарет делают из сложенного вдвое листа плотной бумаги или фольги с какой-либо вырезанной фигурой (рисунок 8).



1 – освещенное растение; 2 – лист, закрытый трафаретом; 3 – отпечаток (крахмальная проба) на листе  
Рисунок 8 - Получение отпечатков на листьях с помощью крахмальной пробы

Накладывая его на лист, надо следить, чтобы очертания фигуры на верхней и нижней сторонах листа совпадали, затем трафарет осторожно прикреп-



ляют. Экспозиция на свету может длиться от 2 до 8 ч (в зависимости от вида растения и интенсивности освещения). Зимой в помещении в качестве источника света устанавливают лампу 100 - 200 W на расстоянии 60 - 70 см от листа.

По окончании экспозиции на свету листья срезают, снимают с них трафарет, погружают на 2 - 3 мин в кипяток, чтобы убить ткани, а затем в горячий спирт для извлечения пигментов. Колбу со спиртом и листьями помещают в водяную баню с кипящей водой и выдерживают в горячем спирте до полного извлечения пигментов из листьев и их обесцвечивания. В спирте происходит сильное обезвоживание листа, он становится жестким и легко ломается. Поэтому спирт сливают, а в колбу наливают воду, лист становится мягким, затем его переносят в кювету или в тарелку с раствором йода в йодиде калия. Постепенно на освещавшихся участках листа появляется темная фигура, соответствующая трафарету.

*Задание: опишите опыт и методику проявления «отпечатков», зарисуйте листья, сделайте вывод о том, в какой части листа произошел синтез крахмала.*

#### **6.5.4 Образование сахара в зеленых листьях на свету**

Большинство зеленых растений на свету образует органическое вещество -крахмал. Их называют крахмалофильными растениями. Некоторые растения в тех же условиях образуют не крахмал, а сахар. К ним относятся, чеснок, лук, ирис, ландыш и др. Это сахарофильные растения. Образование сахара на свету можно проследить на листьях лука. Если опыт проводится зимой, то нужно за 3 - 4 недели до занятия посадить в горшок с почвой или в стакан с водой несколько луковиц лука репчатого и вырастить зеленые листья.

*Цель работы: установить, что в листьях некоторых растений при фотосинтезе образуется не крахмал, а сахар.*

*Материалы и оборудование: раствор йода в йодиде калия, жидкость Феллинга, сосуд с почвой, электроплитка, асбестовая сетка, водяная баня, химическая колба на 250 мл, пробирки, фарфоровая тарелка, пинцет, скальпель, штатив для пробирок.*

*Объекты: луковица лука репчатого.*

*Ход работы.* Прежде всего, необходимо выяснить, содержится ли в листьях лука крахмал. Для этого, предварительно обработав листья горячей водой, извлекают из них хлорофилл путем нагревания в спирте и проводят реакцию с йодом (как в работе 6.5.3). Желтая окраска листьев после обработки йодом свидетельствует об отсутствии в них крахмала. Далее обнаруживают сахар. Для этого нарезают 2-3 свежих листа лука на мелкие кусочки, помещают их в пробирку, заливают небольшим количеством воды и нагревают до кипения для экстрагирования из листьев сахара. Затем жидкость сливают в другую пробирку и проводят реакцию на сахар. Для этого приливают к жидкости реактив

Фелинга и продолжают кипячение. В пробирке появляется оранжевый осадок оксида меди (I), свидетельствующий о наличии в листьях лука восстанавливающих сахароз.

*Задание: проведите опыт и сформулируйте вывод.*

## **6.6 Определение интенсивности фотосинтеза растений методом Бойсен-Йенсена**

Метод Бойсена - Йенсена по определению интенсивности фотосинтеза растений основан на учете количества  $\text{CO}_2$ , поглощаемого при фотосинтезе растением, заключенным в замкнутый сосуд.  $\text{CO}_2$ , оставшийся в колбе после поглощения растением за определенный промежуток времени, поглощается известным объемом щелочи, который титруют соляной кислотой. Одновременно с колбами, в которые помещают растения, ставят контрольные колбы того же объема, но без растительного объекта. Это дает возможность учесть количество  $\text{CO}_2$ , содержащегося в колбе.

*Цель работы: определить интенсивность фотосинтеза листьев разных видов растений.*

*Оборудование и материалы: широкогорлые конические колбы емкостью 250 мл, резиновые пробки, весы, 0,1 н раствор КОН; 0,1 н раствор HCl; 1%-ный раствор фенолфталеина в капельнице, марлевые мешочки, нитки, цилиндры.*

*Объекты: листья растений.*

*Ход работы.* По числу вариантов берут такое же число колб. В каждую приливают по 10 мл 0,1н КОН. Листья растений опускают на нитках в колбы, так чтобы они не касались раствора щелочи. Свободный конец нитки укрепляют в колбах с помощью пробки. Через промежутки времени (15 минут) колбы слегка взбалтывают. Колбы помещают на свет (солнечные лучи). Одновременно с колбами, в которые помещены растения, ставят контрольную колбу без растительного объекта. Через один час листья растений вынимают из колб. В каждую, в том числе и в контрольную, добавляют 2-3 капли фенолфталеина, и титруют 0,1н HCl. Результаты заносят в таблицу 14.

По разнице в количестве HCl, пошедшей на титрование опытных и контрольной колб, рассчитывают количество поглощенного  $\text{CO}_2$  за время опыта. Расчеты проводят по формуле:

$$ИФ = \frac{(a - e) \cdot 2,2 \cdot 60}{m \cdot t},$$

где: ИФ – интенсивность фотосинтеза ( $\text{мг CO}_2/\text{см}^2 \cdot \text{ч}$ );  $m$  - масса сырого вещества (г);  $t$  - время (мин);  $a$  - объем раствора HCl, израсходованной на тит-

рование щелочи в опытной колбе;  $v$  - объем раствора HCl, израсходованной на титрование щелочи в контрольной колбе.

*Задание: определите интенсивность фотосинтеза, заполните таблицу 14, сформулируйте вывод.*

**Таблица 14 - Интенсивность фотосинтеза**

Вариант (объект)	Продолжительность опыта, мин	Навеска, г	Объем 0,1н HCl, затраченный на титрование, мл	Интенсивность фотосинтеза, мгСО <sub>2</sub> /г·ч

## **6.7 Влияние внешних условий на фотосинтез**

### **6.7.1 Зависимость фотосинтеза от интенсивности света**

Фотосинтез идет только на свету. Увеличение интенсивности света до определенного предела усиливает протекание этого процесса. Выяснить влияние интенсивности света на фотосинтез по выделению кислорода можно, помещая водные растения в различные световые условия. Перерезав в воде стебель таких водных растений, как элодея и роголистник, можно увидеть выделение из срезанного стебля пузырьков кислорода, так как кислород плохо растворим в воде. На листьях валлиснерии происходит выделение пузырьков газа.

*Цель работы: выяснить влияние интенсивности света на фотосинтез.*

*Материалы и оборудование: гидрокарбонат натрия (сода питьевая) NaHCO<sub>3</sub>; отстоявшаяся водопроводная вода, стеклянная палочка, нитки, ножницы, электролампа в 200 Вт, часы, термометр.*

*Объекты: элодея, роголистник, валлиснерия.*

*Ход работы.* Выбирают здоровые, интенсивно-зеленого цвета побеги элодеи или роголистника с неповрежденной верхушкой, длиной около 8 см, подрезают их под водой, затем осторожно привязывают ниткой к стеклянной палочке и опускают верхушкой вниз в стакан с водой комнатной температуры (температура воды должна оставаться постоянной). Можно взять листья валлиснерии. Для опыта берут отстоявшуюся водопроводную воду, обогащенную углекислым газом путем внесения питьевой соды. стакан с водным растением выставляют на яркий свет. Вскоре из срезанного конца побега начинают выделяться пузырьки кислорода. Когда ток пузырьков станет равномерным, подсчитывают количество пузырьков, выделившихся за 1 мин. Подсчет производят 3 раза с перерывом в 1 мин и определяют средний результат. Затем прибор с растением удаляют от света на 50 - 60 см, или выставляют на рассеянный свет. Через 3 - 5 мин, когда установится новый режим фотосинтеза, проводят отсчет выделившихся за 1 мин пузырьков кислорода.

*Задание: провести опыты и сравнить их результаты на ярком и слабом свете.*

### **6.7.2 Влияние спектрального состава света на фотосинтез**

Хлорофилл поглощает красные и сине-фиолетовые лучи. Энергия этих лучей используется на процесс фотосинтеза. Установить, в каких лучах наиболее интенсивно идет фотосинтез, можно на опыте с водными растениями, сравнивая количество пузырьков кислорода, выделившихся при освещении растений красным и синим светом.

*Цель работы. Установить, в каких лучах спектра наиболее интенсивно идет процесс фотосинтеза.*

*Материалы и оборудование: 1 % раствор дихромата калия ( $K_2Cr_2O_7$ ), 4 % раствор сульфата тетрааммиаката меди ( $Cu(NH_3)_4]SO_4$ , две широкогорлые банки, отстоявшаяся водопроводная вода, пробирки, термометр, ножницы, часы, электролампа в 200 Вт.*

*Объекты: элодея, роголистник, валлиснерия.*

*Ход работы.* В пробирку наливают на  $\frac{2}{3}$  объема отстоявшуюся водопроводную воду и помещают побег водного растения, расположив его верхушкой вниз. В банку наливают (не до самых краев) 1% раствор дихромата калия, который служит экраном, пропускающим только красную часть спектра. В банку осторожно помещают пробирку с водным растением так, чтобы раствор дихромата калия не попал в пробирку. Весь прибор выставляют на яркий свет. Из среза стебля начинают выделяться пузырьки кислорода. Когда ток пузырьков станет равномерным, подсчитывают количество пузырьков, выделившихся в течение 1 мин. Затем пробирку с водным растением помещают в такую же по форме и объему банку, но с 4% раствором сульфата тетрааммиаката меди, пропускающим только синюю часть спектра. Весь опыт повторяют 3 раза. Наблюдения ведут на одинаковом расстоянии от источника света и при одинаковой температуре. Полученные результаты заносят в таблицу 15.

**Таблица 15 – Влияние спектрального состава света на фотосинтез**

Растение	Количество пузырьков $O_2$ , выделившихся за 1 мин							
	при красном экране				при синем экране			
	1-я мин	2-я мин	3-я мин	средние результаты	1-я мин	2-я мин	3-я мин	средние результаты

*Задание: опишите опыт, проведите исследования, заполните таблицу 15, сформулируйте вывод.*

### 6.7.3 Влияние температуры на фотосинтез

Повышение температуры до  $+25^{\circ}\text{C}$ ...  $+30^{\circ}\text{C}$  ускоряет процесс фотосинтеза. Это объясняется тем, что фотосинтез складывается не только из световых реакции, идущих на свету, но и из темновых, являющихся ферментативными реакциями. Скорость ферментативных реакций зависит от температуры: она возрастает и 2-3 раза при увеличении температуры на  $10^{\circ}$ . При  $+35^{\circ}\text{C}$ ...  $+40^{\circ}\text{C}$  наблюдается резкий спад интенсивности фотосинтеза, так как в таких температурных условиях происходит нарушение тончайшей структуры хлоропластов, их инактивация. Это ослабляет процесс фотосинтеза. Влияние температуры на фотосинтез можно проследить на водных растениях — элодее, роголистнике, валлиснерии наблюдая выделение пузырьков кислорода из перерезанных стеблей при разной температуре окружающей среды.

*Цель работы: выяснить зависимость интенсивности фотосинтеза от температуры.*

*Материалы и оборудование: стеклянные банки, термометры, электролампочки в 200 Вт, часы, ножницы, пробирки, штатив для пробирок.*

*Объекты: элодея, роголистник, валлиснерия.*

*Ход работы.* В две стеклянные банки наливают воду разной температуры:  $+4^{\circ}\text{C}$ ,  $+25^{\circ}\text{C}$ . В банки погружают термометры. Температура во время опыта должна оставаться постоянной. Пробирку, с побегом водного растения, подготовленную так же, как в работе 6.7.2, помещают в банку с температурой воды  $+25^{\circ}\text{C}$ . Дают растению адаптироваться в новых условиях в течение 3 - 5 мин, а затем подсчитывают количество выделившихся пузырьков кислорода за 1 мин (подсчет производят 3 раза). Затем переносят пробирку с растением в банку с водой, имеющей температуру  $+4^{\circ}\text{C}$ , и, когда установится новый режим фотосинтеза в этих условиях, снова производят подсчет пузырьков, выделившихся в 1 мин.

**Таблица 16 - Влияние температуры на фотосинтез**

Растение	Количество пузырьков $\text{O}_2$ , выделившихся за 1 мин							
	при температуре $+4^{\circ}\text{C}$				при температуре $+25^{\circ}\text{C}$			
	1-я мин	2-я мин	3-я мин	средние результаты	1-я мин	2-я мин	3-я мин	средние результаты

Наблюдения, ведут на одном и том же расстоянии от источника света. Полученные данные заносят в таблицу 16.

*Задание: опишите опыт, проведите исследования, заполните таблицу 16, сформулируйте вывод.*

### **6.8 Определение чистой продуктивности фотосинтеза**

На долю органических соединений, создаваемых в ходе фотосинтеза, приходится около 95% общей биомассы растительного организма. Поэтому изменение сухой массы может довольно объективно отражать ассимиляционную деятельность растений. Именно этот показатель и лег в основу метода определения «нетто-ассимиляции», или чистой продуктивности фотосинтеза. Чистая продуктивность фотосинтеза (ЧПФ) представляет собой прирост сухой массы растений в граммах за определенное время (сутки), отнесенный к единице листовой поверхности (м<sup>2</sup>). Ее учитывают путем периодического отбора проб растений, у которых определяют общую массу, массу отдельных органов и площадь листьев. Далее «нетто-ассимиляцию» (в г/м<sup>2</sup>·сутки) рассчитывают по формуле:  $ЧПФ = \frac{m_2 - m_1}{1/2 \cdot (S_1 + S_2) \cdot n}$ , где  $m_1$  и  $m_2$  - сухая масса растений в начале и в конце учетного периода, ( $m_2 - m_1$ ) - прирост сухой массы в течение  $n$  дней;  $S_1$  и  $S_2$  — площадь листьев в начале и в конце периода, м<sup>2</sup>;  $1/2 \cdot (S_1 + S_2)$  - средняя работавшая площадь листьев за время опыта;  $n$  - число дней между двумя последовательными сроками наблюдений. Как правило, время между пробами составляет 7 - 10 дней, а в периоды интенсивного роста оно может быть сокращено до 5 дней. Показатели чистой продуктивности фотосинтеза в природных условиях обычно колеблются от 0,1 до 20 г и более сухого вещества на 1 м<sup>2</sup> площади листьев в сутки: у злаков в фазе интенсивного роста — 40 - 50 г, у основных сельскохозяйственных культур при благоприятных условиях — 4 - 10 г/м<sup>2</sup> в сутки.

*Цель работы: определить чистую продуктивность фотосинтеза.*

*Материалы и оборудование: весы, ножницы.*

*Объекты: пшеница, овес, кукуруза и др.*

*Ход работы.* На опытных посевах берут пробы растений. Для уменьшения разброса результатов в пробу включают наиболее типичные и однородные для данного посева и фазы развития экземпляры.

У злаков, например, берут не менее пяти-десяти параллельных проб, каждая из которых состоит из 10 - 20 растений. При этом в пробу включают все опавшие и засохшие листья и побеги. Отобранные растения помечают этикетками, заворачивают в бумагу и переносят в лабораторию для анализа. Затем их быстро разделяют на отдельные органы и каждую часть взвешивают. Пожелтевшие или отмершие листья учитывают отдельно.

Дальнейшая обработка собранного материала заключается в отборе проб для определения сухого вещества в отдельных органах растений и измерении площади листьев.

Для нахождения процентного содержания сухого вещества из растительной массы каждой части берут две-три порции материала, взвешивают и высушивают в термостате при 105°C до постоянной массы. Затем рассчитывают содержание сухого вещества и устанавливают массу абсолютно сухих частей, а в конечном итоге общую сухую массу растений, взятых для исследования.

Определение площади проводят быстро и только у зеленых листьев до высушивания.

Через 7 - 10 дней таким же образом вновь отбирают растения и определяют массу сухих растений и площадь листового аппарата. Чистую продуктивность фотосинтеза рассчитывают по формуле.

Если такие наблюдения провести в течение вегетации растений, можно получить ценные данные о продуктивности работы листьев в отдельные периоды жизни исследуемой культуры или в зависимости от условий ее произрастания.

Результаты наблюдений записывают по форме таблицы 18.

**Таблица 18 - Чистая продуктивность фотосинтеза**

Вариант	Повторность	Число растений в пробе, шт.	Сырая масса растений, г				Сухая масса растений, г				Площадь листьев, см <sup>2</sup>	ЧПФ, г/м <sup>2</sup> ·сутки
			листья	стебли	соцветия	общая	листья	стебли	соцветия	общая		

*Задание: опишите опыт, проведите исследования, результаты запишите в виде таблицы 18, сформулируйте вывод.*

### 6.9 Определение продуктивности растений

Накопление сухого вещества единицей листовой поверхности за единицу времени зависит от интенсивности трех процессов: ассимиляции CO<sub>2</sub>, энергии дыхания и оттока ассимилятов из листа, напряженность которых в свою очередь определяется внешними условиями (минеральным питанием, длиной дня, водным режимом и т. д.).

*Цель работы: определить продуктивность фотосинтеза.*

*Материалы и оборудование: весы, ножницы, сушильный шкаф.*

*Объекты: пшеница, овес, кукуруза и др.*

*Ход работы.* Выбирается по несколько растений каждого варианта. Для анализа берутся листья одинакового яруса, еще не закончившие рост, но не самые молодые. Вначале берут пробу на содержание сухого вещества в листьях в момент начала опыта. Для этого срезают половинку листа вдоль средней жилки и помещают в кристаллизатор с водой на 30 минут для полного насыщения листа, а, следовательно, и для достижения клетками листа их максимальной величины.

Вынув из воды лист и положив его на толстый картон, пробочным сверлом с диаметром около 1 см вырезают вдоль половинки листа кружочки, стараясь вырезать по возможности большее число. Кружочки помещают в заранее вывешенный бюкс и ставят в сушильный шкаф. Высушивание ведут при температуре  $+100^{\circ}\text{C}$  ...  $+105^{\circ}\text{C}$  до постоянной массы, которую определяют взвешиванием на аналитических весах.

Вторая половинка листа (вместе со средней жилкой) остается на растении для ассимиляции на свету углекислого газа и накопления органического вещества, после чего с ней поступают точно так же, как и с первой половинкой.

Разница в количестве сухой массы одинакового числа кружочков ткани листа до и после экспозиции и дает накопление листом сухого вещества за исследуемый промежуток времени, или продуктивность листа, являющуюся результатом интенсивности течения в листе трех процессов: образования органического вещества, траты его на дыхание и оттока ассимилятов из листа в другие органы растения.

Для определения интенсивности фотосинтеза у листьев растений разных вариантов нужно выяснить, сколько в это же время тратилось ассимилятов на дыхание и отток. Для этой цели берется такой же лист на другом растении этого же варианта. Одна половинка листа отрезается и идет на определение сухого вещества в листе до опыта. Вторая оставляется на растении, накрывается бумажным колпачком, темным внутри и белым снаружи. По прошествии определенного времени колпачок снимается, и половинка срезается, и точно таким же образом, как описано выше, в ней определяется сухое вещество. Сравнение с сухим веществом первой половинки говорит об убыли органического вещества в результате дыхания и оттока.

Сложив полученные результаты (продуктивность растения с дыханием и оттоком), получают интенсивность ассимиляции, выраженную в миллиграммах накопленного сухого вещества на определенную площадь (площадь кружочков) за время опыта. Окончательный расчет дается в граммах на  $1 \text{ м}^2$  за час. Полученные результаты записывают в виде таблицы 19.



**Таблица 19 - Продуктивность фотосинтеза**

Вариант	Экспозиция на свету				Интенсивность накопления сухого вещества, г/м <sup>2</sup> ·ч	Экспозиция в темноте				Интенсивность траты сухого вещества на дыхание и отток, г/м <sup>2</sup> ·ч	Интенсивность ассимиляции, г/м <sup>2</sup> ·ч
	число вы-сечек, шт		масса вы-сечек, г			число вы-сечек, шт		масса вы-сечек, г			
	в начале опыта	в конце опыта	в начале опыта	в конце опыта		в начале опыта	в конце опыта	в начале опыта	в конце опыта		

*Задание: опишите опыт, проведите исследования, результаты запишите в виде таблицы 19, сформулируйте вывод.*

## **7 ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ «ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ»**

Дыхание — одно из наиболее характерных свойств живой материи; оно присуще любому органу, любой ткани, каждой клетке. Дыхание — это физиологический процесс постепенного окисления органических веществ с выделением энергии, которая запасается в молекулах АТФ, являющихся, в свою очередь, донорами энергии для выполнения любой работы в клетке. В этом и состоит основное значение дыхания. Органические вещества, разрушающиеся во время дыхания, называют дыхательным субстратом. Главным дыхательным субстратом являются углеводы. В растительной клетке существует даже такая закономерность: чем больше она содержит сахаров, тем интенсивнее дышит. В семенах и других органах, запасаящих вещества для дыхания могут расходоваться белки, жиры и органические кислоты.

### **7.1 Поглощение кислорода и выделение углекислого газа при дыхании органов растений**

*Цель: доказать, что при дыхании органов растений поглощается кислород и выделяется углекислый газ.*

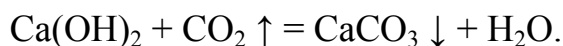
*Материалы и оборудование: колбы объемом на 100 – 300 мл, пробирки, пробки, марля, нитки, ножницы, спиртовка, спички, лучина, прокипяченная вода комнатной температуры, известковая вода.*

*Объекты: проросшие семена или проростки гороха, фасоли, бобов, пшеницы, кукурузы.*

*Ход работы: Поглощение кислорода при дыхании органов растений.* На дно одного из сосудов наливают прокипяченную воду комнатной температуры и помещают необходимое количество проросших семян или проростков

растений. Затем воду сливают оставляя примерно 3 – 5 мл. Во второй сосуд наливают столько воды сколько было оставлено в опытном сосуде. Оба сосуда закрывают пробками и ставят рядом в темное место. Через два часа в сосуды опускают зажженные лучины. Наблюдают за результатами опыта.

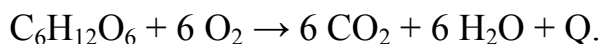
**Выделение углекислого газа при дыхании органов растений.** В одну из пробирок наливают прокипяченную воду комнатной температуры. Проросшие семена или проростки растений помещают в марлевый мешочек, который опускают в пробирку. Воду из пробирки сливают и закрывают пробкой. Вторую пробирку споласкивают водой и закрывают пробкой. Пробирки помещают в темное место на 24 часа. После чего из первой пробирки удаляют марлевый мешочек с проросшими семенами или проростками растений и в обе пробирки наливают гидроксид кальция, встряхивают. Отмечают в какой из пробирок наблюдается помутнение в следствии образования карбоната кальция:



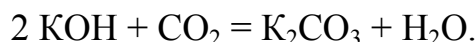
*Задание: проведите опыты, объясните полученные результаты.*

## 7.2 Определение расхода органического вещества растениями при дыхании

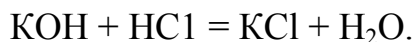
Все живые организмы получают энергию для поддержания своей жизнедеятельности с помощью дыхания. В этом процессе синтезированные в клетках в процессе фотосинтеза органические вещества окисляются с высвобождением энергии:



Метод определения интенсивности дыхания у растений основан на учете количества выделяемого растениями углекислого газа, который поглощается щелочью:



Избыток щелочи, не прореагировавший с  $\text{CO}_2$ , оттитровывают соляной кислотой:



*Цель работы: определить интенсивность дыхания листьев растений разных экологических групп.*

*Оборудование и материалы: широкогорлые конические колбы емкостью 250 мл, резиновые пробки, весы, бюретки, 0,1 н раствор KOH; 0,1 н раствор HCl; 1%-ный раствор фенолфталеина в капельнице, марлевые мешочки.*

*Объекты: листья растений.*

*Ход работы.* В опытные и контрольные колбы наливают по 10 мл 0,1 н раствора KOH. Навеску испытуемого материала по 2 - 3 г и помещают в марлевый мешочек. Мешочек опускают на нитке в колбу так, чтобы он не касался

раствора щелочи. Свободный конец нитки укрепляют в колбе с помощью пробки. Опытные и контрольные колбы на 1 ч помещают в темное место для исключения фотосинтеза и идентичности всех колб.

Через один час приоткрывают пробку и быстро извлекают из колб материал. В каждую колбу добавляют по 2 - 3 капли фенолфталеина. Еще раз взбалтывают содержимое колбы и проводят титрование щелочи 0,1 н НС1 до обесцвечивания жидкости. Разность между объемом раствора соляной кислоты, израсходованной на титрование щелочи в контрольных и опытных колбах показывает, какое количество углекислого газа выделено исследуемым растением за время опыта. Результаты записывают в таблицу 4.

Интенсивность дыхания рассчитывают по формуле:

$ИД = (a - b) \cdot 2,2 \cdot 60 / p \cdot t$ , где  $a$  - количество 0,1н НС1, израсходованное на титрование контрольных колб, мл;  $b$  - количество 0,1 н НС1, израсходованное на титрование опытной колбы, мл; 2,2- количество  $CO_2$ , соответствующее 1 мл 0,1 н НС1, мг;  $p$  - навеска листьев, г;  $t$  - продолжительность опыта, мин; 60 - коэффициент для перевода минут в час.

**Таблица 19 - Интенсивность дыхания растений**

Объект	Навеска, г	Время		Продолжительность опыта, мин	Количество 0,1 н НС1, пошедшее на титрование, мл	Интенсивность дыхания, мг $CO_2$ /г·ч
		начало опыта	конец опыта			

*Задание: определите интенсивность дыхания, заполните таблицу 19, сформулируйте вывод.*

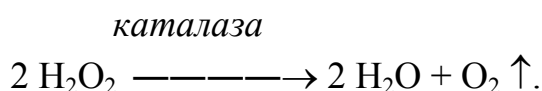
### 7.3 Ферменты дыхания

Окислительно-восстановительные реакции дыхания осуществляются с участием большого набора ферментов, которые принято делить на три группы: дегидрогеназы (активируют водород), оксидазы (активируют кислород) и ферменты – промежуточные переносчики водорода (электрона).

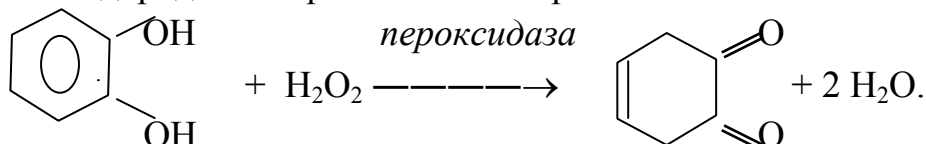
Дегидрогеназы катализируют окисление - отщепление водорода от дыхательного субстрата и перенос его к промежуточным или конечным акцепторам водорода. Дегидрогеназа осуществляет перенос протонов от окисляемого субстрата на метиленовый синий в результате чего происходит его обесцвечивание.

В процессе дыхания в качестве побочного продукта окисления веществ образуется перекись водорода, оказывающая в высоких концентрациях токсическое действие на цитоплазму. Обезвреживание перекиси происходит

при участии фермента каталазы, разлагающей её на воду и на молекулярный кислород по уравнению:



Пероксидаза – фермент, катализирующий окисление циклических полифенолов и некоторых ароматических аминов с помощью кислорода, перекиси водорода или органических перекисей:



Пероксидаза образует с перекисью водорода комплексное соединение, в результате чего перекись активируется и приобретает способность действовать как акцептор водорода. Обнаружение пероксидазы в соке клубня картофеля основано на изменении окраски при окислении полифенолов в хиноны.

*Цель работы: обнаружить действие ферментов: дегидрогеназы, каталазы, пероксидазы, участвующих в процессе дыхания.*

*Материалы и оборудование: 5 % раствор сахарозы, 3 % раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1% раствор гидрохинона, метиленовая синь, конические колбы, пробирки, пипетки на 1 мл и 10 мл, водяная баня, термометр, стеклянная палочка, марля, терка*

*Объекты: дрожжи, клубень картофеля.*

*Ход работы: **Обнаружение дегидрогеназы.** За 1 час до начала опыта готовят бродящую жидкость (1 г дрожжей растворяют в 100 мл 5% раствора сахарозы).*

Две пробирки наполняют на  $\frac{2}{3}$  объема бродящей жидкостью. Содержимое одной пробирки кипятят в течение 5 мин на водяной бане, затем охлаждают.

В пробирки добавляют по 3 капли метиленового синего. Растворы встряхивают и ставят в водяную баню при температуре  $+40^\circ\text{C} \dots +50^\circ\text{C}$ . Следят за изменением окраски в обеих пробирках.

**Обнаружение каталазы.** Очищенный сырой картофель натирают на терке и отжимают сок через марлю в колбу. В пробирку с раствором  $\text{H}_2\text{O}_2$  вносят несколько капель сока клубня картофеля. Наблюдают вспенивание вследствие выделения молекулярного кислорода.

**Обнаружение пероксидазы.** Очищенный сырой картофель натирают на терке и отжимают через марлю сок в колбу. В первую пробирку наливают 5 мл 1% раствора гидрохинона, 1 мл 3 % раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 1 мл сока клубня картофеля. Во вторую пробирку наливают 5 мл 1% раствора гидрохинона, 1 мл 3 % раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В третью пробирку наливают 5 мл 1% раствора

гидрохинона и 1 мл сока клубня картофеля. Наблюдают, в каких пробирках происходит побурение содержимого.

*Задание: опишите и проведите опыты, зарисуйте пробирки, сформулируйте вывод.*

## **8 ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ «УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ»**

### **8.1 Определение защитного действия сахаров на протоплазму**

При воздействии отрицательных температур на растительные ткани в межклетниках образуется лед, который, оттягивая воду из клеток, обезвоживает протоплазму. При определенной степени обезвоживания, индивидуальной для каждого растительного организма, протоплазма коагулирует. Кристаллы льда, образующиеся непосредственно в клетках, оказывают механическое воздействие, в результате чего нарушается внутренняя структура протоплазмы, резко повышается ее проницаемость, а при длительной экспозиции на морозе наступает отмирание. Скорость отмирания протоплазмы клеток зависит как от температуры и времени экспозиции, так и от водоудерживающей способности самой клетки. Увеличение количества растворимых сахаров в зимующих органах растений повышает водоудерживающую способность тканей.

*Цель работы: проследить защитное действие сахарозы на протопласты клеток при действии пониженных температур.*

*Материалы и оборудование: 0,5 и 1 М раствора сахарозы, поваренная соль, лед колотый или снег, термометры до 30°C, скальпели, пробочные сверла диаметром 6 мм, бритвы, пробирки, микроскопы, предметные стекла, кисточки, карандаши по стеклу, фильтровальная бумага, лопатки для охлаждающей смеси.*

*Объекты: корнеплод свеклы.*

*Ход работы.* Из поперечного среза красной столовой свеклы толщиной 0,5 см при помощи пробочного сверла диаметром 5 - 6 мм делают высечки. Тщательно ополаскивают их водой и помещают в три пробирки по три-четыре высечки в каждую. В первую пробирку наливают 5 мл дистиллированной воды, во вторую - 0,5 мл 0,5М раствора сахарозы, в третью - 5 мл 1М раствора сахарозы. Пробирки этикетировывают и на 20 мин погружают в охлаждающую смесь, состоящую из трех частей льда или снега и одной части поваренной соли. Затем пробирки вынимают из охлаждающей смеси и размораживают в стакане воды комнатной температуры.

*Задание: отметьте различия в интенсивности окрашивания жидкостей в пробирках и объясните их. Из дисков сделайте тонкие срезы и рассмотрите их под микроскопом при малом увеличении в капле того же раствора, в кото-*

ром они находились. Подсчитайте общее количество клеток в одном поле зрения и число клеток обесцвеченных, из которых вышел антоциан.

## **8.2 Защитное действие сахара на белки протоплазмы при отрицательных температурах**

При действии экстремальных температур белки коагулируют. Выпадение хлопьевидного осадка белка из вытяжки растительной ткани является показателем ее повреждения. Сахароза стабилизирует нативную структуру белка тем самым защищая его от губительного действия отрицательных температур.

*Цель работы: выявить защитное действие сахарозы на белки протоплазмы при отрицательных температурах*

*Материалы и оборудование: клубни картофеля, 0,5 М и 1 М растворы сахарозы, снег и поваренная соль, терки, марля, конические колбы, пробирки, пипетки на 10 мл, чашки для охлаждающей смеси, термометры до 30°C.*

*Ход работы.* Очищенный клубень картофеля натирают на терке, переносят на двойной слой марли и отжимают через нее сок в коническую колбу и дают отстояться крахмалу. Надосадочную жидкость наливают в три пробирки по 2,5 мл в каждую. В первую пробирку добавляют 2,5 мл дистиллированной воды, во вторую — 2,5 мл 0,5 М сахарозы, в третью — 2,5 мл 1 М сахарозы. Перемешивают содержимое в пробирках и ставят в охлаждающую смесь на 20 мин (см. работу 7.1). Оттаивают пробирки в стакане с водопроводной водой и, не встряхивая, наблюдают образование хлопьев коагулировавшего белка.

*Задание: пробирки зарисовать, сделать выводы о защитном действии сахарозы при замерзании растительных тканей.*

## **8.3 Определение устойчивости растений к высоким температурам**

Принцип метода предложен Ф.Ф. Мацковым и основан на установлении порога повреждения живых клеток от экстремальных температур. Если подвергнуть листья 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 (бурого цвета), тогда как неповрежденные клетки останутся зелеными. У растений, имеющих кислый клеточный сок, феофитинизация может произойти и без обработки соляной кислотой, т.к. при нарушении полупроницаемости тонопласта органические кислоты проникают из клеточного сока в цитоплазму и вытесняют магний из молекулы хлорофилла.

*Цель работы: установить температурный порог повреждения живых клеток листьев растений разных экологических групп.*

*Оборудование и материалы: водяная баня, термометр, пинцет, чашки Петри (5 шт.), стакан с водой, тонкая проволока, карандаш по стеклу, 10% HCl.*

*Объекты: свежие листья растений.*

*Ход работы.* Перед занятием нагревают водяную баню до 40°C, в самом начале занятия погружают в нее пучок из 5 одинаковых листьев исследуемых растений. Выдерживают листья в воде в течение 30 мин, поддерживая температуру на уровне 40°C. Затем берут первую пробу (по одному листу) каждого вида растений и опускают в чашку Петри с холодной водой. После охлаждения лист пинцетом перенесут в чашку с соляной кислотой.

Поднимают температуру в водяной бане до 50°C и через 10 мин после этого извлекают из нее еще по одному листу, повторив операцию и перенеся охлажденный в воде лист в новую чашку Петри с HCl. Так постепенно доводят температуру до 80°C, беря пробы через каждые 10 мин при повышении температуры на 10°C.

Через 20 мин после погружения листа в HCl учитывают степень повреждения по количеству бурых пятен. Результаты записывают в таблицу 10, обозначив отсутствие побурения знаком «-», слабое побурение «+», побурение более 50% площади листа «++» и сплошное побурение «+++». Записать результаты по разным растениям в общую таблицу.

**Таблица 20 - Степень повреждения листьев в зависимости от температуры**

Объект	Степень повреждения листьев				
	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
1					
2					
...					

*Задание: постройте ряд термостойкости растений по степени убывания. Сделайте соответствующие выводы.*

#### **8.4 Определение температурного порога коагуляции белков цитоплазмы клеток разных растений**

Клетки разных растений имеют неодинаковую устойчивость к повышенным температурам. Температура, при которой в течение 10 мин полностью коагулируют белки цитоплазмы, считается условной границей жаростойкости растений. Гибель клеток устанавливается по потере ими способности плазмолизировать.

*Цель работы: определение температурного порога коагуляции белков цитоплазмы клеток разных растений.*

*Оборудование и материалы: микроскоп, стаканы химические большие (6 шт.), пробирки (5 шт.), большая колба, электроплитка, термометр, острая бритва, препаровальная игла, кисточка, предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага, карандаш по стеклу, 1 М раствор NaCl, 0,02%-ный*

*раствор «нейтрального красного».*

*Объекты: свежие листья разных растений.*

*Ход работы.* Острой бритвой делают по 12 срезов эпидермиса листьев разных растений, опускают по два среза в пробирки, в которые налито небольшое количество водопроводной воды.

Нагревают в большой колбе воду. Смешивая горячую воду с холодной, в шести химических стаканах готовят водяные бани с температурой 48, 50, 52, 54, 56 и 58°C. Погружают одновременно в водяные бани пробирки со срезами, поддерживая установленную температуру путем осторожного подливания в стаканы горячей воды.

**Таблица 21 - Влияние температуры на степень плазмолиза в клетках растений**

Объект	Температура, °C					
	48	50	52	54	56	58
1						
2						
...						

Через 10 мин извлекают срезы из пробирок, перенесут на предметные стекла, снабженные надписями (если клетки не содержат пигмента, следует их окрасить, выдержав в растворе «нейтрального красного» в течение 10-15 мин), на срезы наносят по капле 1М раствора NaCl, закрывают покровными стеклами и через 15-20 мин рассматривают в микроскоп. Заполняют таблицу 11, обозначив знаком «+» плазмолиз у клеток и знаком «-» его отсутствие. Наличие плазмолиза показывает, что клетки живые, отсутствие – мертвые.

*Задание: сравните жаростойкость различных растений.*

### **8.5 Определение устойчивости растений к засолению**

На территории нашей страны и сопредельных государств встречаются засоленные почвы, которые особенно характерны для засушливых районов. Это почвы, содержащие в своем профиле легкорастворимые соли (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>), в токсичных количествах. Влияние таких солей на растения является мощным экологическим фактором, сдерживающим их нормальный рост и развитие.

*Цель работы: определить влияние засоления на растения разных экологических групп.*

*Оборудование и материалы: большие пробирки или цилиндры на 100 мл, штативы к пробиркам, мерные пробирки или цилиндры, весы, разновесы, острая бритва, соли NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, вода.*



*Объекты: веточки разных растений с 3-4 одинаковыми небольшими листьями.*

*Ход работы.* Приготавливают серию растворов разных солей (NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>): 1, 3, 5, 7, 10, 20 %. Наливают равное количество этих растворов в большие пробирки. Контролем служит вода. Ветви растений взвешивают и уравнивают. Сосуды изолируют от испарения воды фольгой и оставляют на семь дней. Через 7 дней оценивают состояние растений (потеря тургора, появление некрозов, изменение листовой пластинки) и измеряют объем поглощенной воды.

*Задание: выявите, какая из солей наиболее сильно влияет на поглощение растворов? Какие растения поглощают растворы сильнее? Какие растения имеют наименьшие повреждения от поглощения солевых растворов?*

## **8.6 Влияние солей тяжелых металлов на плазмолиз протоплазмы растительной клетки**

Соли тяжелых металлов в водной среде распадаются на ионы. Все ионы металлов могут быть разделены на две группы: биогенные (Cu, Zn, Co, Mn, Fe и др.) и небιοгенные (Pb, Hg, Sn, Ni, Al, Cd, Sr, Cs и др.). Биогенные ионы входят в состав ферментных систем, которые обеспечивают регуляцию всех процессов в клетке и организме. Поэтому их ПДК значительно выше, чем у небιοгенных. При поступлении в растения определенная доза биогенных тяжелых металлов включается в состав ферментных систем, что стимулирует метаболические процессы. Так, медь входит в состав ферментов, участвующих в процессах темновых реакций фотосинтеза, способствует поглощению других элементов; цинк входит в состав ферментов, расщепляющих белки, увеличивает устойчивость растений к жаре, засухе, болезням. Лишь при более высоких концентрациях они действуют как токсиканты.

*Цель работы: выявление действия биогенных и небιοгенных тяжелых металлов на плазмолиз протоплазмы растительной клетки.*

*Оборудование и материалы: микроскоп; предметные и покровные стекла; препаровальная игла; бритвы; пипетка на 1 - 3 мм; стаканы с дистиллированной водой; кусочки фильтровальной бумаги; 5%-ные растворы солей CuSO<sub>4</sub>, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, и др.*

*Объекты: луковица синего лука или фиолетовые листья традесканции.*

*Ход работы.* С поверхности сильноокрашенной синей луковицы делают несколько срезов эпидермиса, состоящего из 1-2 слоев окрашенных клеток, содержащих антоциан. Помещают срезы по отдельности в капли воды на предметные стекла, закрывают покровными стеклами и рассматривают в микроскоп. Клетки с окрашенным клеточным соком зарисовывают.

Определяют начало и характер плазмолиза клетки под действием одинаковых концентраций биогенных и небιοгенных солей. Для этого: заменяют воду в препаратах 5%-ным раствором  $\text{CuSO}_4$  на одном предметном стекле и таким же раствором  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  на другом. Эта замена производится способом 4-5-кратного накапывания раствора соли с одной стороны покровного стекла и отсасывания кусочком фильтровальной бумаги с другой до полной замены воды раствором соли. Оставляют клетки в растворе солей на 15 мин, когда плазмолиз будет хорошо заметен, рассматривают в микроскоп.

Выявляют комплексное действие повышенной температур и солей. Для этого препараты, в которых вода заменена на раствор соли, выдерживают 10 мин на водяной бане при температуре  $40^\circ\text{C}$ , затем рассматривают в микроскоп и зарисовывают. При этом часто наблюдается усиление плазмолиза и почернение содержимого некоторых клеток, т.к. соли свинца при реакции с сероводородными группами белков образуют соединения черного цвета.

*Задание: зарисуйте и сделайте выводы относительно действия солей биогенных и небιοгенных тяжелых металлов на характер плазмолиза клетки и на состояние клетки при повышении температуры.*

## **9 ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ «РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ»**

Рост и развитие растений – главные физиологические процессы, определяющие продуктивность растений. Рост – необратимое увеличение размеров и массы тела, связанное с новообразованием элементов структуры организма. Рост растения складывается из роста клеток, тканей и органов. Развитие – качественные изменения структуры и функций растения и его отдельных частей – органов, тканей и клеток, возникающие в процессе онтогенеза. Все процессы роста и развития растений осуществляются через деление, растяжение и дифференциацию клеток. Рост в длину и ветвление побегов и корней происходит благодаря деятельности апикальных меристем верхушек побегов и кончиков корней, рост в толщину — деятельности камбия. В период роста клетки меристем и камбия непрерывно делятся; наружная часть клеток остается в меристематическом состоянии, а все остальные растут и дифференцируются в ткани и органы. Меристематические клетки имеют тонкую пектино-целлюлозную оболочку, они заполнены густой цитоплазмой и, как правило, не имеют вакуолей. В фазе растяжения клетки сильно увеличиваются в размере главным образом благодаря поглощению воды и образованию крупных вакуолей, но при этом также увеличивается масса клеточной оболочки и цитоплазмы. Зона растяжения у корней составляет около 1 см, у стеблей — около 5 – 10 см. Уже в зоне растяжения клетки начинают дифференцироваться в ткани.

Общий закон роста — его неравномерность, или периодичность, обусловленная внутренними причинами. Вначале рост органа или всего растения происходит медленно, затем быстрее и потом замедляется. Нарастание общей массы органа или растения графически выражают в виде кривой Сакса, а скорость роста, или прирост массы, в виде плавной, более или менее симметричной кривой с одним максимумом. К важному внутреннему фактору роста и развития растений относятся фитогормоны (ауксины, гиббереллины, цитокинины, АБК, этилен и др.). В зависимости от физиологического состояния растения и концентрации фитогормонов и их соотношений они могут стимулировать или прекращать тот или иной физиологический процесс, ускорять или замедлять его.

На рост и развитие растений очень сильно влияют внешние факторы: интенсивность и спектральный состав света, продолжительность дня и ночи, температура и влажность воздуха и почвы, органические и минеральные удобрения.

### **9.1 Определение зон роста в органах растений**

Для изучения ростовых процессов широко применяют метод нанесения меток на поверхность органа через одинаковые расстояния. По мере роста органа эти расстояния увеличиваются и могут быть использованы для характеристики интенсивности роста разных участков растущей зоны органа.

Метки наносят тушью (растирают сухую тушь в 5% растворе декстрина или альбумина) или маркировочной жидкостью, полученной из сажи или активированного угля и парафинового масла (сажу или активированный уголь растирают с парафиновым маслом до образования густой жидкости).

Для нанесения меток можно использовать щетинку, привязанную к палочке, тонко заточенную деревянную палочку или нитку, смоченную тушью или маркировочной жидкостью.

#### ***Определение зоны роста корня***

*Цель работы: определить зоны роста корня.*

*Материалы и оборудование: тушь или маркировочная жидкость, древесные опилки, препаровальные иглы или тонко заточенные деревянные палочки, миллиметровая бумага, влажные камеры.*

*Объекты: проростки гороха с длиной корней 1,5 - 2 см.*

*Ход работы.* Берут семена гороха или фасоли, конских бобов, кукурузы и проращивают во влажных опилках, в которых стеклянной палочкой делают углубления для свободного и строго вертикального роста корня. Затем на небольших (длиной 1,5 - 2 см) совершенно прямых, предварительно осторожно обсушенных фильтровальной бумагой корнях (3 - 4 корня) наносят метки, начиная от кончика корня. Расстояния между метками 1 мм. Метки должны быть тонкими и хорошо заметными. Далее проростки помещают в благоприятные для роста условия: во влажные камеры, темные комнаты при 20 - 25 °С.

Через сутки измеряют расстояния между метками (при увеличении ширины самих меток измеряют с их середины) и вычисляют средний суточный прирост различных участков корня. Результаты опыта записывают в таблицу 22 и выражают графически, откладывая на оси абсцисс номера отрезков, а на оси ординат - приросты.

*Задание: опишите и проведите опыт, результаты запишите в форме таблицы 22 и отобразите графически, сформулируйте выводы.*

### **Определение зоны роста стебля**

Метод основан на учете приростов различных участков стебля за сутки.

*Цель работы: определить зоны роста стебля.*

*Материалы и оборудование: выращенные в темноте, тушь, препаровальные иглы или деревянные палочки, линейки.*

*Объекты: проростки подсолнечника высотой 2 - 3 см.*

*Ход работы.* На четырех проростках подсолнечника высотой 2 - 3 см тушью наносят (начиная от верхушки проростка) по 10 меток на расстоянии 2 мм друг от друга. Проростки помещают в темноту при 20 - 25 °С, через сутки измеряют расстояния между метками и вычисляют прирост различных участков стебля. Результаты опыта записывают в тетрадь и выражают графически, откладывая на оси абсцисс порядковый номер метки, а на оси ординат - прирост. Делают заключение о характере роста стебля. Результаты опыта учитывают по схеме, указанной при определении зоны роста корня.

**Таблица 22 - Зоны приростов органов растений**

№ проростка	Зона прироста, мм																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2																				
3																				
среднее																				

*Задание: опишите и проведите опыт, результаты запишите в форме таблицы 22 и отобразите графически, сформулируйте выводы.*

### **9.2 Периодичность роста древесных побегов**

Побег растет неравномерно. Вначале наблюдается медленный рост, затем он увеличивается, достигает максимума и, наконец, снова замедляется и прекращается. Таким образом, наблюдается периодичность роста побега, которая характеризуется законом большого периода роста. Периодичность роста прояв-

ляется в том, что междоузлия, образующиеся по мере нарастания побега, имеют неодинаковую длину. В большинстве случаев она увеличивается от основания к середине, где достигает максимума, а к верхушке побега опять уменьшается.

*Цель работы: определить периодичность роста древесных побегов*

*Материалы и оборудование: линейки.*

*Объекты: побеги древесных растений.*

*Ход работы.* Измеряют линейкой длину междоузлий побега какой-либо древесной породы. Результаты измерений записывают в таблице 23. На основании полученных результатов строят кривые роста междоузлий и роста побега. По ординате откладывают длину междоузлий и длину побега, по абсциссе - номера междоузлий, считая от основания побега.

**Таблица 23 - Приросты побегов древесных растений**

Номер междоузлия от основания побега	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Длина междоузлия, см										
Длина побега, см										

*Задание: опишите и проведите опыт, результаты запишите в форме таблицы 23 и отобразите графически, сформулируйте вывод о периодичности роста побега.*

### **9.3 Действие гетероауксина на рост корней**

Метод заключается в проращивании семян на растворах различных концентраций гетероауксина и учете длины корешков.

*Цель работы: изучить влияние растворов гетероауксина на рост корней.*

*Материалы и оборудование: 0,01 %-й раствор гетероауксина, чашки Петри, пипетки на 1 мл, мерные цилиндры на 10 мл, фильтровальная бумага.*

*Объекты: семена кукурузы или пшеницы.*

*Ход работы.* Пять чашек Петри выстилают фильтровальной бумагой, увлажняют 9 мл воды или раствора гетероауксина 0,01; 0,001; 0,0001 и 0,00001 % концентрации.

Для получения указанных концентраций 1 мл исходного 0,01 %-го раствора гетероауксина наливают в мерный цилиндр на 10 мл и доливают водой до черты, тщательно перемешивают; затем 9 мл помещают в чашку Петри, а оставшийся 1 мл разбавляют водой до черты и т.д.

**Таблица 24 - Влияние растворов гетероауксина на рост корней**

Вариант	Суммарная длина корешков, см	Средняя длина корешков на одно растение, см	Длина корешка, % к контролю
Контроль (вода)			
Раствор гетероауксина	0,01 %		
	0,001 %		
	0,0001 %		
	0,00001 %		

На увлажненную фильтровальную бумагу раскладывают по пять зерновок кукурузы или пшеницы, закрывают чашки Петри крышкой и помещают их в темное место при 20 - 25 °С. Через неделю измеряют длину корешков и делают вывод о задержке и стимулировании роста корней в зависимости от концентрации гетероауксина.

*Задание: опишите и проведите опыт, результаты запишите в форме таблицы 24 и отобразите в виде диаграммы, сформулируйте вывод о влиянии гетероауксина на рост корней.*

#### **9.4 Апикальное доминирование у гороха**

У многих растений верхушка побега подавляет пробуждение спящих почек и рост боковых побегов. Это явление называется апикальным доминированием. Оно отражает коррелятивные взаимоотношения между главным и боковыми побегами растения. Удаление или повреждение верхушки главного побега снимает апикальное доминирование, что вызывает пробуждение спящих почек и рост боковых побегов. Горох принадлежит к тем видам растений, у которых сильно выражено апикальное доминирование. Для обнаружения этого явления удаляют верхушку побега гороха и через несколько дней отмечают появление боковых побегов.

*Цель работы: изучить апикальное доминирование у гороха.*

*Материалы и оборудование: бритвы, линейки.*

*Объекты: сосуды с растениями гороха (песчаная или водная культуры).*

*Ход работы.* Берут сосуд с растениями гороха. Одни растения оставляют интактными (контроль), у других срезают верхушку побега. На следующем занятии сравнивают контрольные и опытные растения, для чего подсчитывают число и измеряют длину боковых побегов у каждого растения. Данные записывают в таблицу 25.

**Таблица 25 - Влияние апекса побега на рост боковых побегов**

Растение	Число боковых побегов, шт.	Длина боковых побегов, см	
		каждого	суммарная
Интактное			
Декапитированное:			
первое			
второе			
В среднем			

*Задание: опишите и проведите опыт, результаты запишите в форме таблицы 25, сформулируйте вывод.*

### **9.5 Изучение движения растений**

Среди многообразных видов движения растений ростовые (тропизмы и настии) распространены наиболее широко и играют исключительно важную приспособительную роль. Ростовые движения свойственны только тем частям растений, которые сохраняют способность к росту.

Тропизмы - это ростовые изгибы органов, вызванные односторонним действием какого-либо фактора. В зависимости от характера действующего раздражителя они подразделяются на гео-, магнито-, фото- и хемотропизмы. При положительных тропизмах ростовое движение органа направлено в сторону раздражающего фактора, при отрицательных - от него. Хемотропизм - это ростовая реакция на химический реагент, точнее, на неравномерное его распределение в окружающей среде. Хемотропическая реакция свойственна корням, гифам, пыльцевым трубкам. Положительную хемотропическую реакцию вызывают сахара, аминокислоты, белки, фосфат-ионы, ионы аммония. В отношении других соединений вопрос остается неясным. Есть данные, что катионы вызывают отрицательный хемотропизм, анионы - положительный. В то же время известна отрицательная хемотропическая реакция на кислоты. Разновидностью хемотропизма является гидротропизм - ориентация органа по градиенту упругости водяного пара (влажности) или от него. Положительный гидротропизм свойствен корням, пыльцевым трубкам, ризоидам заростков папоротников и мхов, гифам грибов отрицательный - спорангиеносцам.

#### **9.5.1 Хемотропическая реакция наклюнувшихся семян на химические соединения**

*Цель работы: изучить хемотропическую реакцию наклюнувшихся семян на химические соединения.*

*Материалы и оборудование: концентрированный раствор NaCl, 30% растворы NaCl и KCl, 0,4 М раствор сахарозы, вода, чашки Петри, пластилин, кружки фильтровальной бумаги по диаметру чашки, пинцеты.*

*Объекты: наклюнувшиеся семена ячменя, ржи, гороха, люпина.*

*Ход работы.* Подготовить к работе чашки Петри. Для этого в центре чашки кольцо пластилина высотой и шириной в 1 см уложить так, чтобы диаметр образовавшегося углубления был около 3 см. Бортик тщательно прикрепить ко дну чашки (чтобы предотвратить вытекание раствора) и разложить на нем вокруг углубления наклюнувшиеся семена (корешки должны быть направлены по периметру чашки). Чашку прикрыть крышкой, в которую вложен кружок увлажненной фильтровальной бумаги. В углубление налить исследуемый раствор и через 3 - 6 суток в зависимости от скорости прорастания семян ликвидировать опыт. В опытах по хемотропизму в качестве контроля берут воду. Подсчитать число корешков с положительным и отрицательным хемотропизмом. Результаты записать в форме таблицы 26.

**Таблица 26 - Влияние химических соединений на хемотропическую реакцию наклюнувшихся семян**

Вариант опыта	Число семян		Процент семян с положительным хемотропизмом
	с положительным хемотропизмом	с отрицательным хемотропизмом	

*Задание: опишите и проведите опыт, результаты запишите в форме таблицы 26, сформулируйте вывод.*

### **9.5.2 Нарушение геотропизма корней эозином**

Проявление тропизмов зависит не только от раздражителя, но и от растения (природы и физиологического состояния органов, концентрации фитогормонов в них). Нарушение жизнедеятельности растения приводит к ослаблению его реакции на раздражения.

*Цель работы: изучить влияние эозина на геотропизм корней.*

*Материалы и оборудование: 0,05% раствор эозина, подставки для прикрепления семян, влажная камера, боксы, фильтровальная бумага, ножницы.*

*Объекты: проросшие семена гороха или фасоли с прямыми корешками,*

*Ход работы.* Проросшие семена гороха или фасоли помещают в бокс и заливают 10 мл 0,05 % раствора эозина. Столько же проросших семян одновременно заливают в другом боксе 10 мл водопроводной воды. Через 1ч семена вынимают, корешки просушивают фильтровальной бумагой прикрепляют к подставке так, чтобы они были в горизонтальном положении, и помещают во влажную камеру с температурой около 20 °С на сутки. Затем отмечают, у каких проростков корешки дали геотропический изгиб.

*Задание: опишите и проведите опыт, сформулируйте вывод.*



## 9.6 Оценка содержания фитогормонов с помощью биотестов

Гормональную систему растений можно изучать различными способами. Количество и состав фитогормонов в растительном материале определяют биохимическими методами с применением спектрофотометрии, газовой или жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией, иммунохимическими методами (твердофазный иммуноферментный анализ). В то же время классическим способом изучения фитогормонов, не потерявшим значение и сегодня, являются различные биологические методы (биотесты), которые позволяют оценить количество гормона по его физиологическому действию, активности. Биотесты обычно не требуют сложной аппаратуры, обладают высокой чувствительностью.

### 9.6.1 Оценка содержания цитокининов с помощью биотестов

Прорастание семян сопровождается активизацией в них метаболизма. В семядолях при прорастании происходит активация и новообразование ферментных систем, необходимых как для обеспечения использования запасных веществ, так и для превращения семядолей из запасающего органа в зеленый лист. Эти процессы протекают под контролем осевых частей зародыша. Большая роль в этом контроле принадлежит фитогормонам (интегративная функция). При прорастании семян фитогормоны поступают в семядоли из осевых частей зародыша и влияют на развитие активности ферментов, участвующих в распаде запасных веществ. Образующиеся при этом продукты распада поступают в осевые части зародыша и обеспечивают их рост. Высокой чувствительностью к экзогенным цитокининам обладают изолированные семядоли тыквы, так как после изоляции в них происходит быстрое истощение запаса этих эндогенных гормонов. Экзогенный цитокинин значительно активизирует рост семядолей. При этом влияние цитокинина распространяется на все стороны формирования внутриклеточных структур и обмен веществ семядолей. Цитокинин резко ускоряет использование в клетках семядолей запасных веществ, ускоряет и усиливает формирование мембранного аппарата хлоропластов - гран и ламелл стромы, рост хлоропластов и их деление.

*Цель работы: провести оценку содержания цитокининов с помощью биотестов*

*Материалы и оборудование: чашки Петри, фильтровальная бумага, вода, испытуемые растворы, стандартные растворы, спирт, весы, пестики, ступки, стеклянные фильтры, спектрофотометр, песок, мел.*

*Объекты: 14-дневные проростки пшеницы*

*Ход работы. Биотест, основанный на разрушении хлорофилла.* У растений пшеницы в возрасте 14 дней срезают листья первого яруса. Из них вырезают 5 см отрезки (между 2 и 7 см от основания листа). Полученные отрезки по

10 шт. помещают в чашки Петри на кружки фильтровальной бумаги, смоченные водой (контроль) или испытуемым раствором. Чашки с отрезками листьев ставят в кюветы, закрывают стеклом и экспонируют 6 суток в тех же условиях освещения, при которых выращивали растения. По окончании экспозиции отмечают убыль хлорофилла по сравнению с исходным содержанием.

*Определение количества хлорофилла.* Навеску семян (200 мг) растирают в ступке с небольшим количеством песка и CaCO<sub>3</sub> (на кончике скальпеля), экстрагируют пигменты раствором этанола, фильтруют экстракт через стеклянный фильтр, измеряют объем вытяжки. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при  $\lambda = 662$  и  $\lambda = 642$  нм. Количество хлорофилла (*a* и *b*) определяют по формуле:

$$C_{a+b} = 7,12E_{662} + 16,8E_{642}.$$

Пересчитывают количество хлорофилла на 1 г сырой массы по формуле:

$$A = C_{a+b} \cdot V/m,$$

где *A* – содержание хлорофилла, мг/г<sub>сырой массы</sub>; *V* – объем вытяжки, мл; *m* – масса навески, г. Результаты записывают в форме таблицы 27.

**Таблица 27 - Содержание хлорофилла**

Вариант	Оптическая плотность спиртовой вытяжки		Количество хлорофилла ( <i>a</i> + <i>b</i> )	Содержание хлорофилла, мг/г <sub>сырой массы</sub>
	$\lambda = 662$ нм	$\lambda = 642$ нм		

**Биотест, основанный на образовании хлорофилла.** У этиолированных растений пшеницы в возрасте 14 дней срезают листья первого яруса. Из них вырезают отрезки по 5 см (между 2 и 7 см от основания листа). Полученные отрезки по 10 шт. помещают в чашки Петри на кружки фильтровальной бумаги, смоченные водой (контроль) или испытуемым раствором. Чашки с отрезками листьев ставят в кюветы, закрывают стеклом и экспонируют 6 суток на свету. По окончании экспозиции определяют содержание хлорофилла в отрезках листьев. Результаты заносят в форме таблицы 30.

*Задание: провести оценку содержания цитокининов с помощью биотестов, результаты запишите в форме таблицы 30, сформулируйте вывод.*

### 9.6.2 Оценка содержания ауксинов с помощью биотестов

Среди многочисленных эффектов, которые вызывают ауксины, наиболее изученным 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<sup>+</sup> из клетки, гиперполяризацию мембранного потенциала, усиление поглощения K<sup>+</sup>, повышение pH 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 кислотолабильных 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 существования так называемого «кислого роста».

*Цель работы: провести оценку содержания ауксинов с помощью биотестов*

*Материалы и оборудование: растворы ауксина (100, 20, 10, 5, 1, 0,5 мг/л) на калийфосфатном буфере, испытуемые растворы, калийфосфатный буфер.*

*Объекты: отрезки coleoptилей пшеницы (овса, кукурузы) в фазе растяжения.*

*Ход работы.* Выбирают проростки пшеницы (выращенной в темноте в течение трех дней) одного размера, отделяют coleoptили (нужно брать только целые coleoptили), укладывают их на линейку и отрезают лезвием сегмент длиной 5 мм, отступая от верхушки 4 мм. Из отрезка coleoptиля капилляром удаляют первичный лист и помещают отрезок в чашку Петри с водой. Набрав достаточное количество отрезков, помещают их по 5 шт. в чашечки с растворами. Контрольный буфер не содержит ауксина.

Лодочки ставят в термостат с температурой 25° С и отмечают время. Через 2,5 - 3 ч с помощью пинцета вынимают и измеряют длину всех отрезков coleoptилей.

Для определения динамики роста отрезков coleoptилей злаков под влиянием ауксинов проводят измерения прироста через каждые 10 мин в течение 60 - 80 мин. Полученные результаты заносят в таблицу 28.

*Задание: проведите оценку содержания ауксинов с помощью биотестов, результаты запишите в форме таблицы 28. При определении динамики роста отрезков coleoptилей строят график зависимости скорости роста от времени при оптимальной концентрации ауксина. Сформулируйте вывод.*

**Таблица 28 - Длина отрезков coleoptiles**

Вариант		Изменение длины coleoptiles, мм					Среднее значение	% к контролю
		1	2	3	4	5		
контроль								
Шкала растворов ауксина, мг/л	100							
	20							
	10							
	5							
	1							
	0,5							
испытуемый раствор								

### 9.6.3 Оценка содержания гиббереллина с помощью биотестов

Одной из наиболее изученных реакций растения на гиббереллин является индукция гидролитических ферментов в семенах злаков. В 1960 г. впервые было показано, что после набухания зерен злаков, через 12 - 24 ч зародыш начинает выделять гиббереллины, ГК, которые диффундируют в алейроновый слой. Там они индуцируют синтез или активируют гидролитические ферменты ( $\alpha$ -амилазу, РНКазу, кислую фосфатазу, протеазу и др.) и стимулируют секрецию этих ферментов в эндосперм, где происходит распад запасных полимеров. Растворимые продукты распада поступают затем для питания зародыша. При удалении зародыша из семян индукции ферментов не наблюдается. Обработка таких беззародышевых семян экзогенным гиббереллином приводит к появлению ферментативной активности.

Наиболее детально проанализирована индукция  $\beta$ -амилазы - фермента, гидролизующего крахмал. С помощью метки и ингибиторов белкового синтеза показано, что  $\alpha$ -амилаза под влиянием гиббереллина не просто переходит из неактивной формы в активную, а синтезируется заново. Индукция ГК синтеза фермента *de novo* позволяет предположить, что механизм действия фитогормона связан с регуляцией экспрессии генов и образованием РНК. Действительно, ингибиторы синтеза РНК подавляют синтез  $\alpha$ -амилазы, индуцируемый ГК в алейроновых клетках. Опыты, которые проводили на бесклеточной системе синтеза белка с использованием мРНК, образованной под влиянием ГК в качестве матрицы, показали, что вновь синтезируемый белок -  $\alpha$ -амилаза.

Кроме действия на синтез белков и РНК ГК вызывает изменение ультраструктуры клеток алейронового слоя. В присутствии эндогенного или экзо-

генного гиббереллина происходит переваривание белкового материала в алейроновых зернах, быстрая активация синтеза фосфолипидов мембран, общего синтеза мембран, особенно шероховатого эндоплазматического ретику-лума (ЭР), возрастает доля связанных с ЭР рибосом, стимулируется образование секреторных пузырьков.

*Цель работы: провести оценку содержания гиббереллинов с помощью биотестов*

***Оценка содержания гиббереллина с помощью определения активности  $\alpha$ -амилазы***

*Материалы и оборудование: натрийацетатный буфер, раствор  $I_2$  в KI, пробирки, центрифуга.*

*Объекты: зерновки пшеницы, ячменя, овса (зерновки замачивают в дистиллированной воде на 3 часа. Затем зерновки разрезают по бороздке на половинки и отделяют сегменты с зародышем от сегментов без зародыша. Через 12 ч половинки зерновок помещают в стерильные чашки Петри (в свежую дистиллированную воду), половинки зерновок без зародыша делят на две части, одну из которых помещают в воду, другую - в водный раствор ГК<sub>3</sub>, и на испытуемые растворы. Все варианты ставят в термостат при температуре 26°C. Время инкубации 24 и 48 ч.).*

*Ход работы.* Пять половинок семян пшеницы взвешивают, растирают в охлажденной ступке на льду, постепенно прибавляя 10 мл натрийацетатного буфера, содержащего CaCl<sub>2</sub>. Гомогенат центрифугируют при 10 000 g в течение 10 мин. Супернатант сливают в колбу и помещают на 15 мин в термостат при 70°C, затем охлаждают в течение 10 мин при 4°C. Эта процедура подавляет активность  $\beta$ -амилазы и мало влияет на активность  $\alpha$ -амилазы, так как последняя более термоустойчива. После этой обработки супернатант центрифугируют вторично при 10 000 g в течение 10 мин.

Активность  $\alpha$ -амилазы определяют по гидролизу крахмала. Для этого 2 мл раствора крахмала в натрийацетатном буфере разливают в контрольные и опытные пробирки, помещают их в термостат с температурой 37°C на 10 мин, затем прибавляют 0,5 мл надосадочной жидкости в опытные пробирки и 0,5 мл натрийацетатного буфера в контрольные пробирки. Через 15 мин реакцию останавливают, прибавляя 2 мл подкисленного раствора  $I_2$  в KI, добавляют 10 мл воды и определяют оптическую плотность растворов при  $\lambda=620$  нм. Рассчитайте активность фермента в величинах изменения оптической плотности за 1 мин на 1 г сырой массы. Сделайте выводы.

***Оценка содержания гиббереллина по приросту проростков салата***

*Материалы и оборудование: стаканы, линейки.*

*Объекты: семена салата сорта Берлинский.*

*Ход работы.* В качестве другого биотеста для определения активности гиббереллинов может быть использован салат сорта Берлинский. На этом растении так же, как и на горохе, удобно продемонстрировать зависимость ростовых процессов от концентрации гиббереллина.

Семена салата проращивают при температуре 25 °С в течение 24 ч. Отбирают наклюнувшиеся семена с корешком 2 - 4 мм и раскладывают в стаканы с водой и растворами гиббереллина на фильтровальную бумагу. Стаканы закрывают и ставят на непрерывное освещение при температуре 25°С на 72 ч. После экспозиции измеряют длину гипокотыля салата и определяют процент прироста гипокотилей в опытных вариантах по отношению к контролю.

*Задание: проведите оценку содержания гиббереллинов с помощью биотестов. Сделайте выводы.*

### **Список литературы**

- Баславская С. С., Трубецкова О. М. Практикум по физиологии растений. – Москва : Изд-во МГУ, 1964. – 328 с.
- Васильева З. В., Кириллова Г. А., Строчкова А. В. Учебно-методическое пособие по физиологии растений. – Москва : Просвещение, 1977. – 96 с.
- Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина Л. М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. – Москва : Высшая школа, 1975. – 392 с.
- Малый практикум по физиологии растений : учебное пособие / под ред. А. Т. Мокроносова. – Москва: Изд-во МГУ, 1994. – 184 с.
- Практикум по физиологии растений / под ред. Н. Н. Третьякова. – Москва : Колос, 1982. – 271 с.
- Практикум по физиологии растений : учебное пособие / под ред. В. Б. Иванова. – Москва : Издательский центр «Академия», 2001. – 144 с.
- Федорова А. И., Никольская А. Н. Практикум по экологии и охране окружающей среды : учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений. – Москва : Гуманитарный издательский центр ВЛАДОС, 2001. – 288 с.
- Шабельская Э. Ф. Лабораторные занятия по физиологии растений. – Минск : Выш. школа, 1981. – 142 с.
- Якушкина Н. И., Денисова Г. М. Физиология роста и развития растений : учебное пособие. – Москва : МОПИ им. Н.К. Крупской, 1985. – 200 с.

Учебное издание

**ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Учебное пособие

В авторской редакции

---

Подписано к печати 25.07.18  
Печать цифровая  
Заказ № 147

Формат 60×84 1/16  
Усл. п.л. 5,8  
Тираж 100

Бумага 80г/м<sup>2</sup>  
Уч. изд .л. 5,8

---

БИЦ Курганского государственного университета.  
640020, г. Курган, ул. Советская, 63/4.  
Курганский государственный университет.