

КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
Институт фундаментальной медицины и биологии

ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие

Казань  
2013

**УДК 581.1**

*Печатается по решению Редакционно-издательского совета ФГАОУВПО  
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»*

*методической комиссии Института фундаментальной медицины и биологии  
Протокол № 2 от 28 мая 2013 г.*

*заседания кафедры физиологии и биохимии растений  
Протокол № 2 от 13 мая 2013 г.*

*Составители:*

канд. биол. наук, доц. В.Н. Воробьев  
канд. биол. наук, доц. Ю.Ю. Невмержицкая  
канд. биол. наук, ст. преподаватель Л.З. Хуснетдинова  
канд. биол. наук, ст. преподаватель Т.П. Якушенкова

*Рецензент:*

канд. биол. наук, доц. Э.В. Бабынин

**Практикум по физиологии растений:** учебно-методическое пособие / В.Н. Воробьев, Ю.Ю. Невмержицкая, Л.З. Хуснетдинова, Т.П. Якушенкова. – Казань: Казанский университет, 2013. – 80 с.

В практикуме представлены теоретические основы и практические методики по основным разделам физиологии растений. Рассмотрены методы изучения физиологии растительной клетки, водного обмена, фотосинтеза, дыхания, минерального питания растений.

Предназначено для студентов, бакалавров, магистрантов и аспирантов биологических, сельскохозяйственных и педагогических вузов.

© Казанский университет, 2013  
© Воробьев В.Н., Невмержицкая Ю.Ю.,  
Хуснетдинова Л.З., Якушенкова Т.П., 2013

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Клетка представляет собой структурную и функциональную единицу всего живого. Специфическими особенностями строения растительных клеток, отличающими их от клеток других эукариотических организмов, является наличие системы пластид, крупной центральной вакуоли, а также прочной полисахаридной клеточной стенки. Растительная клетка содержит три относительно автономных, но тесно взаимодействующих между собой генетических системы – ядерную, митохондриальную и пластидную.

Являясь открытой системой, живая клетка обменивается с окружающей средой веществом, энергией и информацией. Ее структурную основу составляют биологические мембраны, поддерживающие постоянство среды в клетке и ее отдельных компартментах. Основу составляют липиды, придающие мембранному матриксу высокие изолирующие свойства. Другой обязательный компонент мембран – белки. Они выполняют в мембранах структурную, транспортную, ферментативную и рецепторную функции. Внутренние мембраны хлоропластов и митохондрий обеспечивают пространственную организацию молекул, осуществляющих трансформацию энергии в клетке и образование универсальных аккумуляторов энергии – молекул АТФ.

Важнейший компонент клетки – ядро – хранит и передает наследственную информацию, заключенную в определенных нуклеотидных последовательностях молекулы ДНК, обеспечивая тотипотентность всех клеток организма. На этом свойстве основаны современные биотехнологические приемы с использованием культур клеток и тканей и с последующей регенерацией целых растений.

Хлоропласты и митохондрии – энергетические станции клетки – являются полуавтономными органеллами. Они обладают своей, отличной от ядерной, наследственной информацией, реализующиеся в этих органеллах при синтезе специфических белков. Однако их функционирование теснейшим образом связано с деятельностью белков, кодируемых ядерной ДНК.

Каждая клеточная органелла выполняет оригинальную и незаменимую функцию. Эндоплазматическая сеть переносит вещества и передает сигналы, аппарат Гольджи выполняет секреторную функцию, снабжая строительным материалом клеточную стенку; в сферосомах происходит синтез липидов, а лизосомы изолируют гидролитические ферменты от цитозоля, предотвращая в нем неконтролируемый лизис веществ. Единственные органеллы, не имеющие мембран, – рибосомы. В них осуществляется сборка специфических белков из аминокислот согласно информации, поступающей от ДНК.

Взрослая растительная клетка имеет большую вакуоль с водным раствором органических и минеральных веществ. Она участвует в биохимическом круговороте веществ в клетке.

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, который определяется их химическим потенциалом. Точкой 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, называется водным потенциалом, отражает способность воды в данной системе совершать работу в сравнении с работой, которую при тех же условиях совершала бы чистая вода. Водный потенциал определяет способность молекул воды диффундировать, испаряться или поглощаться.

Молекулы растворенных в воде веществ снижает уровень свободной энергии молекул воды. Это снижение измеряется осмотическим потенциалом. Осмотический потенциал – компонент водного потенциала раствора, который определяется присутствием растворенных веществ, снижающих химический потенциал воды. Поэтому осмотический потенциал всегда величина отрицательная.

## **Работа 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЯЗКОСТИ ПРОТОПЛАЗМЫ МЕТОДОМ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ**

**Общие сведения.** Вязкость – одно из свойств цитоплазмы. Вязкость, или внутреннее трение, характеризуется силой, необходимой для перемещения одного слоя жидкости относительно другого. Вязкость протоплазмы можно определить: 1) путем определения скорости движения в ней искусственно введенных при помощи микроманипулятора кусочков никеля или железа, на которые затем действуют магнитом; 2) путем смещения под воздействием центробежной силы крахмальных зерен или других каких-либо включений клетки; 3) изучая скорость передвижения хлоропластов под влиянием центробежной силы.

**Материалы и оборудование.** Веточка элодеи канадской (*Elodea canadensis* Michx.). Препаровальные иглы, лезвия, пинцеты, предметные и покровные стекла, микроскоп, центрифуга и центрифужные пробирки.

**Порядок выполнения работы.** Для определения вязкости протоплазмы последним способом берут несколько листков элодеи, которые погружают в центрифужные пробирки, наполненные водопроводной водой. Пробирки помещают в центрифугу на 40 минут. После чего центрифужированные листочки элодеи рассматривают под микроскопом. Под микроскопом видно смещение хлоропластов в клетках в группы. Обнаруживают большее смещение в старых верхушечных клетках листа, в которых вязкость протоплазмы оказывается наименьшей. В молодых клетках, которые обычно располагаются у основания листа, подобное смещение происходит медленно,

и оно не так ясно выражено вследствие того, что протоплазма в этих клетках обладает большей вязкостью.

## Работа 2. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛИЯ И КАЛЬЦИЯ НА ФОРМУ ПЛАЗМОЛИЗА

**Общие сведения.** При погружении клеток в гипертонический раствор происходит отток воды из клеток до тех пор, пока не сравняются концентрации клеточного сока и наружного раствора. После этого начинается плазмолиз, т.е. отставание цитоплазмы от клеточной оболочки. Сначала цитоплазма отстает от оболочки в уголках (угловой плазмолиз), затем во многих местах с образованием вогнутых поверхностей (вогнутый) и, наконец, принимает округлую форму (выпуклый). А 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 (рис. 1). Явление, обратное плазмолизу называется деплазмолизом. Наблюдается в том случае, если плазмолизованную клетку поместить в воду.

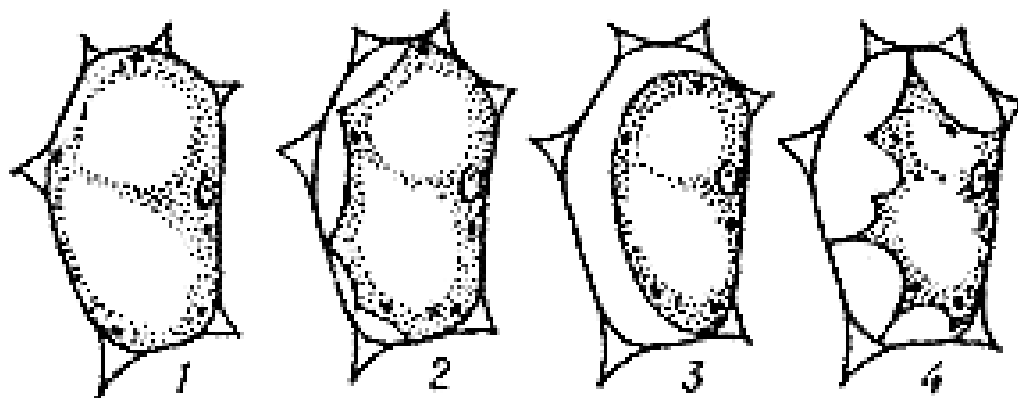


Рис. 1. Формы плазмолиза: 1 – угловой; 2 – вогнутый; 3 – выпуклый; 4 – судорожный

Ионы минеральных солей способны влиять на свойства коллоидов цитоплазмы, изменяя ее вязкость, причем ионы одно- и двухвалентных металлов проявляют противоположное действие. При сравнении вязкости цитоплазмы в растворах солей калия и кальция можно отметить, что 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.

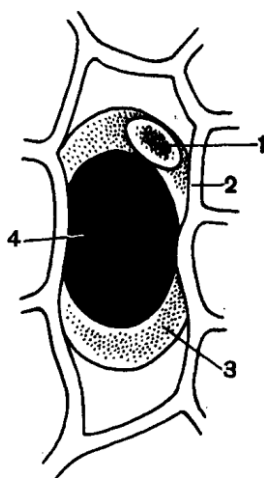
В качестве плазмолитиков (веществ, растворы которых вызывают плазмолиз) используют неядовитые вещества, плохо проникающие через цитоплазму в вакуоль.

**Материалы и оборудование.** Луковица синего лука (*Allium cepa* L.), 1 М раствор нитрата калия, 0,7 М раствор нитрата кальция. Препаровальные иглы, лезвия, пинцеты, предметные и покровные стекла, скальпель, микроскоп.

**Порядок выполнения работы.** Сделать лезвием срез эпидермиса, клетки которого содержат антоциан. Поместить срез в каплю воды на предметное стекло, накрыть покровным стеклом и рассмотреть в микроскоп клетки с окрашенным клеточным соком. Затем заменить воду на раствор нитрата калия (1 М). Следят за сменой форм плазмолиза. Затем ввести в покровное стекло каплю воды, оттягивая раствор кусочками фильтровальной бумаги, и вновь наблюдать за изменениями, происходящими в клетке. На другое предметное стекло нанести каплю нитрата кальция (0,7 М) поместить срез эпидермиса, накрыть покровным стеклом и наблюдать за изменениями, происходящими в клетке.

Записать результаты и сделать схематические рисунки клеток в воде и после пребывания в растворе, обозначив основные составные части клеток и показав стрелками процессы плазмолиза и деплазмолиза.

### Работа 3. НАБЛЮДЕНИЕ КОЛПАЧКОВОГО ПЛАЗМОЛИЗА



**Рис. 2. Колпачковый плазмолиз:** 1 – ядро;

2 – плазмалемма;

3 – цитоплазма; 4 – вакуоль

**Общие сведения.** Колпачковый плазмолиз возникает при действии гипертонических растворов солей. Такие соли вызывают набухание мезоплазмы, уменьшение степени ее дисперсности, изменение структуры. При длительном нахождении клеток в растворе нитрата калия (15 мин и более) цитоплазма набухает в удлинённых клетках, и там, где протопласт не касается клеточных стенок, образуются так называемые колпачки цитоплазмы. Такой плазмолиз носит название колпачкового (рис. 2). В еще большей степени набухание происходит в растворах роданида калия, в которых колпачки цитоплазмы образуются сразу же после начала плазмолиза.

Колпачковый плазмолиз может свидетельствовать 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 плазмолизированной вакуоли не увеличивается и плазмолиз сохраняется.

**Материалы и оборудование.** Луковица синего лука (*Allium cepa* L.), 1 М раствор KCNS. Препаровальные иглы, лезвия, пинцеты, предметные и покровные стекла, микроскоп.

**Порядок выполнения работы.** Срез эпидермиса с выпуклой поверхности пигментированной чешуи луковицы помещают на предметное стекло в каплю раствора роданида калия (1 М) и накрывают покровным стеклом. Сразу же наблюдают за образованием колпачкового плазмолиза сначала при малом, а затем при среднем увеличении.

Сделать рисунок и сформулировать вывод о причине появления колпачкового плазмолиза.

#### **Работа 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЯЗКОСТИ ЦИТОПЛАЗМЫ ПО ВРЕМЕНИ ПЛАЗМОЛИЗА**

**Общие сведения.** Промежуток времени от момента погружения клеток в гипертонический раствор до наступления выпуклого плазмолиза называют временем плазмолиза. Это время зависит от вязкости цитоплазмы: чем меньше вязкость, тем легче цитоплазма отстает от клеточной стенки и тем быстрее вогнутый плазмолиз переходит в выпуклый. Вязкость цитоплазмы зависит от степени дисперсности и гидратации коллоидов, от содержания в клетке воды и ряда других факторов. Цитоплазма растущих клеток и клеток, закончивших рост, имеет разную вязкость.

Для опыта используют молодые листочки элодеи, в которых можно различить 4 зоны: в основании расположена слабо окрашенная зона деления клеток, выше находится зона растяжения, еще выше – зона дифференциации и, наконец, верхушка листа, которая состоит из клеток, закончивших рост и имеющих интенсивную зеленую окраску.

**Материалы и оборудование.** Веточка элодеи канадской (*Elodea canadensis* Michx.), луковица синего лука (*Allium cepa* L.) или листья традесканции (*Tradescantia*), 1 М раствор NaCl или сахарозы. Лезвия, препаровальные иглы, пинцеты, предметные и покровные стекла, микроскоп.

**Порядок выполнения работы.** Взять 2-3 молодых листочка из верхушечной части побега элодеи (листья должны иметь зеленый кончик и бледно-зеленое основание), погрузить в каплю 1 М раствора NaCl на предметное стекло и закрыть покровным стеклом. Для сравнения, в другую каплю раствора NaCl поместить срез эпидермиса синего лука или традесканции. Отметить время погружения исследуемых объектов в раствор. Рассматривая препараты в микроскоп через каждые 5 минут, определить время плазмолиза. Причем, у листа элодеи следует наблюдать за клетками различных зон.

Записать результаты и сделать вывод о зависимости вязкости цитоплазмы от возраста листа.

## Работа 5. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛИЯ И КАЛЬЦИЯ НА ВЯЗКОСТЬ ЦИТОПЛАЗМЫ

**Общие сведения.** Ионы минеральных солей способны влиять на свойства коллоидов цитоплазмы, изменяя ее вязкость, причем ионы одно- и двухвалентных металлов проявляют противоположное действие. О вязкости цитоплазмы можно судить по времени плазмолиза: при большей вязкости цитоплазма с трудом отстает от клеточной стенки, сохраняя длительное время вогнутые поверхности (вогнутый плазмолиз). Если же вязкость цитоплазмы мала, то вогнутый плазмолиз быстро переходит в выпуклый.

**Материалы и оборудование.** Луковица синего лука (*Allium cepa* L.), растворы 1 М  $KNO_3$  и 0,7 М  $Ca(NO_3)_2$ . Лезвия, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, кусочки фильтровальной бумаги, микроскоп.

**Порядок выполнения работы.** Нанести на предметные стекла по капле растворов  $KNO_3$  и  $Ca(NO_3)_2$ . Поместить в растворы по кусочку эпидермиса лука и закрыть покровными стеклами. Записать время погружения срезов в растворы и приступить к наблюдению под микроскопом, отмечая время наступления фаз плазмолиза (при этом не следует принимать во внимание периферическую зону, т.к. там свойства цитоплазмы могут быть изменены вследствие раневого раздражения).

Результаты опыта записывают в таблицу 1 по приведенной форме.

### 1. Влияние ионов калия и кальция на форму и время наступления плазмолиза

Плазмолитик	Время погружения ткани в раствор	Время наступления плазмолиза		
		уголковый	вогнутый	выпуклый
$KNO_3$ $Ca(NO_3)_2$				

Зарисовать наиболее характерные клетки через 5-10 минут после погружения срезов в растворы. Сделать вывод о влиянии ионов калия и кальция на вязкость цитоплазмы.

## Работа 6. ПРИЖИЗНЕННОЕ ОКРАШИВАНИЕ КЛЕТОК НЕЙТРАЛЬНЫМ КРАСНЫМ

**Общие сведения.** Цитоплазма обладает прижизненной структурой, с которой связаны ее свойства и функции. Важнейшее из этих свойств – избирательная проницаемость. Живая цитоплазма не удерживает в себе витальные красители, которые свободно проходят в вакуоль и окрашивают клеточный сок. После гибели или при повреждении клетки красители задерживаются в самой цитоплазме в результате изменения нативной



(прижизненной) структуры белков. Цитоплазма и ядро приобретают соответствующую окраску.

**Материалы и оборудование.** Неокрашенный лук (*Allium cepa* L.), раствор нейтрального красного (1:1000), 1 М  $\text{KNO}_3$ , 10%-ный раствор аммиака. Химические стаканы на 100 мл, предметные и покровные стекла, пинцеты, стеклянные палочки, препаровальные иглы, лезвия, пипетки, микроскоп.

**Порядок выполнения работы.** Срез с чешуи не пигментированной луковицы выдерживают в слабом растворе нейтрального красного в течение 20 мин. После окрашивания срез помещают на предметное стекло в каплю воды, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом при малом, а затем при среднем увеличении.

У живых клеток вакуоли окрашиваются нейтральным красным в малиновый цвет, а цитоплазма и ядро не окрашиваются. У мертвых клеток оструктуренные цитоплазма и ядро окрашиваются этим красителем. Не снимая препарат со столика микроскопа, фильтровальной бумагой отсасывают воду из-под покровного стекла и вводят под него каплю 1 М раствора  $\text{KNO}_3$ . После этого наблюдается плазмолиз клеток, накопивших краску в вакуолях, подтверждающий, что эти клетки живые.

Чтобы проследить за изменениями в клетке при ее повреждении и гибели, применяют сильный яд – аммиак. Из-под покровного стекла фильтровальной бумагой отсасывают  $\text{KNO}_3$  и заменяют его каплей 10%-ного аммиака. Окраска среза становится желтой, так как в присутствии аммиака кислая реакция клеточного сока изменилась на щелочную (в щелочной среде нейтральный красный имеет желтый цвет). В погибших под действием аммиака клетках цитоплазма и ядро приобретают видимую в микроскоп структуру и окрашиваются в желто-бурый цвет.

Зарисовать живые клетки лука, накопившие нейтральный красный в вакуолях; эти же клетки, плазмолизированные в 1 М растворе  $\text{KNO}_3$ ; клетки лука с оструктуренными и окрашенными цитоплазмой и ядром, убитые аммиаком. По результатам работы сделать выводы о признаках повреждения и гибели клетки.

## **Работа 7. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛИЯ И КАЛЬЦИЯ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЦИТОПЛАЗМЫ**

**Общие сведения.** Проницаемость цитоплазмы зависит от ионов минеральных солей. Ионы, повышающие проницаемость степень гидратации коллоидов, увеличивают проницаемость. Тогда как ионы, проявляющие коагулирующее действие, вызывают дегидратацию белков, уменьшение пор мембран и понижение скорости проникновения веществ в клетку.

**Материалы и оборудование.** Луковица синего (неокрашенного) лука (*Allium cepa* L.), 1 М  $\text{KNO}_3$ , 0,7 М  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 М раствор сахарозы или  $\text{NaCl}$ ,

раствор 0,02% нейтрального красного. Лезвия, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, кусочки фильтровальной бумаги, фарфоровые чашки, микроскоп.

**Порядок выполнения работы.** В фарфоровые чашечки налить 9 объемов (18 капель) раствора нейтрального красного, добавив в одну 1 объем (2 капли) 1 М раствора  $KNO_3$ , а в другую – 1 объем (2 капли) 0,7 М  $Ca(NO_3)_2$ . Поместить в растворы минимум 3 среза эпидермиса лука. Через 5 минут вынуть 1 срез, промокнуть фильтровальной бумагой и поместить на предметное стекло в каплю раствора сахарозы или  $NaCl$ , накрыть покровным стеклом. То же самое сделать с объектами, пролежавшими в растворе нейтрального красного в течение 10-15 минут. Рассмотреть плазмолизированные клетки в микроскоп и сравнить скорость проникновения красителя в вакуоли.

Сделать вывод о влиянии ионов калия и кальция на проницаемость цитоплазмы.

## **Работа 8. ДИАГНОСТИКА ПОВРЕЖДЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПО УВЕЛИЧЕНИЮ ПРОНИЦАЕМОСТИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН**

**Общие сведения.** Избирательная проницаемость – свойство живой цитоплазмы сохранять постоянство внутриклеточной среды (гомеостаз). При повреждении клетки цитоплазма теряет это свойство, и вещества, находящиеся в клетке, свободно выходят наружу. Степень повреждения коррелирует с количеством выделяющихся в водную среду веществ. Таким образом, интенсивность выхода веществ из клетки служит критерием ее повреждения. Выделившийся из поврежденных клеток пигмент антоциан легко учесть колориметрическим способом.

**Материалы и оборудование.** Корнеплод красной столовой свеклы, хлороформ, 30%-ный раствор уксусной кислоты, 50%-ный раствор спирта, 1 М раствор  $KNO_3$ . Штативы с пятью пробирками, конические колбы, сверла, линейки, пипетки градуированные на 10 мл, предметные и покровные стекла, микроскоп, фотоэлектроколориметр (ФЭК).

**Порядок выполнения работы.** Из очищенного корнеплода красной столовой свеклы сверлом диаметром 0,7-0,8 см вырезают кусочки толщиной 3-4 см. Их тщательно промывают под струей водопроводной воды и помещают по одному в пять пробирок, содержащих по 10 мл растворов (в соответствии со схемой опыта).

Вариант с кипячением выполняют следующим образом. В колбу с кипящей водой бросают один из приготовленных кусочков. Через 2 мин кусочек вынимают, охлаждают и опускают в пробирку с 10 мл холодной водопроводной воды.

Через 30 мин после начала опыта все пробирки интенсивно встряхивают, кусочки свеклы извлекают и сравнивают количество вышедшего из клеток пигмента в разных вариантах опыта при помощи ФЭК на синем светофильтре

при длине волны 430-450 нм. При этом в контрольную кювету ФЭК наливают тот раствор, действие которого изучают. Интенсивность окраски устанавливают по коэффициенту экстинкции на шкале ФЭК.

Для наблюдения за состоянием клеток используют явление плазмолиза, свойственное только неповрежденным клеткам. Из кусочков столовой свеклы контрольного варианта и варианта с наиболее интенсивным выходом антоциана готовят тонкие срезы, помещают их на предметное стекло в каплю раствора 1 М КNO<sub>3</sub>, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом. Зарисовывают клетки срезов двух вариантов, находящихся под действием плазмолитика.

Результаты опыта записывают в таблицу 2 по приведенной форме.

## 2. Выход антоциана из клеток корнеплода красной столовой свеклы под действием повреждающих агентов

Интенсивность окраски раствора (коэффициент экстинкции)	Контроль (водопроводная вода)	Кипячение (водопроводная вода)	Водопроводная вода + 6 капель хлороформа	30%-ный раствор уксусной кислоты	50%-ный раствор спирта

По степени выхода антоциана делают вывод о силе повреждения растительной ткани различными агентами.

## Работа 9. НАБЛЮДЕНИЕ ЗА ДЕЙСТВИЕМ СВЕТА НА СКОРОСТЬ ДВИЖЕНИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ

**Общие сведения.** Во многих растительных клетках хорошо заметно передвижение различных цитоплазматических структур, вызванное спонтанным движением цитоплазмы. Оно обусловлено метаболизмом и обратимыми изменениями цитоплазматических белков. Вместе с током цитоплазмы передвигаются метаболиты и передаются различные сигналы из клетки в клетку. Наличие или отсутствие движения цитоплазмы, изменение его скорости могут указывать на функциональное состояние растительной клетки.

**Материалы и оборудование.** Веточка элодеи канадской (*Elodea canadensis* Michx.). Предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, окуляры-микрометры, микрометрические линейки, секундомеры, настольные лампы, микроскоп.

**Порядок выполнения работы.** На предметное стекло в каплю воды помещают лист водного растения элодеи, взятый вблизи верхушечной почки находящегося на рассеянном свете растения. Накрывают лист покровным стеклом и рассматривают под микроскопом сначала при малом, а затем при среднем увеличении. Окуляр должен быть снабжен окуляром-микрометром.

Наблюдают движение хлоропластов в клетках, расположенных рядом со средней жилкой.

Для учета скорости передвижения хлоропластов вращением окуляра совмещают шкалу окуляра-микрометра с направлением движения хлоропластов. Включив секундомер, замечают время, необходимое для прохождения каким-либо одним хлоропластом пути в десять делений окуляра-микрометра. Определение выполняют не менее чем с десятью хлоропластами.

Таким же образом устанавливают скорость движения хлоропластов в листьях элодеи, находящейся в течение 15 мин под светом электролампы (100 Вт). Лампа должна быть удалена от растения на расстояние 20-30 см, чтобы исключить перегрев.

Для того чтобы выразить скорость движения хлоропластов в микрометрах в секунду, необходимо определить цену деления окуляра-микрометра. На предметный столик помещают микрометрическую линейку и совмещают ее с направлением шкалы окуляра-микрометра. Совмещают также нулевые точки обеих шкал. Находят соответствующие друг другу линии на шкалах и определяют, сколько делений микрометрической линейки ( $A$ ) и окуляра-микрометра ( $B$ ) находится между совмещенными точками. Поскольку цена деления микрометрической линейки (10 мкм) известна, определяют цену деления окуляра-микрометра ( $C$ ).

$$C = 10 \text{ мкм} \cdot A/B$$

Зная время, необходимое для прохождения каждым хлоропластом расстояния, равного десяти делениям окуляра-микрометра ( $10 \cdot C$  мкм), вычисляют скорость движения хлоропластов.

Результаты опыта записывают в таблицу 3 по приведенной форме.

### 3. Определение скорости движения хлоропластов

Вариант опыта	Время прохождения хлоропластами десяти делений окуляра-микрометра, с										Среднее время, с	Длина проходимого отрезка, мкм	Скорость движения хлоропластов, мкм/с	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
На свету														
Под лампой														

Сделать выводы о влиянии света на скорость движения цитоплазмы. Как правило, свет ускоряет движение цитоплазмы в 2-4 раза.

## **Работа 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО СОКА МЕТОДОМ ПЛАЗМОЛИЗА**

**Общие сведения.** Клеточный сок – водный раствор различных органических и неорганических веществ. Потенциальное осмотическое давление зависит от числа частиц, находящихся в этом растворе, т.е. от концентрации и степени диссоциации растворенных молекул. Под осмотическим давлением понимается сила равная той, которую необходимо приложить, чтобы помешать проникновению частиц чистого растворителя (вода) в раствор (раствор сахарозы), разграниченные между собой полупроницаемой мембраной.

Для того чтобы получить представления о величине осмотического потенциала какого-либо раствора, необходимо определить в нем концентрацию растворенного вещества.

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

**Материалы и оборудование.** Луковица синего лука (*Allium cepa* L.), 1 М раствор сахарозы или  $\text{KNO}_3$ . Лезвия, предметные и покровные стекла, бюксы, градуированные пипетки на 10 мл, кисточки, препаровальные иглы, часы, фильтровальная бумага, микроскоп.

**Порядок выполнения работы.** В бюксах готовят по 10 мл растворов сахарозы (можно  $\text{KNO}_3$ ) путем разбавления 1 М раствора дистиллированной водой согласно таблице 4. Бюксы закрывают крышками, чтобы предотвратить испарение, и ставят в ряд по убывающей концентрации.

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

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

Определяют степень плазмолиза клеток в каждом растворе и находят изотоническую концентрацию как среднюю арифметическую между концентрацией, при которой плазмолиз только начинался, и концентрацией, которая уже не вызывает плазмолиза.

Результаты опыта записывают в таблицу 4 по приведенной форме.

#### 4. Определение потенциального осмотического давления

Концентрация раствора, моль/л	На 10 мл раствора		Продолжительность пребывания срезов в растворе		Степень плазмолиза	Изотоническая концентрация, моль/л	Осмотическое давление, кПа
	1 М раствора сахарозы или KNO <sub>3</sub> , мл	воды, мл	время погружения	время наблюдения			
0,7	7	3					
0,6	6	4					
0,5	5	5					
0,4	4	6					
0,3	3	7					
0,2	2	8					
0,1	1	9					

Потенциальное осмотическое давление рассчитывают по формуле

$$P = RTci,$$

где  $R$  – газовая постоянная, равная 8,3 Дж/моль·К;  $T$  – абсолютная температура по Кельвину ( $273^\circ + \text{комнатная}$ );  $c$  – изотоническая концентрация, М.;  $i$  – изотонический коэффициент Вант-Гоффа.

Коэффициент Вант-Гоффа характеризует ионизацию растворов:

$$i = 1 + \alpha(n-1),$$

где  $\alpha$  – степень диссоциации раствора данной концентрации;  $n$  – число ионов, на которое диссоциирует соль.

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

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

Концентрация (М)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Степень диссоциации	0,71	0,74	0,76	0,79	0,83

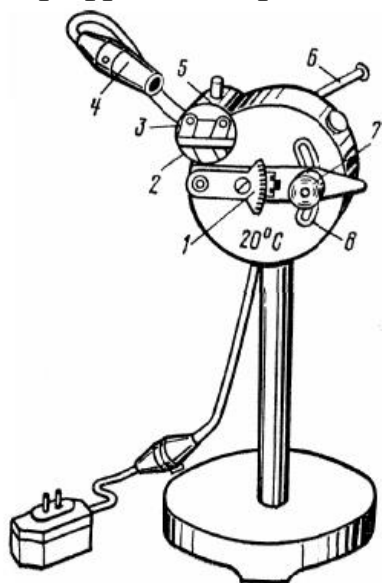
#### Работа 11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КЛЕТОЧНОГО СОКА И ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

**Общие сведения.** Рефрактометрический метод позволяет быстро и точно определить концентрацию клеточного сока и потенциальное осмотическое давление. Он очень удобен для работы в полевых условиях. Метод основан на учете показателя преломления света клеточным соком.

**Материалы и оборудование.** Листья растений. Ручной пресс или ступка с пестиком, марля, ножницы, фильтровальная бумага, пипетки, рефрактометр.

**Порядок выполнения работы.** При помощи ручного пресса получают сок из двух-трех листьев исследуемых растений, предварительно завернутых в кусочек марли. В качестве опытных вариантов желателен взять растения, относящиеся к трем разным группам – мезофитам, гигрофитам, ксерофитам.

Если ручного пресса нет, растительную массу измельчают в ступке, переносят на двойной слой марли и отжимают сок. Определение можно вести на любом рефрактометре.



**Рис. 3. Лабораторный рефрактометр:**

1 – компенсатор; 2 – окно для отраженного света; 3 – система призм; 4 – осветитель; 5 – окно для проходящего света; 6 – корпус термометра; 7 – окуляр; 8 – прорезь

Приведем описание работы на рефрактометре (рис. 3). На нижнюю поверхность призмы рефрактометра наносят две капли исследуемого сока и прижимают верхней поверхностью призмы. Прибор направляют на свет и вращением винта на тубусе добиваются четкого изображения в окуляре вертикальной шкалы с делениями, обозначающими содержание сахара в растворе (в %). Деление шкалы, через которое проходит горизонтальная граница между светлым и темным полями, соответствует концентрации сахара в клеточном соке испытуемого растения. Для каждого варианта делают не менее трех определений. При переходе от одного варианта к

другому призму для очистки ее от предыдущего раствора протирают сначала влажной, а затем сухой фильтровальной бумагой.

По специальной таблице находят величину потенциального осмотического давления (кПа), соответствующую найденной концентрации клеточного сока (См. Приложение).

Результаты записывают в таблицу 5 по приведенной форме.

### **5. Определение потенциального осмотического давления рефрактометрическим методом**

Вариант опыта	Концентрация клеточного сока, %	Потенциальное осмотическое давление, кПа
---------------	---------------------------------	--

По результатам опыта делают вывод о различиях потенциального осмотического давления у растений разных экологических групп и приспособительном значении этих различий.

## Работа 12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЛИСТЬЕВ МЕТОДОМ ШАРДАКОВА

**Общие сведения.** Энергетический уровень воды, как и любого другого вещества, отражаемый скоростью диффузии, называют химическим потенциалом, или, применительно к воде, водным потенциалом ( $\Psi_w$ ). Водный потенциал, являясь фактически мерой активности воды, определяет термодинамически возможное направление ее транспорта. Молекулы воды всегда перемещаются от более высокого водного потенциала к более низкому.

Метод основан на подборе раствора, концентрация которого не изменяется при погружении в него растительной ткани. В этом случае величина водного потенциала раствора будет равна водному потенциалу клеток листа.

**Материалы и оборудование.** Растения (горох, фасоль, подсолнечник, герань и др.) политые и неполитые, 1 М раствор сахарозы ( $KNO_3$ ), метиленовая синь. Штативы с двумя рядами пробирок, пипетки, градуированные на 10 мл, мерные пипетки на 0,5 мл, сверла диаметром 0,8-1,0 см, резиновые пластинки, пинцеты, проволочки, пробки для пробирок, стеклянные палочки.

**Порядок выполнения работы.** Пробирки расставляют в штативе в два ряда: пять в верхнем и пять в нижнем. В верхнем ряду готовят по 10 мл растворов сахарозы (можно  $KNO_3$ ) путем разбавления 1 М раствора дистиллированной водой согласно форме 6. В пробирки нижнего ряда переносят по 0,5 мл раствора из соответствующих верхних пробирок и закрывают пробками.

Для опыта целесообразны два варианта – растения, испытывающие недостаток воды и только что политые. Из листа сверлом вырезают 10 дисков, для чего лист поворачивают нижней стороной вверх и подкладывают под него резиновую пластинку. Диски выбивают между крупными жилками. В каждую пробирку нижнего ряда опускают на 40 мин по два диска. Каждые 10 мин пробирки с дисками встряхивают. Затем стеклянной палочкой удаляют диски и подкрашивают опытные растворы в пробирках нижнего ряда метиленовой синью, взятой в небольшом количестве на кончике проволочки. Содержимое встряхивают, добиваясь равномерной окраски раствора.

Пипеткой на 0,5 мл набирают подкрашенный раствор. Конец пипетки опускают в соответствующий исходный раствор в пробирке верхнего ряда так, чтобы уровень жидкости в пипетке немного превышал уровень раствора в пробирке. Медленно выпускают жидкость из пипетки в исходный раствор, отмечая направление движения струйки. Если концентрация и, следовательно, плотность окрашенного раствора увеличились по сравнению с исходными, то струйка пойдет вниз, если концентрация уменьшилась, струйка пойдет вверх. При равенстве концентраций струйка равномерно распределится внутри



пробирки с исходным раствором. Это означает, что водные потенциалы данного раствора и растительной ткани равны.

Величину водного потенциала по найденной опытным путем концентрации рассчитывают по формуле

$$\Psi_{w \text{ ткани}} = \Psi_{w \text{ раствора}} = - RTci,$$

где  $R$  – газовая постоянная, равная 8,3 Дж/моль·К;  $T$  – абсолютная температура по Кельвину ( $273^\circ + \text{комнатная}$ );  $c$  – изотоническая концентрация, М.;  $i$  – изотонический коэффициент [ $i=1+\alpha(n-1)$ ].

Результаты опыта записывают в таблицу 6 по приведенной форме.

### 6. Определение водного потенциала методом Шардакова

Концентрация раствора, моль/л	На 10 мл раствора		Направление движения струйки	Концентрация, оставшаяся неизменной, моль/л	Водный потенциал, кПа
	1 М раствора сахарозы или KNO <sub>3</sub> , мл	воды, мл			
0,5	5,0	5,0			
0,4	4,0	6,0			
0,3	3,0	7,0			
0,2	2,0	8,0			
0,1	1,0	9,0			

По результатам опыта делают вывод о возможности использования показателей водного потенциала для правильного выбора времени полива растений.

### Работа 13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДНОГО ПОТЕНЦИАЛА РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ПО МАКСИМОВУ И ПЕТИНОВУ

**Общие сведения.** Метод основан на подборе раствора, концентрация которого не изменяется при погружении в него растительной ткани. В этом случае величина водного потенциала раствора равна водному потенциалу клеток листа.

**Материалы и оборудование.** Листья фасоли, гороха, герани, 1 М раствор сахарозы. Сверла диаметром 0,6-0,8 см для выбивания дисков из листьев, резиновые пробки, стеклянные палочки, штативы с пробирками, пробки для пробирок, градуированные пипетки на 10 мл, фильтровальная бумага, рефрактометр.

**Порядок выполнения работы.** В штативе расставляют 10 пробирок: пять в верхнем и пять в нижнем ряду. Из 1 М раствора сахарозы в верхних пробирках готовят по 10 мл 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 и 0,5 М растворов сахарозы. В соответствующие пробирки нижнего ряда переносят из верхних

по 2 мл жидкости и в каждую из них при помощи стеклянной палочки помещают по восемь или десять дисков, выбитых сверлом из листовой пластинки (минуя жилки). Пробирки закрывают пробками. Диски оставляют в растворах на 40-60 мин, периодически встряхивая пробирки. Затем вынимают диски, а пробирки вновь закрывают пробками.

Для определения концентрации раствора сахарозы после нахождения в нем испытуемого материала можно пользоваться рефрактометрами РПЛ, 06-101А и др.

На призму рефрактометра стеклянной палочкой наносят по две капли сначала исходного, а потом соответствующего опытного раствора. Палочку и призму перед каждым новым определением протирают фильтровальной бумагой. Находят раствор, концентрация которого после пребывания в нем опытных объектов не изменилась. Если водный потенциал клеток больше водного потенциала одного раствора, но меньше другого, для расчета берут среднюю концентрацию между этими двумя растворами. Величину водного потенциала рассчитывают по формуле

$$\Psi_{w \text{ ткани}} = \Psi_{w \text{ раствора}} = - RTci,$$

где  $R$  – газовая постоянная, равная 8,3 Дж/моль·К;  $T$  – абсолютная температура по Кельвину ( $273^\circ + \text{комнатная}$ );  $c$  – изотоническая концентрация, М.;  $i$  – изотонический коэффициент [ $i=1+\alpha(n-1)$ ].

Результаты опыта записывают в таблицу 7 по приведенной форме.

### 7. Определение водного потенциала рефрактометрическим методом

Объект исследования	Концентрация раствора сахарозы, М	Показания рефрактометра, %		Концентрация, оставшаяся неизменной, моль/л	Водный потенциал, кПа
		до опыта	после опыта		

## Работа 14. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДНОГО ПОТЕНЦИАЛА РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ МЕТОДОМ ПОЛОСОК ПО ЛИЛИЕНШТЕРН

**Общие сведения.** Водный потенциал характеризует сосущую силу растительной ткани. Его величина зависит от разности химических потенциалов воды в клетке и чистой воды. Водный потенциал всегда имеет отрицательный знак. Чем ниже водный потенциал, тем сильнее обезвожена растительная клетка, поэтому этот показатель используют для выбора правильного времени полива.

Для конкретных культур различных почвенно-климатических зон установлены оптимальные значения водного потенциала. Это позволяет по справочным данным проводить поливы в оптимальные сроки.

Метод полосок основан на подборе наружного раствора такой концентрации, при погружении в который длина полоски растительной ткани не меняется. Если водный потенциал наружного раствора выше водного потенциала растительной ткани, то клетки, всасывая воду из раствора, увеличиваются в объеме, и длина полосок возрастает, если же он ниже, то раствор отнимает воду от клеток, в результате чего их объем и длина полоски уменьшается. В растворе, у которого водный потенциал равен водному потенциалу растительной ткани, длина полосок не изменяется.

**Материалы и оборудование.** Клубни картофеля, 1 М раствор сахарозы или  $\text{KNO}_3$ . Штативы с семью пробирками, градуированные пипетки на 10 мл, пинцеты, ланцеты, ножи, часы, миллиметровые линейки.

**Порядок выполнения работы.** При помощи разбавления 1 М раствора сахарозы (или  $\text{KNO}_3$ ) в пробирках готовят по 10 мл растворов 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 и 0,1 М концентрации. Из клубня картофеля вырезают 14 полосок длиной 4-6 см и сечением около 4 мм<sup>2</sup>. Концы полосок срезают наискось. Работать следует быстро, чтобы исключить подсыхание полосок. Миллиметровой линейкой точно измеряют их длину и помещают по две в каждую пробирку с приготовленным раствором. Через 20 мин полоски вынимают, обсушивают фильтровальной бумагой и снова измеряют их длину.

Для расчета величины водного потенциала берут концентрацию, при которой длина полосок не изменяется.

Величину водного потенциала рассчитывают по формуле

$$\Psi_w \text{ ткани} = \Psi_w \text{ раствора} = - RTci,$$

где  $R$  – газовая постоянная, равная 8,3 Дж/моль·К;  $T$  – абсолютная температура по Кельвину ( $273^\circ +$  комнатная);  $c$  – изотоническая концентрация, М.;  $i$  – изотонический коэффициент [ $i=1+\alpha(n-1)$ ].

Значения  $\alpha$  для растворов  $\text{KNO}_3$  указаны в работе 10; для сахарозы  $i=1$ . Результаты опыта записывают в таблицу 8 по приведенной форме.

## 8. Определение водного потенциала методом Лилиенштерн

Концентрация раствора, моль/л	На 10 мл раствора		Длина полоски ткани, мм		Концентрация при которой длина полосок не изменялась, М	Водный потенциал, кПа
	1 М раствора сахарозы или $\text{KNO}_3$ , мл	воды, мл	перед погружением в раствор	после пребывания в растворе		
0,7	7	3				
0,6	6	4				
0,5	5	5				
0,4	4	6				
0,3	3	7				
0,2	2	8				
0,1	1	9				

## Работа 15. ЗАВИСИМОСТЬ СОСУЩЕЙ СИЛЫ ОТ СТЕПЕНИ НАСЫЩЕНИЯ КЛЕТОК ВОДОЙ

**Общие сведения.** Силу, с которой клетка способна поглощать воду, называют сосущей силой ( $S$ ) клетки. Сосущая сила растительной клетки равна разности между осмотическим давлением ( $P$ ) клеточного сока и тургорным давлением ( $T$ ). При погружении клетки в какой-либо раствор водообмен между ними определяется соотношением их сосущих сил: вода передвигается в ту сторону, где больше сосущая сила.

Данная работа – продолжение предыдущей. На основе полученных данных в работе № 14 нужно начертить диаграмму, показывающую, как изменяется сосущая сила клеток, осмотическое давление клеточного сока и тургорное давление при изменении степени насыщения клеток водой.

Зависимость между указанными показателями выражается следующей формулой:

$$S=P-T$$

Если до погружения все клетки имели более или менее одинаковую степень насыщения водой, а следовательно, и одинаковые  $S$ ,  $P$  и  $T$ , то после пребывания клеток в растворах все эти показатели для разных полосок стали различными.

**Материалы и оборудование.** Миллиметровая бумага, линейки.

**Порядок выполнения работы.** Заполнить таблицу 9, в которой записать показатели, характеризующие состояние клеток после пребывания в растворах (см. таблицу в работе 14):

### 9. Состояние клеток после пребывания в растворах

1.	Длина полоски $V$ , мм				
2.	Сосущая сила $S$ , кПа				
3.	Осмотическое давление $P$ , кПа				
4.	Тургорное давление $T$ , кПа				

1. Длина полосок ( $V$ ). В первую строку таблицы записать длину полосок после пребывания клеток в растворах, начиная с наименьшей концентрации. При совпадении длины полосок в нескольких самых крепких растворах (например, 0,6 М; 0,8 М; 1,0 М) взять величину, относящуюся только к наиболее слабому из этих растворов (в приведенном примере – 0,6 М, поскольку уже в этом растворе клеточные оболочки достигли предела сокращения).

2. Сосущая сила ( $S$ ). Исходя из того, что полоски достаточно долго пролежали в растворах и уже перестали изменяться в длине, считаем, что сосущая сила клеток сравнялась с осмотическим давлением соответствующего

раствора. Осмотическое давление раствора, а, следовательно, и равная ему сосущая сила клеток вычисляется по уравнению Вант-Гоффа:

Потенциальное осмотическое давление

$$P = RTci,$$

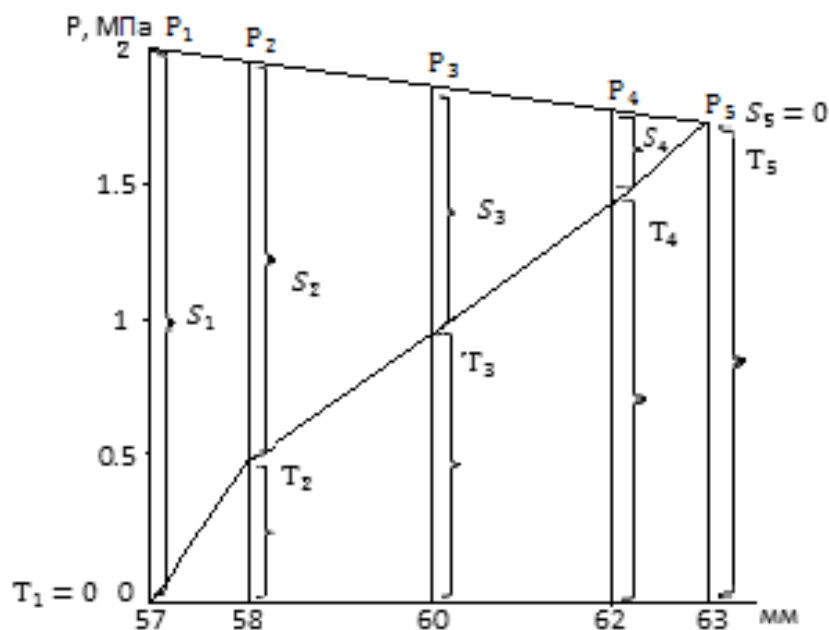
где  $R$  – газовая постоянная, равная 8,3 Дж/моль·К;  $T$  – абсолютная температура по Кельвину ( $273^\circ + \text{комнатная}$ );  $c$  – изотоническая концентрация, М.;  $i$  – изотонический коэффициент Вант-Гоффа.

3. Осмотическое давление клеточного сока ( $P$ ). Для самой короткой полоски ( $V_1$ ) характерно полное отсутствие тургора:  $T_1=0$ , откуда (по формуле  $S=P-T$ )  $P_1= S_1$ . Остальные полоски имеют все более разбавленный клеточный сок, причем  $P$  уменьшается обратно пропорционально объему клеток (или длине полосок):  $P_1V_1= P_nV_n$ , откуда  $P_n= P_1V_1/V_n$

4. Тургорное давление ( $T$ ) находим по формуле:  $S=P-T$ , откуда  $T =P-S$ .

Заполнив таблицу, начертить диаграмму (образец представлен). Для этого на миллиметровой бумаге начертить систему координат: ось абсцисс ( $X$ ) – миллиметры, ось ординат ( $Y$ ) – кПа. На оси абсцисс отложить длину полосок ( $V$ ), например, 1 мм=1 см, причем точку пересечения осей обозначить не нулем (0), а –  $V_1$ . На оси ординат отложить значения для  $P$  и  $T$ , соединить линиями полученные точки. Получатся графики зависимости  $P$  и  $T$  от степени насыщения клеток водой. Значения для  $S$  откладывать не придется, т.к. эти величины представлены отрезками  $P-T$ .

Образец диаграммы показан на рис. 4.



**Рис. 4. Зависимость осмотических показателей от степени насыщения клеток водой**

По результатам опыта делают вывод о том, как изменяются Р, Т и S в зависимости от насыщения клеток водой.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что представляет собой растительная клетка?
2. Каковы структурные особенности растительной клетки? Охарактеризуйте главные компоненты, входящие в состав клеточной оболочки, их химическую структуру, характер связей, возникающих между ними.
3. Охарактеризуйте ультраструктуру и функции мембранных и немембранных органелл клетки.
4. Отметьте особенности жидкостно-мозаичной структуры мембран. Почему она имеет такое название? Как особенности структуры мембраны связаны с выполняемыми функциями?
5. Понятие вязкости цитоплазмы. Методы определения вязкости.
6. Существует ли связь между проницаемостью цитоплазмы и ее вязкостью?
7. Плазмолиз. Формы и время плазмолиза. Деплазмолиз. Способны ли плазмолизироваться мертвые клетки?
8. Что такое колпачковый и судорожный плазмолиз?
9. Что лежит в основе избирательной проницаемости клетки?
10. Какова физическая природа процессов диффузии и осмоса?
11. Что называется осмотическим давлением и от чего зависит его величина?
12. Какое практическое значение имеет определение величины осмотического давления клеток растения?
13. Что такое водный потенциал клетки? Каковы его составляющие?
14. Что такое тургор? Какое биологическое значение он имеет?

## ВОДНЫЙ ОБМЕН

Вода играет важную роль в жизни растений и является основной составной частью их органов. Она составляет от 80 до 95% массы растущих тканей. Вода обладает уникальными свойствами, благодаря которым она имеет первостепенное значение во всех процессах жизнедеятельности клетки.

Именно водная фаза объединяет все клетки и ткани растительного организма в единое целое, участвует в построении и упорядочении мембранных структур, гидратирует белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды. Вода является основным растворителем и активным метаболитом многих биохимических процессов. При фотосинтезе вода служит донором электронов и протонов, используемых на восстановительные биосинтезы. В процессе роста растения большая часть увеличения его массы обеспечивается за счет воды. При дыхании, например в цикле Кребса, вода принимает непосредственное участие в окислительных процессах. Процессы гидролиза, а в ряде случаев и синтеза идут с участием воды. Передвижение веществ по растению в сосудах ксилемы и ситовидных трубках осуществляется в водной среде. Обладая высокой теплоемкостью и большой удельной теплотой парообразования, вода обеспечивает терморегуляцию растительного организма и защищает ткани от резких колебаний температуры. Благодаря явлениям осмоса и тургорному давлению вода обеспечивает упругое состояние клеток и тканей растительного организма, а также их защиту (как амортизатор) при механических воздействиях.

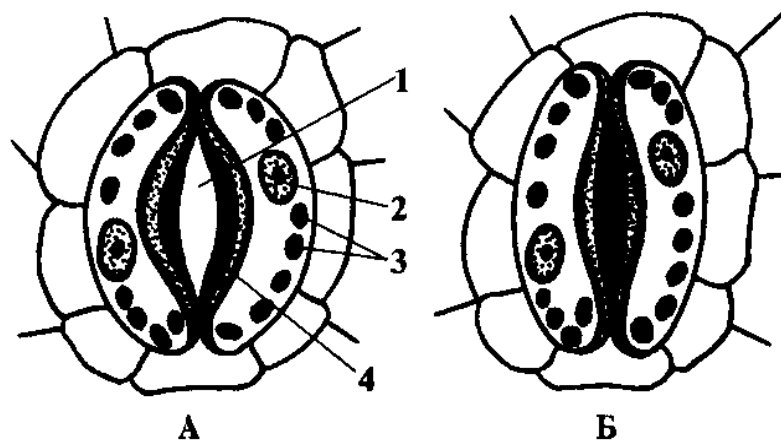
В основе транспирации лежит физиологический процесс испарения воды надземными органами. Основным органом транспирации является лист. Различают устьичную и кутикулярную транспирацию.

Процесс транспирации состоит из ряда этапов:

- 1) переход воды из клеточных оболочек в межклетники;
- 2) выход паров воды из межклетников через устьичные щели;
- 3) диффузия паров воды от поверхности листа в атмосферу.

Основное значение в регулировании этого процесса принадлежит устьицам. Устьица представляют собой отверстия (щели) в эпидермисе, образованные двумя замыкающими клетками (рис. 5). В отличие от клеток эпидермиса замыкающие клетки устьичного аппарата имеют бобовидную форму, содержат хлоропласты.

Устьица обладают способностью открываться и закрываться в зависимости от насыщенности замыкающих клеток водой. Количество устьиц варьирует в зависимости от возраста листа и условий среды и составляет от 50 до 500 на 1 мм<sup>2</sup>. В листьях устьица могут располагаться или на обеих сторонах, или только на нижней.



**Рис. 5. Структура устьиц у двудольных растений:** А – открытое устьице; Б – закрытое устьице; 1 – устьичная щель; 2 – ядро; 3 – хлоропласты; 4 – толстая клеточная стенка

Испарение воды в атмосферу из клеточных стенок эпидермиса листа называют кутикулярной транспирацией. При открытых устьицах потери водяного пара через кутикулу листа обычно незначительны по сравнению с общей транспирацией. Однако если устьица закрыты, например во время засухи, кутикулярная транспирация приобретает важное значение в водном режиме растения.

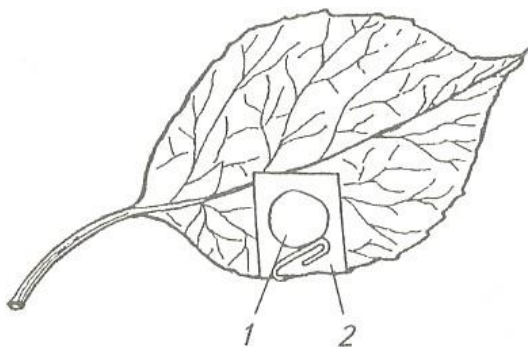
Интенсивность кутикулярной транспирации зависит от толщины кутикулы: у молодых листьев с тонкой кутикулой она составляет 50%, а у зрелых листьев с мощной кутикулой – 10% от всей транспирации. В стареющих листьях кутикулярное испарение воды вновь возрастает из-за разрушения и растрескивания кутикулы.

Транспирация предохраняет лист от перегрева; способствует поступлению воды и растворимых минеральных веществ; создает непрерывный ток воды из корневой системы к листьям, который связывает все органы растения в единое целое.

## **Работа 16. СРАВНЕНИЕ ТРАНСПИРАЦИИ ВЕРХНЕЙ И НИЖНЕЙ СТОРОН ЛИСТА ХЛОРКОБАЛЬТОВЫМ МЕТОДОМ**

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





**Рис. 6. Определение транспирации хлоркобальтовым методом:** 1 – хлоркобальтовая бумажка; 2 – целлулоидная подложка

Хлоркобальтовый метод определения транспирации листьев, не отделенных от растения, очень прост и доступен. Однако его применение ограничено только сравнительными опытами, так как не позволяет определять абсолютные величины интенсивности транспирации. Существуют количественные модификации этого метода, основанные на взвешивании хлоркобальтовой бумаги до и после определенной экспозиции ее на листе, но они неточные.

**Материалы и оборудование.** Растения. Диски из хлоркобальтовой бумаги на целлулоидной подложке, канцелярские скрепки, часы, предметные и покровные стекла, пинцеты, капельницы с водой, лезвия, препаровальные иглы, микроскоп.

**Порядок выполнения работы.** Диски из хлоркобальтовой бумаги на целлулоидной подложке прикладывают к верхней и нижней сторонам листа и укрепляют подложку канцелярской скрепкой (рис. 6). Наблюдают, через сколько минут бумажка на верхней и нижней сторонах листа порозовеет. По скорости порозовения определяют, с какой стороны листа испарение идет быстрее.

По окончании опыта под микроскопом исследуют эпидермис верхней и нижней сторон листа и подсчитывают количество устьиц в поле зрения. Для этого просматривают по три-пять полей зрения на трех препаратах каждого варианта и вычисляют среднее арифметическое значение.

Зарисовывают эпидермис верхней и нижней сторон листа. Делают выводы о причинах различной интенсивности испарения сторон листа данного растения и о соотношении между устьичной и кутикулярной транспирацией.

Результаты опыта записывают в таблицу 10 по приведенной форме.

### 10. Интенсивность транспирации листьев

Вариант опыта	Сторона листа	Период наблюдения		Время, за которое порозовеет бумага, мин	Число устьиц в поле зрения микроскопа	
		начало опыта	конец опыта		отдельные подсчеты	среднее арифметическое

### Работа 17. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТОЯНИЯ УСТЬИЦ МЕТОДОМ ИНФИЛЬТРАЦИИ ПО МОЛИШУ

**Общие сведения.** Причиной устьичных движений может быть действие света, изменение оводненности тканей, температуры, концентрации CO<sub>2</sub> в

межклетниках и др. В условиях недостаточного водообеспечения происходит гидроактивное закрывание устьиц. Причем они начинают постепенно закрываться еще до проявления каких-либо внешних признаков водного дефицита. Поэтому степень открытости устьиц может служить физиологическим показателем для определения обеспеченности растений водой и установления сроков полива.

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

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

**Материалы и оборудование.** Растения. Капельницы, спирт, бензол, ксилол.

**Порядок выполнения работы.** Исследуют состояние устьиц у растений, находящихся в условиях оптимального и недостаточного водоснабжения. На соседние участки нижней стороны листа наносят последовательно спирт, бензол и ксилол. Лист выдерживают в горизонтальном положении до полного исчезновения капель, которые могут либо испариться, либо проникнуть внутрь листа, и рассматривают его в проходящем свете. Если жидкость проникла в межклетники листа, то на нем появляются прозрачные пятна.

На основании полученных данных делают заключение о разной степени раскрытия устьиц, исходя из того, что при инфильтрации только ксилолом они открыты слабо, ксилолом и бензолом – средне, ксилолом, бензолом и спиртом – сильно.

Результаты опыта записывают в таблицу 11 по приведенной форме.

### 11. Определение степени раскрытия устьиц

Условия опыта	Проникновение			Степень раскрытия устьиц
	спирта	бензола	ксилола	

### Работа 18. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ РАСКРЫТИЯ УСТЬИЦ НА ФИКСИРОВАННОМ ЭПИДЕРМИСЕ ПО ЛЛОЙДУ

**Общие сведения.** Метод заключается в быстром обезвоживании и фиксации в абсолютном спирте снятого эпидермиса и последующем его исследовании под микроскопом.

**Материалы и оборудование.** Десятидневные проростки овса или пшеницы, абсолютный спирт. Предметные и покровные стекла, пинцеты, препаровальные иглы, маленькие склянки с притертыми пробками или бюксы, лезвия, окуляры-микрометры, объекты-микрометры, микроскопы.

**Порядок выполнения работы.** Наблюдают за движением устьиц у десятидневных проростков злаков при переносе их из светлого помещения в темную камеру. Наблюдение выполняют сначала на свету, а затем после пребывания растений в темной камере в течение 30 мин и 2 ч.

На нижней стороне листа под прямым углом к центральной жилке делают неглубокие надрезы бритвой через 2-3 мм и срезают в этом направлении полоску эпидермиса. Помещают ее в склянку с абсолютным спиртом, который быстро фиксирует снятый эпидермис и предохраняет его от дальнейшей деформации. Материал можно хранить в спирте долгое время.

Фиксированный эпидермис просматривают под микроскопом, измеряют ширину устьичных щелей не менее чем у 20 устьиц и вычисляют среднюю величину степени их открытия. Измерения выполняют при помощи окуляра-микрометра, который представляет собой круглую стеклянную пластинку с нанесенной шкалой. Окуляр-микрометр вставляют в окуляр. Перемещают объект препаратом и шкалу микрометра поворотом окуляра так, чтобы можно было измерить объект в делениях окуляра-микрометра.

Для выражения ширины устьичных щелей в микрометрах необходимо определить цену деления окуляра-микрометра. Для этого на столик микроскопа помещают объект-микрометр со шкалой длиной 1 мм и величиной одного деления – 100 мкм. Совмещают направление и нулевые точки шкалы окуляра-микрометра и объекта-микрометра. Находят число делений объекта-микрометра ( $A$ ), точно соответствующее числу делений окуляра-микрометра ( $B$ ). Вычисляют цену деления окуляра-микрометра.

$$C = 10 A/B.$$

Для получения истинных размеров устьичных щелей умножают их ширину в делениях окуляра-микрометра на цену деления. Результаты опыта записывают в таблицу 12 по приведенной форме.

## 12. Определение степени раскрытия устьиц

Вариант опыта	Цена деления окуляра-микрометра, мкм	Ширина устьичных щелей	
		в делениях окуляра-микрометра	в микрометрах

## Работа 19. ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ УСТЬИЦ МЕТОДОМ ОТПЕЧАТКОВ ПО ПОЛАЧЧИ

**Общие сведения.** Метод основан на получении тонкой прозрачной пленки с отпечатками (репликами) устьиц. Рассматривая их под микроскопом, можно определить число устьиц на единице листовой поверхности и их размер. Для изготовления реплик применяют вещества, образующие пленку при испарении растворителя или в результате полимеризации. Действие самих органических растворителей и охлаждение листа в результате их испарения могут влиять на апертуру устьиц. Использование полимеров снижает артефакты.

**Материалы и оборудование.** Растения, раствор коллодия или кремнийорганический каучук и катализатор, бесцветный лак для ногтей для изготовления пленки. Предметные и покровные стекла, пинцеты, кисточки, окуляры-микрометры, объекты-микрометры, микроскопы.

**Порядок выполнения работы.** На нижнюю поверхность листа стеклянной палочкой тонкий слой раствора силиконового каучука, смешанного с катализатором, и оставляют на 2-3 мин для полимеризации. «Негатив» снимают с листа пинцетом, покрывают бесцветным лаком и дают высохнуть. Таким образом на лаковой пленке, которая легко снимается со слепка, получают позитивное изображение листа. Пленку помещают в каплю воды на предметное стекло, накрывают покровным и рассматривают под микроскопом с объективом  $\times 40$ . Определяют среднее число устьиц в поле зрения микроскопа, исследовав несколько полей зрения в разных участках препарата.

Затем при помощи окуляра-микрометра (см. работу 9) находят среднюю площадь устьичной щели и площадь поля зрения микроскопа. Для этого измеряют ширину и длину устьичной щели не менее чем у 20 устьиц и устанавливают среднюю величину. Площадь устьичной щели вычисляют по формуле

$$S = \pi ab,$$

где  $a$  и  $b$  – малая и большая полуоси эллипса, т.е. половина ширины и длины устьичной щели.

По числу устьиц и средней площади устьичной щели рассчитывают общую площадь устьичных отверстий в поле зрения микроскопа. Измеряют диаметр поля зрения, вычисляют радиус и определяют площадь поля по формуле  $S = \pi r^2$ . Рассчитывают площадь, занимаемую всеми устьичными отверстиями, в процентах общей поверхности листа.

Методом отпечатков исследуют листья разных ярусов одного и того же растения, а затем делают вывод о влиянии ярусности на размеры испаряющей поверхности листа. Результаты опыта записывают в таблицу 13 по приведенной форме.

### 13. Определение состояния устьиц у растений

Ярус листьев	Число устьиц в поле зрения микроскопа	Цена деления окуляра-микрометра, мкм	Размеры устьичных отверстий			Общая площадь устьичных отверстий в поле зрения, мкм <sup>2</sup>	Площадь поля зрения, мкм <sup>2</sup>	Площадь устьичных отверстий, % общей поверхности листа	
			в делениях окуляра-микрометра		в микрометрах				
			ширина	длина	ширина				длина

#### Работа 20. НАБЛЮДЕНИЕ ЗА УСТЬИЧНЫМИ ДВИЖЕНИЯМИ ПОД МИКРОСКОПОМ

**Общие сведения.** Газообмен между межклетниками листа и наружной атмосферой регулируется устьицами. Каждое устьице состоит из двух замыкающих клеток, у которой стенки, примыкающие к устьичной щели, сильно утолщены, тогда как наружные части оболочки остаются тонкими. Неодинаковая толщина наружных и внутренних стенок замыкающих клеток приводит к тому, что при изменении тургора замыкающие клетки способны искривляться или распрямляться, открывая или закрывая при этом устьичную щель.

**Материалы и оборудование.** Листья комнатных растений, 1 М раствор сахарозы, 5%-ный раствор глицерина, вода. Лезвия, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, стеклянные палочки, кусочки фильтровальной бумаги, микроскоп.

#### Порядок выполнения работы.

**Опыт 1.** Срез нижнего эпидермиса листа рассмотреть в капле воды при большом увеличении микроскопа. Зарисовать одно устьице, отметив утолщения клеточных стенок замыкающих клеток. Нанести рядом с покровным стеклом 2-3 капли 1 М раствора сахарозы и приступить к наблюдению за изменением устьичных щелей. Зарисовать устьице в закрытом состоянии. Снова заменить раствор сахарозы водой и наблюдать постепенное открывание устьиц.

**Опыт 2.** Приготовить срез эпидермиса листа, поместить в каплю 5%-ного раствора глицерина на предметное стекло, накрыть покровным стеклом и

начать наблюдать явление плазмолиза в замыкающих клетках, а также и в остальных клетках эпидермиса. Устьичные щели при этом замыкаются.

Через некоторое время, вследствие того, что глицерин начинает проникать через цитоплазму в клеточный сок, наступает деплазмолиз и устьица открываются.

Заменить глицерин водой, для этого нужно нанести рядом с покровным стеклом каплю воды, а с другой стороны оттянуть глицерин кусочком фильтровальной бумаги. При этом устьица откроются еще шире, чем это было в начале опыта, так как вследствие проникновения глицерина в клеточный сок осмотическое давление в замыкающих клетках начинается повышаться.

Записать результаты наблюдений и объяснить причины устьичных движений.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Из чего складывается водный режим растения?
2. Какие органы служат для поглощения воды?
3. Какой процесс называется транспирацией и каково ее биологическое значение?
4. От каких внешних факторов зависит интенсивность транспирации?
6. Какие типы устьичных движений вам известны? Каков их механизм?
7. Какое значение имеют устьичные движения в жизни растений?

## ФОТОСИНТЕЗ

Фотосинтез – процесс усвоения растениями световой энергии и использования ее для синтеза органических веществ из углекислого газа и воды. В ходе этого процесса в атмосферу выделяется кислород.

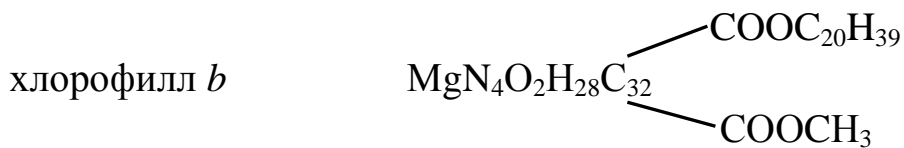
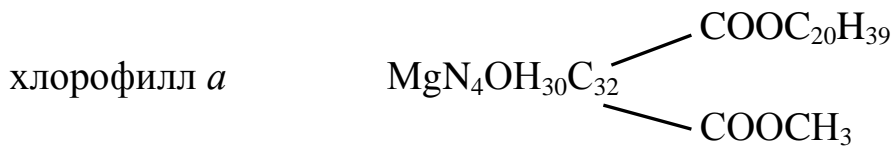
Во многих учебниках можно увидеть следующее уравнение фотосинтеза:  $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ . Его составил в 1840 г. французский ученый Ж. Буссенго. В 1877 г. немецкий ученый Р. Пфеффер – назвал этот процесс фотосинтезом. В 1869 г. К.А. Тимирязев доказал, что зеленые растения превращают световую энергию и запасают ее в химических веществах.

Образование органического вещества из неорганического, происходящее во время фотосинтеза, – самый грандиозный биологический процесс на Земле. 155 млрд т органических веществ (или 95% от их общего количества) ежегодно образуется зелеными растениями, при этом они усваивают 200 млрд т  $\text{CO}_2$  и выделяют примерно 145 млрд т  $\text{CO}_2$ . К.А. Тимирязев писал: «Это превращение простых неорганических веществ:  $\text{CO}_2$  и воды – в органические – единственный на нашей планете естественный процесс образования органического вещества. Все органические вещества, как бы разнообразны они ни были, где бы они ни встречались: в растении, в животном, в человеке, а также в нефти, угле, – прошли через лист, образовались из веществ, сделанных листом».

### Работа 21. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПИГМЕНТОВ ЛИСТА

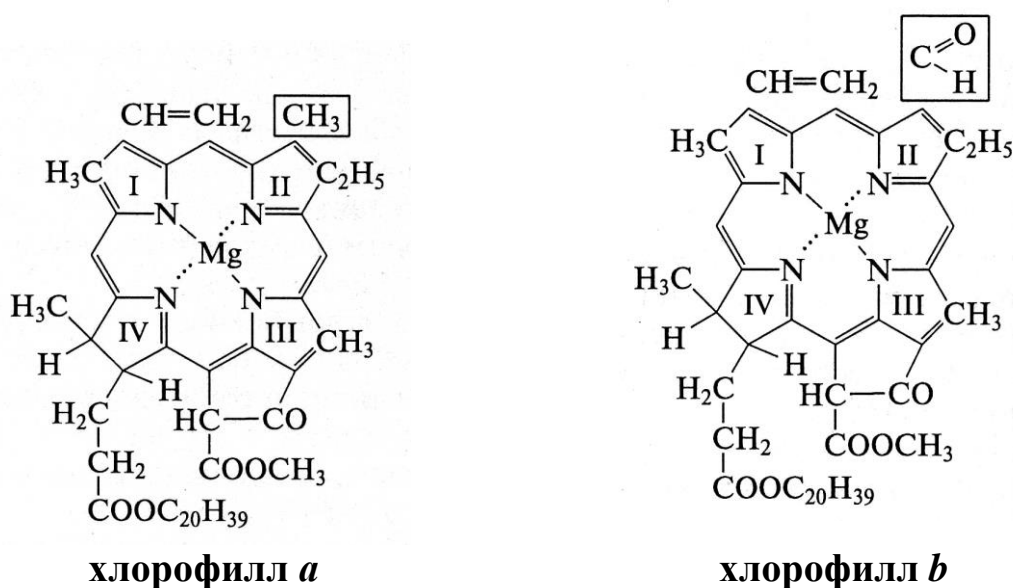
**Общие сведения.** Пигментная система хлоропласта высших растений представлена двумя типами пигментов: зелеными – хлорофиллами *a* и *b* и желтыми – каротиноидами. Основной функциональный пигмент хлорофилл *a* обнаружен у всех фотосинтезирующих организмов за исключением бактерий. Этот пигмент служит непосредственным донором энергии для фотосинтетических реакций, остальные пигменты лишь передают поглощенную ими энергию хлорофиллу *a*. У большинства наземных высших растений содержание хлорофилла *a* в два-три с половиной раза выше, чем содержание хлорофилла *b*.

По химической природе хлорофиллы *a* и *b* – сложные эфиры дикарбоновой кислоты хлорофиллина и двух спиртов – метанола и фитола. В центре молекулы хлорофилла расположен атом магния, который соединен с четырьмя атомами азота пиррольных колец.



Хлорофилл *b* отличается от хлорофилла *a* тем, что у него ко второму пиррольному кольцу присоединена не метильная, а альдегидная группа, поэтому хлорофилл *b* содержит кислорода на один атом больше, а водорода – на два атома меньше.

Молекулу хлорофилла делят на две части: порфириновое ядро (гидрофильная часть) и фитольный хвост (гидрофобная углеводородная часть). Таким образом, молекула хлорофилла полярна. Эта полярность молекулы обуславливает ее расположение в мембранах хлоропластов.

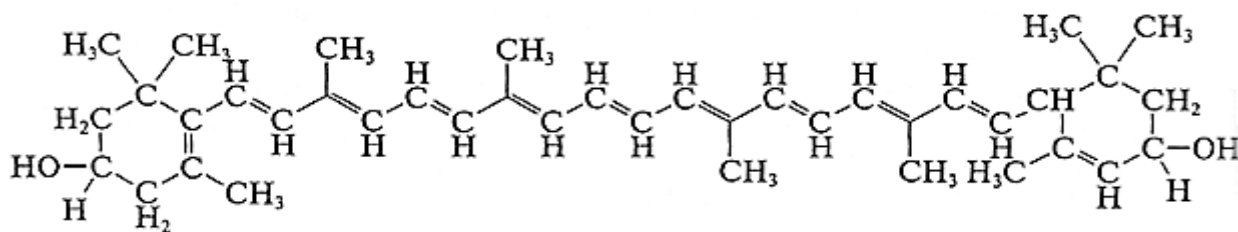


Обе части молекулы хлорофилла выполняют разные функции: порфириновое ядро поглощает свет, а фитольный хвост играет роль якоря, удерживающего молекулу хлорофилла в определенной части мембраны тилакоида.

Каротиноиды – это полиеновые углеводороды красного, желтого и оранжевого цветов. Каротиноиды содержат 40 атомов углерода и представляют собой цепи, обладающие сопряженными двойными связями. Каротиноиды присутствуют в хлоропластах всех растений. Они входят также в состав хромопластов. В зеленых листьях каротиноиды обычно незаметны



из-за присутствия хлорофилла, но осенью при разрушении хлорофилла окрашивают листья в желтый и оранжевый цвет.



**Структура лютеина**

**Материалы и оборудование.** Сухие или свежие листья, этиловый спирт, бензин, 20%-й раствор NaOH, 10%-й раствор соляной кислоты, ацетат меди. Конические колбы с обратным холодильником, водяные бани, штативы с пробирками, пипетки на 1 мл, конические колбочки, цветные карандаши.

**Порядок выполнения работы.**

### **Получение спиртового раствора (вытяжки) пигментов**

Обычно пигменты из растительной ткани извлекают полярными растворителями (этиловый спирт, ацетон), которые разрушают связь хлорофиллов и ксантофиллов с липопротеидами пластид и тем самым обеспечивают их полное экстрагирование. Неполярные растворители (петролейный эфир, гексан, бензин и др.) не нарушают связи этих пигментов с белками и потому не могут их извлечь из свежих листьев. Для получения вытяжки пигментов используют как сырой, так и сухой материал.

При получении вытяжки пигментов из свежего растительного материала листья растений необходимо измельчить, поместить в ступку, добавить на кончике скальпеля CaCO<sub>3</sub> (для нейтрализации кислот клеточного сока) и немного чистого кварцевого песка. Тщательно растереть, приливая понемногу этилового спирта, смазать носик ступки с наружной стороны вазелином и слить полученный темно-зеленый раствор по стеклянной палочке в воронку с бумажным фильтром и отфильтровать.

Для экстрагирования пигментов из сухого материала высушенные листья помещают в коническую колбу на 200 мл и ошпаривают кипятком для лучшего извлечения пигментов, затем воду сливают. В колбу приливают 100 мл этилового спирта, закрывают ее корковой пробкой с обратным холодильником и ставят в баню с кипящей водой для экстрагирования пигментов. После пятиминутного кипячения содержимое колбы охлаждают, и

раствор осторожно сливают в другую колбу. Экстракт используют в последующих опытах.

### Разделение пигментов по Краусу

Метод основан на различной растворимости пигментов в спирте и бензине. Указанные растворители в одном сосуде не смешиваются, а образуют две фазы – верхнюю бензиновую и нижнюю спиртовую, благодаря чему разделяются компоненты смеси пигментов.

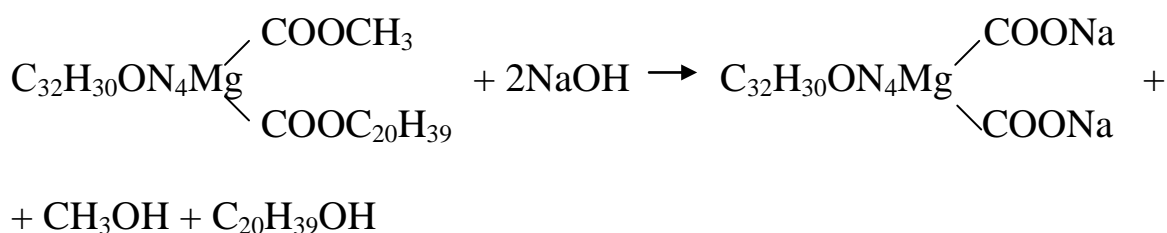
В пробирку наливают 2-3 мл спиртового экстракта пигментов, добавляют 3-4 мл бензина. Содержимое пробирки сильно встряхивают, предварительно закрыв ее пробкой, и оставляют отстояться. По мере расслоения эмульсии бензиновый слой будет окрашиваться в зеленый цвет из-за лучшей растворимости в нем хлорофиллов. В бензин переходит и каротин, но его окраска маскируется окраской хлорофилла. Ксантофилл остается в спиртовом слое и придает ему золотисто-желтую окраску.

Если пигменты разделяются недостаточно четко, добавляют три-четыре капли воды и снова встряхивают. При избытке воды возможно помутнение нижнего слоя. В этом случае следует прилить немного этилового спирта и взболтать содержимое пробирки.

Зарисовывают окраску слоев и указывают распределение пигментов.

### Омыление хлорофилла щелочью

Обрабатывая хлорофилл щелочью, можно вызвать омыление эфирных групп, т.е. отщепление остатков метилового спирта и фитола:



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

В пробирку с 2-3 мл спиртового раствора пигментов приливают 1 мл 20 %-го раствора NaOH и взбалтывают. После смешивания экстракта со щелочью пробирку ставят в кипящую водяную баню. Образующаяся при этом соль хлорофиллиновой кислоты сохраняет зеленую окраску и оптические

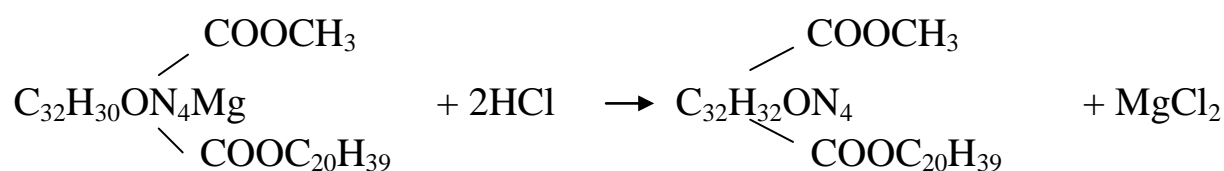
свойства хлорофилла, но отличается от него большей гидрофильностью. Как только раствор закипит, пробирку вынимают и охлаждают. К охлажденному раствору добавляют равный объем бензина и несколько капель воды для лучшего разделения смеси. Затем содержимое пробирки резко встряхивают и дают отстояться.

В бензиновый слой переходят каротин и ксантофилл, а в спиртовой – натриевая соль хлорофиллиновой кислоты.

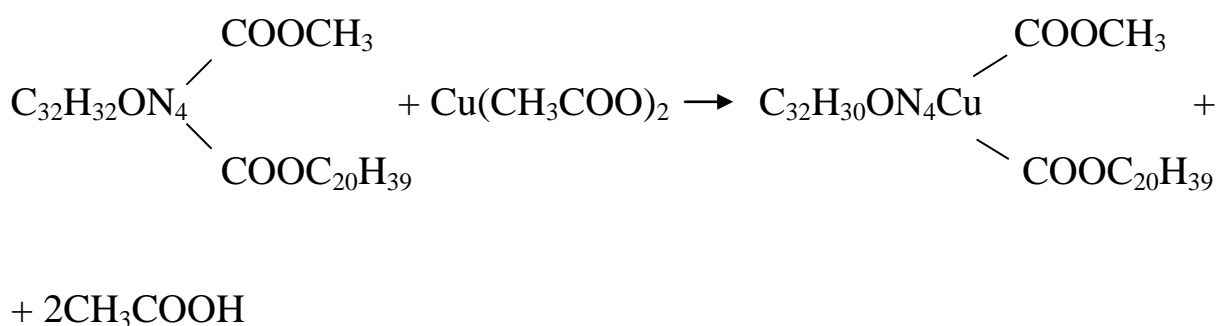
Зарисовывают окраску слоев и указывают распределение пигментов.

### Получение феофитина и обратное замещение водорода атомом металла

Атом магния сравнительно слабо удерживается в порфириновом ядре хлорофилла и при осторожном воздействии сильных кислот легко замещается двумя протонами с образованием феофитина бурого цвета:



Если на феофитин действовать солями меди, цинка или ртути, то вместо двух протонов в ядро входит соответствующий металл и продукты реакции окрашиваются в зеленый цвет. Однако полученная окраска несколько отличается от окраски хлорофилла:



Следовательно, цвет хлорофиллов обусловлен металлорганической связью в их молекулах. Обратное введение магния в феофитин происходит с большим трудом. В две пробирки берут по 2-3 мл спиртовой вытяжки пигментов и добавляют по одной-две капли 10%-го раствора соляной кислоты. При взбалтывании зеленая окраска хлорофилла переходит в бурую, характерную для феофитина. Одну пробирку с феофитином оставляют для

контроля, а во вторую вносят несколько кристаллов ацетата меди и нагревают раствор на водяной бане до кипения. По мере нагревания бурый цвет раствора меняется на зеленый в результате образования хлорофиллоподобного производного меди.

Зарисовывают окраску феофитина и медьпроизводного хлорофилла.

## Работа 22. НАБЛЮДЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПИГМЕНТОВ

**Общие сведения.** В процессе фотосинтеза световая энергия перед преобразованием в химическую поглощается пигментами. Пигменты, локализованные в пластидах, поглощают свет видимой части спектра (380-720 нм), чем обусловлено название излучения этой области спектра (фотосинтетически активная радиация, или ФАР). Пигменты поглощают видимый свет не полностью, а избирательно, т.е. каждый пигмент имеет свой характерный спектр поглощения. В частности, важнейшая особенность спектра поглощения хлорофилла *a* и *b* – наличие у них двух ярко выраженных максимумов: в красной области – соответственно 660 и 640 нм и в сине-фиолетовой – 430 и 450 нм (рис. 7). Минимум поглощения лежит в зоне зеленых лучей. Этим и объясняется зеленая окраска пигментов. В живом листе у хлорофиллов более широкий и выровненный спектр поглощения. Так, красный максимум поглощения хлорофилла *a* в хлоропласте имеет несколько пиков: 670, 683, 700, 710 нм; у хлорофилла *b* он приходится на длины волн 650-655 нм. Аналогичное смещение в сторону длинноволновой части характерно и для синего максимума. Указанные различия между спектрами поглощения хлорофиллов в растворе и листе обусловлены степенью агрегации молекул пигмента и характером их связи с липопротеиновым комплексом в ламеллах тилакоидов.

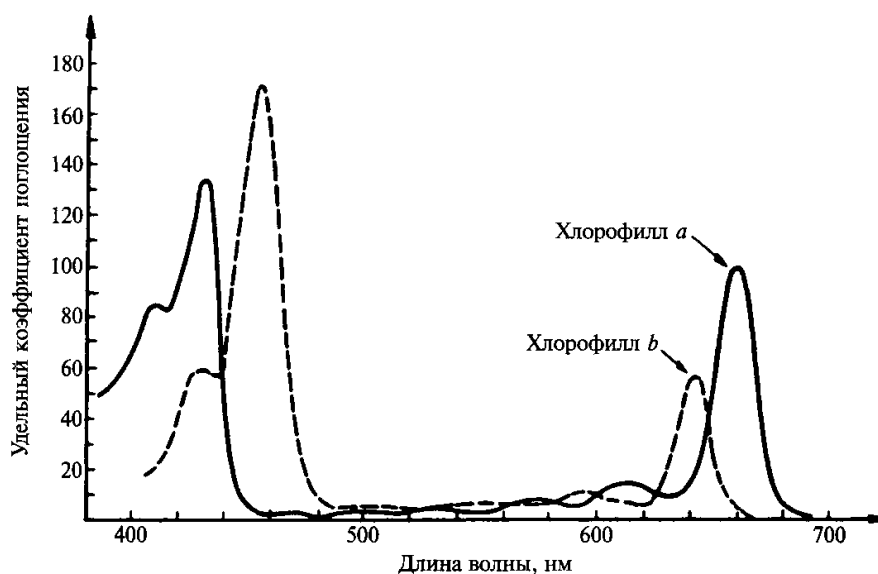
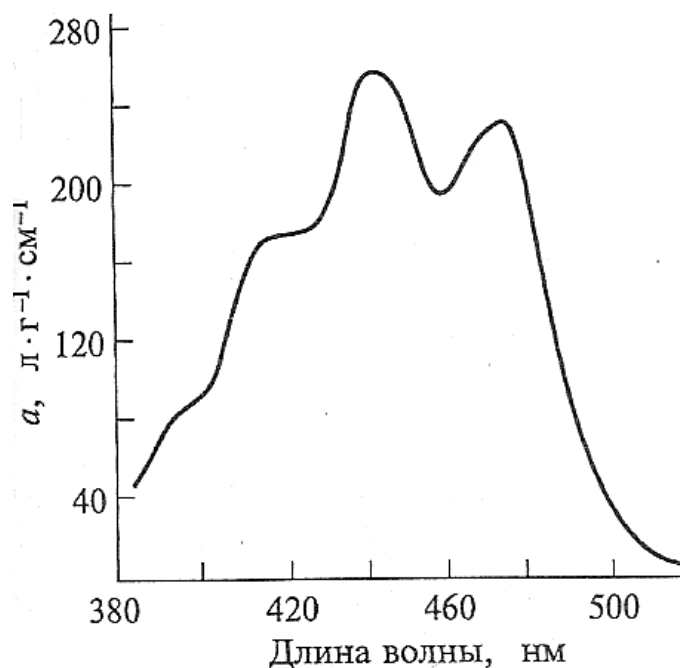


Рис. 7. Спектры поглощения хлорофиллов *a* и *b*

Каротины и ксантофиллы поглощают свет только сине-фиолетовой части спектра (рис. 8). Оптические свойства пигментов определяются особенностями их химической структуры. В молекулах хлорофиллов и каротиноидов существует система конъюгированных (сопряженных) двойных связей. Скелет системы составляют атомы углерода, соединенные между собой простыми (двухэлектронными) ковалентными связями –  $\sigma$ -электронами. В образовании двойных связей, помимо  $\sigma$ -электронов, участвуют два  $\pi$ -электрона. В подобных системах  $\pi$ -электроны не связаны с определенными атомами углерода, поэтому могут перемещаться по всей молекуле, образуя делокализованное электронное облако. Возбуждение  $\pi$ -электронов может осуществляться за счет квантов видимого света.



**Рис. 8. Спектр поглощения лютеина в органических растворителях**

В молекулах хлорофилла и каротиноидов система конъюгированных двойных связей определяет поглощение сине-фиолетовых лучей. Для хроматофорных свойств хлорофиллов большое значение имеет также гидрирование связи между атомами углерода в положении седьмого и восьмого атомов углерода четвертого пиррольного кольца. В частности, оно приводит к появлению полосы поглощения в красной части спектра и ослабляет поглощение желто-зеленых лучей. И, наконец, присутствие магния в ядре обуславливает еще большее усиление поглощения в красной области и ослабление – в зеленой.

Для установления спектра поглощения пигментов используют спектроскоп. В него одновременно поступают два световых потока. Один идет непосредственно от источника света и проходит через кювету с пигментом, а потом разлагается призмой на составные части, другой отражается зеркалом в

боковую щель, где попадает на грань второй призмы. В результате возникают два параллельных спектра, расположенных один над другим. Спектр отраженного от зеркала света служит контролем. По положению темных полос в опытном спектре определяют, какие лучи поглощаются исследуемым пигментом.

**Материалы и оборудование.** Спиртовая вытяжка пигментов листа, раствор каротина и ксантофилла (бензиновый слой, полученный после омыления хлорофилла). Пипетки на 1 мл, спектроскопы.

**Порядок выполнения работы.**

### **Определение спектра поглощения хлорофилла**

Спектроскоп устанавливают по отношению к свету так, чтобы все области спектра имели одинаковую яркость. В кювету наливают спиртовую вытяжку хлорофилла, помещают ее перед щелью спектроскопа и определяют положение темных полос, которые соответствуют лучам, поглощаемым хлорофиллом.

Ширина полос зависит от концентрации пигмента или толщины слоя его раствора. Для наблюдения спектров поглощения растворов с разной концентрацией хлорофилла разбавляют вытяжку спиртом в отношениях 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 и т.д. и исследуют оптические свойства полученных растворов. По окончании опыта делают заключение о зависимости спектра поглощения хлорофилла от концентрации его раствора и объясняют установленный факт.

### **Спектры поглощения каротина и ксантофилла**

Для получения спектра поглощения каротиноидов пипеткой осторожно берут бензиновый раствор, в который перешли каротин и ксантофилл после омыления хлорофилла, переносят его в кювету и помещают перед щелью спектроскопа. Рассматривают спектр поглощения и сравнивают его со спектром поглощения хлорофилла. Зарисовывают оба спектра.

### **Флуоресценция хлорофилла**

Флуоресценция – испускание света возбужденной молекулой хлорофилла. Суть явления в следующем. При комнатной температуре и в темноте молекула хлорофилла находится в основном состоянии, т.е. энергия ее соответствует нижнему синглетному уровню ( $S_0$ ). Поглощение кванта света

сопровождается переходом одного из  $\pi$ -электронов на более высокий энергетический уровень. В результате возникает синглетное электронно-возбужденное состояние молекулы.

Синглетным называют такое возбужденное состояние, при котором переход электрона на более высокий энергетический уровень не сопровождается изменением знака спина. В спектрах поглощения ему соответствует одна линия. Если при этом поглощается квант красного света, то электрон переходит на первый синглетный уровень ( $S_1$ ) с энергией 1,7 эВ и временем жизни  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  с. В случае захвата кванта синего света электрон оказывается на втором синглетном уровне ( $S_2$ ) с энергией 2,9 эВ, а время жизни электрона в таком состоянии уменьшается до  $10^{-12}$ - $10^{-13}$  с.

Независимо от того, в какое электронно-возбужденное состояние молекула была переведена поглощенным квантом, она, в конечном счете переходит на низший колебательный подуровень первого синглетного возбужденного состояния ( $S_1$ ). Энергия этого состояния может использоваться на осуществление фотохимических процессов, мигрировать от одной молекулы хлорофилла к другой, растрачиваться в виде тепла или флуоресцентного излучения. В последнем случае электрон возвращается в исходное положение.

Таким образом, независимо от длины возбуждающего света хлорофилл флуоресцирует только в красной части спектра. Уменьшение энергии кванта, излученного возбужденной молекулой, по сравнению с энергией поглощенного кванта получило название стоковского сдвига.

Флуоресцируют только хлорофилл *a* и хлорофилл *b*, каротиноиды не обладают этой способностью. В живом листе основным флуоресцирующим пигментом служит хлорофилл *a*. При этом в листьях флуоресценция выражена гораздо слабее, чем в растворе, так как часть поглощенной энергии используется на сенсбилизацию фотохимических реакций. Поэтому возрастание интенсивности фотосинтеза, как правило, влечет за собой ослабление флуоресценции. Изучение флуоресценции дает ценные сведения не только об использовании энергии в фотохимических процессах, но и о характере взаимодействия молекул различных пигментов в ламеллах тилакоидов хлоропласта, миграции энергии в фотосистемах и пр.

Для определения флуоресценции спиртовую вытяжку пигментов или раствор хлорофилла в бензине, полученный при разделении пигментов по Краусу, помещают на темную бумагу у источника освещения и рассматривают в отраженном свете. Вытяжка хлорофилла будет темно-красного цвета.

Флуоресценцию можно наблюдать и в живом листе. Для этого берут водяной мох *Fontinalis* или элодею канадскую (*Elodea canadensis* Michx.), помещают объект на предметный столик микроскопа и освещают синевioletовыми лучами, под действием которых зеленые пластиды начинают светиться красным светом.

## **Работа 23. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ**

**Общие сведения.** Хлорофилл и каротиноиды – важнейшие компоненты фотосинтетического аппарата листьев. Количественное их содержание в листьях зависит от жизнедеятельности организма, его генетической природы. Поэтому оно может быть использовано как физиологический показатель, характеризующий онтогенетические, возрастные и генетические особенности растений. Количество пигментов отражает и реакцию растительного организма на условия произрастания. Поэтому при физиологических исследованиях часто возникает необходимость проследить за динамикой содержания хлорофилла и каротиноидов в отдельных органах.

Для извлечения пигментов из листьев применяют полярные растворители (этиловый спирт, ацетон) или смесь полярных и неполярных (петролейный эфир, гексан, бензин, бензол) растворителей. Выбор растворителя зависит от условий опыта и объекта исследования. Наиболее часто используют этиловый спирт и ацетон.

Пигменты лучше всего экстрагировать из свежего растительного материала, но можно и из фиксированного. В последнем случае надежным способом служит замораживание тканей с последующей лиофилизацией (лиофильная сушка). Недопустимо фиксирование растительного материала сухим жаром в сушильном шкафу, поскольку постепенное повышение температуры сопровождается усилением гидролитических процессов, и в том числе гидролиза хлорофилла. Фиксированные листья помещают в эксикатор и хранят в темном и прохладном месте. При работе с сухим материалом используют 80%-й раствор ацетона или 90%-й раствор этилового спирта.

Вытяжку используют для количественного анализа. Концентрацию пигментов определяют при помощи фотоэлектроколориметра или спектрофотометра. Фотоэлектроколориметром можно определить концентрацию хлорофиллов в спиртовой или ацетоновой вытяжке, содержащей все пигменты, не отделяя их от каротиноидов. Это возможно, потому что для хлорофиллов в отличие от каротиноидов характерно поглощение и в красной части спектра.



Количество каротиноидов в смеси с хлорофиллами можно определить только на спектрофотометре. Для более тонкого количественного анализа пигментной системы листьев предварительно осуществляют ее разделение хроматографическим методом. Содержание пигментов выражают: в миллиграммах на единицу сырой или сухой массы (на 1 г), в процентах сырой (сухой) массы и на единицу площади листьев ( $\text{дм}^2$ ).

**Материалы и оборудование.** Листья растений, 85%-й раствор ацетона, кварцевый песок,  $\text{CaCO}_3$ , вазелин. Весы, ножницы, ступки с пестиками, мерные колбы на 25 мл, воронки, стеклянные палочки, спектрофотометр.

### **Порядок выполнения работы.**

#### **Получение ацетоновой вытяжки**

Навеску листьев (0,1-0,15 г) помещают в фарфоровую ступку, добавляют немного диоксида кальция, промытого кварцевого песка и растирают с 2-3 мл 85%-го раствора ацетона. К растертой массе добавляют 4-5 мл ацетона и снова растирают несколько минут. После отстаивания раствора экстракт осторожно сливают по палочке в воронку фильтром. Экстракцию небольшими порциями чистого растворителя повторяют до тех пор, пока пигменты не будут извлечены полностью. Затем фильтрат переливают через сухую стеклянную воронку в мерную колбочку на 25 мл. Далее содержимое колбочки доводят растворителем до метки, закрывают каучуковой пробкой, тщательно взбалтывают и используют для определения концентрации пигментов.

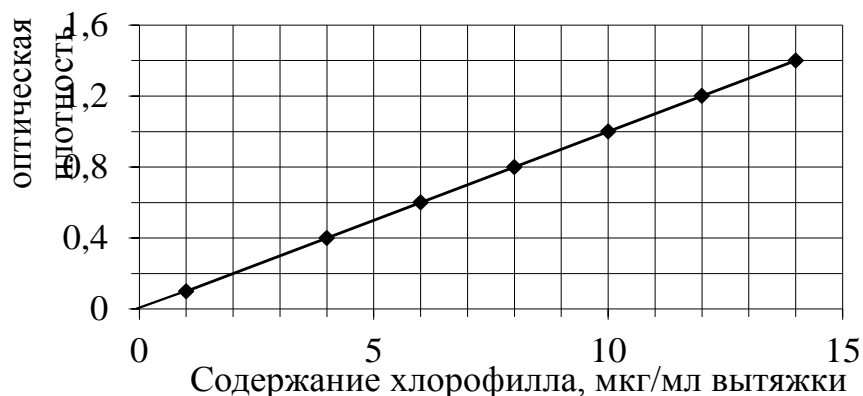
Анализ пигментов выполняют при комнатной температуре на рассеянном свете, так как при сильном освещении может произойти фотоокисление хлорофилла. Хранить вытяжку можно в темном холодном месте.

#### **Определение концентрации хлорофилла на фотоэлектрокалориметре**

Для определения концентрации пигментов используют красный светофильтр (650 нм) и кюветы шириной 10 мм. Оптическую плотность экстракта, определяют относительно чистого растворителя (ацетона). Результаты получаются надежными при показаниях ФЭКа от 0,1 до 0,4. Если оптическая плотность выше 0,5, то вытяжку следует разбавить. Если же показания ФЭКа меньше 0,08, работу следует повторить с самого начала, взяв большую навеску.

Показания ФЭКа переводят в величины концентрации, используя калибровочный график.

Для построения калибровочного графика готовят серию стандартных растворов хлорофилла возрастающей концентрации и находят оптическую плотность каждого из них. Затем строят график. На оси абсцисс откладывают значения концентрации, а на оси ординат – соответствующие им значения оптической плотности (рис. 9). Точки пересечения соединяют и получают калибровочный график.



**Рис. 9. Пример построения калибровочного графика**

Стандартные растворы готовят в мерных колбочках на 25 мл; концентрацию исходного раствора хлорофилла обычно определяют на спектрофотометре. В качестве стандартного можно использовать также раствор Гётри. Кюветы должны быть той же рабочей длины, что и при определении оптической плотности исследуемого раствора.

Концентрацию хлорофилла выражают в процентах массы сырых листьев. Расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot B}{A},$$

где В – количество хлорофилла в вытяжке, мг; А – масса сырых листьев, взятых для анализа, мг; 100 – коэффициент для выражения в процентах.

Результаты опыта записывают в таблицу 14 по приведенной форме.

#### **14. Определение содержания хлорофилла на фотоэлектрокалориметре**

№ п/п	Навеска листьев, мг	Объем вытяжки, мл	Показания ФЭКа	Количество хлорофилла по калибровочной кривой (мг на 25 мл)	Содержание хлорофилла, % массы сырых листьев

## Определение концентрации хлорофилла и каротиноидов на спектрофотометре

Спектрофотометрический анализ – наиболее точный количественный метод определения содержания пигментов листа. Концентрация пигментов на спектрофотометре определяется по оптической плотности. Плотность экстракта на спектрофотометре измеряют при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов *a* и *b* в красной области спектра и при длине волны абсорбционного максимума каротиноидов. При этом учитывают, что положение максимума поглощения несколько меняется в зависимости от используемого растворителя. Концентрацию пигментов рассчитывают по уравнениям:

для 100%-го ацетона (по Хольму-Ветштейну):

$$C \text{ хл.}a = 9,784 D_{662} - 0,990 D_{644};$$

$$C \text{ хл.}b = 21,426 D_{644} - 4,650 D_{662};$$

$$C \text{ хл.}a + \text{хл.}b = 5,134 D_{662} + 20,436 D_{664};$$

$$C \text{ кар.} = 4,695 D_{440,5} - 0,268 C \text{ хл.}a + \text{хл.}b$$

для 85%-го ацетона (по Реббелену):

$$C \text{ хл.}a = 10,3 D_{663} - 0,918 D_{644};$$

$$C \text{ хл.}b = 19,7 D_{644} - 3,87 D_{663};$$

$$C \text{ хл.}a + \text{хл.}b = 6,4 D_{663} + 18,8 D_{664};$$

$$C \text{ кар.} = 4,75 D_{452,5} - 0,226 C \text{ хл.}a + \text{хл.}b$$

для 80%-го ацетона (по Вернону):

$$C \text{ хл.}a = 11,63 D_{665} - 2,39 D_{649};$$

$$C \text{ хл.}b = 20,11 D_{649} - 5,18 D_{665};$$

$$C \text{ хл.}a + \text{хл.}b = 6,45 D_{665} + 17,7 D_{649};$$

для 96%-го раствора этанола:

$$C \text{ хл.}a = 13,70 D_{665} - 5,76 D_{649};$$

$$C \text{ хл.}b = 25,80 D_{649} - 7,60 D_{665};$$

$$C \text{ хл.}a + \text{хл.}b = 6,10 D_{665} + 20,04 D_{649} = 25,1 D_{654};$$

для этилового эфира:

$$C \text{ хл.}a = 9,93 D_{660} - 0,78 D_{642,5};$$

$$C \text{ хл.}b = 17,6 D_{642,5} - 2,81 D_{660};$$

$$C \text{ хл.}a + \text{хл.}b = 7,12 D_{660} + 16,8 D_{642,5};$$

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

Результаты опыта записывают в таблицу 15 по приведенной форме.

## 15. Определение концентрации хлорофиллов и каротиноидов

№ п/п	Навеска листьев, мг	Объем вытяжки, мл	Оптическая плотность			Содержание пигментов, % массы сырых листьев			
			D <sub>663</sub>	D <sub>644</sub>	D <sub>452,5</sub>	хлорофилл <i>a</i>	хлорофилл <i>b</i>	хлорофилл <i>a</i> + хлорофилл <i>b</i>	каротиноиды
1.									

Определив концентрацию пигмента, находят его содержание в опытном материале по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot B}{A},$$

где В – количество хлорофилла в вытяжке, мг; А – масса сырых листьев, взятых для анализа, мг; 100 – коэффициент для выражения в процентах.

Содержание хлорофилла в листьях растений составляет в среднем около 0,3% сырой массы (0,1-0,7%). При расчете на 1 дм<sup>2</sup> листовой поверхности количество хлорофилла варьирует в пределах 0,7-0,8 мг. каротиноидов в листьях примерно в три-восемь раз меньше, чем хлорофилла.

## Работа 24. РАЗДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

**Общие сведения.** Метод хроматографического разделения хлорофиллов был впервые разработан русским физиологом Михаилом Семеновичем Цветом и представлен в магистерской диссертации «Физико-химическое строение хлорофильного зерна», защита которой состоялась в 1901 г. в Казанском университете.

Метод бумажной хроматографии основан на распределении пигментов между целлюлозой хроматографической бумаги и подвижной фазой – растворителями. Когда по бумаге под действием капиллярных сил движутся растворители, молекулы пигментов, нанесенные на бумагу, распределяются между двумя фазами в соответствии с коэффициентом распределения. Чем выше растворимость пигмента в подвижной фазе, тем дальше он продвигается по бумаге вместе с растворителем, и наоборот.

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

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

Хроматографирование выполняют в герметично закрытых сосудах, где поддерживают насыщенную парами растворителей атмосферу, что предотвращает их испарение с бумаги. Для эффективного разделения пигментов толщина бумаги должна быть равномерной, а сама бумага – обладать достаточной плотностью.

При хроматографировании получают пять полос пигментов, хорошо отделенных друг от друга, в такой последовательности (от стартовой линии): хлорофилл *b*, хлорофилл *a*, виолаксантин, лютеин и каротины.

**Материалы и оборудование.** Листья растений, ацетон, бензин, бензол, хлороформ, изопропиловый спирт, хлорид натрия (насыщенный раствор), сульфат натрия прокаленный, вазелин,  $\text{CaCO}_3$ , кварцевый песок. Весы, ножницы, ступки с пестиками, пробирки или колбочки на 25 мл, воронки, фильтры, фарфоровые чашки, пипетки, хроматографические колонки, полоски хроматографической бумаги размером 3x25 см, вентилятор или фен, штативы для пробирок, предметные стекла, линейки, карандаши.

### **Порядок выполнения работы.**

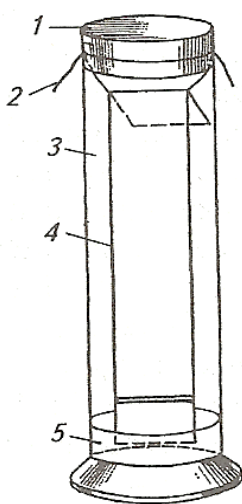
#### **Получение вытяжки**

Для анализа отбирают зеленые листья. Величина навески может меняться в зависимости от содержания пигментов.

Отвешенную пробу быстро измельчают ножницами, переносят в фарфоровую ступку и тщательно растирают с чистым кварцевым песком или толченым стеклом. Предварительно в ступку вносят немного  $\text{CaCO}_3$  для нейтрализации кислот клеточного сока. Затем приливают 3-4 мл ацетона и продолжают. Полученный экстракт сливают по палочке в сухую чистую колбочку на 25 мл.

## Разделение пигментов

Полученный экстракт пигментов наливают в фарфоровую чашку. Берут полоску хроматографической бумаги размером 3x25 см и на один из концов пипеткой наносят 0,5 мл экстракта пигментов (в виде узкой полосы). Для анализа необходим сравнительно большой объем раствора, поэтому наносить раствор надо в несколько приемов: каждую следующую порцию после подсушивания предыдущей в токе воздуха от вентилятора или фена. После этого погружают кончик бумажной полоски в ацетон, чтобы все пигменты поднялись на 1-1,5 см.



**Рис. 10. Общий вид сосуда для восходящей хроматографии:**

- 1 – корковая пробка;
- 2 – нитка;
- 3 – стеклянный сосуд;
- 4 – хроматографическая бумага;
- 5 – смесь растворителей

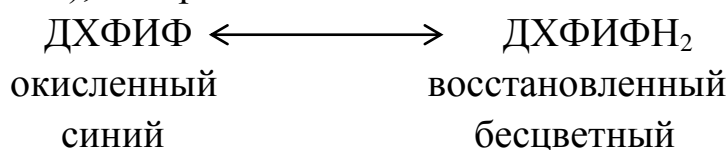
Хроматограмму вынимают из цилиндра и просушивают при помощи вентилятора или фена.

Затем обводят простым карандашом зоны с соответствующими пигментами. Вклеивают полученную хроматограмму в тетрадь, подписывают пигменты и делают вывод о причинах разделения пигментов на бумаге.

### Работа 25. ВЫДЕЛЕНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ И РЕАКЦИЯ ХИЛЛА

**Общие сведения.** В 1939 г. Роберт Хилл, работая в Кембридже, обнаружил, что изолированные хлоропласты способны высвобождать кислород в присутствии окислителя (акцептора электронов). С тех пор эту реакцию называют реакцией Хилла. Природный акцептор электронов – НАДФ

– можно заменить другими окислителями (они получили название окислителей Хилла). Один из них – голубой краситель ДХФИФ (2,6-дихлорфенолиндифенол), который обесцвечивается после восстановления:



**Материалы и оборудование.** Листья гороха, 0,05 М фосфатный буфер, рН 7,0; среда для выделения; раствор ДХФИФ (реакционная среда). Ножницы, предварительно охлажденная ступка с пестиком, марля, воронки для фильтрования, водяная баня со льдом и солью, стеклянные палочки, пробирки, центрифужные пробирки, центрифуга.

**Порядок выполнения работы.** Навеску листьев гороха (4 г) измельчить ножницами в ступке, погруженной в лед. Залить в ступку охлажденную среду для выделения (20 мл). **Вся посуда и среда выделения должны быть охлажденными!!!**

**Быстро растереть листья в ступке.**

Положить в воронку 4 слоя марли, смочив холодной средой выделения.

Профильтровать гомогенат через воронку в цилиндр. Собрать края марли вместе и тщательно отжать в цилиндр. Цилиндр должен находиться в воде со льдом.

Разделить содержимое цилиндра поровну в две центрифужные пробирки и центрифугировать 5 минут.

Слить надосадочную жидкость. Налить в одну пробирку 2 мл среды выделения и расуспендировать осадок с помощью стеклянной палочки. Полученную суспензию перелить во вторую пробирку и повторить расуспендирование. Все проводить на льду.

Полученную суспензию хлоропластов держать на льду и использовать для изучения реакции Хилла. Раствор ДХФИФ должен быть комнатной температуры. Необходимо подготовить 4 пробирки и налить в них соответственно:

1) 0,5 мл суспензии хлоропластов + 5 мл раствора ДХФИФ;

2) 0,5 мл суспензии хлоропластов + 5 мл раствора ДХФИФ;

3) 0,5 мл суспензии хлоропластов + 5 мл раствора ДХФИФ;

4) 0,5 мл суспензии хлоропластов + 5 мл дистиллированной воды. Эта пробирка служит цветным стандартом: она покажет, какой должна быть окраска суспензии после полного восстановления ДХФИФ.

Поставьте красный светофильтр (640-680 нм) на ФЭКе. Сначала измерьте оптическую плотность в пробирке № 2, в качестве контроля используют среду выделения. Оставьте пробирку до окончания опыта.

Далее взять в качестве контроля пробирку № 4. Приготовьте пробирки № 1 и 3 и снимите показания ФЭКа. Затем пробирку № 3 поставьте в темноту, а № 1 – на яркий свет. Дальнейшие измерения с пробиркой № 1 проводить через 1 мин в течение 4-5 мин.

Построить график зависимости оптической плотности от времени освещения.

Как только реакция закончится, т.е. произойдет полное обесцвечивание ДХФИФ в пробирке № 1, измерить оптическую плотность в пробирке № 3.

Самопроизвольное восстановление красителя можно оценить по пробирке № 2. Для этого снова измерить оптическую плотность этого варианта после окончания опыта.

## Работа 26. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА

**Общие сведения.** На долю органических соединений, создаваемых в ходе фотосинтеза, приходится около 85% общей биомассы растительного организма. Поэтому изменение сухой массы может довольно объективно отражать ассимиляционную деятельность растений. Именно этот показатель положен 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 ( $m^2$ ). Ее учитывают периодическим отбором проб растений, у которых определяют общую массу, массу отдельных органов и площадь листьев. Далее «нетто-ассимиляцию» [ $г/(m^2 \cdot сут)$ ] рассчитывают по формуле

$$\text{ЧПФ} = \frac{B_2 - B_1}{0,5(L_1 + L_2) \cdot n},$$

где  $B_1$  и  $B_2$  – сухая масса растений в начале и в конце учетного периода;  $(B_2 - B_1)$  – прирост сухой массы за  $n$  дней;  $L_1$  и  $L_2$  – площади листьев в начале и в конце периода,  $m^2$ ;  $0,5(L_1 + L_2)$  – средняя рабочая площадь листьев за время опыта;  $n$  – период между двумя наблюдениями, дней.

При использовании формулы допускают, что листовая поверхность за время наблюдения нарастает равномерно. В действительности в большинстве случаев площадь листьев увеличивается неравномерно. В связи с этим зарубежными исследователями предложена иная формула для определения чистой продуктивности фотосинтеза:

$$\text{ЧПФ} = \frac{(B_2 - B_1)(\ln L_2 - \ln L_1)}{(L_2 - L_1) \cdot n},$$



где  $\ln L_2$  и  $\ln L_1$  – натуральные логарифмы показателей площадей листьев в начале и в конце учитываемого периода; остальные показатели те же, что и в предыдущее формуле.

Уравнение наиболее удовлетворительно выражает зависимость «нетто-ассимиляции» от прироста сухого вещества и динамики нарастания листовой поверхности, однако проще пользоваться первой формулой. Следует иметь в виду, что чем больше разрыв между пробами, тем менее точны результаты определения. Оптимальное время между пробами составляет 7-10 дней, в периоды интенсивного роста растений оно может быть сокращено до 5 дней.

Другой источник погрешностей метода связан с трудностью отбора проб растений, обусловленной большим разнообразием культур, ценозов и условий произрастания.

Невозможно точно учесть и изменения массы подземных частей, которые у некоторых растений служат основным местом накопления пластических веществ. Кроме того, часть фотосинтетически усвоенного углерода расходуется на дыхание и экзосмос. Наконец, в период физиологической зрелости растений наблюдается стабилизация массы сухого вещества, а с возрастом отмечается даже снижение количества биомассы в результате отмирания части листового аппарата и других органов растения. Однако скорость фотосинтеза у функционирующих листьев может не меняться очень слабо.

В данном случае показатель «нетто-ассимиляции» уже не будет отражать реальное состояние фотосинтетической активности растений. Перечисленные обстоятельства необходимо учитывать при использовании рассматриваемого метода. Метод определения «нетто-ассимиляции» эффективен при использовании фотосинтеза в природных условиях. Он позволяет получать ценный материал для изыскания наиболее рациональных путей повышения продуктивности культурных и естественных ценозов, прогнозирования и программирования урожаев, целесообразного географического размещения сельскохозяйственных растений.

Показатели чистой продуктивности фотосинтеза в природных условиях обычно колеблется от 0,1 до 20 г и более сухого вещества на  $1\text{ м}^2$  площади листьев в сутки: у злаков в фазе интенсивного роста – 40-50, у основных сельскохозяйственных культур при благоприятных условиях – 4-10 г/( $\text{м}^2 \cdot \text{сут}$ ).

**Материалы и оборудование.** Растения. Бюксы или металлические стаканчики, ножницы, бумага, технические и аналитические весы, термостат.

**Порядок выполнения 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 пятидесяти параллельных проб, каждая из которых состоит из 10-20 растений. В пробу включают все опавшие и засохшие листья и побеги. Отобранные растения помечают этикетками, заворачивают в бумагу и переносят для анализа в лабораторию, где быстро

разделяют на отдельные органы и каждую часть взвешивают. Пожелтевшие или отмершие листья учитывают отдельно.

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

Для нахождения содержания сухого вещества из растительной массы каждой части (%) берут две-три порции материала, помещают в бюксы (или металлические стаканчики), взвешивают и высушивают в термостате при 105 °С до постоянной массы. Затем рассчитывают содержимое сухого вещества и устанавливают массу абсолютно сухих частей, а в итоге общую сухую массу растений, взятых для исследования.

Площадь листьев определяют по одному из методов, описанных в работе 27. Определение следует выполнять быстро и только на зеленых листьях.

Через 7-10 дней таким же образом вновь отбирают растения и описанные определения повторяют. Чистую продуктивность фотосинтеза рассчитывают по формуле (См. с. 48-49).

Если 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 опыта записывают в таблицу 16 по приведенной форме.

### 16. Определение чистой продуктивности фотосинтеза

Дата наблюдения	Вариант опыта	Повторность	Число растений в пробе	Сырая масса, г				Сухая масса, г				Площадь листьев (S), см <sup>2</sup>	Чистая продуктивность фотосинтеза, г/(м <sup>2</sup> ·сут)	
				листьев	стеблей	соцветий	общая	листьев	стеблей	соцветий	общая			

### Работа 27. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛОЩАДИ ЛИСТЬЕВ

**Общие сведения.** При изучении интенсивности фотосинтеза, дыхания, транспирации чаще всего получаемые величины рассчитывают на единицу листовой поверхности, поэтому возникает необходимость ее измерения. Для определения листовой поверхности разработано множество методов и приемов. Рассмотрим некоторые из них.

**Материалы и оборудование.** Растения. Бумага, линейки, сверла, ножницы, торсионные или аналитические весы.

**Порядок выполнения работы.**

## Метод отпечатков

Лист растения накладывают на однородную бумагу и обводят контур остро отточенным карандашом. Получив отпечаток листа, определяют его площадь весовым методом.

Для этого вырезают бумагу по контуру листовой пластинки и взвешивают на торсионных или аналитических весах. Одновременно из такой же бумаги вырезают квадрат, например площадью  $100 \text{ см}^2$  ( $10 \times 10 \text{ см}$ ), и также определяют его массу. Площадь исследуемого листа находят по формуле

$$S = aC/b,$$

где  $a$  – масса контура листа, мг;  $b$  – масса квадрата бумаги, мг;  $C$  – площадь квадрата бумаги,  $\text{см}^2$ .

Описанный метод прост и достаточно точен, но малопроизводителен. Кроме того, его практически нельзя использовать при исследовании гофрированных и сложных листьев.

## Метод высечек

Этот наиболее доступный и продуктивный метод особенно ценен в полевых условиях. Суть его в следующем. Отбирают среднюю пробу растений, быстро срезают листья и определяют их массу. Затем из каждого листа выбирают пробочным сверлом определенного диаметра несколько высечек, объединяют их вместе и устанавливают массу. Диаметр сверла выбирают в зависимости от размеров листовой пластинки и ее поверхностной плотности. Площадь листьев определяют по формуле

$$S = ac/b,$$

где  $a$  – общая масса сырых листьев, г;  $b$  – общая масса сырых высечек, г;  $c$  – общая площадь высечек,  $\text{см}^2$ .

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

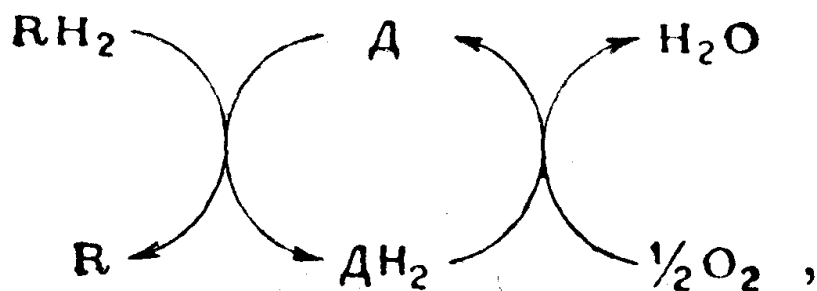
1. Что представляют собой фотосинтетические пигменты по химической природе?
2. Чем отличается хлорофилл  $a$  от хлорофилла  $b$ ?
3. Какими химическими и физическими свойствами обладают хлорофиллы?
4. Какие спектры поглощения имеют фотосинтетические пигменты?
5. Что такое флуоресценция? Что она доказывает?
6. Почему на свету изолированные хлоропласты способны осуществлять реакцию, в которой кислород выделяется, но  $\text{CO}_2$  не восстанавливается?
7. Что такое чистая продуктивность фотосинтеза?

## ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ

Все жизненные процессы, протекающие в растительном организме, связаны с затратой энергии. Рост, питание, размножение, обмен веществ, процессы синтеза и распада органических веществ, прорастание, передвижение и поглощение веществ и т.д. связаны с затратой энергии. Это обусловлено тем, что живая клетка представляет собой открытую энергетическую систему и жизненные процессы в ней протекают только при условии притока энергии извне. Для поддержания жизненных процессов у растений имеется 2 источника энергии: солнечная энергия, усваиваемая и запасаемая в процессе фотосинтетического фосфорилирования в АТФ. А также запасаемая в образуемых органических веществах в процессе фотосинтеза, в основном в углеводах, энергия которых используется растением в процессе их окисления, т.е. в процессе дыхания, при котором в митохондриях также она запасается в АТФ. Поэтому дыхание является процессом противоположным фотосинтезу и выражается следующим суммарным уравнением:



Дыхание – сложный многоступенчатый процесс биохимического преобразования органического вещества с выделением энергии для процессов жизнедеятельности. В процессе дыхания образуется также целый ряд промежуточных веществ, идущих на синтез белков, жиров и других веществ. Таким образом, процессы обмена веществ и энергии, происходящих в клетке, неразрывно связаны с дыханием. Дыхание протекает, в основном, в митохондриях, при котором дыхательный субстрат окисляется не кислородом, а отнятием водорода (дегидрированием) с участием ферментов дегидраз и уже окислением водорода до воды с участием цитохромной системы, фермента цитохромоксидазы и кислорода воздуха по схеме



где  $RH_2$  – дыхательный субстрат;  $D$  – дегидразы.

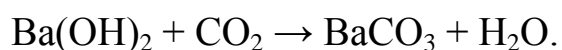
Часть образующихся в процессе дыхания восстановленных коферментов НАД могут использоваться на восстановление нитратов до аммиака, восстановительное аминирование кетокислот и т.д.

## Работа 28. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ДЫХАНИЯ ПО КОЛИЧЕСТВУ ВЫДЕЛЕНИЯ CO<sub>2</sub>

**Общие сведения.** Наиболее общим показателем скорости окисления является интенсивность дыхания (ИД), о котором можно судить по поглощению кислорода, количественному выделению углекислого газа и окисленного органического вещества. Интенсивность дыхания и его энергетическая эффективность зависит от физиологического состояния растений, внешних условий. В свою очередь, интенсивность дыхания может, в известной мере, быть показателем уровня физиологической активности тканей исследуемого растения.

**Материалы и оборудование.** Растительный материал различных частей растений или их физиологического состояния (проросшие и непроросшие семена, молодые и старые листья, листья и побеги, распускающиеся почки и побеги, цветки и листья и т.д.), 0,1 н. раствор барита, 0,1 н. раствор соляной или щавелевой кислоты, 1% раствор фенолфталеина. Весы, конические колбы на 250 мл с резиновыми пробками, и резиновые пробки с отверстием для титрования, нитки, марлевые мешочки или марлевые салфетки 15×15 см, бюретки для титрования, стеклянные воронки.

**Порядок выполнения работы.** Метод заключается в учете количества CO<sub>2</sub>, выделяемого органами растения при дыхании и поглощении его баритом. Процесс поглощения диоксида углерода баритом можно записать в виде уравнения:



Для этого в конические колбы на 250 мл с подогнанными резиновыми пробками по количеству изучаемых объектов быстро залить из колбы сифоном с зажимом по 10 мл 0,1 н. раствора Ba(OH)<sub>2</sub> и внести по 2 капли фенолфталеина, сразу закрыть плотно резиновыми пробками. Отвесить по 5-10 г исследуемого материала: молодые и старые листья, распускающиеся почки и побеги, проросшие и не проросшие семена, цветки и листья и др., поместить их в маршевые мешочки или марлевые салфетки 15×15 см, завязав их ниткой, оставив длинный конец. Подвесить мешочки в колбы так, чтобы они не касались раствора барита, закрепив их за конец нитки, прижав к стенке колбы пробкой. Записать время для каждой колбы, когда они были закрыты пробкой. При использовании корковых пробок, необходимо заливать их парафином. Аналогично подготовить и контрольную колбу, в которую тоже налить 10 мл барита и 2 капли фенолфталеина, закрыть плотно пробкой. Колбы с объектами, содержащими хлорофилл, необходимо на все время опыта поместить в темноту для исключения процесса фотосинтеза. Время от времени колбы следует осторожно покачивать, чтобы разрушать пленку BaCO<sub>3</sub>, препятствующую полноте поглощения CO<sub>2</sub>, не допуская попадания ни

одной капли раствора на мешочек с материалом. Через 30 минут вынуть материал, быстро закрыть колбу пробкой и отметить время окончания опыта. Провести титрование оставшейся щелочи, приливая из бюретки каплями через отверстие в пробке 0,1 н. щавелевую или соляную кислоту до исчезновения розового окрашивания. Чтобы избежать уменьшения концентрации раствора барита из-за поглощения углекислоты из воздуха, следует провести титрование колб, используя для титрования пробку с отверстием. Контрольную колбу можно титровать через 20 минут после наливания раствора барита.

Результаты опыта записывают в таблицу 17 по приведенной форме.

### 17. Интенсивность дыхания

Объект	Навеска, г	Объем Ва(ОН) <sub>2</sub> , мл	Время опыта			Расход 0,1 н. НСl, мл		Поправка к титру НСl	Интенсивность дыхания, мг/г/ч
			начало	конец	продолжительность опыта, мин	контроль	опыт		

Интенсивность дыхания определяется количеством выделенного мг СО<sub>2</sub> на г растительной массы за час, по формуле:

$$\text{ИД} = \frac{(a - b) \cdot K \cdot 2,2 \cdot 60}{p \cdot t} \text{ мг/г/час,}$$

где  $a$  – количество 0,1 н соляной или щавелевой кислоты, израсходованной на титрование барита в контрольной колбе;  $b$  – результат титрования опытной колбы;  $K$  – поправка к титру соляной или щавелевой кислоты; 2,2 – количество мг СО<sub>2</sub>, эквивалентное 1 мл 0,1н соляной или щавелевой кислоты;  $p$  – масса растительного материала, г;  $t$  – продолжительность опыта в минутах; 60 – для перевода времени на час.

Сделать выводы об интенсивности дыхания различных органов растения в зависимости от их физиологического состояния.

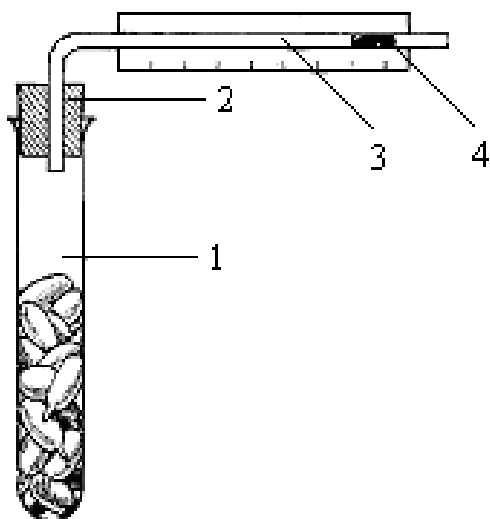
## Работ 29. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОГО КОЭФФИЦИЕНТА ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН

**Общие сведения.** Дыхательный коэффициент (ДК) – это объемное или молярное отношение  $\text{CO}_2$ , выделенного при дыхании, к поглощенному за это время  $\text{O}_2$  ( $\text{CO}_2/\text{O}_2$ ). ДК служит характеристикой калорийности субстрата, т.е. его энергоемкости. Степень энергоемкости зависит от вида дыхательного субстрата и степени его окисленности. При дыхании могут использоваться жиры, белки, углеводы и органические кислоты. Чем больше окислен материал, тем меньше поглощается кислорода воздуха, а значит и меньше выделяется энергии. Поэтому, при нормальном доступе кислорода величина ДК зависит от субстрата дыхания. Если в процессе дыхания используется углеводы, то ДК равен единице. Это видно из уравнения  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2$ , в котором отношение  $6\text{CO}_2/6\text{O}_2$  равно 1. При окислении жирных кислот и белков ДК будет меньше единицы. Они менее насыщены кислородом, и на их окисление идет больше  $\text{O}_2$ . Например, окисление масляной кислоты  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH} + 5\text{O}_2 \rightarrow 4\text{H}_2\text{O} + 4\text{CO}_2$ , имеет отношение  $4\text{CO}_2/5\text{O}_2$  равное 0,8, т.е. меньше единицы.

При использовании более окисленных органических кислот, например щавелевоуксусной кислоты, ДК больше единицы:  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5 + 2,5\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{CO}_2$ , соотношение  $4\text{CO}_2/2,5\text{O}_2$  равно 1,6. Поэтому, как более калорийный субстрат для дыхания, в качестве запасного вещества жиры составляют более 80% видов растений. Жиры обладают и другими преимуществами: низкий удельный вес, не гигроскопичность.

**Материалы и оборудование.** Наклюнувшиеся семена (подсолнечника, клещевины, гороха, пшеницы), 20-ный% раствор КОН, окрашенная вода в химическом стаканчике. Прибор, состоящий из пробирки с хорошо притертой резиновой пробкой, в которую вставлена изогнутая под прямым углом тонкая стеклянная трубка; горизонтальное колено трубки градуируют, прикрепляя к ней при помощи резиновых колечек полоску миллиметровой бумаги. Штатив для пробирок, фильтровальная бумага, фарфоровые чашки, пинцеты, пипетки, секундомер или песочные часы.

**Порядок выполнения работы.** Помещают в пробирку (примерно до половины) наклюнувшиеся семена (подсолнечника, клещевины, гороха, пшеницы) закрывают ее пробкой, в которую вставлена изогнутая градуированная трубка.



**Рис. 11. Прибор для определения дыхательного коэффициента:**

1 – пробирка; 2 – резиновая пробка;  
3 – трубка с измерительной шкалой;  
4 – капля окрашенной воды

Прежде вводят в трубку каплю окрашенной жидкости, для этого погружают наружный конец трубки в окрашенный раствор и зажимают пальцем противоположный конец и вставляют, держа трубку горизонтально, в пробирку (рис. 11). Во время опыта обязательно поддерживают постоянную температуру. Для этого ставят прибор в штатив или колбу и не нагревают руками. Отмечают положение внутреннего мениска капли и засекают время по секундомеру. После пятиминутной экспозиции измеряют расстояние, пройденное каплей, и делают второй отсчет, а еще через 5 минут – третий.

Вычисляют среднее расстояние, пройденное каплей за 5 минут (А), которое соответствует разности между объемами поглощенного кислорода и выделенной углекислоты.

Открывают пробку с семенами и вкладывают в нее пинцетом свернутую в кольцо полоску фильтровальной бумаги, смоченную 20%-ным раствором едкого натра. Закрывают пробирку пробкой с трубкой с каплей окрашенной жидкости. Отмечают положение мениска при пятиминутных интервалах и вычисляют среднюю величину (В). Обозначают объем поглощенного кислорода через В, т.к. весь выделяемый диоксид поглощается щелочью, а объем выделенной углекислоты определяют через А, как разницу между поглощенным  $O_2$  и выделенным  $CO_2$ . Зная величины А и В, находят дыхательный коэффициент:

$$A = O_2 - CO_2; B = O_2; CO_2 = B - A$$

Отсюда дыхательный коэффициент

$$ДК = \frac{CO_2}{O_2} = \frac{(B - A)}{B}.$$

Результаты опыта записывают в таблицу 18 по приведенной форме.

### 18. Дыхательный коэффициент прорастающих семян

Условия опыта	Отсчеты, мм, за 5 минут				ДК = $\frac{(B - A)}{B}$
	1	2	3	среднее	
Без щелочи (А)					
С щелочью (В)					



Делают вывод о зависимости величины дыхательного коэффициента от характера окисляемых веществ.

Производят теоретический расчет дыхательного коэффициента при окислении до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  какого-либо жира, например, триолеина, имеющего формулу  $\text{C}_{57}\text{H}_{104}\text{O}_6$ .

## ФЕРМЕНТЫ ДЫХАНИЯ

Дыхание – это сложный окислительно-восстановительный процесс, который осуществляется при участии комплексной системы ферментов. Ферменты, катализирующие непосредственно окислительно-восстановительные превращения дыхательного субстрата, разделяются на ряд групп. Дегидрогеназы (дегидразы), ферменты катализирующие дегидрирование субстрата, т.е. отнятие водорода и электрона от субстрата дыхания. Они активируют водород субстрата. Другие способствуют его переходу на соответствующий акцептор с более высоким редокс-потенциалом, например, кислород. Такие дегидрогеназы называют аэробными дегидразами или оксидазами, т.к. они выполняют оксидазные функции, переводя протон водорода и электрон на кислород. Анаэробные дегидрогеназы переносят водород и электрон на промежуточные переносчики водорода.

По химической природе дегидрогеназы бывают пиридиновыми и флавиновыми. Это сложные ферменты, состоящие из апофермента (белковый носитель), определяющего их специфичность к определенному субстрату, и кофермента (небелковая часть), определяющим активность фермента. У пиридиновых коферментом служит НАД (никотинамидадениндинуклеотид) или НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат). В составе флавиновых дегидраз присутствует рибофлафин (витамин  $\text{B}_2$ ), который образует кофермент ФМН (флафинмононуклеотид) и ФАД (флавинадениндинуклеотид).

Оксидазы катализируют перенос электронов на кислород. Катализируемый ими процесс представляет конечный этап окисления – передачу электрона и протона на кислород воздуха, с образованием  $\text{H}_2\text{O}$  или перекиси водорода –  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Среди оксидаз большое место занимают ферменты, содержащие Fe (железопротеиды) и Cu (медьпротеиды). Железопротеиды: гемоглобин, каталаза, пероксидаза, цитохромоксидаза и цитохромы в цепи переноса электрона могут осуществлять различные реакции. К медьпротеидам относятся полифенолоксидазы или фенолоксидазы, а также аскорбиноксидаза. Полифенолоксидазы окисляют фенолы с образованием хинонов, в результате чего водород фенолов соединяется с кислородом, образуя  $\text{H}_2\text{O}$ . Познакомимся с работой некоторых дыхательных ферментов.

## **Работа 30. ОБНАРУЖЕНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗ В СЕМЕНАХ ГОРОХА (ФАСОЛИ)**

**Общие сведения.** Растительные дегидрогеназы можно обнаружить с помощью некоторых химических соединений, например, метиленовая синь, имеющих в окисленном состоянии цветные молекулы. В восстановленном состоянии (т.е. присоединив водород) молекулы этих веществ становятся бесцветными. Эти соединения используются для обнаружения дегидраз.

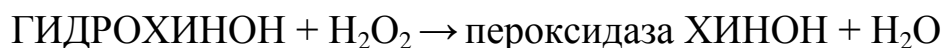
**Материалы и оборудование.** Набухшие суточные семена фасоли (гороха), темно-синий водный раствор метиленовой сини. Нагретая водяная баня до 25-30 °С, пробирки, спиртовки, спички, резиновые пробки для пробирок.

**Порядок выполнения работы.** С семян набухшего гороха (фасоли) снимают кожуру. Часть семян убивают кипячением в течение 10 минут (на спиртовке в пробирке). Затем живые (опытные) и убитые (контрольные) семена помещают в две пронумерованные пробирки и в течение 5-10 минут окрашивают водным раствором метиленовой сини. Окрашенные семена промывают и заливают водой для создания анаэробных условий, так как дегидразы работают в анаэробных условиях. Пробирки закрывают пробками и ставят в термостат или на водяную баню при температуре 25-30 °С. Через некоторое время в опытной пробирке семена теряют синюю окраску. Последнее происходит потому, что дегидразы, участвующие в дыхании клеток, отняли и активизировали водород дыхательного материала (окисление дыхательного материала) и затем передали водород метиленовой сини, которая восстановилась и обесцветилась. В контрольной пробирке цвет семян остается синим, т.к. при кипячении семян дегидразы разрушились.

Описать результаты опыта и объяснить полученные результаты о работе дегидразы семян исследуемой культуры.

## **Работа 31. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ**

**Общие сведения.** Пероксидаза играет важную роль в окислительно-восстановительных процессах, протекающих в растительном организме при дыхании и брожении, т.е. она является дыхательным ферментом. Она способна окислять органические соединения лишь с помощью каких либо органических перекисей. В растениях перекись водорода образуется под действием оксидаз (полифенолоксидаза, монофенолоксидаза). Пероксидаза вместе с перекисью водорода образует комплексные соединения, в результате чего перекись активируется и приобретает способность действовать как акцептор водорода. Она может окислять полифенолы и некоторые органические амины. Например, под действием пероксидазы и перекиси водорода гидрохинон переходит в интенсивно буро окрашенный хинон.



**Материалы и оборудование.** Клубни картофеля, 1%-ный раствор гидрохинона, 3%-ный раствор перекиси водорода, вода. Скальпели, пипетки, пластиковые тарелки.

**Порядок выполнения работы.** Из клубня картофеля поперек нарезают 4 пластинки толщиной 3-4 мм и раскладывают на пластиковой тарелке. На срез первой пластинки картофеля (носитель пероксидазы) наносят только воду, на 2-ю только гидрохинон, на 3-ю только  $\text{H}_2\text{O}_2$ , на 4-ю перекись водорода и гидрохинон.

При окислении гидрохинона в хинон происходит интенсивное побурение среза. Слабое побурение среза наблюдается и без нанесения гидрохинона и перекиси водорода, оно не связано с действием пероксидазы, которая проявляет активность только в присутствии перекиси водорода, это происходит в связи с действием полифенолоксидазы, окисляющей полифенолы с участием молекулярного кислорода.

Результаты опыта записывают в таблицу 19 по приведенной форме.

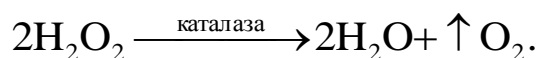
### 19. Наличие пероксидазы в запасяющих тканях картофеля

Вариант	Картофельный срез (носитель пероксидазы)	Гидрохинон	$\text{H}_2\text{O}_2$	Окраска среза
1	+	-	-	
2	+	+	-	
3	+	-	+	
4	+	+	+	

Объяснить особенности работы фермента пероксидазы, исходя из результатов опыта.

### Работа 32. ОБНАРУЖЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ЭЛОДЕИ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

**Общие сведения.** В процессе дыхания в качестве побочного продукта окисления веществ образуется перекись водорода, как активная форма кислорода (АФК), оказывающая в высоких концентрациях токсичное действие на цитоплазму. Обезвреживание перекиси происходит при участии ферментов каталазы, разлагающей ее на воду и молекулярный кислород по уравнению:



Существует ряд методов определения активности каталазы в растении. Наиболее наглядным и доступным демонстрационным, и в то же время,

дающим возможность определить изменение активности фермента, служит опыт наблюдения за активностью каталазы в листьях элодеи под микроскопом.

**Материалы и оборудование.** Веточка элодеи канадской (*Elodea canadensis* Michx.), 3%-ный раствор перекиси водорода. Предметные и покровные стекла, пинцеты, микроскоп.

**Порядок выполнения работы.** На предметное стекло наносят каплю 3%-ной перекиси водорода. В каплю помещают разрезанные пополам поперек старый и молодой лист срезами друг против друга на небольшом удалении, чтобы они вмещались в поле зрения микроскопа при малом увеличении, накрыть покровным стеклом и сразу рассматривают препараты под микроскопом.

Перекись водорода проникает в клетки листа элодеи и расщепляется в ней каталазой, что видно по бурному выделению из среза пузырьков кислорода.

Сделать вывод об активности каталазы в молодых и старых листьях элодеи.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. В чем принципиальное отличие между окислением при горении и окислением дыхательного субстрата при клеточном дыхании?
2. Какой класс ферментов участвует в процессах дегидрирования дыхательного субстрата?
3. Какова роль цитохромной системы и кислорода воздуха при дыхании?
4. Что такое интенсивность дыхания и дыхательный коэффициент?
5. Ферменты дыхания, их роль и значение.



Поступление минеральных веществ в клетки корней растений осуществляется в несколько этапов. Благодаря тому, что клетки корневой системы имеют свободное пространство (апопластическое), доступное для диффузии, и клеточные стенки представляют собой ионообменник, осуществляется адсорбция поступающих веществ на их поверхности. Погружение корней в какой-либо раствор приводит к диффузии растворенных веществ по свободному пространству периферических клеток и их адсорбции на поверхности клеток. Адсорбционное насыщение длится в течение нескольких минут и поглощаемое вещество распределяется мономолекулярным слоем на поверхности клетки.

Адсорбируя определенное количество тех или иных ионов и освобождая их при изменении рН и величины фиксированного заряда, пектоцеллюлозные оболочки служат ионообменным резервом клетки, особенно при низкой концентрации питательных элементов в среде.

При изучении процесса адсорбции в качестве адсорбируемого вещества возможно использование легкорастворимого в воде красителя, изменение концентрации которого определяют колориметрически. В ходе выполнения данной работы будет применяться метиленовый синий. Известно, что 1 мг метиленового синего при полной адсорбции покрывает  $1,1 \text{ м}^2$  поверхности адсорбента.

При погружении корней в раствор метиленового синего он через 1,5-2 мин появляется внутри первого слоя клеток. И. И. Колосов установил, что при двукратном полутора минутном погружении корневой системы в 0,0002 н. раствор метиленовый синий происходит адсорбционное насыщение как рабочей, так и общей поверхности корневой системы.

Если допустить, что при этом поверхность корней равномерно покрывается мономолекулярным слоем адсорбируемого вещества, то можно определить размеры общей адсорбирующей поверхности по изменению концентрации метиленовой синей при первых двух полутора минутных погружениях. При погружении корневой системы в раствор красителя в третий раз, последний будет поглощаться только рабочей частью корневой системы, от которой адсорбированные вещества перемещаются внутрь корня.

### **Опыт 1. Определение объема корневой системы**

Определение объема корневой системы, предварительно хорошо отмытой в проточной воде, осуществляют путем погружения ее в мерный цилиндр по количеству вытесненной воды. Метод определения объема корней, разработанный Д. А. Сабининым и И. И. Колосовым, позволяет определять объем с ошибкой не более 5-7%. Объем корней определяют при помощи специального объемомера (рис. 13). Объем измерительного устройства, состоящего из стеклянного цилиндра 1, нижняя часть которого вытянута в трубку 2, соединенную каучуковой трубкой 3 с градуированной пипеткой 4

(емкость пипетки 1-2 мл, цена деления 0,01-0,02 мл). Чем меньше диаметр цилиндра, тем чувствительней прибор. Стекло цилиндра укрепляют в штативе вертикально, а градуированную пипетку – под небольшим углом к горизонтальной поверхности. В прибор наливают воду или раствор, в котором росли растения.

При погружении корней в сосуд уровень воды в нем поднимается и переходит из положения  $AA'$  в положение  $BB'$ . Водный мениск в пипетке также поднимается, но поскольку она наклонена к горизонтали, то водный мениск ( $A''B''$ ) в ней передвинется на большее расстояние, чем вода в цилиндре.

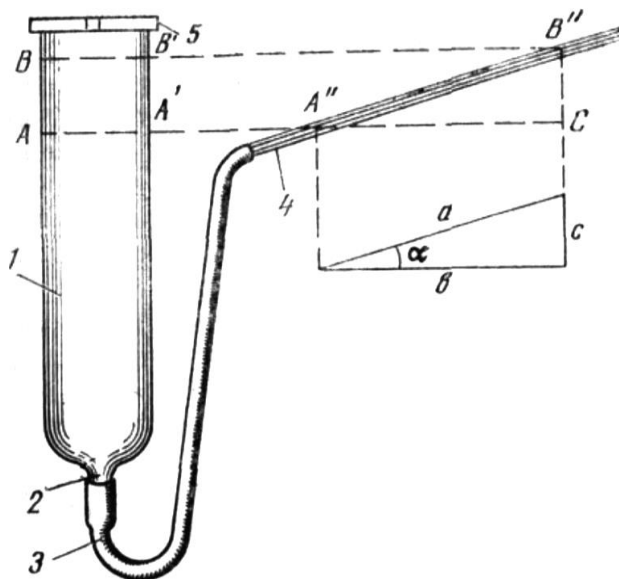
Изменение уровня воды в цилиндре  $l$  соответствует катету  $B''C$  треугольника  $A''B''C$ , а передвижение мениска в капилляре – его гипотенузе  $A''B''$ . Обозначив стороны треугольника буквами  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , а угол между сторонами  $a$  и  $b$  греческой буквой  $\alpha$ , получим

$$\sin \alpha = \frac{c}{a},$$

откуда

$$a = \frac{c}{\sin \alpha} = c \frac{1}{\sin \alpha}.$$

Следовательно, сдвиг мениска в пипетке равен изменению уровня воды в цилиндре, умноженному на  $1/\sin \alpha$ . Отсюда, меняя положение пипетки, можно изменять чувствительность прибора. Она тем больше, чем меньше угол  $\alpha$  к горизонтали у пипетки.



**Рис. 13. Прибор для определения объема корней (объемомер), по Д. А. Сабину и И. И. Колосову:** 1 – цилиндрический сосуд с оттянутым концом (2); 3 – каучуковая трубка; 4 – градуированная пипетка; 5 – пробка;  $AA'$  – исходный уровень воды в цилиндре;  $BB'$  – уровень воды в цилиндре после погружения корней;  $A''$  – исходное положение мениска в пипетке,  $B''$  – положение мениска в пипетке после погружения корней.

**Материалы и оборудование.** Проростки растений. Объемомер Д. А. Сабинина и И. И. Колосова, корковая пробка, бюретки, вата, суровые нитки.

**Порядок выполнения работы.** Прибор с предварительно промытыми внутренними поверхностями свежеприготовленной хромовой смесью с водой укрепляют в штативе и наливают раствор, в котором росли растения, таким образом, чтобы уровень жидкости в цилиндре был на 2-3 см ниже верхнего края. Измерения объема корней проростков растений необходимо производить в питательном растворе, в котором они росли для устранения ошибки из-за разности в осмотическом давлении. Уровень жидкости в пипетке должен совпадать с началом градуированной части. Из прибора вытесняют пузырьки воздуха. Для определения объема корней растения связывают в пучки суровыми нитками так, чтобы корневые шейки были на одном уровне, и закрепляют в отверстии разрезанной пополам пробки. Работу необходимо выполнять быстро, чтобы корни не подсыхали. Перед погружением корней в цилиндр необходимо дать стечь раствору с корней. Отмечают положение мениска А" в пипетке объемомера и погружают корни в цилиндр. В результате погружения корней в объемомер уровень жидкости в цилиндре повысится, и мениск в пипетке сдвинется до положения В". В последующем удаляют корни из цилиндра и дают воде с них стечь в цилиндр. Если после стекания всей воды уровень ее в пипетке не достигнет вновь положения А", то, не меняя наклона пипетки, воду доливают в цилиндр, пока мениск в пипетке не займет положения А". Приливают в цилиндр воду из бюретки до тех пор, пока мениск в пипетке не займет вновь положения В". Прилитый объем воды равен объему измеряемых корней. Определение повторяют два-три раза и рассчитывают среднюю величину.

Результаты опыта записывают в таблицу 20 по приведенной форме.

## 20. Определение объема корней и концентрации метиленовой синей

Объем корней	Повторности				Среднее значение
	1	2	3	4	

### Опыт 2. Определение общей и рабочей адсорбирующей поверхности корневой системы

**Материалы и оборудование.** Проростки растений, 0,0002 н. раствор метиленовой сини, дистиллированная вода. Салфетка и фильтровальная бумага, бюретки с воронками, стаканы стеклянные, чистые сухие колбочки на 100 мл, пипетки градуированные на 2-5 мл, кристаллизаторы, карандаши по стеклу, ФЭК.

**Порядок выполнения работы.** Корни проростков осторожно просушивают фильтровальной бумагой и последовательно погружают на 1,5 мин в три стакана с метиленовым синим, превышающим объем корней в 10 раз (стаканы пронумеровать). Переносить корни из стакана в стакан следует



не протирая их и не ожидая полного стекания раствора краски. Осторожным поворачиванием корней в стаканах перемешивают раствор. Измеряют оптическую плотность растворов относительно контроля, предварительно разбавленных в 5 раз (5 мл раствора+20 мл воды), с помощью ФЭК при длине волны 630 нм. Проводят три-четыре повторности каждого измерения и вычисляют среднее арифметическое. Далее полученную оптическую плотность умножают на коэффициент 0,287. Зная объем и концентрацию красителя, вычисляют его содержание в стаканах – исходное и после пребывания в них корней. Общую адсорбирующую поверхность находят, умножив 1,1 м на количество мг красителя, поглощенного корнями из первых двух стаканов. Для того, чтобы определить рабочую поверхность корня, нужно 1,1 м умножить на количество мг красителя, поглощенного из третьего стакана.

Результаты опыта записывают в таблицу 21 по приведенной форме.

### 21. Определение адсорбирующей поверхности корней

№ стакана	Объем краски, мл	Оптическая плотность растворов		Концентрация растворов, мг/ мл		Количество краски, в стаканах, мг		Поглощено краски, мг
		исходная	после погружения	исходная	после погружения	исходная	после погружения	

Сделать вывод о соотношении общей и рабочей поверхности.

### Работа 34. АНТАГОНИЗМ ИОНОВ

**Общие сведения.** Важную роль в поступлении ионов в клетку играет факт взаимодействия их между собой. При несбалансированном соотношении элементов в питательном растворе некоторые ионы могут влиять на транспорт других ионов. Кроме антагонистического взаимодействия ионов на этапе поступления, данный тип взаимоотношений может проявляться и на различных стадиях метаболизма. Например, повышение концентрации  $Rb^+$  во внешнем растворе снижает поступление  $K^+$  и наоборот;  $Cl^-$  и  $Br^-$  также действуют как взаимные антагонисты. Наличие  $Na^+$ , напротив, оказывает незначительное влияние на поглощение  $Rb^+$ , но снижает поглощение  $Li^+$ .

По характеру взаимодействия ионов различают следующие эффекты:

1. Явление, когда один ион уменьшает или устраняет действие другого, называют антагонизмом ионов. Например, отдельные соли могут оказывать пагубное действие на клетки растений, тогда как их смесь оказывается безвредной. Явление антагонизма открыто в начале XX в. на животных организмах ( $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ ).

Противодействие ионов можно объяснить влиянием их на проницаемость плазмалеммы, гидратацию белков цитоплазмы, а также конкуренцией за места связывания на поверхности плазматических мембран и клеточных стенок переносчиками и активными центрами ферментов. Например, увеличение концентрации одновалентных катионов в цитоплазме вызывает увеличение гидратации ее компонентов, в частности, полипептидных комплексов, в то время, как повышение концентрации двухвалентных катионов индуцирует обратный эффект, а именно уменьшение оводненности составляющих ее структурных элементов. Иногда поглощение того или иного иона может предотвратить вредные влияния, обусловленные избыточным поглощением другого иона. Например, токсичное действие  $\text{Mn}^{2+}$  можно снять  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  и другие одновалентные катионы имеют тенденцию уменьшать вязкость цитоплазмы и увеличивать текучесть и проницаемость мембран, тогда как двухвалентные катионы, например  $\text{Ca}^{2+}$ , оказывают противоположное влияние. Из-за таких антагонистических взаимодействий для корректировки дефицита отдельных минеральных веществ под растения обычно вносят смеси солевых растворов, а не отдельные соли.

2. Синергизм действия компонентов смеси состоит в том, что одна из солей усиливает действие другой, поэтому физиологический эффект солевой смеси превышает сумму эффектов компонентов смеси. Такие явления могут носить характер как отрицательного, так и положительного действия. Некоторые токсически действующие соли усиливают этот эффект в смеси с одной или несколькими солями. При положительных эффектах действие смеси солей оказывает благоприятное усиленное влияние на те, или иные физиологические процессы.

3. Аддитивность действия компонентов смеси наблюдается, если эффект равен сумме действия отдельных компонентов. Это имеет место в явлениях осмоса. Осмотическое давление солевой смеси равно сумме парциальных осмотических давлений солей, входящих в смесь.

### **Опыт 1. Антагонизм ионов водорода и кальция**

**Материалы и оборудование.** Веточка элодеи канадской (*Elodea canadensis* Michx.),  $\text{HCl}$  0,002 М,  $\text{CaCl}_2$  0,001 М, 1 М раствор сахарозы. Кристаллизаторы, микроскоп.

**Порядок выполнения работы.** В три кристаллизатора наливают по 10 мл следующих растворов: 1)  $\text{HCl}$  0,002 М; 2)  $\text{CaCl}_2$  0,001 М; 3) смесь, содержащую  $\text{CaCl}_2$  0,001 М и  $\text{HCl}$  0,002 М и погружают в каждый из них по

8-10 листочков элодеи на 1,5-2 ч. По истечении указанного времени из каждого раствора вынимают листья и плазмолизируют их 1 М раствором сахарозы. Отсутствие плазмолиза является доказательством повреждаемости клеток. Степень повреждения определяют подсчетом количества интактных и поврежденных клеток в поле зрения микроскопа при большом увеличении ( $\times 40$ ). Число поврежденных клеток выражают в % от их общего числа. Результаты опыта записывают в таблицу 22 по приведенной форме.

## 22. Влияние ионов водорода и кальция на повреждаемость клеток

Вариант опыта	Общее число клеток, шт	Число поврежденных клеток, шт
HCl		
CaCl <sub>2</sub>		
HCl+CaCl <sub>2</sub>		

Сделать вывод о действии ионов водорода и кальция на клетки элодеи канадской.

## Опыт 2. Антагонизм ионов калия и кальция

**Материалы и оборудование.** Наклюнувшиеся зерна пшеницы, бидистиллированная вода, растворы KCl 0,1 М, CaCl<sub>2</sub> 0,09 М (оба раствора должны быть приготовлены из химически чистых солей на бидистиллированной воде). Фарфоровые чашки, чашки Петри, пипетки градуированные на 10 мл, ножницы, пинцеты, фильтровальная бумага, карандаши по стеклу, миллиметровая бумага.

**Порядок выполнения работы.** В фарфоровую чашку поместить 30 одинаковых наклюнувшихся семян пшеницы, предварительно 3-4 раза промытых в бидистиллированной воде. В три чашки Петри вложить на дно вырезанную по размеру фильтровальную бумагу и разложить на ней пинцетом (**брать руками зерна нельзя!**) по 10 отобранных ранее семян. Пронумеровать чашки карандашом по стеклу. Налить в 1-ю чашку 15 мл раствора KCl, во 2-ю – 15 мл раствора CaCl<sub>2</sub>, в 3-ю – 3 мл раствора KCl и 2 мл раствора CaCl<sub>2</sub>. Закрыть чашки крышками и оставить при комнатной температуре на 7-8 дней. Через каждые два дня проветривать чашки, открывая крышки на несколько секунд. Через неделю измерить длину надземной части и корешков (у каждого экземпляра определить размер самого длинного корня), вычислить средние величины.

Результаты опыта записывают в таблицу 23 по приведенной форме.

## 23. Влияние ионов калия и кальция на длину корней

Вариант опыта	Длина, см надземной части	Длина, см корней
KCl		
CaCl <sub>2</sub>		
KCl+CaCl <sub>2</sub>		

Сделать вывод о влиянии ионов калия и кальция на морфофизиологические показатели проростков.

## Работа 35. ОБНАРУЖЕНИЕ МАКРОЭЛЕМЕНТОВ В ЗОЛЕ РАСТЕНИЙ

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

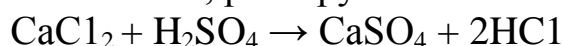
Для изучения химического состава золы можно использовать микрохимический метод, для которого требуется небольшое количество золы.

**Материалы и оборудование.** Зола, полученная при сжигании листьев, или табачный пепел, 10%-ный раствор HCl, 1%-ный раствор H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10%-ный раствор NH<sub>3</sub>, 1%-ный раствор Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1%-ный раствор молибдата аммония в 1%-ной HNO<sub>3</sub>, 1%-ный раствор желтой кровяной соли в капельнице, дистиллированная вода в стакане. Пробирки, воронки, бумажный фильтр, стеклянные палочки с заостренным концом, предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага, микроскоп.

### Опыт 1. Микрохимический анализ золы

**Порядок выполнения работы.** Насыпать в пробирку небольшое количество золы и залить ее примерно четырехкратным объемом 10%-ной HCl. Отфильтровать полученный раствор в чистую пробирку через маленький фильтр. Провести на предметных стеклах реакции на Ca, Mg и P. Для этого тупым концом стеклянной палочки нанести на предметное стекло маленькую каплю вытяжки и на расстоянии 4-5 мм от нее – каплю соответствующего реактива. Затем заостренным концом стеклянной палочки соединить капли дугообразным каналом. В месте соединения произойдет реакция, причем по краям канала будет наблюдаться быстрая кристаллизация продуктов реакции. Рассмотреть образующиеся кристаллы в микроскоп. Стеклянные палочки после нанесения каждого реактива необходимо вымыть и вытереть фильтровальной бумагой.

Реактивом на ион кальция служит 1%-ная H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. При этом хлорид кальция, содержащийся в вытяжке, реагирует с кислотой по уравнению

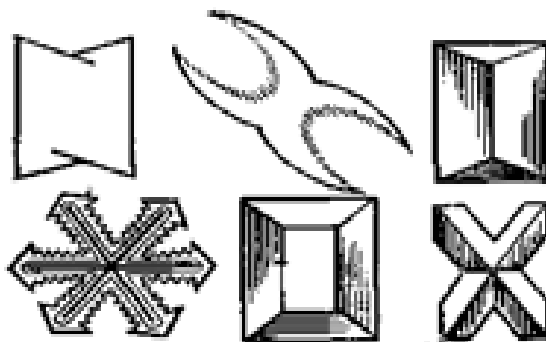
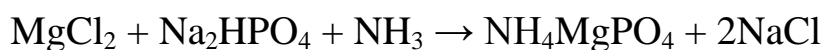


Образующийся гипс осаждается в виде игольчатых кристаллов (рис. 14).



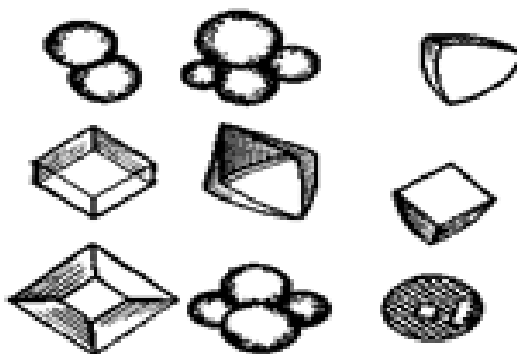
**Рис. 14. Кристаллы сульфата кальция**

Для обнаружения магния к капле испытуемого раствора следует сначала добавить каплю раствора аммиака, а затем соединить канальцем с реактивом, которым служит 1%-ный раствор фосфорнокислого натрия. Образуется фосфорноаммиачномагнезиальная соль (рис. 15), кристаллизующаяся в виде прямоугольников, крышечек, звезд или крыльев, в результате следующей реакции:



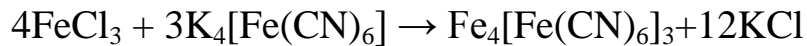
**Рис. 15. Кристаллы фосфорноаммиачномагнезиальной соли**

Для обнаружения фосфора соединить каплю вытяжки с 1%-ным раствором молибдата аммония в азотной кислоте. Получается зеленовато-желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония (рис. 16):



**Рис. 16. Кристаллы фосфорномолибденовокислого аммония**

Железо можно обнаружить с помощью раствора желтой кровяной соли. В результате реакции образуется берлинская лазурь:

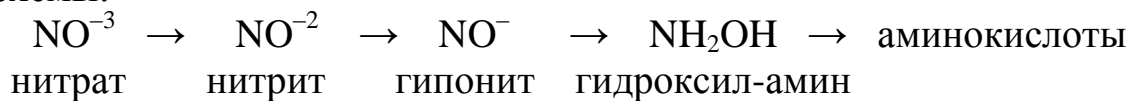


Реакцию на железо рекомендуется проводить в пробирке: к остатку зольной вытяжки добавлять по каплям раствор желтой кровяной соли до появления синей окраски.

Результаты работы оформить в виде рисунков кристаллов гипса, фосфорноаммиачномагнезиальной соли и фосфорномолибденовокислого аммония. Записать уравнения реакций.

## Опыт 2. Обнаружение нитратов в растениях

**Общие сведения.** Соли азотной кислоты (нитраты), поглощаемые корнями из почвы, восстанавливаются в растении до аммиака через ряд этапов, каждый из которых катализирует особый фермент (нитратредуктаза, нитритредуктаза, гипонитритредуктаза и гидроксилламинредуктаза). Аммиак связывается кетокислотами ( $\alpha$ -кетоглутаровой, щавелевоуксусной и пировиноградной), образуя в процессе восстановительного аминирования первичные аминокислоты – глутаминовую, аспарагиновую и аланин. Другие аминокислоты образуются путем трансаминирования или ферментативного превращения одних аминокислот в другие. Сказанное можно представить в виде схемы:



При достаточном содержании растворимых углеводов и высокой активности соответствующих ферментов перечисленные биохимические процессы происходят в корнях. Однако часть нитратов (нередко весьма значительная) может пройти через паренхиму корня в неизменном виде. В этом случае нитраты попадают в сосуды ксилемы и поднимаются с восходящим током к листьям, где и происходит их восстановление. Для восстановления нитратов требуется АТФ, образующаяся в процессе окислительного или фотофосфорилирования.

Определение содержания нитратов в соке, отжатом из стеблей или черешков, позволяет судить о восстановлении нитратов в корнях: чем меньше обнаруживается ионов  $\text{NO}^{-3}$  в соке, тем полнее проходит этот процесс в клетках корня. Сопоставление содержания нитратов в черешках и листовых пластинках дает представление о нитратредуктазной активности клеток мезофилла.

Для обнаружения нитратов можно использовать реакцию с дифениламином, который в присутствии иона  $\text{NO}^{-3}$  образует синюю анилиновую краску. По интенсивности посинения можно приблизительно судить о количестве нитратов в исследуемом объекте.

**Материалы и оборудование.** Растения, выращенные на питательном растворе или в почве, 1%-ный раствор дифениламина в концентрированной серной кислоте в капельнице (хранить в темноте; капельницу поставить на крышку чашки Петри, чтобы предотвратить попадание на стол каплей этой едкой жидкости), вода. Ножницы, белая фарфоровая тарелка, стеклянные палочки, фильтровальная бумага.

**Порядок выполнения работы.** Поместить на белую тарелку кусочки черешка и листовой пластинки какого-либо растения. Размять эти кусочки стеклянной палочкой (палочку каждый раз споласкивать чистой водой и вытирать) и облить раствором дифениламина в крепкой серной кислоте. Исследовать 2-3 растения разных видов. Желательно также проанализировать растения одного вида, произраставшие в разных условиях (на солнце и в тени, до и после подкормки минеральными удобрениями и т. п.).

Результаты наблюдений записывают в таблицу 24 по приведенной форме, оценивая интенсивность окраски по пятибалльной шкале.

#### 24. Количество нитратов в растениях

Объект исследования	Условия опыта	Количество нитратов	
		в надземной части	в подземной части

Сделать выводы о наличии (или отсутствие) нитратной формы азота в различных органах растения.

#### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Охарактеризуйте процесс адсорбции.
2. Чем объясняется адсорбция ионов клеточной стенкой?
3. Какие составляющие включают кажущее свободное пространство?
4. Что происходит с морфофизиологическими показателями проростков при выращивании их в средах с различным ионным составом?
5. Какова длина надземной части и корней при влиянии ионов калия и кальция?
6. Каким образом можно объяснить неодинаковый рост проростков на растворах?
7. В каких органах исследованных растений восстанавливались нитраты?
8. Как влияют внешние условия на содержание нитратов в листьях?
9. Какие макроэлементы содержатся в растительной золе и какое это может иметь практическое применение?

# ВОПРОСЫ К КУРСУ «ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ»

## ВВЕДЕНИЕ

1. Предмет, цели и задачи физиологии растений. Краткая история развития физиологии растений в мире, России и Казанском университете.
2. Методы и методология физиологии растений: аналитический и синтетический подход, причинный анализ. Общая и частная физиология растений.
3. Практическое значение физиологии растений как теоретической основы растениеводства. Связь физиологии растений с агрономическими науками и селекцией.
4. Природные и синтетические регуляторы роста растений, применение в сельском хозяйстве.
5. Положение физиологии растений в системе биологических наук. Связь с современными биологическими дисциплинами. Физиология растений – интегрирующая наука.
6. Перспективы практического приложения результатов физиологических исследований в растениеводстве, биотехнологии, охраны и защиты растительного мира, биоэнергетике, фармацевтике и освоении космоса.
7. Системы регуляции растений (внутриклеточные и организменные): генетическая, мембранная, трофическая, гормональная, электрофизиологическая.
8. Раздражимость растений и ее значение для сохранения целостности растительного организма.

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

1. Особенности строения растительной клетки, ее структурные элементы: клеточная оболочка, ядро, митохондрии, рибосомы, пероксисомы, глиоксисомы, ЭПС, аппарат Гольджи, вакуоль.
2. Мембранный принцип организации поверхности протоплазмы и органоидов клетки. Строение и функции биологических мембран.
3. Пластиды растительной клетки: типы, локализации в тканях и органах растений, функции, взаимопревращения.
4. Структурная организация фотосинтетического аппарата. Строение листа как органа фотосинтеза. Хлоропласты: химический состав, строение, онтогенез, функции.

## ВОДНЫЙ ОБМЕН РАСТЕНИЙ

1. Роль воды в жизни растений. Молекулярная структура и физические свойства воды.
2. Поступление воды в растительную клетку. Осмотическое давление и ее значение в поглощении воды клеткой. Методы определения осмотического давления.



3. Термодинамические показатели водного режима растений: активность воды, химический и водный потенциал. Методы определения водного потенциала.
4. Сосущая сила клетки и водный потенциал. Методы определения сосущей силы.
5. Состояние воды в растворах. Взаимодействие воды и биополимеров (белков), гидратация. Формы воды в клетке – свободная и связанная вода, их физиологическая роль.
6. Корневая система как орган поглощения воды. Состояние воды в почве. Поступление и передвижение воды в корне: пути и механизмы.
7. Корневое давление. «Плач» и гуттация растений.
8. Транспирация, ее значение; лист как орган транспирации. Виды транспирации, ее показатели. Суточный ход транспирации, влияние внешних условий.
9. Устьичная транспирация. Регуляция устьичных движений при действии внешних и внутренних факторов.
10. Пути и механизмы передвижения воды по растению.
11. Особенности водного обмена у растений различных экологических групп. Физиологические основы орошаемого земледелия.

### ФОТОСИНТЕЗ

1. История развития учения о фотосинтезе до работ К.А. Тимирязева.
2. Работы К.А. Тимирязева в области фотосинтеза.
3. Масштабы и значение фотосинтеза для биосферы.
4. Экологический этап в развитии учения о фотосинтезе. Водное происхождение кислорода фотосинтеза. Доказательства существования световой и темновой фаз фотосинтеза.
5. Пигментные системы фотосинтезирующих организмов. Хлорофиллы: строение, спектральные свойства, функции, биосинтез. Электронно-возбужденное состояние пигментов.
6. Каротиноиды и фикобиллины: распространение, строение, спектральные свойства, функции. Явление хроматической адаптации.
7. Две пигментные системы (ФС I и ФС II): состав, функции, локализация. Фотосинтетическая единица. Реакционный центр.
8. ЭТЦ фотосинтеза: циклический и нециклический транспорт электронов (световая стадия фотосинтеза).
9. Фотофосфорилирование: циклическое и нециклическое. Хемиосмотическая теория энергетического сопряжения Митчелла.
10. Темновая стадия фотосинтеза: химизм реакций цикла Кальвина-Бенсона.
11. Химизм реакций ассимиляции  $C_4$  растений. Цикл Хетча-Слэка-Карпилова. САМ-метаболизм органических кислот.
12. Физиологические особенности  $C_4$ -растений.

13. Фотодыхание (химизм, структурная организация процесса) и функциональная роль.

14. Суточные и сезонные изменения фотосинтеза. Фотосинтез, рост и продуктивность растений.

15. Экология фотосинтеза: влияние основных факторов среды на интенсивность и направленность фотосинтеза.

## ДЫХАНИЕ

1. Дыхание и его роль в жизнедеятельности растений. История развития учения о дыхании: начальный этап, работы Баха, Палладина, Виллана, Варбурга, Кейлина.

2. Взаимосвязь брожения и дыхания. Работы С.П. Костычева.

3. Количественные показатели дыхания: интенсивность дыхания, дыхательный коэффициент и его зависимость от природы окисляемого субстрата.

4. Основные этапы дыхания и их субклеточная локализация.

5. Анаэробная фаза дыхания (гликолиз): этапы и энергетический выход.

6. Аэробная фаза дыхания. Цикл Кребса, энергетический выход.

7. ЭТЦ дыхания растений, ее особенности. Окислительное фосфорилирование: механизмы и энергетическая эффективность.

8. ПФП дыхания, его значение.

9. Экология дыхания (влияние внешних и внутренних факторов); изменение интенсивности дыхания в онтогенезе растений.

## МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ

1. История развития учения о минеральном питании растений.

2. Содержание минеральных элементов в растениях. Классификация минеральных элементов: макро- и микроэлементы.

3. Макроэлементы – К, Са, Mg, S, P, их физиологическая роль.

4. Физиологическая роль азота в жизни растений. Источники азотного питания высших растений. Фиксация молекулярного азота.

5. Азотный обмен высших растений: восстановление нитратов и пути их усвоения аммиака.

6. Микроэлементы в жизни растений.

7. Механизм поступления ионов в клетку. Роль клеточной оболочки. Транспорт ионов через мембраны: пассивный и активный.

8. Корень как орган поглощения минеральных элементов. Метаболизм корней.

9. Экология минерального питания: влияние внешних и внутренних факторов. Физиологические основы применения удобрений.

## РОСТ И РАЗВИТИЕ

1. Рост и развитие растений. Этапы онтогенеза высших растений: эмбриональный, ювенильный, размножение, старость и отмирание.

2. Фазы роста растительной клетки: деление, растяжение и дифференцировка. Старение и смерть клетки.
3. Типы роста у растений и морфогенез основных вегетативных органов – стебля, листа, корня. Коррелятивный рост.
4. Влияние внешних условий на рост растений. Периодичность роста, типы покоя.
5. Ростовые движения (геотропизм, фототропизм, хемотропизм и др.). Нastiи.

## ФИТОГОРМОНЫ

1. Открытие и общие свойства фитогормонов. Работы Ч. Дарвина, Бойсена-Иенсена, Холодного, Вента. Гормональная теория тропизмов.
2. Ауксины. Строение, содержание, синтез, распределение в различных частях растений. Окислительный распад. Полярный транспорт.
3. Ауксины. Физиологическая активность и механизмы действия. Явление апикального доминирования. Практическое использование ауксинов в растениеводстве и биотехнологии.
4. Гиббереллины. Открытие, строение, содержание, транспорт и распределение в различных частях и органах растений. Физиологическая активность и механизмы действия. Практическое применение.
5. Цитокинины. Природные и синтетические. Открытие, строение, содержание, места синтеза, транспорт и распределение в растениях. Физиологическая активность и механизмы действия. Взаимодействие с другими гормонами.
6. Фитогормоны – ингибиторы роста: абсцизовая кислота и этилен. Строение, места синтеза, содержание и распределение в растениях. Физиологическая активность и механизмы действия.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

### Показатели, концентрация и осмотическое давление растворов сахарозы

Показатель шкалы рефрактометра	Концентрация		Осмотическое давление	Показатель шкалы рефрактометра	Концентрация		Осмотическое давление
	% по массе	моль			% по массе	моль	
1	2	3	4	5	6	7	8
0,0	0,00	0,000	0,0	4,0	38	40	107,4
1	03	01	2,0	1	42	42	112,4
2	07	02	4,0	2	45	43	114,5
3	11	03	6,1	3	49	44	117,5
4	14	04	9,1	4	52	45	120,5
5	18	05	12,2	5	56	46	122,6
6	21	06	13,2	6	59	47	125,6
7	25	07	18,3	7	63	48	128,6
9	32	09	21,3	8	66	49	130,7
				9	70	50	133,7
1,0	35	10	26,3	5,0	73	51	136,7
1	39	11	28,4	1	76	52	138,8
2	42	12	31,4	2	80	53	141,8
3	46	13	34,4	3	83	54	144,8
4	49	14	36,5	4	87	55	146,9
5	53	15	39,5	5	90	56	149,9
6	56	16	42,5	6	93	57	152,9
7	60	17	44,6	7	97	58	155,0
8	63	18	47,6	8	2,00	59	158,0
9	66	19	50,6	9	03	60	161,1
2,0	70	20	53,7	6,0	07	61	163,1
1	73	21	56,7	1	10	62	166,1
2	77	22	58,7	2	14	63	169,1
3	80	23	61,8	3	17	64	172,2
4	84	24	63,8	4	21	65	175,2
5	87	25	66,8	5	24	66	178,3
6	90	26	69,9	6	27	67	180,3
7	94	27	71,9	7	31	68	183,3
8	97	28	74,9	8	34	69	185,4
9	1,00	29	78,0	9	38	70	187,4
3,0	04	0,030	81,0	7,0	41	71	190,4
1	07	31	83,1	1	41	72	193,4
2	11	32	85,1	2	48	73	196,5
3	14	33	88,1	3	51	74	199,6
4	18	34	90,2	4	55	75	201,6
5	21	35	93,2	5	58	76	204,6
6	24	36	96,2	6	61	77	207,7
7	27	37	98,3	7	65	78	209,7
8	31	38	101,3	8	68	79	211,7
9	35	39	104,3	9	72	80	213,7

#### Значение изотонического коэффициента $i$ растворов NaCl (20 °C)

NaCl, M	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

Здесь  $i=1+\alpha(n-1)$ , где  $\alpha$  – степень диссоциации;  $n$  – число ионов, на которое диссоциирует молекула.

## ПРИГОТОВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ РАСТВОРОВ, РЕАКТИВОВ И КРАСИТЕЛЕЙ

**Хлоркобальтовая бумага.** Берут равномерную по толщине фильтровальную бумагу или обеззолненные тонкие фильтры и намачивают в кювете с раствором хлорида кобальта, приготовленным по Камерлингу [в 100 мл воды растворяют 6,7 г  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  и 2,64 г  $\text{NaCl}$ ], в течение 1 мин, а затем высушивают в подвешенном состоянии на стеклянных палочках до появления голубого цвета. Из бумаги вырезают кружочки диаметром 1 см и при помощи полиэтиленовой ленты с клейким слоем приклеивают по два к целлоулоидной подложке. Хранят целлоулоидные камеры с хлоркобальтовой бумагой в эксикаторе над хлоридом кальция.

**Раствор Гётри.** В мерную колбу на 100 мл наливают 28,5 мл 1%-го раствора  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 50 мл 2%-го раствора  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  и 10 мл 2 н раствора  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; доливают дистиллированной водой до метки и тщательно взбалтывают. Окраска раствора Гётри соответствует окраске раствора, содержащего 85 мг/л хлорофилла.

**Раствор дифениламина.** Перед приготовлением раствора проверяют серную кислоту на присутствие  $\text{NO}_3$ . Для этого в пробирку (диаметром 24-26 мм) помещают приблизительно 0,01-0,02 г (несколько кристалликов) дифениламина, приливают 1,4 мл воды и 5 мл  $\text{H}_2\text{SO}_4$  перемешивают и охлаждают (под струей холодной воды). Если раствор после охлаждения бесцветен или имеет слабо-голубую окраску  $\text{H}_2\text{SO}_4$  для определения  $\text{NO}_3$  пригодна; если окраска выражена сильнее, кислоту очищают.

Для приготовления раствора дифениламина 0,14 г реактива помещают в колбу вместимостью 250-500 мл из термостойкого стекла, приливают 55 мл дистиллированной воды, 200 мл концентрированной, свободной от нитратов  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и перемешивают.

**Раствор 0,0002 н. метиленовой сини.** 64 мг метиленовой сини красителя растворить в 1 л дистиллированной воды.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ботаника. Учебник для вузов: Т. 2. Физиология растений / П. Зитте, Э.В. Вайлер, Й.В. Кадерайт, А. Брезински, К. Кернер; на основе учебника Э. Страсбургера и др. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 496 с.
2. Воскресенская О.Л., Грошева Н.П., Скочилова Е.А. Физиология растений: Учебное пособие. / Мар. гос. ун-т. – Йошкар-Ола, 2008. – 148 с.
3. Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Большой практикум по фотосинтезу. – М.: Академия, 2006. – 256 с.
4. Кузнецов В.В. Физиология растений / В.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Высш. шк., 2005. – 735с.
5. Медведев С.С. Физиология растений / С.С. Медведев. – СПб.: БХВ-Петербург, 2013. – 512 с.
6. Пильщикова Н.В. Физиология растений с основами микробиологии. – М.: Мир, 2004. – 184 с.
7. Полевой В.В. Физиология растений / В.В. Полевой. – М.: Высшая школа., 1989. – 464 с.
8. Практикум по физиологии и биохимии растений: метод. руководство / О.А. Тимофеева. – Казань: Казанский университет, 1998. – 24 с.
9. Практикум по физиологии растений / Н.Н. Третьяков, Л.А. Паничкин, М.Н. Кондратьев и др. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: КолосС, 2003. – 288 с.
10. Практикум по физиологии растений. Под редакцией проф. И.И. Гунара. – М.: Колос, 1972. – 167 с.
11. Практикум по физиологии растений: Учеб. пособие для студ. высш. пед. учеб. заведений / В.Б. Иванов, И.В. Плотникова, Е.А. Живухина и др.; Под ред. В.Б. Иванова. – 2-е изд., испр. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 144 с.
12. Семихатова О.А. Физиология дыхания растений: учебное пособие / О.А. Семихатова, Т.В. Чиркова. – СПб: Изд-во Санкт-Петербург. ун-та, 2001. – 220 с.
13. Синицына Ю.В., Олюнина Л.Н., Половинкина Е.О. Фотосинтез и дыхание растений: Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2008. – 28 с.
14. Сказкин Ф.Д., Ловчиновская Е.И., Красносельская Т.А., Миллер М.С., Аникиев В.В. Практикум по физиологии растений. – М.: Советская наука, 1953. – 310 с.
15. Физиология растений: учебник для студ. вузов / Н.Д. Алехина, Ю.В. Балнокин, В.Ф. Гавриленко и др.; под ред. И.П. Ермакова. – 2-е изд., испр. – М.: Академия, 2007. – 640 с.
16. Якушкина Н.И. Физиология растений: учебник для студ. вузов / Н.И. Якушкина, Е.Ю. Бахтенко. – М.: ВЛАДОС, 2005. – 463 с.

## СОДЕРЖАНИЕ

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ.....	3
Работа 1. Определение вязкости протоплазмы методом центрифугирования.....	4
Работа 2. Влияние ионов калия и кальция на форму плазмолиза.....	5
Работа 3. Наблюдение колпачкового плазмолиза.....	6
Работа 4. Определение вязкости цитоплазмы по времени плазмолиза.....	7
Работа 5. Влияние ионов калия и кальция на вязкость цитоплазмы.....	8
Работа 6. Прижизненное окрашивание клеток нейтральным красным.....	8
Работа 7. Влияние ионов калия и кальция на проницаемость цитоплазмы.....	9
Работа 8. Диагностика повреждения растительной ткани по увеличению проницаемости клеточных мембран.....	10
Работа 9. Наблюдение за действием света на скорость движения цитоплазмы.....	11
Работа 10. Определение потенциального осмотического давления клеточного сока методом плазмолиза.....	13
Работа 11. Определение концентрации клеточного сока и потенциального осмотического давления рефрактометрическим методом.....	14
Работа 12. Определение водного потенциала листьев методом Шардакова.....	16
Работа 13. Определение водного потенциала растительной ткани рефрактометрическим методом по Максиму и Петину.....	17
Работа 14. Определение водного потенциала растительной ткани методом полосок по Лилиенштерн.....	18
Работа 15. Зависимость сосущей силы от степени насыщения клеток водой.....	20
ВОДНЫЙ ОБМЕН.....	23
Работа 16. Сравнение транспирации верхней и нижней сторон листа хлоркобальтовым методом.....	24
Работа 17. Определение состояния устьиц методом инфильтрации по Молишу.....	25
Работа 18. Определение степени раскрытия устьиц на фиксированном эпидермисе по Ллойд.....	26
Работа 19. Изучение состояния устьиц методом отпечатков по Полаччи.....	28
Работа 20. Наблюдение за устьичными движениями под микроскопом.....	29
ФОТОСИНТЕЗ.....	31
Работа 21. Определение химических свойств пигментов листа.....	31
Работа 22. Наблюдение оптических свойств пигментов.....	36

Работа 23. Количественное определение пигментов.....	40
Работа 24. Разделение пигментов методом бумажной хроматографии.....	44
Работа 25. Выделение хлоропластов и реакция Хилла.....	47
Работа 26. Определение чистой продуктивности фотосинтеза.....	48
Работа 27. Определение площади листьев.....	51
<b>ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ.....</b>	<b>53</b>
Работа 28. Определение интенсивности дыхания по количеству выделения $CO_2$ .....	54
Работ 29. Определение дыхательного коэффициента прорастающих семян.....	56
Работа 30. Обнаружение дегидрогеназ в семенах гороха (фасоли).....	59
Работа 31. Определение пероксидазы в растительных тканях.....	59
Работа 32. Обнаружение и определение активности каталазы в листьях элодеи разного возраста.....	60
<b>МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ.....</b>	<b>62</b>
Работа 33. Определение объема корневой системы, общей и рабочей адсорбирующей поверхности корней.....	62
Работа 34. Антагонизм ионов.....	66
Работа 35. Обнаружение макроэлементов в золе растений.....	69
<b>ВОПРОСЫ К КУРСУ «ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ».....</b>	<b>73</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>77</b>
<b>ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>79</b>