

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

А.Т. Епринцев, Г.Н. Хожанова

**МАЛЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Учебно-методическое пособие

Воронеж
Издательский дом ВГУ
2018

Утверждено научно-методическим советом медико-биологического факультета 26 января 2018 г., протокол № 1

Рецензент – д-р биол. наук, проф. В.А. Агафонов

Учебно-методическое пособие подготовлено на кафедре биохимии и физиологии клетки медико-биологического факультета Воронежского государственного университета.

Рекомендовано для студентов 3-го и 4-го курсов дневного и вечернего отделений медико-биологического факультета Воронежского государственного университета.

Для специальностей: 060301 – Биология;
Б1.Б.20 – Физиология растений

СОДЕРЖАНИЕ

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ.....	6
Работа 1. Определение осмотического давления клеточного сока плазмолитическим методом (по де-Фризу).....	6
Работа 2. Влияние различных факторов на выход электролитов из клеток	9
Работа 3. Влияние температуры на проницаемость клеточных мембран для бетацианина	12
Работа 4. Влияние ионов калия и кальция на вязкость цитоплазмы	13
Работа 5. Прижизненное окрашивание клеток нейтральным красным.....	15
Работа 6. Определение жизнеспособности семян методом окрашивания (по Д.Н. Нелюбову).....	17
Работа 7. Определение сосущей силы клеток при изменении концентрации растворов	18
Работа 8. Определение сосущей силы клеток упрощенным методом (по Уршпрунгу)	23
Работа 9. Выделение субклеточных фракций из колеоптилей пшеницы	27
Работа 10. Способ выделения митохондрий из растительных тканей	29
ФОТОСИНТЕЗ	32
Работа 11. Оптические свойства хлорофилла	32
Работа 12. Определение интенсивности фотосинтеза методом ассимиляционной колбы (по Л.А. Иванову и Н.Л. Коссович)	34
Работа 13. Пигменты зеленого листа	38
Работа 14. Определение содержания хлорофилла в листьях	42
Работа 15. Разделение пигментов методом бумажной хроматографии	45
Работа 16. Обнаружение фотосинтеза методом крахмальной пробы	47
Работа 17. Накопление первичного (ассимиляционного) крахмала в клетках листьев C_3 - и C_4 -растений	50
Работа 18. Выделение хлоропластов из листьев C_3 -растений	52
Работа 19. Выделение хлоропластов из листьев C_4 -растений	53
Работа 20. Выделение протопластов из листьев C_4 -растений	55
Работа 21. Влияние внешних условий на интенсивность фотосинтеза водного растения.....	57

ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ	61
Работа 22. Потеря сухого вещества при прорастании семян	61
Работа 23. Определение интенсивности дыхания по количеству выделенного диоксида углерода (по Бойсен-Иенсену)	64
Работа 24. Определение дыхательного коэффициента маслянистых семян.....	67
Работа 25. Определение активности пероксидазы.....	70
Работа 26. Определение активности каталазы.....	74
Работа 27. Определение активности полифенолоксидазы	75
Работа 28. Количественное определение активности дегидрогеназ.....	79
Работа 29. Обнаружение амилазы в прорастающих семенах.....	81
Работа 30. Определение общей антиокислительной активности растений.....	83
Работа 31. Превращения веществ при прорастании семян.....	85
 ВОДНЫЙ РЕЖИМ РАСТЕНИЙ	 88
Работа 32. Сравнение транспирации верхней и нижней сторон листа хлоркобальтовым методом.....	88
Работа 33. Определение содержания воды в листьях растений.....	89
Работа 34. Определение скорости набухания семян	92
Работа 35. Определение интенсивности транспирации несрезанных листьев (по В.Ф. Купревичу)	93
Работа 36. Определение свободной и связанной воды в тканях растений.....	95
Работа 37. Определение водного дефицита растений.....	100
Работа 38. Определение водоудерживающей способности тканей методом подсушивания	102
Работа 39. Определение интенсивности транспирации по уменьшению массы срезанных листьев	104
Работа 40. Влияние внешних условий на процесс гуттации	107
Работа 41. Водообмен ветки сосны.....	109
Работа 42. Изучение устьичных движений	112
 КОРНЕВОЕ ПИТАНИЕ РАСТЕНИЙ.....	 116
Работа 43. Методика водной культуры.....	116
Работа 44. Методика гравийной культуры	119

Работа 45. Выращивание плесневого гриба на полном и неполном питательных растворах.....	122
Работа 46. Определение содержания золы в разных частях растений.....	126
Работа 47. Обнаружение нитратов в растениях.....	129
Работа 48. Определение нитратов в растительных тканях.....	131
Работа 49. Определение объема корневой системы методом Сабинина и Колосова.....	134
Работа 50. Определение общей и рабочей адсорбирующих поверхностях корневой системы методом Сабинина и Колосова.....	136
Работа 51. Диагностика заболеваний растений при голодании по элементам минерального питания.....	140
Работа 52. Определение солеустойчивости злаков по всхожести их семян.....	142
Работа 53. Изучение выделения протонов корневыми системами растений по смещению рН питательного раствора.....	143
Работа 54. Определение фосфора с помощью аскорбиновой кислоты.....	145
Работа 55. Определение меди в гомогенатах растительных тканей.....	146
РОСТ, РАЗВИТИЕ И ДВИЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ.....	149
Работа 56. Влияние ауксинов на рост отрезков coleoptилей злаков.....	149
Работа 57. Определение места восприятия силы земного притяжения у корня.....	150
Работа 58. Влияние фитогормонов на метаболизм изолированных семядолей тыквы.....	151
Работа 59. Влияние индолил-3-уксусной кислоты на укоренение черенков фасоли.....	159
Работа 60. Изучение тропизмов и настий.....	161
ПРИЛОЖЕНИЕ № 1. КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ К ПРАКТИЧЕСКИМ РАБОТАМ И КОЛЛОКВИУМАМ.....	166
ПРИЛОЖЕНИЕ № 2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ РАСТВОРОВ И РЕАКТИВОВ.....	170
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	173

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Работа 1. Определение осмотического давления клеточного сока плазмолитическим методом (по де-Фризу)

Материалы и оборудование

- 1) луковица синего лука или листья традесканции;
- 2) 1 М раствор NaCl или сахарозы;
- 3) дистиллированная вода;
- 4) бюретки с воронками (2 шт.);
- 5) часовое стекло;
- 6) баночки или тигельки для растворов (7 шт.);
- 7) крышки или кусочки стекла для закрывания баночек (7 шт.);
- 8) микроскоп;
- 9) предметные и покровные стекла;
- 10) скальпель;
- 11) лезвие бритвы;
- 12) препаровальная игла;
- 13) кисточка;
- 14) стеклянная палочка;
- 15) стакан с кипяченой водой;
- 16) кусочки фильтровальной бумаги;
- 17) карандаш по стеклу;
- 18) термометр комнатный.

Принципиальные основы метода

Концентрацию клеточного сока, представляющего собой раствор большого количества разнообразных органических и минеральных веществ, чаще всего определяют по его осмотическому давлению. Плазмолитический метод определения осмотического давления клеточного сока заключается в том, что срезы исследуемой ткани погружают в ряд растворов известной концентрации, а затем рассматривают в микроскоп.

Исходя из того что плазмолиз способны вызывать только гипертонические растворы, находят такой, в котором наблюдается начальный (уголковый) плазмолиз не менее чем у 50 % клеток исследуемой

ткани. Изотонический раствор будет находиться между этим раствором и следующим (более слабым), который не вызывает плазмолиза. Отсюда следует, что концентрация изотонического раствора равна (с известной долей погрешности) среднему арифметическому между концентрациями указанных соседних растворов. Установив концентрацию изотонического раствора, вычисляют осмотическое давление по уравнению Вант-Гоффа

$$P = R T C i ,$$

где P – осмотическое давление, Мпа, 1 МПа (мегапаскаль) = 10^6 Па, 1 Па (паскаль) = 9,87 атм; R – универсальная газовая постоянная ($R = 0,00831$ кДж/град.моль); T – температура по Кельвину; C – концентрация раствора, моль/л; i – изотонический коэффициент, показывающий отношение числа частиц (молекул и ионов) в растворе к исходному количеству молекул растворенного вещества.

Для неэлектролитов, например для сахарозы, $i = 1$. Для растворов электролитов i зависит от числа ионов, на которые распадается молекула, и от степени диссоциации. С повышением концентрации электролита i несколько убывает. Значения i для растворов NaCl даны в табл. 1.

Таблица 1

*Значения изотонического коэффициента для растворов NaCl
различных концентраций (моль/л)*

Концентрация NaCl	1,0	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,01
Изотонический коэффициент	1,62	1,64	1,6	1,7	1,7	1,7	1,7	1,8	1,8	1,93

Ход работы

Приготовить по 5 мл растворов NaCl или сахарозы концентрацией от 0,1 до 0,7 моль/л, наливая из бюреток в баночки, снабженные соответствующими надписями, 1 М раствор и дистиллированную воду. Воспользуйтесь приведенной ниже таблицей разведения.

Таблица 2

Концентрация опытного раствора, моль/л	На 5 мл раствора	
	1 М раствора NaCl, мл	воды, мл
0,1	0,5	4,5
0,2	1,0	4,0
0,3	1,5	3,5
0,4	2,0	3,0
0,5	2,5	2,5
0,6	3,0	2,0
0,7	3,5	1,5

Тщательно перемешав растворы, закрыть баночки крышками или кусочками стекла для защиты от испарения. Приготовить при помощи бритвы 14 срезов исследуемой ткани, например кожицы синего лука, и поместить их в воду на часовое стекло (вода должна быть кипяченой, чтобы не было пузырьков воздуха). При погружении в воду удаляется сок, вытекающий из поврежденных клеток, и достигается одинаковое состояние всех срезов.

Через несколько минут извлечь срезы кисточкой из воды, обсушить фильтровальной бумагой и погрузить по 2 среза в каждый раствор, начиная с самого концентрированного. При этом необходимо следить за тем, чтобы срезы не плавали на поверхности, а были погружены в растворы (если срез всплывает, его следует «утопить» при помощи препаровальной иглы).

Через 20–30 мин рассмотреть срезы в микроскоп в капле соответствующего раствора в той же последовательности. Стеклянную палочку, которой наносилась капля раствора, кисточку, стекла после

каждого раствора необходимо ополаскивать водой и вытирать салфеткой или фильтровальной бумагой.

Результаты опыта записать по образцу, данному в табл. 3.

Таблица 3

Концентрация раствора, моль/л	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Степень плазмолиза							
Рисунок клетки							

Во второй строке указать, в каком состоянии находится большинство клеток среза (сильный плазмолиз, когда протопласт сокращается более чем на 1/3, слабый плазмолиз – цитоплазма немного отстает от клеточной стенки, уголковый плазмолиз или плазмолиза нет). В третьей строке схематически зарисовать одну клетку, характерную для данного среза. Найти изотоническую концентрацию и вычислить осмотическое давление клеточного сока по уравнению Вант-Гоффа. Сделать вывод о зависимости степени плазмолиза клеток от концентрации наружного раствора (с соответствующим объяснением).

Работа 2. Влияние различных факторов на выход электролитов из клеток

Материалы и оборудование

- 1) двухдневные проростки сои, выращенные на влажной фильтровальной бумаге в темноте при температуре 28 °С;
- 2) бюксы объемом 20–50 мл;
- 3) пипетки;
- 4) термостат на 28 °С;
- 5) две водяные бани с температурой 40 и 45 °С;
- 6) кондуктометр.

Принципиальные основы метода

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

Одной из первых и неспецифических реакций растений на действие различных стрессов является повреждение клеточных мембран, которое ведет к изменению их проницаемости. Характер изменения проницаемости мембран зависит от устойчивости растения к действующему фактору. Этот показатель может служить тестом при отборе устойчивых форм в селекционной работе. Объектом могут быть растения, инфицированные разными патогенами; растения, выращенные в разных условиях снабжения водой; разные органы растений, подвергшиеся действию температурного стресса, и т.д. Исследование самых разных организмов (от бактерий и растений до человека) показало, что при стрессовых воздействиях во всех клетках (за исключением пыльцы) изменяется спектр синтеза белков: синтез обычных белков прекращается и индуцируется синтез так называемых шоковых белков. Предполагают, что шоковые белки выполняют защитную функцию, предохраняя от повреждений мРНК, мембраны, органеллы клетки. Наиболее изучено воздействие на синтез и функции шоковых белков теплового стресса. Существует положительная корреляция между накоплением белков теплового шока (далее – БТШ) и термоустойчивостью растений. Так, длительная инкубация проростков сои при температуре 45 °С приводит к их гибели; выход электролитов из клеток

пропорционален времени. Если проростки предварительно инкубируют при 40 °С, то выход электролитов при дальнейшей летальной обработке (45 °С) значительно снижается. Снижение воздействия теплового шока в этом опыте связано с синтезом и накоплением БТШ, которые появляются при длительном воздействии температуры 40°С или при кратковременном действии температуры 45 °С и последующей инкубации при 28 °С. Целью данной работы является исследование влияния теплового шока на выход электролитов из проростков сои.

Ход работы

Для каждого варианта опыта берут десять проростков сои, отделяют семядоли, промывают водопроводной водой, ополаскивают три раза дистиллированной водой, помещают в бюксы, заливают 10 мл дистиллированной воды и проводят пять вариантов исследования: 1) инкубируют в термостате с температурой 28 °С; 2) инкубируют в течение 7 мин на водяной бане при 45 °С, затем в термостате при 28 °С; 3) инкубируют на водяной бане при 40 °С; 4) инкубируют на водяной бане при 45–50 °С; 5) инкубируют в течение 30–60 мин на водяной бане при 40 °С, затем 7 мин при 45 °С и далее в термостате при 28 °С. Время окончательной инкубации во всех вариантах 3 ч. Через каждые 30–60 мин берут пробу для определения электропроводности. Для этого встряхивают бюкс и отбирают пипеткой по 1 мл жидкости, охлаждают ее до комнатной температуры и измеряют электропроводность с помощью кондуктометра. Жидкость после измерения выливают в тот же бюкс.

Полученные результаты представьте в виде графика зависимости электропроводности (в усл. ед.) от времени. Сделайте выводы.

Работа 3. Влияние температуры на проницаемость клеточных мембран для бетацианина

Материалы и оборудование

- 1) корень столовой свеклы (*Beta vulgaris*);
- 2) 1М водный раствор сахарозы;
- 3) сверло (пробковое) диаметром 5 мм;
- 4) лезвие, линейка;
- 5) воронка Бюхнера;
- 6) пробирки;
- 7) пипетки;
- 8) термостаты с температурой 35 и 45–50 °С;
- 9) фотоэлектроколориметр (далее – ФЭК).

Принципиальные основы метода

Бетацианин – пигмент столовой свеклы – относительно большая, хорошо растворимая в воде молекула, находящаяся в клеточном соке. Чтобы попасть во внешнюю среду, молекула бетацианина должна пройти через тонопласт, основной цитоплазматический матрикс и плазмалемму. Диффузия бетацианина из вакуоли в среду может проходить достаточно быстро при действии различных факторов или агентов, вызывающих изменение проницаемости мембраны. Измеряя оптическую плотность инкубационной среды через определенный промежуток времени, можно оценить степень воздействия данного фактора на проницаемость мембран. Этот простой и быстрый метод используют обычно в прикладных исследованиях при изучении действия какого-либо вещества или фактора на биологические объекты. Целью данной работы является исследование влияния температуры на проницаемость мембран для бетацианина по выходу его в различные инкубационные среды.

Ход работы

Из корня столовой свеклы сверлом вырезают столбики ткани диаметром 5 мм, с помощью лезвия и линейки разрезают их на миллиметровые кусочки. Стараясь выбирать одинаковые по цвету, отсчитывают 60 дисков, которые для удаления остатков клеток в течение 15–20 мин промывают водопроводной водой на воронке Бюхнера. В три пробирки наливают по 10 мл воды, в три другие – по 10 мл сахарозы. В каждую пробирку помещают по десять дисков свеклы. Две пробирки (одна с водой, другая с сахарозой) оставляют при комнатной температуре, две другие ставят в водяную баню с температурой 35 °С, замечают время, две оставшиеся пробирки (с водой и сахарозой) помещают в водяную баню при 45 °С и также отмечают время. В течение 1 ч через каждые 10–15 мин в пробирках измеряют выход бетацианина в раствор. Для этого из опытной пробирки пипеткой отливают раствор в чистую пробирку и после измерения оптической плотности вливают раствор в ту же опытную пробирку, стараясь не терять жидкость. Измерение плотности проводят на ФЭКе с зеленым светофильтром (кюветы 0,5 см) или спектрофотометре при длине волны = 535 нм.

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

Работа 4. Влияние ионов калия и кальция на вязкость цитоплазмы

Материалы и оборудование

- 1) луковица синего лука;
- 2) растворы 1 М KNO_3 и 0,7 М $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ в капельницах (оба раствора должны быть приготовлены из химически чистых солей на дистиллированной или, еще лучше, бидистиллированной воде);
- 3) лезвие бритвы;
- 4) препаровальная игла;

- 5) микроскоп;
- 6) предметные и покровные стекла;
- 7) карандаш по стеклу;
- 8) вазелин;
- 9) фильтровальная бумага.

Принципиальные основы метода

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 большой 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.

Ход работы

Нанести на предметные стекла по капле растворов KNO_3 и $Ca(NO_3)_2$ (сделать на стеклах соответствующие надписи). Поместить в растворы по кусочку эпидермиса с окрашенным клеточным соком и закрыть покровными стеклами. Во избежание испарения смазать края покровных стекол вазелином (или время от времени вводить под покровные стекла новые капли растворов). Записать время погружения срезов в растворы и сразу приступить к наблюдению под микроскопом, отмечая время наступления фаз плазмолиза (при этом не следует принимать во внимание периферическую зону, так как там свойства цитоплазмы могут быть изменены вследствие раневого раздражения). Результаты записать в табл. 4.

Таблица 4

Плазмолитик	Время погружения в раствор	Время наступления плазмолиза		
		уголкового	вогнутого	выпуклого
KNO_3				
$Ca(NO_3)_2$				

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

Работа 5. Прижизненное окрашивание клеток нейтральным красным

Материалы и оборудование

- 1) луковица обыкновенного лука;
- 2) листья разных растений;
- 3) 0,02%-й раствор нейтрального красного в капельнице;
- 4) 1 М раствор KNO_3 в капельнице;
- 5) скальпель;
- 6) лезвие бритвы;
- 7) препаровальная игла;
- 8) микроскоп;
- 9) предметные и покровные стекла;
- 10) стеклянная палочка;
- 11) стаканчик с водой;
- 12) кусочки фильтровальной бумаги;
- 13) цветные карандаши.

Принципиальные основы метода

Подобно метиленовой синей краске нейтральный красный способен проникать в живые клетки и накапливаться в них в больших количествах. При непродолжительном пребывании клеток в растворе нейтрального

красного цитоплазма не отмирает, в чем можно убедиться, вызвав плазмолиз окрашенных клеток (плазмолизироваться могут только живые клетки). Нейтральный красный – двухцветный индикатор: в кислой среде ($\text{pH} < 6$) он имеет малиновую окраску, в щелочной – желтую.

Для понимания результатов данной работы необходимо иметь в виду, что в растворе с pH около 7 нейтральный красный находится в форме недиссоциированных молекул, хорошо растворимых в липидах мембран, тогда как в кислой среде ($\text{pH} < 6$) это вещество диссоциирует на ионы, плохо растворимые в липидах.

Ход работы

Приготовить 2–3 среза эпидермиса чешуи обыкновенного лука или листьев каких-либо других растений и поместить их на предметное стекло в большую каплю раствора нейтрального красного, не накрывая покровным стеклом (при хорошем доступе воздуха прокрашивание происходит быстрее). Через 10–15 мин (не более) отсосать раствор краски фильтровальной бумагой, перенести срезы в каплю воды, накрыть покровным стеклом и рассмотреть в микроскоп. Заменить воду 1 М раствором KNO_3 и продолжать наблюдения при большом увеличении. Зарисовать плазмолизированную клетку, отметив, какая часть окрашена красителем (клеточная стенка, цитоплазма или вакуоль) и в какой цвет (раскрасить цветным карандашом).

Ответить на следующие вопросы.

1. Велика ли проницаемость цитоплазмы для нейтрального красного?
2. Какова реакция (pH) содержимого исследованных клеток?
3. Как объяснить накопление нейтрального красного в клетках?

Работа 6. Определение жизнеспособности семян методом окрашивания (по Д.Н. Нелюбову)

Материалы и оборудование

- 1) семена гороха, намоченные в воде за 10–15 ч до занятия;
- 2) 0,1%-й раствор индигокармина (1 г на 1 л дистиллированной воды);
- 3) чашки фарфоровые (2 шт.);
- 4) стакан химический;
- 5) стакан фаянсовый с влажными опилками;
- 6) тарелка;
- 7) препаровальная игла;
- 8) электроплитка;
- 9) карандаш по стеклу.

Принципиальные основы метода

Метод окрашивания семян для определения их всхожести основан на непроницаемости живой цитоплазмы для некоторых красок (индигокармин, кислый фуксин), тогда как мертвая цитоплазма легко прокрашивается. Бывают случаи, когда зародыш мертвый и тем не менее при погружении семени в раствор краски оно не окрашивается из-за того, что окружающие зародыш части семени не пропускают краску. В связи с этим необходимо предварительно обнажить зародыш: у семян с эндоспермом извлечь зародыш или разрезать семя вдоль, а у семян без эндосперма удалить семенные покровы. Подготовленные описанным способом семена выдерживают в растворе краски от 1 до 3 ч (в зависимости от вида растения) и оценивают жизнеспособность семян: семена с полностью окрашенными зародышами или с окрашенными корешками считают невсхожими, семена неокрашенные или с частично окрашенными семядолями относят к числу жизнеспособных. Данный метод используют для быстрой оценки всхожести семян гороха, фасоли, люпина, льна, конопли, тыквенных.

Ход работы

Отсчитать, не выбирая, две порции по 10 набухших семян гороха. Одну порцию поместить в стакан с водой и прокипятить в течение 5 мин (контроль). Осторожно, не повреждая семядоли, очистить препаровальной иглой семена обеих порций от кожуры, поместить в фарфоровые чашки, залить раствором индигокармина и выдержать 1 ч, после чего слить краску обратно в бутылочку, а семена отмыть водой от избытка красителя. Отметить окраску семян, убитых кипячением. В опытной порции подсчитать количество окрашенных, частично окрашенных и неокрашенных семян. Для проверки всхожести высадить все 10 семян в стакан с влажными опилками, поставить в темный шкаф и ежедневно поливать. Через несколько дней подсчитать количество проросших семян. Результаты записать в табл. 5.

Таблица 5

Объект	Кол-во взятых семян, шт.	Количество семян, шт.				
		окрашен- ных пол- ностью	окрашен- ных частично	неокра- шенных	проросших	непро- росших

Сопоставить результаты, полученные методом окрашивания и методом проращивания.

Работа 7. Определение сосущей силы клеток при изменении концентрации растворов

Материалы и оборудование

- 1) свежие листья каких-либо растений;
- 2) 1 М раствор сахарозы;

- 3) дистиллированная вода;
- 4) спиртовой раствор нигрозина в капельнице или метиленовая синяя кристаллическая;
- 5) рефрактометр;
- 6) пробочное сверло диаметром 7–8 мм;
- 7) препаровальная игла;
- 8) термометр;
- 9) бюретки с воронками (2 шт.);
- 10) двухрядный штатив с пробирками: в нижнем ряду – обычные пробирки с пробками (7 шт.), в верхнем – маленькие пробирки объемом 3–4 мл с пробками (7 шт.);
- 11) большая корковая пробка;
- 12) стеклянная палочка;
- 13) пипетки с оттянутым в капилляр концом, с выходным отверстием не более 1 мм (7 шт.);
- 14) карандаш по стеклу;
- 15) кусочки фильтровальной бумаги.

Принципиальные основы метода

Сила, с которой клетка способна всасывать воду, называется сосущей силой клетки. В отличие от любого раствора, сосущая сила которого численно равна его осмотическому давлению, сосущая сила растительной клетки, целлюлозная стенка которой препятствует поступлению воды, равна разности между осмотическим давлением клеточного сока (P) и тургорным давлением (T); $S_{\text{клетки}} = P - T$. При погружении клетки в какой-либо раствор водообмен между ними определяется соотношением их сосущих сил: вода передвигается в ту сторону, где больше сосущая сила. Для определения сосущей силы клеток куски исследуемой ткани погружают в ряд растворов известной концентрации и подбирают такой раствор, сосущая сила которого равна сосущей силе клеток. В отличие от плазмолитического метода определения осмотического давления клеточного сока, где критерием служит начало плазмолиза, при определении сосущей силы клеток критерием является неизменность

содержания воды в клетках. Наиболее точные методы определения сосущей силы клеток основаны на измерении концентрации окружающих клетки растворов. Если погрузить растительную ткань в раствор, сосущая сила которого больше сосущей силы клеток, то раствор будет отсасывать воду из клеток, вследствие чего его концентрация уменьшится. Наоборот, если сосущая сила клеток больше сосущей силы раствора, то клетки всасывают воду из раствора, который становится при этом более концентрированным. При равенстве сосущих сил клеток и раствора не происходит ни всасывания, ни отнятия воды, в результате чего концентрация раствора остается без изменения. Изменение концентрации можно установить путем определения показателя преломления (рефрактометрический метод) или плотности растворов (метод струек). В данной работе рекомендуется использовать оба метода (с одним и тем же материалом).

Ход работы

Тщательно вымыть пробирки (7 обычных и 7 маленьких), сполоснуть их дистиллированной водой, высушить в сушильном шкафу и снабдить надписями карандашом по стеклу. Смешивая соответствующие количества молярного раствора сахарозы и дистиллированной воды, приготовить по 10 мл растворов следующих концентраций (моль/л): 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1. Для приготовления растворов использовать большие пробирки. После тщательного перемешивания отлить в маленькие пробирки по 5 мл приготовленных растворов и закрыть пробирки пробками. Вырезать при помощи острого пробочного сверла диски из листьев недалеко от средней жилки, не захватывая по возможности крупных жилок (для этого повернуть листья нижней стороной вверх и подложить под листья пробку). Разложить по три диска в маленькие пробирки, закрыть их пробками. Выдержать

диски в растворах 30–40 мин, время от времени встряхивая пробирки и следя за тем, чтобы диски были все время погружены в растворы. По истечении указанного времени вынуть пробы из растворов препаровальной иглой и закрыть пробирки пробками. Определить изменение концентрации растворов после пребывания в них дисков из листьев.

Рефрактометрический метод (по Н.А. Максимова и Н.С. Петинору)

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

Метод струек (по В.С. Шардакову)

Данный метод основан на изменении плотности растворов после пребывания в них изучаемых объектов. Раствор, в котором находились кусочки исследуемых листьев, вносят пипеткой в пробирку с раствором исходной концентрации. Если струйка пойдет вниз, это будет свидетельствовать об увеличении концентрации раствора. Движение струйки вверх указывает, что концентрация раствора уменьшилась. Если струйка останется на месте, то плотность раствора не изменилась и, следовательно, сосущая сила клеток равна сосущей силе этого раствора. Работу проводят с теми же растворами, которые использовались для рефрактометрического метода.

Таблица 6

Молярность раствора сахарозы	Осмотическое давление при 20 °С, МПа	Коэффициент преломления растворов		Направление движения струек	Соотношение между S раствора и S клеток
		исходный	после пребывания дисков		
0,1	0,263				
0,2	0,537				
0,3	0,821				
0,4	1,125				
0,5	1,449				
0,6	1,803				
0,7	2,178				

Уравнение Вант-Гоффа ($P = RTC$) вполне справедливо только для слабых растворов (до 0,1 М). В таблице приведены более точные, эмпирически полученные величины.

Перед определением подкрасить растворы, для чего внести в маленькие пробирки по кристаллику метиленовой синей на кончике препаровальной иглы. Много краски добавлять нельзя, так как это может вызвать увеличение концентрации раствора. Вместо метиленовой синей

целесообразнее внести в пробирки по капле спиртового раствора нигрозина, поскольку эта краска очень слабо растворяется в воде. Встряхнув содержимое пробирки, набрать окрашенную жидкость в пипетку с оттянутым в капилляр концом и опустить в соответствующую пробирку с исходным раствором так, чтобы нижний конец пипетки был погружен в раствор на 2–3 см. Медленно выпуская раствор, проследить за направлением движения струйки окрашенной жидкости. Каждый раствор следует брать чистой сухой пипеткой. Полученные результаты записать в форме таблицы.

Сделать выводы о причинах изменения концентрации растворов и записать значения сосущей силы клеток перед их погружением в растворы.

Работа 8. Определение сосущей силы клеток упрощенным методом (по Уршпрунгу)

Материалы и оборудование

- 1) большой клубень картофеля;
- 2) 1 М раствор NaCl;
- 3) дистиллированная вода;
- 4) бюретки с воронками (2 шт.);
- 5) тарелка;
- 6) нож большой (кухонный);
- 7) скальпель;
- 8) пинцет;
- 9) крышка чашек Петри (7 шт.);
- 10) кусок стекла с прямыми углами (предметное стекло);
- 11) фильтровальная бумага;
- 12) карандаш по стеклу;
- 13) полоски миллиметровой бумаги 10 × 10 см;
- 14) термометр комнатный.

Принципиальные основы метода

Поступление воды в клетку определяется ее сосущей силой (S), которая зависит от степени насыщения клетки водой. В состоянии полного завядания (или начинающегося плазмолиза) тургорное давление

отсутствует и сосущая сила клетки равна ее осмотическому давлению ($T = 0, S = P$). При погружении клеток в воду тургорное давление достигает максимальной величины, а сосущая сила падает до нуля ($T = P, S = 0$). Клетки наземных растений, как правило, не бывают насыщены водой, у таких клеток $T < P$, а $S = P - T$. Определение сосущей силы клеток упрощенным методом Уршпрунга осуществляется, как и в предыдущей работе, путем подбора равновесного (изопестического) раствора, в котором не происходит ни потери, ни поглощения воды клетками. Однако данный метод основан на измерении не концентрации растворов, а размеров кусков, вырезанных из исследуемых органов растений и погруженных в растворы известной концентрации: при погружении куска ткани в раствор, S которого больше S клеток, раствор отнимает воду от клеток и их размеры уменьшаются. Если S клеток больше S раствора, то клетки всасывают воду и увеличиваются в объеме. При равенстве S клеток и раствора размеры клеток не изменяются. Если методами, описанными в работе 7, можно определить сосущую силу любых растительных объектов, то упрощенный метод Уршпрунга пригоден только для крупных паренхиматозных органов со слабо развитыми механическими тканями (клубней, корнеплодов). Достоинство данного метода – простота и возможность непосредственно наблюдать за изменениями тургора в зависимости от степени насыщения клеток водой.

Ход работы

Приготовить по 20 мл растворов NaCl концентрации(моль/л): 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0, смешивая в чашках соответствующие количества 1М раствора и воды. В одну чашку налить чистую воду. Вырезать из картофельного клубня большим ножом плоско-параллельную пластинку толщиной 3–4 мм, положить пластинку на тарелку; пользуясь предметным

стеклом, вырезать из пластинки прямоугольник шириной 20–30 мм и длиной 40–70 мм (чем длиннее, тем лучше). Разрезать прямоугольник вдоль на 7 одинаковых полосок шириной 2–3 мм, измерить их длину с точностью до 0,5 мм и погрузить одну полоску в воду, а остальные – в приготовленные растворы, следя за тем, чтобы погружение было полным (даже небольшая часть полоски, оказавшаяся вне раствора, будет испарять воду, что приведет к грубому искажению результатов опыта). Готовить и измерять полоски следует быстро, не допуская подвядания материала. Тарелка, на которой разрезают клубень, стекло и скальпель должны быть сухими. Вытекающий из клубня при разрезании сок удаляют фильтровальной бумагой. Через 20–30 мин пинцетом извлечь полоски из растворов, промокнуть фильтровальной бумагой и повторно измерить их длину. Записать результаты в таблицу. Отметить тургор – слабый или его отсутствие; для определения этого показателя разложить полоски на тарелке так, чтобы они наполовину свисали с ее края. Сделать выводы, объяснив причины изменения размеров полосок в растворах разной концентрации, и записать сосущую силу клеток перед погружением их в растворы.

Таблица 7

Концентрация NaCl, моль/л		1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0
Сосущая сила раствора, МПа								
Длина полоски, мм	исходная							
	после пребывания в растворе							
Тургор								

На основе полученных данных нужно вычертить диаграмму, показывающую, как изменяются сосущая сила клеток (S), осмотическое

давление клеточного сока (P) и тургорное давление (T) при изменении степени насыщения клеток водой. Если до погружения в растворы 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.

Заполнить таблицу, в которую записать показатели, характеризующие состояние клеток после пребывания в растворах.

Таблица 8

Концентрация NaCl, моль/л	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0
Длина полоски, мм							
Сосущая сила S , Мпа							
Осмотическое давление P , Мпа							
Тургорное давление T , МПа							

1. Длина полосок (l). В 1-ю строку формы записать длину полосок после пребывания клеток в растворах, начиная с наименьшей концентрации. При совпадении длины полосок в нескольких самых крепких растворах (например 0,6; 0,8 и 1,0 М) выбрать наиболее слабый из них (в приведенном примере 0,6 М), поскольку уже в этом растворе клеточные стенки достигли предела сокращения.

2. Сосущая сила клеток (S). Исходя из того что полоски достаточно долго пролежали в растворах и перестали изменяться в длине (между клетками и растворами установилось равновесие), следует полагать, что сосущая сила клеток сравнялась с сосущей силой внешних растворов.

3. Осмотическое давление клеточного сока (P). Для самой короткой полоски (l_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):

$$P_1 l_1 = P_n l_n,$$

откуда $P_n = P_1 l_1 / l_n$.

4. Тургорное давление (T) находим по формуле

$$S = P - T,$$

откуда $T = P - S$.

Заполнив форму, вычертить диаграмму. Для этого на миллиметровой бумаге начертить систему координат, откладывая по оси абсцисс миллиметры, а по оси ординат – мегапаскали. На оси абсцисс отложить, соблюдая определенный масштаб, длину полосок (l), например 1 мм = 1 см, причем точку пересечения осей обозначить не нулем, а l_1 . На оси ординат сначала отложить значения P , затем значения T и полученные точки соединить линиями. Получатся графики зависимости P и T от степени насыщения клеток водой. Значения для S откладывать не придется, так как эти величины будут представлены отрезками $P - T$. В выводах указать, как изменяются P , T и S в зависимости от насыщения клеток водой.

Работа 9. Выделение субклеточных фракций из колеоптилей пшеницы

Материалы и оборудование

- 1) ультрацентрифуга;
- 2) весы аналитические;
- 3) гомогенизатор или фарфоровая ступка;
- 4) колба на 500 мл (1 шт.);
- 5) пипетка на 5 мл (1 шт.);
- 6) центрифужные пробирки;
- 7) колеоптили проростков пшеницы;
- 8) среда гомогенизации – 0,5 М раствор сахарозы, 10 мМ раствор 2-меркаптоэтанола, 5 мМ раствор ЭДТА, 50 мМ трис-НСl буфер с рН 7,8.

Принципиальные основы метода

Основными субклеточными органеллами являются митохондрии, ядро, лизосомы, мембраны эндоплазматического ретикулума. Для выделения субклеточных структур готовится определенная среда, содержащая соединения, препятствующие их разрушению, и сохраняющая весь спектр низко- и высокомолекулярных биогенных соединений, которые в дальнейшем можно определить с помощью стандартных аналитических методов исследования. В основе способа выделения субклеточных фракций используется метод ультрацентрифугирования, который позволяет получить в достаточном количестве субклеточные элементы (ядра, митохондрии, хлоропласты и микросомы) и изучить их состав и функции. Все операции необходимо проводить при температуре 0...4 °С, используя охлажденную посуду и растворы.

Ход работы

Буферный раствор готовится из исходных 0,05 М растворов триса и HCl путем их смешивания на рН-метре до рН 7,8. Затем в буферный раствор добавляют сахарозу (171 мг/мл), 2-меркаптоэтанол (0,781 мг/мл) и ЭДТА (1,461 мг/мл).

Навеску колеоптилей пшеницы (12...15 г) растирают на гомогенизаторе или в фарфоровой ступке в течение 1 мин с 1...2 объемами среды гомогенизации при температуре 0...4 °С и слабом освещении. Гомогенат фильтруют через 4 слоя марли и центрифугируют при 750 g в течение 10 мин, осажая ядра и мембраны клеточных стенок. Надосадочную жидкость осторожно переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 15 мин при 15 000 g. В осадке получают фракцию митохондрий. Надосадочную жидкость вновь центрифугируют при 106 000 g в течение 60 мин. В осадке получают фракцию микросом.

Нарисовать схему эксперимента, выделить этапы получения субклеточных фракций. Назвать и описать строение компонентов субклеточных фракций.

Работа 10. Способ выделения митохондрий из растительных тканей

Материалы и оборудование

- 1) центрифуга;
- 2) рН-метр;
- 3) аналитические весы;
- 4) проростки пшеницы;
- 5) 0,9%-й раствор NaCl или KCl;
- 6) 0,25...0,3 М раствор сахарозы, содержащий 10 мМ ЭДТА (рН 7,4);
- 7) 0,25 М раствор сахарозы, содержащий 10 мМ триэтанолamina и 2 мМ ЭДТА (рН 7,4);
- 8) 0,01 М фосфатный буфер (рН 7,4...7,5).

Принципиальные основы метода

Митохондрии служат органеллами, осуществляющими в клетках растений функции дыхания. Митохондрии имеют двойную мембрану. Внутренняя мембрана образует выросты – кристы. Внутреннее пространство митохондрии заполнено матриксом, где локализуются ферменты цикла трикарбоновых кислот, окисления жирных кислот и нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК) для биосинтеза белка. Во внутренней мембране расположены компоненты электронтранспортной системы. Предлагаемый способ позволяет выделить из клеток растений митохондрии и изучить функциональную активность некоторых ферментов.

Ход работы

Все реактивы готовят перед началом исследований на бидистиллированной воде и хранят при +4 °С.

Условия эксперимента

Выделение субклеточных фракций проводят при 0 °С. Для этого используют ледяную баню, или процедуры проводят в холодной комнате. Предварительно охлаждают и инструменты, используемые во время исследований.

Получение гомогената

На аналитических весах взвешивают измельченную растительную ткань (навеска 1 г) и помещают в стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком. Гомогенизирование растительной ткани проводят в выбранной среде выделения при соотношении 1 : 9 (1 г ткани на 9 мл охлажденной среды выделения) в течение 30...60 с при скорости вращения пестика 800...900 об./мин. Все процедуры проводят при низкой температуре. Полученный тканевой гомогенат фильтруют или подвергают центрифугированию.

Градиентное центрифугирование

На первом этапе центрифугирования достигается удаление не полностью разрушенных клеток и ядер. Для этого гомогенат помещают в центрифужную пробирку, уравнивают и центрифугируют в течение 10 мин при 10^3 g. Супернатант I осторожно сливают, а осадок, содержащий ядра и неразрушенные клетки, отбрасывают. На втором этапе для осаждения митохондрий супернатант I центрифугируют в течение 10 мин при $14 \cdot 10^3$ g. После центрифугирования в осадке получают митохондрии, которые промывают средой выделения. Если митохондрии выделяли в сахарозной среде, то для промывки используют 0,25 М раствор сахарозы, не содержащий ЭДТА. Для этого к осадку митохондрий добавляют 5 мл среды выделения и осторожно гомогенизируют вручную с помощью тефлонового пестика. Затем полученную взвесь митохондрий еще раз центрифугируют (10 мин при $14 \cdot 10^3$ g). Супернатант III отбрасывают, а осадок промытых митохондрий используют в аналитических исследованиях.

Исследование митохондрий

Для изучения активности митохондриальных ферментов, которые локализируются на внутренней мембране или матриксе, необходимо разрушить органеллы. Для этого используют ультразвук, многократное действие замораживания и оттаивания, обработку детергентом (дигитонин, производные холевой или дезоксихолевой кислот, додецилсульфат натрия, тритон X-100, твин-80 и др.). При анализе активности трансаминаз (АсТ и АлТ), сукцинат- и малатдегидрогеназ митохондрии разрушают с помощью 0,1%-го раствора тритона X-100 в соотношении 1 : 2 (на 1 г ткани добавляют 2 мл тритона X-100). Осадок митохондрий суспендируют вручную в стеклянном гомогенизаторе, оставляя после этого пробы на 25...30 мин при 0 °С. Фрагменты митохондриальных мембран удаляют центрифугированием в течение 20 мин при $24 \cdot 10^3$ g. При исследовании активности ферментов пируват- и α -кетоглутарат-дегидрогеназного комплекса митохондрии разрушают путем замораживания и оттаивания. При этом замораживание осуществляется при -20 °С, а оттаивание – при $+23$ °С. Действие повторяют 3–4 раза.

Записать условия опыта и нарисовать схему эксперимента.

Зарисовать митохондрии и написать формулу АТФ.

ФОТОСИНТЕЗ

Работа 11. Оптические свойства хлорофилла

Материалы и оборудование

- 1) концентрированная спиртовая или ацетоновая вытяжка пигментов зеленого листа;
- 2) раствор каротина (бензиновая вытяжка корнеплода моркови);
- 3) раствор ксантофилла, полученный при разделении пигментов по Краусу;
- 4) спирт или ацетон;
- 5) спектроскоп;
- 6) настольная лампа;
- 7) чугунный штатив с двумя лапками;
- 8) штатив с пробирками (7 шт.);
- 9) пипетки градуированные на 5–10 мл (2 шт.);
- 10) кусок черной бумаги или черной материи;
- 11) цветные карандаши.

Принципиальные основы метода

Основное свойство хлорофилла – его способность поглощать световую энергию, причем свет поглощается хлорофиллом избирательно. В этом можно убедиться, пропуская белый свет через раствор хлорофилла, а затем разлагая его при помощи призмы. Отдельные участки спектра окажутся поглощенными, и на их месте будут видны темные полосы. Полученный спектр называется спектром поглощения. Сопоставляя спектры поглощения растворов разной концентрации (или одного и того же раствора, но при разной толщине слоя), можно установить степень поглощения отдельных лучей: чем слабее поглощается данный участок спектра, тем концентрированнее нужно взять раствор, чтобы добиться исчезновения этого участка в спектре поглощения. Наиболее сильно поглощаемые лучи

можно определить по полосам в спектре поглощения очень разбавленного раствора, тогда как наименее поглощаемые лучи проходят даже через довольно концентрированный раствор. Хлорофилл обладает и другим оптическим свойством – флюоресценцией, возникающей при поглощении света. Это явление объясняется переходом молекул хлорофилла из возбужденного в нормальное состояние. Флюоресценция – признак фотохимической активности хлорофилла.

Ход работы

1. Спектры поглощения пигментов

Направить спектроскоп на источник света. Отрегулировать ширину щели на конце трубы спектроскопа так, чтобы спектр получился четкий и достаточно яркий (при слишком широкой щели спектр получается размытый, нечистый, при очень узкой щели освещенность спектра недостаточна). Налить исследуемый раствор в пробирку и закрепить в лапке штатива перед щелью спектроскопа. Изучить спектры поглощения растворов хлорофилла разной концентрации, разбавляя вытяжку из зеленого листа в отношениях 1:1, 1:3, 1:5, 1:15. Для сравнения рассмотреть спектр бензиновой вытяжки из корнеплода моркови, содержащей каротин, и спиртовой раствор ксантофилла, полученный при разделении пигментов по Краусу. Зарисовать спектры по форме, приведенной в таблице, причем поглощенные участки закрасить черным, а видимые участки – цветными карандашами. Если в лаборатории есть регистрирующий спектрофотометр (например СФ-10), то целесообразно записать спектр поглощения самого разбавленного раствора хлорофилла и зарисовать полученную кривую.

Ответить на контрольные вопросы:

1. Лучи какого участка спектра поглощаются хлорофиллом наиболее сильно?

2. Лучи какого участка спектра поглощаются хлорофиллом наиболее слабо?

3. Какие лучи поглощают желтые пигменты?

2. Флюоресценция хлорофилла

Рассмотреть вытяжку пигментов в отраженном свете, для чего поместить пробирку на черном фоне у окна или у электролампы и рассмотреть со стороны, откуда падает свет. Отметить окраску раствора и записать вывод о способности хлорофилла к флюоресценции.

Таблица 9

Цвет Разведение	ф	с	г	з	ж	о	к
Растворы хлорофилла							
1:15							
1:5							
1:3							
1:1							
Неразведенный раствор							
каротина							
ксантофилла							

Работа 12. Определение интенсивности фотосинтеза методом ассимиляционной колбы (по Л.А. Иванову и Н.Л. Коссович)

Материалы и оборудование

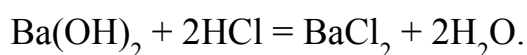
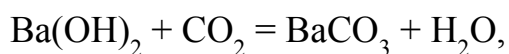
- 1) комнатные растения или свежесрезанные побеги, поставленные в банку с водой;
- 2) 0,025 н. раствор $\text{Ba}(\text{OH})_2$ в бутылки, соединенной с бюреткой, закрытой пробкой;
- 3) 0,025 н. HCl с бюреткой;
- 4) фенолфталеин в капельнице;

- 5) одинаковые круглодонные колбы емкостью 1,5–3 л (2 шт.);
- 6) салфетки, куски бумаги (2 шт.);
- 7) резиновые пробки;
- 8) штатив или широкогорлые сосуды для установки колб в перевернутом положении;
- 9) бритва;
- 10) кристаллизатор;
- 11) электрическая лампа 200–300 Вт;
- 12) кипяченая вода;
- 13) технические весы;
- 14) разновес;
- 15) ножницы;
- 16) миллиметровая бумага.

Принципиальные основы метода

Метод основан на определении количества диоксида углерода, поглощенного листьями при фотосинтезе. Побег или отдельный лист помещают в повернутую вверх дном стеклянную колбу и выставляют на свет на определенное время. Часть содержащегося в колбе диоксида углерода потребляется в процессе фотосинтеза. Затем связывают не поглощенный листьями CO_2 , наливая в колбу некоторый избыток раствора щелочи, после чего оставшуюся щелочь титруют соляной или щавелевой кислотой. Проводят то же самое с контрольной колбой (без растения) и сопоставляют результаты титрования.

Если опытная и контрольная колбы имеют равный объем и если в обе колбы было налито одинаковое количество раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$, то количество поглощенного растением диоксида углерода будет прямо пропорционально разности результатов титрования содержимого этих колб. Для того чтобы установить, какому количеству CO_2 соответствует 1 мл используемой для титрования кислоты, сопоставим реакции, в которые вступает прилитая в колбу щелочь:



Из приведенных уравнений видно, что 1 моль HCl соответствует 0,5 моля CO₂, т.е. 44:2 = 22 г CO₂.

При концентрации HCl 0,025 н в 1 мл этого раствора содержится 0,000025 моля HCl, что эквивалентно $22 \times 0,000025 = 0,00055$ г, или 0,55 мг CO₂.

Данный метод дает достаточно точные результаты лишь в том случае, если все операции по открыванию и закрыванию колб проводить не прикасаясь к стеклу руками (в противном случае воздух, расширяясь при нагревании, будет частично выходить из колб).

Если нужно определить фотосинтез более точно, то ставят опыт в двух повторностях и, кроме того, учитывают дыхание, для чего проделывают такой же опыт, закрывая колбу (для исключения фотосинтеза) светонепроницаемым чехлом (черным внутри и белым снаружи).

Ход работы

Взять две одинаковые колбы и обернуть их горла кусками бумаги или салфетками. Выдержать колбы в одинаковых условиях открытыми в течение 20–30 мин для заполнения воздухом. Затем одновременно вставить в них пробки с отверстиями, закрытыми стеклянными пробками, не допуская нагревания колб прикосновением рук.

Срезать веточку или отдельный лист, обновить бритвой срез под водой и поставить в заполненную водой пробирку, прикрепленную к палочке, вставленной в пробку (воду употреблять кипяченую, чтобы не было пузырьков воздуха). Быстрым, но спокойным движением вынуть из колбы

пробку № 1 и вставить пробку № 2 (с растением). Выставить колбу на свет и отметить время. Во время опыта необходимо следить за температурой внутри колбы и в случае перегрева охладить колбу водой. Особенно важно, чтобы в конце опыта температура была такой же, как и в начале, иначе воздух может войти в колбу или выйти из нее.

Продолжительность опыта должна быть такой, чтобы листья успели поглотить не более 25 % содержащегося в колбе CO_2 , при хорошем освещении для колбы вместимостью 1 л экспозиция не должна превышать 5 мин, для более крупных колб – 15–20 мин. По окончании опыта извлечь из колбы растение и быстро закрыть пробкой №1, отметив время. Контрольную колбу также приоткрыть на несколько секунд. Налить в колбы через отверстие в пробке по 20 мл 0,025 н. раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и по 2–3 капли фенолфталеина и немедленно закрыть отверстие стеклянной пробкой.

Для увеличения поверхности соприкосновения $\text{Ba}(\text{OH})_2$ с воздухом осторожно смочить этим раствором стенки колб и в течение 20 мин периодически взбалтывать, после чего провести через отверстие в пробке титрование 0,025 н. соляной кислотой до исчезновения розового окрашивания.

Определить площадь листьев методом, описанным в работе 39.

Результаты записать в табл. 10.

Таблица 10

Объект	Время			Площадь листьев, дм^2	Объем прилитого $\text{Ba}(\text{OH})_2$	Расход HCl , мл		Правка к титру HCl	Интенсивность фотосинтеза, $\text{мг/дм}^2\text{ч}$
	начало	конец	экспозиция, мин			опыт	контроль		

Интенсивность фотосинтеза I_{ϕ} вычислить по формуле

$$I_{\phi} = (A - B) \cdot K \cdot 0,55 \cdot 60 / (s - t),$$

где A – количество мл HCl , пошедшее на титрование барита в опытной колбе; B – количество мл HCl , пошедшее на титрование барита в контрольной колбе; K – поправка к титру HCl ; 0,55 – число мг CO_2 , соответствующее 1 мл 0,025 н. HCl ; s – площадь листьев, дм^2 ; t – экспозиция, мин; 60 – коэффициент перевода минут в часы.

Работа 13. Пигменты зеленого листа

Материалы и оборудование

- 1) свежие или сушеные листья растений (крапива, примула, аспидистра, плющ);
- 2) этиловый спирт;
- 3) бензин;
- 4) 20%-й раствор KOH в капельнице;
- 5) 10%-я HCl в капельнице;
- 6) CaCO_3 ;
- 7) уксуснокислый цинк;
- 8) кварцевый песок или толченое стекло;
- 9) ступка с пестиком (сухие);
- 10) воронка;
- 11) стеклянная палочка;
- 12) штатив с пробирками (5 шт.);
- 13) стакан с водой;
- 14) пипетка;
- 15) ножницы;
- 16) скальпель;
- 17) спиртовка;
- 18) держалка для пробирок;
- 19) вазелин;
- 20) бумажный фильтр;
- 21) спички;
- 22) цветные карандаши.

Принципиальные основы метода

Фотосинтез – процесс образования органических веществ из диоксида углерода и воды с использованием световой энергии:



Фотосинтез происходит в хлоропластах, которые окружены двумя белково-липоидными мембранами. Хлоропласт включает систему ламеллярных двойных мембран тилакоидов, образованных внутренней мембраной. В тилакоидах осуществляется световая фаза фотосинтеза, т.е. преобразование энергии световых лучей в химическую энергию молекул АТФ и НАДФ.Н₂, а биохимические реакции восстановления СО₂ и синтеза углеводов происходят в межтилакоидном пространстве. В мембранах тилакоидов содержатся следующие пигменты: *хлорофилл а* C₅₅H₇₂O₅N₄Mg зеленый с синеватым оттенком; *хлорофилл b* C₅₅H₇₀O₆N₄Mg зеленый с желтоватым оттенком; каротин C₄₀H₅₆ желто-оранжевый; ксантофилл C₄₀H₅₆O₂ золотисто-желтый. Все эти пигменты нерастворимы в воде, но растворяются в органических растворителях (спирте, ацетоне и др.). По химической природе хлорофилл представляет собой сложный эфир дикарбоновой кислоты хлорофиллина и двух спиртов метанола СН₃ОН и фитола C₂₀H₃₉ОН. Хлорофиллин содержит порфириновое ядро, состоящее из четырех пиррольных колец, соединенных друг с другом метиновыми мостиками = СН-. В центре порфиринового ядра расположен атом магния, соединенный с атомами азота пиррольных колец. Кроме того, в ядре молекулы хлорофилла имеется пятое кольцо циклопентановое, содержащее карбонильную группу. Хлорофилл b отличается от хлорофилла а лишь тем, что у второго пиррольного кольца вместо метильной группы имеется альдегидная. Благодаря атому азота порфириновое ядро имеет гидрофильный характер и связано с белковыми молекулами мембран. В то же время длинный гидрофобный углеводородный «хвост», образованный

остатком фитола, обращен в сторону липидных слоев тилакоидов и обуславливает хорошую растворимость хлорофилла в неполярных растворителях (бензин, петролейный эфир). Однако для полного извлечения хлорофилла из листьев используют не эти безводные растворители, а спирт или ацетон, содержащие небольшое количество воды, необходимой для гидролиза хлорофилл-белкового комплекса. Наряду с хлорофиллами а и b в хлоропластах содержатся каротиноиды – группа желтых пигментов, являющихся по химической природе тетратерпеноидами (8 остатков изопрена C_5H_8). Каротины (в основном бета-каротин) – непредельные углеводороды, содержащие два симметрично расположенных иононовых кольца, соединенных длинной углеродной цепью. Среди ксантофиллов, являющихся кислородсодержащими производными каротина, преобладает лютеин, имеющий в каждом иононовом кольце спиртовую группу. Задача данной работы состоит в получении спиртовой вытяжки из зеленых листьев и ознакомление с некоторыми свойствами пигментов.

Ход работы

Свежие или сушеные листья измельчить ножницами, отбросив крупные жилки и черешки, поместить в ступку, добавить на кончике ножа $CaCO_3$ (для нейтрализации кислот клеточного сока) и немного чистого кварцевого песка или толченого стекла. Тщательно растереть, приливая понемногу этиловый спирт, смазать носик ступки с наружной стороны вазелином и слить полученный темно-зеленый раствор по палочке в воронку с фильтром. Налить полученную вытяжку по 2–3 мл в четыре пробирки и провести следующие опыты.

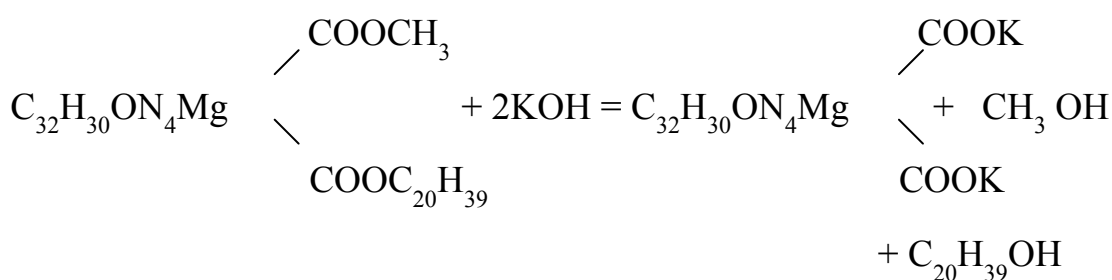
1. Разделение пигментов по Краусу

Добавить к спиртовой вытяжке пигментов несколько больший объем бензина и 2–3 капли воды (чтобы спирт не смешивался с бензином).

Закрывать пробирку большим пальцем, несколько раз сильно встряхнуть и дать отстояться. Если разделение пигментов будет недостаточно четким (оба слоя окрашены в зеленый цвет), то необходимо прилить еще бензина и продолжать взбалтывание. Помутнение нижнего слоя (от избытка воды) можно устранить, добавляя немного спирта. Отметить окраску нижнего спиртового слоя и верхнего бензинового (сделать рисунок). Сделать выводы о различной растворимости пигментов в спирте и бензине. При этом нужно учесть, что ксантофилл, будучи двухосновным спиртом, почти нерастворим в бензине. В отношении каротина правильный вывод можно будет сделать, сопоставив результаты данного опыта и следующего.

2. Омыление хлорофилла щелочью

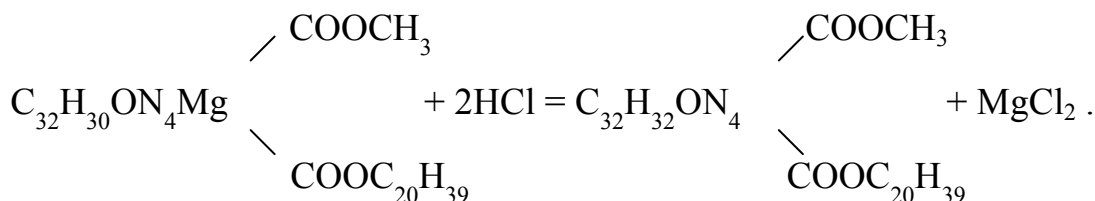
К 2–3 мл спиртовой вытяжки пигментов добавить 4–5 капель 20%-го раствора щелочи и взболтать. Прилить в пробирку равный объем бензина, сильно встряхнуть и дать отстояться. Отметить окраску спиртового и бензинового слоев (зарисовать). В выводах записать реакцию омыления хлорофилла, в результате которой происходит отщепление спиртов метилового и фитола, а двухосновная кислота хлорофиллин дает соль:



Соли хлорофиллинов имеют зеленую окраску, но отличаются от хлорофилла нерастворимостью в бензине. Указать, какие вещества растворены в спирте и какие в бензине, имея в виду, что желтые пигменты со щелочью не реагируют.

3. Получение феофитина и восстановление металлорганической связи

Взять две пробирки со спиртовой вытяжкой пигментов и добавить в них по 2–3 капли 10%-й соляной кислоты. Получается буровато-оливковое вещество феофитин – продукт замещения магния в молекуле хлорофилла двумя атомами водорода:



В одну из пробирок с феофитином внести на кончике ножа немного уксуснокислого цинка и довести раствор до кипения. Если окраска не изменится, добавить еще уксуснокислого цинка и продолжать нагревание. Отметить изменение окраски благодаря восстановлению металлорганической связи (атом цинка становится на то место, где раньше был магний). Написать уравнение реакции.

Работа 14. Определение содержания хлорофилла в листьях

Материалы и оборудование

- 1) свежие листья различных растений;
- 2) ацетон;
- 3) CaCO_3 ;
- 4) кварцевый песок или толченое стекло;
- 5) весы;
- 6) ножницы;
- 7) ступка малого размера;
- 8) колба Бунзена с пробкой, в которую вставлен стеклянный фильтр № 2 или 3;
- 9) насос Камовского;
- 10) стеклянная палочка;

- 11) мерная колба на 50 мл с пробкой;
- 12) воронка;
- 13) ФЭК или спектрофотометр;
- 14) калька;
- 15) вазелин;
- 16) салфетка.

Принципиальные основы метода

Содержание хлорофилла в листьях зависит от условий освещения и минерального питания, от возраста листьев и ряда других внешних и внутренних факторов. При точных определениях сначала выделяют хлорофилл хроматографическим методом или путем его омыления. При сравнительных исследованиях можно определить содержание хлорофилла в спиртовой или ацетоновой вытяжке без предварительного разделения пигментов. Во избежание потерь хлорофилла все операции необходимо проводить быстро, в затененном помещении, желательно на холоде.

Ход работы

Измельчить листья ножницами, отбросив черешки и крупные жилки, отвесить на куске кальки 300–500 мг. Поместить навеску в ступку, добавить кварцевого песка или толченого стекла и немного CaCO_3 , прилить 4–5 мл ацетона и тщательно растереть. Смазать снизу носик ступки вазелином и слить вытяжку по палочке в воронку со стеклянным фильтром, вставленную в колбу Бунзена, не теряя ни одной капли. Отсосать жидкость при помощи насоса. Прилить в ступку еще немного ацетона, растереть, снова слить на фильтр и отсосать. Повторить эту операцию 2–3 раза, затем перенести растертую массу на фильтр. Сполоснуть ступку 3 раза ацетоном, слить на материал в воронку, дать постоять несколько минут и отсосать. Промыть материал ацетоном до полного извлечения пигментов (растворитель, стекающий с фильтра, должен стать бесцветным). Перелить

вытяжку в мерную колбу на 50 мл и довести ацетоном до метки, споласкивая колбу Бунзена не менее трех раз небольшими порциями ацетона и сливая в ту же мерную колбу. Закрывать мерную колбу пробкой, тщательно перемешать (перевернуть 3 раза вверх дном и взболтать) и хранить до определения в темноте на холоде. Определить концентрацию хлорофилла на ФЭКе. Для этого за 20 мин до определения включить ФЭК, установить барабан на нулевое деление, поставить красный световой фильтр и открыть шторы (предварительное освещение фотоэлементов необходимо потому, что в первые минуты после включения ФЭК дает неустойчивые показания). Определить оптическую плотность раствора относительно чистого растворителя (ацетона), используя кюветы с расстоянием между гранями 10 мм. Для предотвращения испарения растворителя закрыть кюветы крышечками. Надежные результаты получаются при показаниях ФЭКа от 0,1 до 0,4. Если оптическая плотность больше 0,5, то вытяжку следует разбавить, отмерив в чистую сухую посуду определенные объемы вытяжки и ацетона; если же показание ФЭКа окажется ниже 0,08, то необходимо выполнить всю работу сначала, взяв большую навеску. Повторить измерение и из полученных отсчетов взять среднее арифметическое. Определить концентрацию вытяжки по калибровочному графику, найти на оси ординат соответствующую оптическую плотность, провести от нее горизонтальную линию и от точки пересечения с калибровочным графиком опустить перпендикуляр на ось абсцисс. При работе на спектрофотометре при 652 нм (кювета 10 мм) можно использовать следующую формулу:

$$\text{Содержание хлорофилла (мг/мл)} = \text{Экстинкция при 652 нм} \times 30.$$

Вычислить процентное содержание хлорофилла в листьях. Результаты анализов всех объектов, исследованных группой, записать в табл. 11.

Таблица 11

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

В выводах сопоставить содержание хлорофилла в разных объектах.

Работа 15. Разделение пигментов методом бумажной хроматографии

Материалы и оборудование

- 1) свежие листья каких-либо растений;
- 2) ацетон;
- 3) петролейный эфир;
- 4) CaCO_3 ;
- 5) кварцевый песок или толченое стекло;
- 6) полоска фильтровальной бумаги для хроматографии («быстрой») размером 1,5 x 15 см;
- 7) ступка с пестиком;
- 8) чистая сухая колба Бунзена с пробкой, в которую вставлен стеклянный фильтр;
- 9) стеклянная палочка;
- 10) насос Камовского;
- 11) вазелин;
- 12) стеклянные бюксы (2 шт.);
- 13) стеклянный цилиндр или большая пробирка высотой 20–25 см с хорошо подобранной корковой пробкой с проволочным крючком;
- 14) цветные карандаши.

Принципиальные основы метода

Хроматографический метод разделения пигментов, впервые предложенный русским ученым М.С. Цветом, заключается в том, что раствор, содержащий смесь пигментов, пропускается через слой адсорбента. Разные пигменты, обладая неодинаковой растворимостью в

данном растворителе и разной адсорбируемостью, передвигаются с неодинаковой скоростью и располагаются на адсорбенте в разных местах. Чем больше растворимости пигмента в растворителе и чем хуже он адсорбируется данным адсорбентом, тем быстрее он будет передвигаться и тем дальше будет располагаться зона этого пигмента. В настоящее время наиболее распространена хроматография на бумаге.

Ход работы

Измельченные свежие листья поместить в ступку, добавить немного CaCO_3 и кварцевого песка или толченого стекла и растереть, постепенно приливая ацетон (на 2–3 г материала около 25 мл ацетона). Полученный раствор профильтровать через стеклянный фильтр в чистую сухую колбу Бунзена, отсасывая насосом (эту часть работы может делать дежурный, приготавливая вытяжку для всей группы). (Все операции с ацетоном: растирание и фильтрацию желательно проводить в вытяжном шкафу). Налить вытяжку в бюкс и погрузить в нее кончик полоски, вырезанной из фильтровальной бумаги. Через несколько секунд, когда вытяжка поднимется по бумаге на 1,5 см, высушить бумагу на воздухе и снова погрузить в раствор пигментов на несколько секунд. Эту операцию повторять 5–7 раз до тех пор, пока у верхней границы распространения пигментов на бумаге не образуется темно-зеленая полоска. После этого погрузить кончик бумажной полоски на несколько секунд в чистый ацетон, чтобы все пигменты поднялись на 1,5 см. Высушив полоску до полного исчезновения запаха ацетона, поместить ее в вертикальном положении в цилиндр, на дно которого налит петролейный эфир. Полоску нужно подвесить на крючок так, чтобы в растворитель был погружен только неокрашенный конец и чтобы она не касалась стенок сосуда. В связи с тем

что пигменты разрушаются на свету, разделение следует проводить в темноте или при слабом освещении. Через 10–15 мин растворитель поднимается на 10–12 см. При этом пигменты расположатся в следующем порядке: внизу хлорофилл b, над ним хлорофилл a, затем ксантофилл и выше всех каротин, поднимающийся вместе с фронтом растворителя. Зарисовать полученную хроматограмму и сделать вывод о причинах разделения пигментов на бумаге.

Работа 16. Обнаружение фотосинтеза методом крахмальной пробы

Материалы и оборудование

- 1) пеларгония (желательно пестролистная), выдержанная в течение 2–3 суток в темноте;
- 2) спирт;
- 3) раствор J в KJ (концентрированный раствор, разбавленный в 3 раза водой);
- 4) 30%-й раствор щелочи;
- 5) лампа электрическая на 200–300 Вт;
- 6) ножницы;
- 7) пинцет;
- 8) штатив с 2 пробирками;
- 9) спиртовка;
- 10) коническая колбочка;
- 11) фарфоровая чашка;
- 12) водяная баня;
- 13) 2 пробковых кружка диаметром 1–1,5 см с булавкой;
- 14) электроплитка;
- 15) колпак стеклянный, установленный на куске стекла;
- 16) ланолин;
- 17) маленькие стаканчики (2 шт.);
- 18) воронка;
- 19) держалка для пробирок;
- 20) бритва;
- 21) спички;
- 22) цветные карандаши.

Принципиальные основы метода

Наиболее простым методом обнаружения процесса фотосинтеза является крахмальная проба, состоящая в том, что лист, выдержанный на свету, обесцвечивают спиртом, а затем обрабатывают раствором йода, окрашивающего образовавшийся в хлоропластах крахмал в темно-синий цвет. Опыт рекомендуется проводить со срезанными и поставленными в воду листьями, у которых накопление крахмала происходит быстрее, так как отток отсутствует. Для наблюдения за процессом образования первичного крахмала необходимо, чтобы в начале опыта листья не содержали этого вещества. Обескрахмаливания листьев можно достичь, выдерживая их в течение нескольких дней в темноте; за это время весь имевшийся в листьях крахмал превратится в сахара, которые будут частично отведены в стебель, а частично израсходованы на дыхание клеток листа.

Ход работы

Обильно полить растение и выдержать его в течение 2–3 дней в темноте (или закрыть отдельные листья светонепроницаемыми чехлами). Проверить полноту обескрахмаливания листа, для чего отрезать кусочек листа, поместить в пробирку и кипятить его с водой, чтобы убить клетки. Воду слить, прилить спирт и кипятить на водяной бане до полного извлечения пигментов. Нагревать следует осторожно, так как при бурном кипении может произойти выбрасывание спирта из пробирки. Слить спирт, размягчить кусочек листа, наливая на него небольшое количество воды (после действия спирта ткани становятся хрупкими), поместить его в фарфоровую чашку и облить раствором йода. Отсутствие синего окрашивания покажет, что крахмала в листе нет; если же проба с йодом

окажется положительной, то с данным листом ставить опыта не следует, так как в этом случае будет трудно наблюдать за образованием нового крахмала. Срезать лист, обновить бритвой срез под водой и опустить черешок в пробирку с водой. Затемнить часть листовой пластинки, для чего наложить на верхнюю и нижнюю поверхности листа пробковые кружки точно один против другого и закрепить их на листе булавкой. Можно поставить опыт и иначе: покрыть лист с обеих сторон кусками картона с вырезанной в них фигурой или приложить сверху листа контрастный, не очень темный фотонегатив. Другой лист (также проверенный на отсутствие крахмала) поставить черешком в стаканчик с водой и поместить в атмосферу, лишенную углекислоты, для чего поставить рядом с листом сосуд с крепким раствором щелочи и закрыть стеклянным колпаком. Для полной герметичности следует поставить стакан с листом и сосуд со щелочью на кусок стекла, а края колпака смазать ланолином. Выставить оба листа на яркий солнечный или электрический свет (при использовании лампы накаливания 200–300 Вт во избежание перегрева лист должен находиться на расстоянии не менее 30 см от лампы). Через час (или более) обработать листья так же, как и кусочки, которые проверяли на полноту обескрахмаливания: убить кипящей водой, обесцветить спиртом, размягчить погружением в воду и облить раствором йода (лист обесцвечивают в колбе, закрытой для уменьшения испарения спирта воронкой). Записать результаты, отмечая, в каких частях листа образовался крахмал (для пестрого листа обратить внимание на белые участки). Зарисовать постановку опыта и объяснить полученные результаты. Обработанный раствором йода лист можно сохранить, засушив его между кусками газетной бумаги под прессом. В выводах указать, какие условия необходимы для процесса фотосинтеза.

Работа 17. Накопление первичного (ассимиляционного) крахмала в клетках листьев C_3 - и C_4 -растений

Материалы и оборудование

- 1) микроскопы;
- 2) осветители;
- 3) предметные и покровные стекла;
- 4) лезвия безопасной бритвы;
- 5) стакан с водой;
- 6) препаровальные иглы;
- 7) стеклянные палочки;
- 8) фильтровальная бумага;
- 9) кусочки пенопласта или бузины;
- 10) раствор Люголя;
- 11) 30%-й раствор NaOH или KOH;
- 12) растения: листья кукурузы и любых C_3 -растений, зафиксированных в солнечный летний день в 70%-м этаноле.

Принципиальные основы метода

Растения, у которых первый стабильный продукт фотосинтеза представлен трехуглеродной фосфоглицериновой кислотой (ФГК), принято называть C_3 -растениями. Синтез сахаров в фотосинтезе осуществляется у них в цепи реакций, образующих цикл Кальвина. У C_3 -растений во всех фотосинтезирующих клетках функционирует цикл Кальвина и поэтому во всех клетках листа образуется крахмал. У C_4 -растений первичная ассимиляция CO_2 осуществляется и в цикле Хетча-Слека в клетках мезофилла листа. Первыми продуктами этого цикла являются четырехуглеродные органические кислоты, поэтому такие растения принято называть C_4 -растениями. Цикл Кальвина функционирует у них только в клетках обкладки проводящих пучков листа. Поэтому крахмал образуется только в этих клетках, но не в клетках мезофилла.

Ход работы

На срезах листовых пластинок выявить клетки, в которых у C_3 - и C_4 -растений находятся хлоропласты, накапливающие крахмал.

Можно воспользоваться листьями C_3 -растений и молодых растений кукурузы, выращенных в теплице. Перед фиксацией материала растения следует выдержать несколько часов на ярком свету.

Продольные и поперечные срезы листьев кукурузы и C_3 -растений (хлорофитума, традесканции и др.) делают острым лезвием безопасной бритвы. Для получения поперечных срезов используют кусочки бузины или пенопласта. Срезы помещают на предметное стекло в каплю 30%-го раствора КОН или NaOH для их просветления. Через 10–15 мин, а если позволяет время, то и более (до 1,5 ч), щелочь «отсасывают» фильтровальной бумагой, промывают водой и добавляют каплю раствора Люголя. Затем срезы накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом сначала при малом увеличении, а затем при большом.

Изучая срезы, обращают внимание на локализацию крахмала в клетках листа. У кукурузы крахмал локализуется в клетках обкладки проводящих пучков и в клетках устьиц. В остальных клетках мезофилла, расположенных между жилками, крахмала нет. Поэтому на продольном срезе проводящие пучки с обкладкой четко выделяются как темные полосы, а на поперечном срезе клетки обкладки выглядят в виде темной короны (так называемая «kranz»-анатомия), окружающей неокрашенные ткани ксилемы и флоэмы.

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

Сделать рисунки продольных и поперечных срезов листьев C_3 - и C_4 -растений. Отметить локализацию крахмала в тканях листьев. Объяснить причину разной локализации крахмала у C_3 - и C_4 -растений.

Работа 18. Выделение хлоропластов из листьев C_3 - растений

Материалы и оборудование

- 1) размельчитель тканей;
- 2) холодильная камера;
- 3) центрифуга с охлаждением;
- 4) аналитические весы;
- 5) рН-метр;
- 6) колба на 1 л (1 шт.);
- 7) пипетка на 10 мл (1 шт.);
- 8) центрифужные пробирки;
- 9) среда гомогенизации (рН 7,8) – 0,35 М сахара, 50 мМ трис-2-гидроксиметил-аминометан, 5 мМ аскорбат натрия, 3 мМ L-цистеин, 1 мМ $MgCl_2$, 5 мМ дитиотреитол (ДТТ) или 2-меркаптоэтанол;
- 10) дистиллированная вода.

Принципиальные основы метода

У растений с C_3 -путем первичным продуктом фотосинтеза является 3-фосфоглицериновая кислота, превращение которой осуществляется в цикле Кальвина. Фотодыхание у C_3 -растений обычно усиливается при низком содержании CO_2 и высоких концентрациях O_2 . Фотодыхание осуществляется в результате взаимодействия трех органелл: хлоропластов, пероксисом и митохондрий. Гликолатный путь C_3 -растений может завершиться в митохондриях.

Ход работы

Приготовление растворов.

В колбу на 1 л вносят 119,8 г сахарозы, 6,057 г трис-2-гидрокси метиламинометана, 990,5 мг аскорбата натрия, 472,8 мг L-цистеина, 95,3 мг $MgCl_2$, 771,5 мг дитиотреитола (или 390,5 мг 2-меркаптоэтанола). Колбу до метки заполняют дистиллированной водой.

Работы выполняют в холодной камере при температуре +4 °С. 5 г листьев (без жилок) измельчают и затем гомогенизируют в размельчителе тканей с добавлением 20 мл среды гомогенизации в течение 5...10 с при 7...8 об./мин. После этого гомогенат отжимают через 3...4 слоя капрона и центрифугируют в течение 10 мин при 1000 g (+4 °С). Осадок содержит хлоропласты, а супернатант – цитоплазму и остальные органоиды клетки. Нарисовать строение хлоропластов и охарактеризовать их функции.

Работа 19. Выделение хлоропластов из листьев C_4 -растений

Материалы и оборудование

При проведении опытов используют те же оборудование, посуду и реактивы, что и в предыдущей работе (см. работу 18).

Принципиальные основы метода

Растения, у которых процесс фотосинтеза протекает по C_4 -пути, имеют два типа клеток и хлоропластов: 1) мелкие гранальные пластиды в клетках мезофилла листа; 2) крупные пластиды, часто лишенные гран, в клетках обкладки, окружающих сосудистые пучки. Хлоропласты разных типов клеток характеризуются и разным типом фосфорилирования. В клетках мезофилла преимущественно протекает нециклическое фосфорилирование и образуется НАДФН, необходимый для цикла

Кальвина, идущего в клетках обкладки. При этом в клетках обкладки протекают только процессы циклического фосфорилирования. CO_2 , диффундирующий в лист через устьица, попадает в цитоплазму клеток мезофилла, где при участии фосфоенолпируваткарбоксилазы вступает в реакцию с фосфоенолпировиноградной кислотой (ФЕН), образуя щавелевоуксусную кислоту. Последняя восстанавливается до яблочной кислоты за счет НАДФН. Дальнейшие превращения оксалоацетата происходят при участии ферментов цикла Хетча – Слека. Сущность C_4 -пути заключается в том, что реакция карбоксилирования происходит дважды. Это позволяет растению создавать запасы углеводов в клетках. При этом акцепторы CO_2 (фосфоенолпировиноградная кислота и рибулезодифосфат) регенерируют, что и создает возможность непрерывного функционирования циклов. Растения с C_4 -путем могут осуществлять фотосинтез даже при закрытых устьицах, использовать CO_2 , возникающий при фотодыхании. Поэтому C_4 -растения способны произрастать в засушливых тропических зонах и устойчивы к засолению.

Ход работы

Исследования проводят в холодной камере при температуре $+4\text{ }^\circ\text{C}$. 5 г листьев (без жилок) измельчают и затем гомогенизируют в размельчителе тканей с добавлением 20 мл среды гомогенизации в течение 5...10 с при 7...8 об./мин. После этого гомогенат отжимают через 3...4 слоя капрона. Фильтрат отбрасывают, а мезгу, полученную после отжимания гомогената, заливают 10...20 мл среды гомогенизации и повторно гомогенизируют в течение 30...60 с при 12 об./мин. После этого гомогенат отжимают через 3...4 слоя капрона. Фильтрат отбрасывают, а отжатый остаток переносят в фарфоровую ступку и тщательно растирают с кварцевым песком в 5 мл среды гомогенизации. После этого содержимое ступки количественно

переносят на капроновый фильтр, отжимают и фильтрат центрифугируют в течение 10 мин при 10 000 g (+4 °C). Осадок содержит хлоропласты, а супернатант – цитоплазму и остальные органоиды клетки. Хлоропласты определяют с помощью микроскопического контроля, а также по содержанию хлорофиллов а и b.

В выводах указать различия в строении хлоропластов и особенностях протекания фотосинтеза у C₃- и C₄-растений.

Работа 20. Выделение протопластов из листьев C₄-растений

Материалы и оборудование

- 1) центрифуга;
- 2) термостат;
- 3) шейкер;
- 4) колбы на 100 мл (3 шт.);
- 5) бюксы;
- 6) чашки Петри;
- 7) капроновый фильтр;
- 8) листья проростков кукурузы;
- 9) 0,6 М раствор сорбита;
- 10) энзимологический раствор – 2%-й раствор целлюлазы;
- 11) 100 мг пектиназы;
- 12) 100 мг К-декстрансульфата;
- 13) 0,6 М сорбит;
- 14) 1 мМ MgCl₂;
- 15) 1 мМ MnCl₂;
- 16) 2 мМ KН₂РO₄;
- 17) 1 мМ дитиотреитола (ДТТ);
- 18) дистиллированная вода.

Принципиальные основы метода

Протопласт клеток растений включает все содержимое клетки, за исключением клеточной оболочки (ядра, цитоплазма, пластиды, митохондрий и др.). Выделение протопластов широко используется в

исследованиях клеток и генной инженерии. Жизнеспособные протопласты получают, в частности, в результате обработки клеток специальными ферментами, разрушающими клеточную оболочку. Это позволяет путем химических и механических методов выделять и исследовать структурные компоненты и даже отдельные молекулы, вносить изменения в их генетическую структуру. Протопласты могут восстанавливать клеточную оболочку, что используется, в частности для получения полноценных генетически измененных клеток.

Ход работы

Приготовление растворов.

100 мл энзимологического раствора готовят, растворяя 2 г целлюлазы, 100 мг пектиназы, 100 мг К-декстрансульфата, 10,93 г сорбита, 9,53 мг $MgCl_2$, 12,58 мг $MnCl_2$, 27,22 мг KH_2PO_4 и 15,43 мг ДТТ в дистиллированной воде. 0,6 М раствор сорбита готовят, растворяя навеску (109,3 мг/мл) в дистиллированной воде.

Для получения протопластов используют листья, срезанные с 10...15-дневных проростков кукурузы. С нижней стороны свежесрезанного листа снимают эпидермис, и кусочки ткани помещают этой же стороной в чашки Петри с энзимологическим раствором следующего состава: 20 мл 2%-го раствора целлюлазы, 100 мг пектиназы, 0,6 М сорбита, 100 мг К-декстрансульфата, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ $MnCl_2$, 2 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ ДТТ. Чашки Петри ставят в термостат и выдерживают при 35...37 °С в течение 1,5 ч. После этого ткань переносят в бюксы с 0,6 М сорбитом и некоторое время встряхивают для того, чтобы протопласты мезофилла с уже гидролизованной клеточной стенкой вышли в раствор. Затем материал пропускают через нейлоновый или капроновый фильтр. Фильтрат

подвергают центрифугированию при 200 g в течение 1 мин. К полученному осадку добавляют 0,6 М раствор сорбита. В этой суспензии находятся протопласты клеток мезофилла. Остаток ткани, в котором содержатся клетки обкладки, после отделения протопластов мезофилла несколько раз промывают 0,3 М сорбитом и затем гомогенизируют при 700 об./мин в течение 30 с. Образовавшийся гомогенат пропускают через капроновый фильтр, осадок в фильтрате промывают 0,6 М сорбитом, вновь фильтруют и затем используют в качестве препарата обкладочных клеток. О чистоте протопластов судят по соотношению хлорофиллов а и b. В клетках мезофилла содержится протопластов 2,1...0,7, а в клетках обкладки – 3,4...0,5.

В выводах описать строение протопластов и их использование в генной инженерии.

Работа 21. Влияние внешних условий на интенсивность фотосинтеза водного растения

Материалы и оборудование

- 1) аквариум с элодеей;
- 2) сода двууглекислая;
- 3) 1%-й раствор двуххромовокислого калия;
- 4) 4%-й раствор медного купороса, насыщенный аммиаком;
- 5) кювета;
- 6) пинцет длинный;
- 7) лезвие бритвы;
- 8) пробирка, вставленная в колбочку или в специальный сосуд со стоком внизу (в последнем случае сосуд закрепляют в штативе);
- 9) лампа настольная;
- 10) песочные часы на 1–3 мин;
- 11) электроплитка;
- 12) термометр;
- 13) колбы (3 шт.);
- 14) линейка;

- 15) спектроскоп в штативе;
- 16) пробирки (2 шт.).

Принципиальные основы метода

Для определения интенсивности фотосинтеза водных растений можно использовать метод счета пузырьков кислорода. На свету в листьях происходит фотосинтез, продуктом которого является кислород, накапливающийся в межклетниках. При срезании стебля избыток газа начинает выделяться с поверхности среза в виде непрерывного тока пузырьков, быстрота образования которых зависит от интенсивности фотосинтеза. Данный метод не отличается большой точностью, но зато очень прост и дает наглядное представление о тесной зависимости процесса фотосинтеза от внешних условий.

Ход работы

Поместить веточку элодеи с неповрежденной верхушечной почкой в кювету с водой и обновить срез острой бритвой для устранения возможной закупорки путей при выходе газа. Погрузить веточку срезом вверх в пробирку с водой, предварительно обогащенной диоксидом углерода путем растворения небольшого количества соды (перед погружением веточки внести в пробирку на кончике ножа NaHCO_3 и взболтать).

Поместив пробирку с веточкой элодеи в те или иные условия, подождать, пока установится равномерный ток пузырьков, перевернуть песочные часы и подсчитать количество пузырьков, выделенных за определенное время. Используя в качестве источника света проекционный

фонарь или настольную лампу мощностью 100–200 Вт, провести следующие опыты.

1. Влияние освещенности

Налить воду, нагретую до 20 °С, в колбу или в стеклянный цилиндр со стоком внизу и вставить в этот сосуд пробирку с веточкой элодеи. Подсчитать количество пузырьков кислорода при разных расстояниях от источника света.

2. Влияние спектрального состава света

Подсчитать количество пузырьков при освещении белым светом (пробирка погружена в сосуд с водой). Затем провести наблюдение при красном экране, заменяя воду в наружном сосуде раствором $K_2Cr_2O_7$, который пропускает красные, оранжевые и желтые лучи и не пропускает сине-фиолетовые. После этого определить интенсивность фотосинтеза при синем экране, наливая в наружный сосуд раствор серно-аммиачно-медной соли, пропускающий голубые, синие и фиолетовые лучи, но задерживающий длинноволновую часть спектра. Все три наблюдения провести с жидкостями одинаковой температуры и на одном и том же расстоянии от источника света. Спектральный состав света, пропускаемого цветными жидкостями, проверить при помощи спектроскопа.

Вместо жидких экранов можно использовать стеклянные светофильтры, пропускающие лучи определенной длины волны.

3. Влияние температуры

Налить в наружный сосуд сначала теплую, а затем холодную воду и провести отсчеты при одинаковом расстоянии от источника света. Результаты записать в таблицу (расстояние от источника света и температура указаны ориентировочно).

Таблица 12

Расстояние от источника света, см	Экран	Температура, °С	Количество пузырьков O ₂ за 5 мин
5	Белый	20	
10	Белый	20	
20	Белый	20	
5	Белый	20	
5	Красный	20	
5	Синий	20	
5	Белый	20	
5	Белый	10	

Сделать выводы о влиянии исследованных факторов на интенсивность фотосинтеза. Ответить на контрольные вопросы.

1. Как зависит квантовый выход фотосинтеза от длины волны света, падающего на растение? Что такое спектр действия фотосинтеза?

2. Из каких стадий (фаз) складывается суммарный процесс фотосинтеза? Какая из этих фаз является лимитирующей – т.е. ограничивает итоговую скорость фотосинтетического процесса?

3. Как зависят различные фазы фотосинтетического процесса от температуры?

4. Что ограничивает фотосинтетическую продуктивность растений в реальных условиях?

5. Какие методы измерения интенсивности фотосинтеза вы знаете?

ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ

Работа 22. Потеря сухого вещества при прорастании семян

Материалы и оборудование

- 1) семена гороха;
- 2) весы;
- 3) разновесы;
- 4) опилки лиственного дерева, прокипяченные с водой и отжатые для удаления экстрактивных веществ;
- 5) тарелка;
- 6) сушильный шкаф;
- 7) эксикатор;
- 8) бюкс;
- 9) стаканы (2 шт.), один из них снабженный этикеткой;
- 10) фильтровальная бумага;
- 11) кристаллизатор.

Принципиальные основы метода

Интенсивность дыхания определяют, измеряя количество поглощенного клетками кислорода или выделенного диоксида углерода, или окисленного органического вещества. Наиболее удобный объект для учета количества израсходованных на дыхание органических веществ – прорастающие семена. Проращивание ведут в темноте на влажных опилках, т.е. в условиях, исключающих возможность как почвенного, так и воздушного питания. По истечении определенного времени проростки высушивают и взвешивают. Для определения исходной сухой массы необходимо использовать другую порцию таких же семян, поскольку высушивание при высокой температуре убивает зародыши и делает семена невсхожими.

Семена рекомендуется высушивать в течение 2 ч при 130 °С, так как при этой температуре полностью разрушаются белковые глобулы и освобождается заключенная в глобулах иммобилизованная вода. Свежий

растительный материал (листья, проростки и пр.) можно довести до абсолютного сухого состояния при 100–105 °С.

Ход работы

Поместить на чашку весов 10 здоровых и по возможности одинаковых семян и уравновесить их второй порцией из десяти таких же семян. Одну порцию поместить на 1–2 ч в сосуд с небольшим количеством воды, чтобы вызвать набухание семян. Вторую порцию семян взвесить, поместить в бюкс, высушить при температуре 130 °С (не менее 2 ч), охладить в эксикаторе и снова взвесить.

Наполнить стакан влажными и отжатыми от избытка воды опилками, отсыпать часть опилок, разложить набухшие семена и покрыть их сверху опилками, которые следует слегка уплотнить. Поместить стакан в темноту и по мере подсыхания опилок поливать водой. Через 1–2 недели извлечь проростки из опилок, тщательно промыть корни, обсушить проростки фильтровальной бумагой и взвесить.

Поместить проростки в пакет из фильтровальной или газетной бумаги, высушить при 100–105 °С до абсолютно сухого состояния (для этого требуется 4–6 ч), охладить в эксикаторе и взвесить. Если проросли не все семена, то учитывают только проросшие, а затем пересчитывают сырую и сухую массу проростков на 10 экземпляров.

Полученные данные оформить в виде таблицы.

Таблица 13

Масса 10 семян, г		Содержание воды в семенах, %	Масса 10 проростков, г		Содержание воды в проростках, %	Потеря сухого вещества	
воздушно-сухая	абсолютно сухая		воздушно-сухая	абсолютно сухая		в г на 10 семян	в % от абсолютно сухой

Сделать выводы о причинах изменения сырой и сухой массы растений при прорастании.

Ответить на контрольные вопросы:

1. Какова роль дыхания в процессе прорастания семян?
2. Какие запасаемые вещества расходуются в процессе прорастания семян?
3. Как разделяются между собой семена различных видов растений на основании типа запасаемых веществ?
4. Каковы должны быть условия окружающей среды для того, чтобы семена начали прорасти?
5. Какова роль воды в процессе прорастания семян?
6. В виде каких соединений прорастающие семена теряют свою сухую массу?
7. Чем характеризуется дыхание семян и растений в состоянии покоя?
8. На какие субстраты переключается дыхание растений по мере расходования запасных веществ семени?
9. Можно ли богатую питательными веществами мякоть плодов отнести к разряду питательных веществ, необходимых для прорастания семени?
10. С какого момента и почему прекращается потеря сухой массы растущего растения?
11. Какие основные пути дыхательного метаболизма присутствуют в растительной клетке? Чем дыхательный метаболизм растений отличается от дыхательного метаболизма животных и бактерий?
12. Какие внешние и внутренние факторы влияют на процесс дыхания растений и какое практическое значение имеет знание этих факторов?

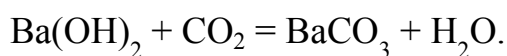
Работа 23. Определение интенсивности дыхания по количеству выделенного диоксида углерода (по Бойсен-Иенсену)

Материалы и оборудование

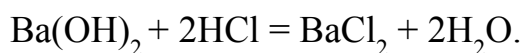
- 1) проросшие и непроросшие семена, почки, листья, стебли, цветки и другой растительный материал;
- 2) 0,025 н. раствор Ва(ОН)₂ в бутылки, соединенной с бюреткой; бутылка и бюретка закрыты пробками, в которые вставлены трубки с патронной известью;
- 3) 0,025 н. НСl в бюретке с приспособлением для титрования;
- 4) фенолфталеин в капельнице;
- 5) технические весы с разновесами;
- 6) одинаковые конические колбы на 250–300 мл с резиновыми пробками, в которые вставлены металлические крючки (3 шт.);
- 7) куски марли 10 x 10 см (2 шт.);
- 8) стакан с водой.

Принципиальные основы метода

Для определения интенсивности дыхания по количеству выделенного диоксида углерода в замкнутый сосуд помещают навеску исследуемого материала и определенное количество раствора щелочи. Выделяемый в процессе дыхания диоксид углерода реагирует со щелочью, в результате чего концентрация раствора уменьшается:



Через определенное время оставшуюся в сосуде щелочь титруют:



Сравнивают полученную величину с результатом титрования такого же количества исходного раствора щелочи. Последнее необходимо для определения исходной концентрации щелочи и одновременно для учета того небольшого количества СО₂, которое содержалось в сосуде до опыта, а

также поглощаемого щелочью во время открывания сосуда. Разность между результатами титрования содержимого контрольного и опытного сосудов прямо пропорциональна количеству выделенного при дыхании CO_2 . Продолжительность экспозиции зависит от размера навески и от интенсивности дыхания исследуемого объекта. При очень короткой экспозиции разность между результатами титрования контрольной и опытной колб будет недостоверной. Наоборот, если в колбе останется слишком мало барита, то может произойти неполное поглощение CO_2 . Желательно поэтому подобрать такую экспозицию, чтобы на связывание CO_2 было израсходовано 20–50 % щелочи (если, например, на титрование барита в контрольной колбе пошло 10 мл HCl , то на титрование раствора в опытной колбе должно пойти не более 8 и не менее 5 мл).

Ход работы

Поместить навеску исследуемого материала (5–10 г) в марлевый мешочек и прикрепить его к пробке при помощи крючка, вставленного в пробку. Провести пробную сборку установки, проверив, свободно ли проходит мешочек с материалом через горло колбы и не опускается ли он слишком низко. Внести в колбу 2–3 капли фенолфталеина и налить 10 мл раствора $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Быстро опустить в колбу материал, слегка смочить пробку водой (для герметичности и плотно (вращательным движением) закрыть колбу пробкой. Записать время начала экспозиции. Задача работы – сравнение интенсивности дыхания разных объектов. Для этого нужно взять две колбы и поместить в них разные части одного и того же растения, например листья и стебли, или проросшие и непроросшие семена и т.п. В контрольную (пустую) колбу также налить 10 мл барита и 2–3 капли фенолфталеина и плотно закрыть 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 разрушить пленку BaCO_3 , препятствующую полноте поглощения CO_2 , не допуская попадания ни одной капли раствора на мешочки с материалом. Через 1–2 ч вынуть материал, быстро закрыть колбу пробкой и отметить время окончания опыта. Оттитровать оставшуюся щелочь, приливая через отверстие в пробке 0,025 н. HCl до исчезновения розового оттенка. Чтобы избежать уменьшения концентрации раствора барита из-за поглощения CO_2 воздуха, следует провести титрование, закрыв колбу резиновой пробкой с двумя отверстиями, одно из которых закрыто трубкой с натронной известью, другое – плотно вставленным концом бюретки. Контрольную колбу можно титровать через 20 мин после того, как налит раствор барита (за это время колбу необходимо периодически взбалтывать).

Таблица 14

Объект	Навеска, г	Объем Ba(OH)_2 , мл	Время			Расход HCl , мл		Поправка к титру HCl	Интенсивность дыхания, мг/г·ч
			начало	конец	экспозиция	контроль	опыт		

Интенсивность дыхания вычисляют по формуле:

$$I_d = (a - b) \cdot K \cdot 0,55 / pt,$$

где a – результат титрования содержимого контрольной колбы; b – результат титрования содержимого опытной колбы; K – поправка к титру HCl ; 0,55 – количество мг CO_2 , эквивалентное 1 мл 0,025 н. HCl ; p – навеска, г; t – экспозиция, ч.

Сделать вывод, сопоставив интенсивность дыхания разных объектов.

Работа 24. Определение дыхательного коэффициента маслянистых семян

Материалы и оборудование

- 1) наклюнувшиеся семена клещевины (или подсолнечника) и пшеницы;
- 2) 20%-й раствор КОН;
- 3) вода, подкрашенная метиленовой синей;
- 4) пробирка с хорошо пригнанной 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;
- 5) высокий (по длине пробирки) стакан с ватой, в которой сделано углубление для пробирки;
- 6) фарфоровая чашечка;
- 7) пинцет; песочные часы на 5 мин;
- 8) пипетка с оттянутым концом;
- 9) полоски фильтровальной бумаги 2×6 см;
- 10) стакан с водой.

Принципиальные основы метода

Дыхательным коэффициентом называется отношение объема выделенного при дыхании диоксида углерода к объему поглощенного кислорода. Величина дыхательного коэффициента зависит прежде всего от того, какие вещества используются при дыхании. При окислении сахаров отношение $\text{CO}_2:\text{O}_2$ равно единице. Если дыхательным материалом служат вещества более окисленные, чем углеводы (например, щавелевая кислота), то величина дыхательного коэффициента будет больше единицы. Наконец, этот коэффициент будет меньше единицы, если используются соединения менее окисленные, чем углеводы. Для ориентировочного определения дыхательного коэффициента исследуемый материал помещают в пробирку, соединенную с градуированной трубкой, в которую введена капля жидкости. Если объемы обмениваемых при дыхании газов равны, то капля в

трубке передвигаться не будет. Если же величина дыхательного коэффициента меньше или больше единицы, то будет наблюдаться перемещение жидкости в трубке, соответствующее разности между объемами поглощенного O_2 и выделенного CO_2 . Затем с тем же материалом проделывают второй опыт, вводя в пробирку крепкий раствор щелочи для поглощения выделяемого при дыхании CO_2 . Наблюдающееся при этом передвижение капли в трубке соответствует объему поглощенного материалом кислорода (данный опыт грубо воспроизводит принцип, на котором основано определение дыхания в аппарате Варбурга).

Ход работы

Перед определением дыхательного коэффициента маслянистых семян исследовать баланс CO_2 и O_2 объекта, богатого углеводами. Для этого насыпать в пробирку (примерно до половины) наклюнувшиеся семена пшеницы и плотно (вращательным движением) вставить пробку с градуированной трубкой, предварительно слегка смочив пробку водой. Дать пробирке остыть от прикосновения рук и поставить ее в стакан с ватой. Ввести в трубку каплю воды, подкрашенной метиленовой синей, при помощи пипетки с оттянутым концом. Наблюдать в течение нескольких минут за каплей в трубке и убедиться в том, что ее положение не меняется. Высыпать из пробирки семена пшеницы, поместить в нее наклюнувшиеся семена клешевины или подсолнечника, собрать установку, поставить пробирку в стакан с ватой и ввести в трубку каплю подкрашенной воды. Когда капля оторвется от края трубки, отметить положение внутреннего мениска капли, перевернуть песочные часы и после 5 мин экспозиции сделать второй отсчет, а еще через 5 мин третий отсчет. Вычислить среднее расстояние, пройденное каплей за 5 мин (A), которое соответствует

разности между объемами поглощенного кислорода и выделенного диоксида углерода. Вынуть пробку из пробирки с семенами, проветрить пробирку и вложить пинцетом в верхнюю часть пробирки свернутую в кольцо полоску фильтровальной бумаги, смоченную 20%-м раствором щелочи (смачивать полоску умеренно, держа ее над фарфоровой чашкой, чтобы во время опыта щелочь с бумажки не попала на семена). Закрывать пробирку пробкой и вновь ввести в трубку каплю воды, подкрашенной краской. Отметить положение мениска капли, определить передвижение капли за два пятиминутных интервала и вычислить среднюю величину (B). Обозначим объем поглощенного кислорода через O_2 , а объем выделенного диоксида углерода CO_2 . Зная величины A и B , легко найти дыхательный коэффициент:

$$A = O_2 - CO_2;$$

$$B = O_2;$$

$$CO_2 = B - A;$$

отсюда дыхательный коэффициент равен $CO_2/O_2 = (B - A)/B$.

Результаты записать в таблицу.

Таблица 15

Объект	Положение мениска						Расстояние, пройденное каплей за 5 мин, мм						CO_2/O_2	
	без щелочи			со щелочью			без щелочи (A)			со щелочью (B)				
	1	2	3	1	2	3	1	2	среднее	1	2	среднее		

Теоретически рассчитать дыхательный коэффициент при окислении до CO_2 и H_2O какого-либо жира, например триолеина с формулой $C_{57}H_{104}O_6$. Сделать вывод о зависимости величины дыхательного коэффициента от характера окисляемых веществ.

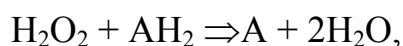
Работа 25. Определение активности пероксидазы

Материалы и оборудование

- 1) листья и корни проростков гороха разного возраста;
- 2) 1/15 М фосфатный буфер, рН 5–6,7;
- 3) 0,1%-й раствор H_2O_2 ;
- 4) разновесы;
- 5) раствор гваякола (0,183 г в 50 мл воды);
- 6) фарфоровые ступки с пестиками;
- 7) мерные колбы объемом 50 мл;
- 8) стеклянные стаканы объемом 100 мл;
- 9) средние стеклянные воронки;
- 10) пипетки объемом 2 и 5 мл;
- 11) автоматические пипетки;
- 12) бумажные фильтры;
- 13) ФЭК (КФК-2-УХЛ 4,2);
- 14) стеклянные кюветы к ФЭКу толщиной 2 см.

Принципиальные основы метода

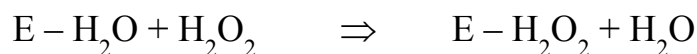
Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) – фермент, окисляющий субстрат при помощи пероксида водорода. Общий вид реакции



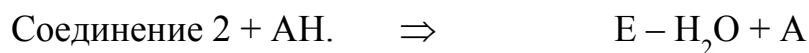
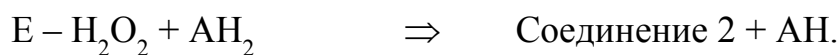
где А и АН_2 – окисленный и восстановленный субстраты соответственно.

Субстратами пероксидаз служат фенолы и ароматические соединения, органические гидроперекиси с небольшими алифатическими заместителями, НАД·Н (НАДФ·Н), нафтогидрохинон, индолилуксусная кислота и др. Пероксидазы – железосодержащие ферменты, простетической группой которых является гем – феррипротопорфирин IX. Окисление субстратов осуществляется, по-видимому, по одноэлектронному механизму. Первой стадией каталитического процесса является образование комплекса между железом фермента и пероксисом водорода.

Следовательно, окисление субстрата осуществляется пероксидом водорода, активированным ферментом



Соединение 1



Соединение 1 – окисленная форма фермента, где железо связано с пероксидом и валентное состояние Fe выше Fe^{3+} ; соединение 2 – продукт восстановления соединения 1 путем одноэлектронного восстановления за счет субстрата AH_2 ; AH_2 – субстрат реакции; $AH.$ – свободнорадикальная форма окисленного субстрата; A – продукт полного окисления субстрата.

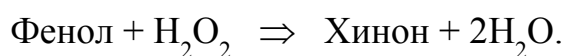
В растительных тканях пероксидазы широко распространены; в основном их находят в пероксисомах, обнаружены они также в клеточной стенке. Известно более 20 изоформ пероксидазы с различной каталитической активностью. Множественность форм фермента и каталитических функций позволяет судить о значительной роли пероксидаз в биохимии и физиологии растений, однако до сих пор их физиологическое значение окончательно не выяснено. Показано изменение изоферментного состава пероксидаз и их активности в онтогенезе растений, при патогенезе, в условиях стресса. Активность пероксидаз наряду с каталазой, очевидно, препятствует накоплению пероксида водорода в клетке. Используя для окисления пероксид водорода, пероксидазы могут играть важную роль в нейтрализации продуктов вторичного обмена (фенолов), в регуляции гормонального статуса растений через окисление индолилуксусной кислоты, образование этилена из метионина, участвуют в процессах синтеза лигнина в клеточной стенке.

Однако одноэлектронный механизм переноса, который осуществляется пероксидазой при окислении субстрата, может привести к образованию

активированных форм кислорода (O_2^- и др.), вызывающих повреждающий эффект в клетке. Тем не менее существует мнение, что образованные в пероксидазных реакциях активные формы кислорода могут быть использованы растением в защите от патогена.

Определение активности пероксидазы основано на образовании окрашенных продуктов при окислении бензидина, гваякола, гидрохинона, катехола и других фенолов. Общая схема реакции

Пероксидаза



В данной работе используется наиболее чувствительный и быстрый гваяколовый метод. При действии пероксидаз в присутствии пероксида водорода гваякол окисляется до тетрагваякохинона, что приводит к развитию красно-коричневой окраски в реакционной среде и позволяет провести фотометрическое измерение скорости ее образования.

Цель работы. Определить активность пероксидазы в различных органах растения, изменение активности фермента с возрастом растения.

Ход работы

Навеску растительного материала (50–100 мг) растирают в ступке с небольшим количеством (10–15 мл) фосфатного буфера. Растертую массу переносят количественно в мерную колбу на 50 мл, доводят пробу буфером точно до метки, хорошо перемешивают и оставляют на 10–15 мин. Затем раствор фильтруют через двойной бумажный фильтр или центрифугируют 10 мин при 4000 об./мин. Фильтрат (или надосадочную жидкость) используют для определения активности фермента.

Активность фермента исследуют на ФЭЖе ($\lambda = 440$ нм). Об активности фермента судят по времени развития окраски до определенного значения оптической плотности (значение D выбирают в зависимости от скорости развития окраски в пределах от 0,25 до 0,4).

Для анализа каждой биологической пробы используют три одинаковые кюветы ФЭЖа: одна – контрольная, две другие – опытные (две аналитические повторности из одной биологической пробы). Во все три кюветы вносят: 2 мл вытяжки; 2 мл буферного раствора, 2 мл гваякола.

Затем в контрольную кювету приливают 2 мл воды и устанавливают ее в контрольную (дальнюю) кюветную подставку ФЭЖа. Вводят ее в световой луч.

Закрывают кюветную камеру и ручками грубой и тонкой наводки устанавливают нуль на шкале оптической плотности по контрольному образцу. Затем одну из опытных кювет ставят в держатель и вводят ее в световой луч.

Автоматической пипеткой вносят в опытную кювету 2 мл раствора H_2O_2 и одновременно включают секундомер. Пробу хорошо перемешивают стеклянной палочкой. Затем закрывают кюветную камеру и по шкале оптической плотности следят за развитием окраски, замечают по секундомеру время достижения необходимой оптической плотности.

Аналогично производят измерения для второй опытной кюветы.

Расчет активности ведут по формуле

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

где A – активность, выраженная в относительных единицах на 1 г сырой массы за 1 с; D – зарегистрированная в опыте оптическая плотность; t – время, с; d – толщина слоя жидкости (толщина кюветы), см; α , β , γ – факто-

ры разведения: α – отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки, мл, к массе навески, г; β – степень дополнительного разведения вытяжки после центрифугирования (если это требовалось); γ – степень постоянного разведения вытяжки в кювете (в наших условиях равна 4).

Результаты представьте в виде таблицы. Сделайте выводы о зависимости активности фермента от исследуемых физиологических факторов.

Работа 26. Определение активности каталазы

Материалы и оборудование

- 1) лупа;
- 2) предметные и часовые стекла;
- 3) лезвие безопасной бритвы;
- 4) спиртовка;
- 5) 5%-й раствор пероксида водорода;
- 6) растения: проростки кукурузы, бобов, тыквы, листья элодеи.

Каталаза в клетках выполняет функцию обезвреживания очень активного и потому опасного для живых клеток окислителя – пероксида водорода, катализируя реакцию $2\text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Этот фермент особенно активен в молодых растущих тканях. Он активен также в зеленых листьях, где участвует в процессе фотодыхания у C_3 -растений. Для количественного определения активности каталазы можно использовать и газометрический метод.

Цель работы: обнаружение активности каталазы в тканях растений.

Ход работы

С проростков делают срезы толщиной 0,5–1 мм, а с побегов элодеи отрывают отдельные листья. Часть срезов и побегов убивают, нагревая их в капле воды на предметном стекле над пламенем спиртовки. Убитые и

живые срезы и листья помещают в воду на часовое стекло и добавляет несколько капель пероксида водорода. Под лупой наблюдают появление газа на поверхности живых срезов и листьев. Это выделяется кислород в результате разложения пероксида под воздействием каталазы. Отмечают отсутствие пузырьков у убитых листьев и срезов.

Задание: описать опыт и сделать вывод об активности каталазы в живых тканях и отсутствии ее в мертвых.

Работа 27. Определение активности полифенолоксидазы

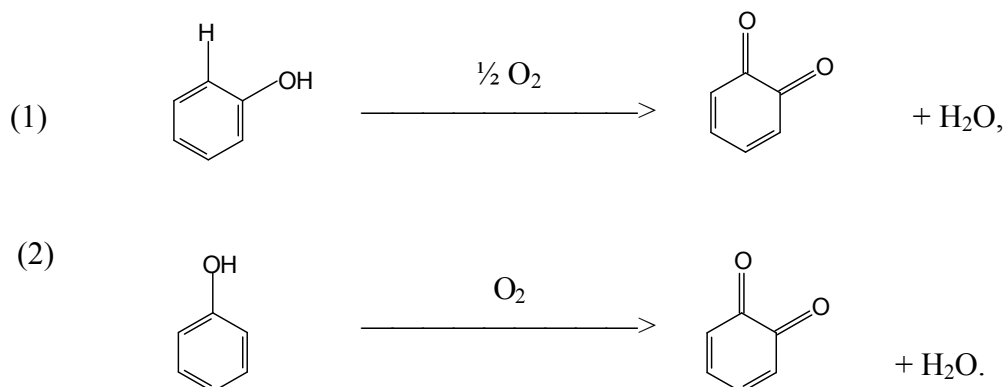
Материалы и оборудование

- 1) листья и корни проростков гороха разного возраста;
- 2) 1/15 М фосфатный буфер, рН 7,0–7,4;
- 3) 1%-й раствор пирокатехина (свежеприготовленный);
- 4) 0,02%-й раствор диметил-п-фенилендиамина в воде (свежеприготовленный);
- 5) разновесы;
- 6) фарфоровые ступки с пестиками;
- 7) мерные колбы объемом 25 мл;
- 8) стеклянные стаканы объемом 50 и 100 мл;
- 9) средние стеклянные воронки;
- 10) пипетки объемом 2 и 5 мл;
- 11) автоматические пипетки;
- 12) бумажные фильтры;
- 13) ФЭК (КФК-2-УХЛ 4,2);
- 14) стеклянные кюветы к ФЭКу толщиной 2 см.

Принципиальные основы метода

Полифенолоксидаза (ПФО), известная также как катехолоксидаза, фенолоксидаза или о-дифенол: кислород оксидоредуктаза (КФ 1.10.3.1) катализирует окисление о-дифенолов до о-дихинонов (дифенолоксидазная, или катехолазная, активность, см. уравнение 1), а также

о-гидроксилирование монофенолов (монофенолгидроксилазная, или крезолозная, активность, см. уравнение 2):



Окислительная активность значительно превышает монофенолгидроксилазную активность этого фермента. Гидроксилирование и окисление составляют две главные реакции в синтезе и расщеплении фенолов растения.

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

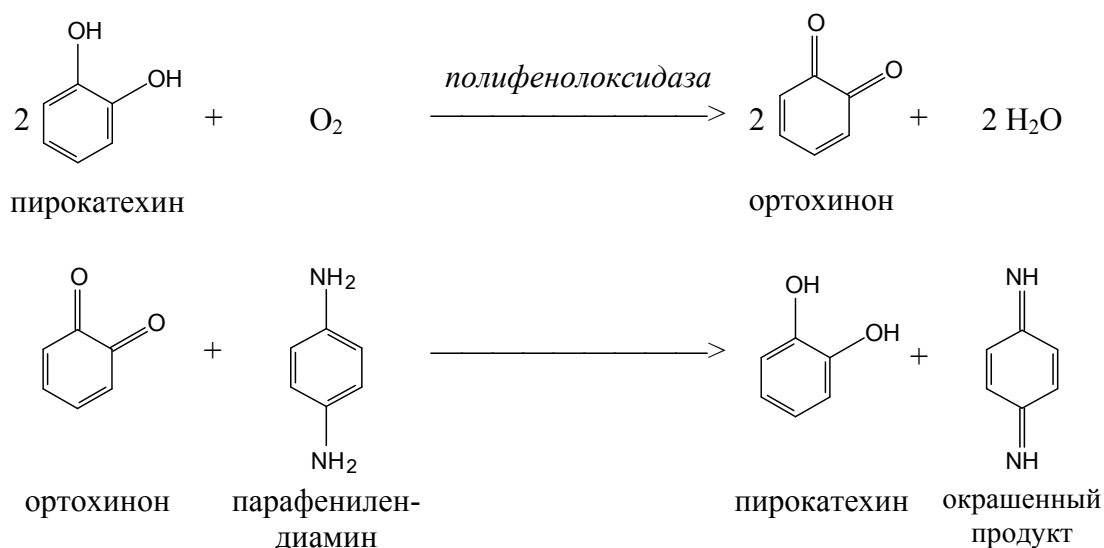
Катехолоксидаза – наиболее изученная и преобладающая форма фенолоксидазы в растениях. В клетках высших растений ПФО локализована в основном в пластидах всех типов (в хлоропластах, лейкопластах) и находится в латентном состоянии (прополифенолоксидаза). Активация

латентной формы ПФО происходит при действии детергентов, жирных кислот, протеаз и некоторых других воздействиях. Физиологическая роль ПФО остается недостаточно ясной. Показано изменение ее активности в онтогенезе растений (активация ПФО при старении), при повреждениях и патогенезе.

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

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

Реакция протекает следующим образом:



Только катехолоксидаза (ПФО) способна осуществлять о-гидроксигирование фенолов.

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

Ход работы

Навеску растительного материала (250–500 мг) растирают в ступке с небольшим количеством (10–15 мл) фосфатного буфера. Растертую массу переносят количественно в мерную колбу, доводят буфером точно до метки, хорошо перемешивают и оставляют на 10–15 мин. Затем раствор фильтруют через двойной бумажный фильтр или центрифугируют 10 мин при 4000 об./мин. Фильтрат (или надосадочную жидкость) используют для определения активности фермента.

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

Для анализа каждой биологической пробы используют три одинаковые кюветы для ФЭКа; одну контрольную и две опытные (две аналитические повторности из одной биологической пробы).

Во все три кюветы вносят: 2 мл вытяжки, 2 мл буферного раствора, 2 мл диметил-п-фенилендиамина.

Затем в контрольную кювету приливают 2 мл воды, устанавливают ее в контрольную (дальнюю) подставку ФЭКа и вводят в световой луч.

Закрывают кюветную камеру и ручками грубой и тонкой регулировки устанавливают нуль на шкале оптической плотности по контрольному образцу.

Одну из опытных кювет ставят в держатель и вводят ее в световой луч.

Автоматической пипеткой добавляют в опытную кювету 2 мл раствора пирокатехина и одновременно включают секундомер. Пробу хорошо перемешивают стеклянной палочкой. Затем закрывают кюветную камеру и следят за развитием окраски по шкале оптической плотности. Замечают по секундомеру время достижения необходимой оптической плотности. Аналогичные изменения производят и для второй опытной кюветы.

Расчет активности ведут по формуле:

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

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

Результаты запишите в таблицу. Сделайте выводы о влиянии исследуемых факторов на активность ПФО.

Работа 28. Количественное определение активности дегидрогеназ

Материалы и оборудование

- 1) ФЭК;
- 2) стеклянные бюксы;
- 3) весы торсионные;
- 4) лезвия безопасной бритвы;
- 5) 0,1%-й раствор ТТХ в 0,87%-м растворе K_2HPO_4 ;
- 6) 0,87%-й раствор K_2HPO_4 ;
- 7) этанол;
- 8) медицинский шприц;

- 9) мерные цилиндры на 10 мл;
- 10) растения: набухшие (но непроросшие) семена и проростки бобов, фасоли, тыквы, спящие и прорастающие почки деревьев.

Окраска тканей разных растений тетразолием позволяет количественно оценить их дегидрогеназную активность.

Цель работы: сравнить активность дегидрогеназ в разных тканях растений и в разных растениях.

Ход работы

Зародыши освобождают от семенной кожуры, с почек снимают чешуи. Берут по две навески (200–300 мг) исследуемых объектов – семядолей или почек без чешуй. Разрезают лезвием безопасной бритвы на тонкие пластинки толщиной 1–2 мм. Срезы разных объектов помещают в отдельные стеклянные бюксы. В один бюкс наливают 10 мл раствора ТТХ, в другой – 10 мл 0,87%-го раствора K_2HPO_4 . Затем все срезы в обоих вариантах инфильтрируют этими же растворами с помощью медицинского шприца. После инфильтрации срезы переносят вновь в бюксы, закрывают крышками и помещают на 30 мин в термостат с температурой 37 °С. Срезы в бюксах с раствором ТТХ приобретают красный цвет, интенсивность которого зависит от активности дегидрогеназ.

Затем срезы каждой пробы вынимают из бюкса и растирают в ступке с небольшим количеством этанола. Содержимое ступки переносят в мерный цилиндр и доводят этанолом до определенного объема (5–10 мл), выбранного по интенсивности окраски раствора, – чем интенсивнее окраска, тем больший можно выбрать объем. Остатки измельченных образцов должны полностью обесцветиться. После растирания пробы центрифугируют, и полученный экстракт, окрашенный формазаном, сразу

колориметрируют на ФЭКе при синем светофильтре. Если в исследуемых тканях имеется хлорофилл и контрольная вытяжка окрашивается в зеленый цвет, а опытная – вместо красного в бурый, то колориметрирование проводят при зеленом светофильтре, что значительно снижает помехи, обусловленные дополнительным зеленым окрашиванием. Об активности дегидрогеназ судят по разнице в оптической плотности между величиной показаний ФЭКа в опытной и контрольной пробах. Для получения достоверных данных по активности дегидрогеназ в данном объекте исследование необходимо повторить не менее 3 раз. Величину дегидрогеназной активности в данных объектах выражают в относительных единицах, исходя из разницы в величинах оптической плотности опытной (с ТТХ) и контрольной (без ТТХ) проб.

Работа 29. Обнаружение амилазы в прорастающих семенах

Материалы и оборудование

- 1) проросшие и непроросшие семена пшеницы;
- 2) чашка Петри с крахмальным агаром;
- 3) тарелка;
- 4) скальпель;
- 5) пинцет;
- 6) стакан с водой;
- 7) слабый раствор I в KI (концентрированный раствор, разбавленный в 10 раз).

Принципиальные основы метода

Ферменты могут действовать не только в той клетке, которая их вырабатывает, но и вне ее, перемещаясь в другие клетки или выделяясь во внешнюю среду. Чтобы наблюдать быстрое выделение ферментов из клеток

семян злаков, необходимо разрезать зерновки, так как семенная кожура и околоплодник препятствуют диффузии веществ.

В данной работе изучается внеклеточное действие амилазы на крахмал. В растениях встречаются две амилазы: альфа-амилаза, вызывающая распад молекулы крахмала на крупные осколки (декстрины), и бета-амилаза, которая отщепляет от крахмала концевые остатки мальтозы. В сухих семенах пшеницы, ржи и ячменя содержится только бета-амилаза, причем почти вся она связана с белками. При прорастании бета-амилаза переходит из связанного состояния в свободное и, кроме того, происходит синтез альфа-амилазы.

Ход работы

Разрезать несколько непроросших зерен пополам, слегка смочить водой и разложить пинцетом на одной половине пластинки из крахмального агара поверхностью среза вниз, не вдавливая семена в пластинку. На другую половину агаровой пластинки поместить несколько проросших семян того же растения, также разрезанных пополам и смоченных водой (желательно оставить на некоторых проросших семенах корешки и приложить их к поверхности крахмального агара). Закрыть крышкой, чтобы не было подсыхания. Через час осторожно снять семена и облить всю пластинку слабым раствором йода.

Отметить результат и ответить на следующие вопросы:

1. Какое действие оказали семена на пластинку?
2. Почему проросшие и непроросшие семена оказали неодинаковое действие?

Работа 30. Определение общей антиокислительной активности растений

Материалы и оборудование

- 1) ФЭК;
- 2) центрифуга;
- 3) термостат;
- 4) аналитические весы;
- 5) колбы на 100 мл (7 шт.);
- 6) колбы на 20 мл (1 шт.);
- 7) пипетки на 0,1 мл (1 шт.);
- 8) пипетки на 0,2 мл (7 шт.);
- 9) пипетки на 1 мл (2 шт.);
- 10) пипетки на 10 мл (1 шт.);
- 11) пробирки (4 шт.);
- 12) 100 мл рабочего раствора;
- 13) 100 мл линетола или НЖК;
- 14) 100 мл 1 мМ FeSO₄;
- 15) 20 мл 1 %-го α-токоферола;
- 16) 100 мл 0,6 М HCl;
- 17) 100 мл 0,06 М рабочего раствора ТБК;
- 18) 100 мл 5 мМ ЭДТА;
- 19) 100 мл раствора этанола с хлороформом в соотношении 7:3 (7,0 мл 96%-го этанола и 3 мл хлороформа);
- 20) 10 мл супернатанта растительной ткани;
- 21) дистиллированная вода.

Принципиальные основы метода

В основе метода реакция ненасыщенных жирных кислот с ионами железа (II), которые активизируют процессы перекисного окисления липидов. Продуктом реакции является малоновый диальдегид, образование которого при добавлении природных антиоксидантов может замедляться. По степени понижения ПОЛ антиоксидантами, содержащимися в экстрактах растений, оценивают антиокислительную активность (АОА). Определение АОА проводят по реакции между малоновым диальдегидом и

тиобарбитуровой кислотой, которая при высокой температуре в кислой среде протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу малонового диальдегида (МДА) и две молекулы тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Максимум светопоглощения комплекса приходится на 532 нм.

Ход работы

Приготовление рабочих растворов.

Готовый препарат линетол (вместо линетола можно использовать НЖК); рабочий раствор готовят, растворяя 1 мл концентрированного тритона X-100 в 99 мл 50%-го этанола; 0,6 М раствор HCl готовят, добавляя 5,1 мл 36%-й HCl к 94,9 мл дистиллированной воды; 0,06 М раствор ТБК готовят, растворяя 864 мг тиобарбитуровой кислоты в 100 мл рабочего раствора; 5 мМ раствор ЭДТА готовят, растворяя 84 мг навески в 50 мл дистиллированной воды; 1 мМ раствор FeSO₄ готовят, растворяя 15 мг навески в 100 мл дистиллированной воды; супернатант растительной или животной ткани получают путем настаивания навески на рабочем растворе в течение 24 ч, а затем путем центрифугирования отделяют нерастворимые компоненты при 7000 g в течение 15 мин.

Работа выполняется в два этапа.

I этап. Определение антиокислительной активности экстракта.

В опытную пробирку последовательно вносят 0,2 мл супернатанта, 0,04 мл линетола, 0,2 мл 1 мМ FeSO₄ и 0,36 мл рабочего раствора. После перемешивания смесь инкубируют при 37 °С в течение 30 мин при постоянном покачивании. Реакцию останавливают добавлением 0,2 мл 1%-го α-токоферола.

II этап. Определение продуктов ПОЛ.

В опытную пробирку прибавляют 0,2 мл 0,6 М НСl и 0,6 мл 0,06 М рабочего раствора ТБК, после перемешивания смесь инкубируют в кипящей водяной бане в течение 10 мин. Охлаждают до комнатной температуры. Для стабилизации окраски в смесь добавляют 0,2 мл 5 мМ ЭДТА. Перед спектрофотометрированием в смесь вносят 10 мл раствора этанола с хлороформом в соотношении 7:3.

Контролем служат три пробирки, в которые добавляют растворы в той же последовательности, как описано выше, а также: в первую – FeSO₄, во вторую – супернатант, в третью – супернатант и FeSO₄.

Измерения производят на 532 нм в следующей последовательности: вначале фотометрируют опытную пробу против первого контроля ($D_{оп}$); затем снимают светопоглощение второго контроля против третьего контроля ($D_{па}$).

Определение антиокислительной активности (в %) проводят по формуле

$$AOA = \frac{D_{оп}}{D_{па}} \cdot 100,$$

где $D_{оп}$ – светопоглощение раствора с антиоксидантом; $D_{па}$ – светопоглощение раствора с прооксидантной активностью.

Сделать выводы об антиокислительной активности в исследуемой ткани.

Работа 31. Превращения веществ при прорастании семян

Материалы и оборудование

- 1) семена пшеницы и клещевины;
- 2) проростки этих растений, выросшие в полной темноте на влажном песке;
- 3) фелингова жидкость;
- 4) раствор I₂ в KI в капельнице (концентрированный раствор, разбавленный в 3 раза);
- 5) раствор краски судан III в капельнице;

- 6) ступки с пестиками (4 шт.);
- 7) водяная баня;
- 8) пробирки с резиновыми колечками (8 шт.);
- 9) скальпели (4 шт.);
- 10) стакан с водой;
- 11) препаровальная игла;
- 12) стеклянная палочка;
- 13) спиртовка;
- 14) держалка для пробирок;
- 15) бритва;
- 16) предметные и покровные стекла;
- 17) микроскоп;
- 18) фильтровальная бумага;
- 19) спички.

Принципиальные основы метода

Семена содержат большое количество запасных питательных веществ – белков, жиров, углеводов и др. В семенах одних растений, например клещевины, подсолнечника и др., жиры преобладают над углеводами (маслянистые семена), у других, например злаков, основным запасным веществом служит крахмал (крахмалистые семена). При прорастании семян сложные запасные вещества при участии ферментов превращаются в более простые, которые используются в процессе роста и дыхания. Для того чтобы установить, каким превращениям подвергаются запасные вещества при прорастании, нужно сопоставить химический состав непроросших семян и проростков, выросших из этих семян. Проращивание проводят в темноте, чтобы исключить образование новых органических веществ в процессе фотосинтеза.

Ход работы

Растереть в четырех ступках непроросшие и проросшие семена – крахмалистые (пшеница) и маслянистые (клещевина). Маслянистые семена

перед измельчением желательно очистить от кожуры. Поместить материал в разные пробирки, снабженные этикетками, залить небольшим количеством воды, нагреть в кипящей водяной бане. Слить вытяжки в чистые пробирки (также с этикетками), прилить равный объем фелинговой жидкости и довести до кипения. По количеству образовавшейся Cu_2O дать оценку содержания редуцирующих сахаров. К оставшемуся в пробирках материалу (мезге) прилить раствор йода и по интенсивности посинения дать оценку содержания крахмала. Сделать тонкие срезы непроросших и проросших маслянистых семян, поместить на предметные стекла в капли раствора краски судан III, закрыв покровными стеклами. Через 5 мин промыть срезы водой, рассмотреть в микроскоп и дать оценку содержания жира – по количеству и размерам капель, окрашенных в красный или оранжевый цвет. Для микроскопирования крахмальных зерен сухих и проросших семян пшеницы взять препаровальной иглой из разрезанной вдоль зерновки крупинку эндосперма вблизи зародыша, растереть в капле воды на предметном стекле, рассмотреть при большом увеличении и зарисовать крахмальные зерна (у проросших семян – в разных стадиях разрушения). Записать результаты в таблицу, оценивая содержание крахмала, сахара и жира по пятибалльной системе.

Таблица 16

Семена	Крахмал	Редуцирующие сахара	Жиры
Крахмалистые сухие			
Крахмалистые проросшие			
Маслянистые сухие			
Маслянистые проросшие			

Сделать выводы о превращении углеводов и жиров при прорастании крахмалистых и маслянистых семян.

ВОДНЫЙ РЕЖИМ РАСТЕНИЙ

Работа 32. Сравнение транспирации верхней и нижней сторон листа хлоркобальтовым методом

Материалы и оборудование

- 1) свежие листья каких-либо растений (гортензии, фуксии, традесканции и др.);
- 2) куски хлоркобальтовой бумаги размером 8×10 см;
- 3) одинаковые стеклянные пластинки размером 6×9 см (2 шт.);
- 4) лезвие бритвы;
- 5) препаровальная игла;
- 6) резиновые кольца для перевязывания стеклянных пластинок (2 шт.);
- 7) стакан с кипяченой водой;
- 8) микроскоп;
- 9) кусочки фильтровальной бумаги;
- 10) электроплитка;
- 11) предметные и покровные стекла.

Принципиальные основы метода

Если прижать к листу предварительно высушенный кусок фильтровальной бумаги, пропитанной раствором хлорида кобальта, то бумага, поглощая выделяющиеся в процессе транспирации водяные пары, будет менять свою окраску из голубой (цвет сухого CoCl_2) в розовую (цвет $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). По быстроте порозовения можно приблизительно судить об интенсивности транспирации.

Ход работы

Просушить над электроплиткой сложенный пополам кусок хлоркобальтовой бумаги до появления ярко-голубого цвета и немедленно приложить его к двум сторонам листа (свежесорванного или непосредственно на растении). Хлоркобальтовые бумажки следует держать

пинцетом, не дотрагиваясь до них пальцами, от которых могут остаться розовые пятна. Чтобы устранить действие атмосферной влаги, осторожно зажать лист вместе с наложенной на него бумагой между двумя стеклянными пластинками и перевязать их резиновыми кольцами. Наблюдать за изменением окраски хлоркобальтовой бумаги и записать результат.

Сделать срезы верхнего и нижнего эпидермиса исследованного листа (или другого листа этого же растения), рассмотреть их в микроскоп при большом увеличении и зарисовать.

Сделать выводы о причинах различной интенсивности транспирации верхней и нижней сторон листа данного растения и о соотношении устьичной и кутикулярной транспирации.

Работа 33. Определение содержания воды в листьях растений

Материалы и оборудование

- 1) сушильный шкаф;
- 2) бюксы;
- 3) эксикатор с высушенным хлоридом кальция;
- 4) тигельные щипцы.

Принципиальные основы метода

Содержание воды в тканях листьев весьма значительно и колеблется у растений разных видов в зависимости от возраста и условий произрастания от 70 до 90 % сырой массы. У различных по засухоустойчивости растений водный обмен неодинаков. Влаголюбивые виды и сорта отличаются более высоким содержанием воды при достаточном водоснабжении, но быстрее теряют воду в случае засухи. У засухоустойчивых форм содержание влаги в тканях, как правило, ниже, но при этом в условиях засухи потери воды

ниже, чем у растений, не устойчивых к засухе. Величина общего содержания воды (общая оводненность) используется как интегральный показатель эколого-физиологических особенностей водного режима растений, механизмов их адаптации к условиям среды. Его применяют при определении и расчете многих других параметров водного обмена растительного организма. Содержание воды в растительных тканях обычно определяют весовым методом и выражают в процентах от сырой или сухой массы растений.

Ход работы

15-дневные растения кукурузы (бобов или подсолнечника) выращивают в течение 4–6 дней в разных условиях водоснабжения. В первом варианте (контроль) растения находятся в условиях оптимального водообеспечения (полива). Во втором варианте (опыт) создается засуха (в зависимости от температуры среды и влажности атмосферного воздуха растения или не поливают, или поливают очень редко и малыми количествами воды).

Предварительно определяют массу абсолютно сухих бюксов. Для этого вымытые бюксы с открытыми крышками помещают в сушильный шкаф при температуре 105 °С. Через час бюксы берут тигельными щипцами и ставят открытыми в эксикатор на 30 мин для охлаждения. После этого бюксы закрывают крышками и взвешивают на аналитических весах. Затем их еще раз ставят в сушильный шкаф на 20–30 мин, охлаждают в эксикаторе и снова взвешивают. Если масса бюксов не меняется, в них можно помещать растительные пробы.

Для исследования берут нормально развитые листья, не имеющие следов повреждения или подсыхания. В каждом варианте определение

проводят три раза. Сырые листья помещают в подготовленные бюксы, взвешивают (навеска должна быть не менее 5 г) и ставят в термостат при температуре 105 °С на 6 ч (крышки бюксов должны быть открыты). Затем бюксы охлаждают в эксикаторе и, закрыв крышками, взвешивают. Чтобы убедиться в удалении всей влаги из листьев, бюксы после взвешивания открывают и снова помещают в сушильный шкаф при той же температуре. Затем охлажденные в эксикаторе бюксы вновь взвешивают. Высушивание материала (и взвешивание) проводят до «постоянной массы», т.е. до тех пор, пока масса бюксов с материалом не перестанет изменяться.

Вычитая из массы бюкса с сухим (сырым) растительным материалом массу высушенного бюкса, получают массу сухого (сырого) растительного материала. По разнице масс сырого и сухого растительного материала находят содержание воды во взятой навеске. Рассчитывают количество воды в процентах от сырой и сухой массы растительного материала. Результаты опыта удобно представить в табличной форме.

Таблица 17

Вариант	Номер определения	Номер бюкса	Масса бюкса, г		Сырая масса, г	Сухая масса, г	Содержание воды	
			С сырым материалом	С сухим материалом			% к сырой массе	% к сухой массе
Контроль	1							
	2							
	3							
	среднее							
Опыт	1							
	2							
	3							
	среднее							

Делают вывод о зависимости содержания воды в листьях от условий водообеспеченности растений.

Работа 34. Определение скорости набухания семян

Материалы и оборудование

- 1) секундомер;
- 2) весы аналитические;
- 3) пинцет;
- 4) колба на 100 мл;
- 5) бюксы;
- 6) фильтровальная бумага;
- 7) 5 г зерновок пшеницы и гороха;
- 8) дистиллированная вода.

Принципиальные основы метода

Семена растений могут находиться в состоянии органического или вынужденного покоя. Последний обусловлен низким содержанием воды как в семенах, так и в окружающей среде. Однако при повышении влажности среды и при наличии благоприятной температуры семена растений начинают активно поглощать воду. Процесс поглощения воды протекает при участии белков, полисахаридов и других гидрофильных коллоидов. Высокомолекулярные соединения (ВМС) способны связывать воду за счет высокой адсорбирующей способности. В гидратации принимают участие функциональные группы белков и полисахаридов. В семенах разных видов процентный состав ВМС может сильно варьироваться. Так, в семенах гороха содержится в среднем 34...36 % белка и 48...50 % крахмала, а в зерновках пшеницы – до 16 % белка и 70 % крахмала.

Ход работы

Навески зерновок пшеницы и гороха (по 5 г) насыпают в бюкс и заливают водой. Зерновки должны быть полностью погружены в воду. Через 2 ч воду сливают, а зерновки обсушивают фильтровальной бумагой и

взвешивают. Затем определяют увеличение массы зерновок и рассчитывают процент поглощенной зерновками воды. Результаты записывают в таблицу.

Таблица 18

Влажность семян

Семена	Масса семян, г		Влажность, %
	исходная	после набухания	
Пшеница			
Горох			

Сделать выводы о скорости набухания семян различных растений.

Работа 35. Определение интенсивности транспирации несрезанных листьев (по В.Ф. Купревичу)

Материалы и оборудование

- 1) растения с широкими листовыми пластинками (за несколько часов до работы растения хорошо полить или выставить на яркий свет);
- 2) CaCl_2 гранулированный, высушенный при $105\text{ }^\circ\text{C}$ (хранить в склянке с притертой крышкой);
- 3) вазелин;
- 4) стеклянный бюкс диаметром 3–4 см;
- 5) аналитические весы с разновесами;
- 6) секундомер или песочные часы на 1 мин;
- 7) проволочное кольцо с ручкой (диаметр кольца равен диаметру бюкса);
- 8) микроскоп;
- 9) предметные и покровные стекла;
- 10) лезвие бритвы;
- 11) препаровальная игла;
- 12) стакан с водой.

Принципиальные основы метода

Метод основан на поглощении гигроскопическим веществом (хлоридом кальция) водяного пара, выделяемого листьями. Увеличение

массы стаканчика с CaCl_2 соответствует количеству транспирированной воды. Экспозицию автор метода рекомендует небольшую (1 мин), в связи с чем надежные результаты можно получить только для крупных листьев (с шириной листовой пластинки более 3 см) и при благоприятных для транспирации условиях (достаточное водоснабжение и хорошее освещение). Раздельно измеряют транспирацию нижней и верхней сторон одного и того же листа. Суммируя полученные данные, находят фактическую величину транспирации исследуемого листа. Данный метод можно использовать как в лабораторных, так и в полевых условиях.

Ход работы

Насыпать в бюкс до половины хорошо просушенный гранулированный CaCl_2 , закрыть бюкс притертой, слегка смазанной вазелином крышкой и тщательно вытереть его наружную поверхность фильтровальной бумагой или салфеткой. Взвесить бюкс на аналитических весах с точностью до 0,0001 г. Открыть бюкс и медленно плотно приложить его к нижней поверхности листа, одновременно пуская в ход секундомер или песочные часы. Для того чтобы удержать лист на месте и слегка прижать его к краям открытого бюкса, используют проволочное кольцо. После минутной экспозиции быстро закрыть бюкс крышкой и взвесить. Прodelать то же самое с верхней стороной листа, повернув его на 180 °С. Измерить площадь бюкса и вычислить интенсивность транспирации I_T (в миллиграммах на 1 дм^2 поверхности листа в 1 мин) по формуле

$$I_T = n \cdot 100/s,$$

где n – увеличение массы бюкса, мг; s – площадь бюкса, см^2 .

Результаты записать в табл. 19.

Растение	Сторона листа	Масса бюкса, CaCl ₂ , мг		Увеличение массы CaCl ₂ , мг	Площадь бюкса	Интенсивность транспирации, мг/мин·дм ²
		исходная	после 1 мин экспозиции			

Рассмотреть в микроскоп и зарисовать строение нижнего и верхнего эпидермиса листа исследованного растения. Сделать вывод, сопоставив интенсивность транспирации нижней и верхней сторон листа.

Работа 36. Определение свободной и связанной воды в тканях растений

Материалы и оборудование

- 1) 30%-й раствор сахарозы (30 г сахарозы растворяют в 70 г воды, точную концентрацию раствора определяют рефрактометрическим методом);
- 2) рефрактометр;
- 3) бюксы;
- 4) марля;
- 5) пробочные сверла;
- 6) резиновые пластинки;
- 7) препаровальные иглы;
- 8) стеклянные палочки;
- 9) пробирки на 3–5 мл;
- 10) пипетки на 2 мл (с делениями);
- 11) фильтровальная бумага.

Принципиальные основы метода

Вода, содержащаяся в клетках и тканях растений, неоднородна по свойствам, состоянию и находится в двух формах – свободной и связанной.

В свободной форме вода сохраняет все свойства чистой воды: подвижность, способность быть растворителем, замерзает при 0 °С. Связанная вода в той или иной степени утрачивает эти свойства. Под «связыванием» понимается возникновение взаимодействий между молекулами воды и неводного компонента, ведущих прежде всего к снижению подвижности молекул воды, что вызывает изменение и других ее свойств.

Для определения фракций воды одна из навесок исследуемого материала помещается в раствор осмотически активного вещества определенной концентрации (например, 30%-й раствор сахарозы). В этот раствор из листьев переходит свободная легкоподвижная вода, и его концентрация снижается. По изменению концентрации, определяемой, например, рефрактометрическим методом, можно рассчитать, сколько воды перешло в раствор. Связанная вода, взаимодействующая с внутриклеточными структурами, остается при этом в клетках. Параллельно, в другой навеске определяют общее содержание воды в исследуемом материале (см. работу № 28), и по разности между общим содержанием воды и количеством свободной воды находят количество связанной воды.

Количество отнятой свободной воды зависит от концентрации раствора осмотически активного вещества. Именно поэтому деление воды на свободную и связанную, конечно, условно. Однако при сравнении результатов тех и других вариантов опыта (например, различающихся по условиям водообеспеченности, минерального питания) или растений различных экологических групп, видов и сортов можно получить сведения, позволяющие выявить изменения в водном обмене растений. На выход воды из растительных клеток оказывает влияние не только ее взаимодействие с внутриклеточными структурами, но и проницаемость клеточных мембран (прежде всего плазмалеммы). На этом основании считают, что выход воды из клеток может характеризовать не только

состояние внутриклеточной воды (соотношение свободной и связанной), но и водоудерживающую способность клеток.

Ход работы

В предварительно высушенные до постоянного веса пробирки приливают по 1,5 мл 30%-го раствора сахарозы и уточняют вес прилитого раствора. При помощи пробочных сверл вырезают из средней части листа высечки (30–35 штук диаметром 7–8 мм из листьев пшеницы или 20–25 штук диаметром 9–10 мм из листьев кукурузы). Для этого листья поворачивают нижней стороной вверх, подкладывают под них резиновую пластинку и выбивают диски, не захватывая крупных жилок. Высечки погружают в раствор сахарозы, залитый в пробирку. Количество высечек и их размер должны быть одинаковыми во всех вариантах опыта. Пробирки с раствором сахарозы и высечками снова взвешивают (для определения сырой массы растительного материала). Высечки находятся в растворе 1–1,5 ч. Считается, что за это время свободная вода переходит в раствор сахарозы.

Затем содержимое пробирок перемешивают препаровальными иглами (или стеклянными палочками), высечки вынимают и определяют конечную концентрацию раствора сахарозы рефрактометрическим методом. Одновременно определяют общее содержание воды в исследуемых листьях (см. работу № 33).

Для определения концентрации сахарозы рефрактометрическим методом измеряют с помощью рефрактометра показатель преломления света исследуемым раствором сахарозы и, пользуясь таблицей (табл. 20 или приложение), переводят его в искомую концентрацию раствора сахарозы.

Таблица 20

Концентрация сахарозы, %	Показатель преломления nD20 (для рефрактометров РЛУ и Аббе)	Показания рефрактометра РПЛ
1	1,33443	2,9
2	1,33588	5,8
3	1,33733	8,7
4	1,33880	11,7
5	1,34027	14,7
6	1,34176	17,7
7	1,34326	20,8
8	1,34477	23,8
9	1,34629	27,0
10	1,34783	30,2
11	1,34937	33,4
12	1,35093	36,6
13	1,35250	39,9
14	1,35408	43,4
15	1,35567	46,6
16	1,35728	50,0
17	1,35890	53,4
18	1,36053	57,0
19	1,36218	61,5
20	1,36384	64,0
21	1,36551	67,7
22	1,36719	71,3
23	1,36888	75,0
24	1,37059	78,7
25	1,37230	82,4
26	1,37400	86,1
27	1,37580	90,0
28	1,37750	93,9
29	1,37930	97,8
30	1,38110	101,9

Измерение показателя преломления света растворами проводят следующим образом: наносят несколько капель исследуемого раствора (при помощи оплавленной стеклянной палочки) на одну из призм рефрактометра и закрывают их второй призмой.

Затем устанавливают оптимальное освещение, проводят диоптрийную коррекцию (добиваются резкого изображения шкалы и нитей перекрестия)

и, перемещая положение призм от величины показателя преломления 1,3 к более высоким, достигают разделения поля зрения на две части (светлую и темную). Размытую радужную границу делают четкой с помощью компенсатора, совмещают с точкой пересечения нитей и записывают показания шкалы. После каждого измерения обе призмы промывают водой и осторожно протирают досуха фильтровальной бумагой.

Определение показателя преломления света растворами следует проводить при постоянной температуре (20 °С) или вносить поправку к найденному значению концентрации раствора (табл. 21).

Таблица 21

Температура, °С	Концентрация сахарозы, %					
	5	10	15	20	25	30
10	-0,54	-0,58	-0,61	-0,64	-0,66	-0,68
11	-0,49	-0,53	-0,55	-0,58	-0,60	-0,62
12	-0,45	-0,48	-0,50	-0,52	-0,54	-0,56
13	-0,40	-0,42	-0,44	-0,46	-0,48	-0,49
14	-0,35	-0,37	-0,39	-0,40	-0,41	-0,42
15	-0,29	-0,31	-0,33	-0,34	-0,34	-0,35
16	-0,24	-0,25	-0,26	-0,27	-0,28	-0,28
17	-0,18	-0,19	-0,20	-0,21	-0,21	-0,21
18	-0,13	-0,13	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14
19	-0,06	-0,06	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08
22	0,13	0,14	0,14	0,15	0,15	0,15
23	0,20	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23
24	0,27	0,28	0,29	0,30	0,30	0,31
25	0,35	0,36	0,37	0,38	0,38	0,39
26	0,42	0,43	0,44	0,45	0,46	0,47
27	0,50	0,52	0,53	0,54	0,55	0,55
28	0,57	0,60	0,61	0,62	0,63	0,63
29	0,66	0,68	0,69	0,71	0,72	0,72
30	0,74	0,77	0,78	0,79	0,80	0,80

Количество свободной воды (X) в растительном материале рассчитывают по формуле

$$X = Am/B - m = m(A/B - 1),$$

где A – концентрация исходного раствора сахарозы, %; B – концентрация раствора сахарозы после опыта, %; m – масса исходного раствора сахарозы, г. Найденное количество свободной воды выражают в процентах от сырой массы навески.

Содержание связанной воды определяют по разности общей оводненности листьев и содержания свободной воды.

Изменение соотношения свободной и связанной воды в листьях растений служит хорошим показателем напряженности водного обмена, например, при нормальном водообеспечении и засухе и т.д.

Работа 37. Определение водного дефицита растений

Материалы и оборудование

- 1) сушильный шкаф;
- 2) бюксы;
- 3) эксикатор с высушенным хлоридом кальция;
- 4) тигельные щипцы;
- 5) чашки Петри;
- 6) фильтровальная бумага.

Принципиальные основы метода

Недостаток влаги в почве и атмосфере нарушает водный режим растений. Сильная засуха приводит к резким изменениям состояния воды в тканях, нарушению структуры протопласта, деятельности всех ферментных систем и энергетического обмена растений. Засуха вызывает снижение интенсивности фотосинтеза, при этом интенсивность дыхания возрастает, но нарушается сопряженность процессов окисления и фосфорилирования,

т.е. снижается энергетическая эффективность дыхания. В результате снижается и продуктивность растений.

В качестве показателей напряженности водного режима растений используют величину водного дефицита и дефицита относительной тургесцентности ткани. В обоих случаях сравнивают содержание воды в растительной ткани с количеством ее в той же ткани, находящейся в состоянии полного тургора. Для полного насыщения клеток влагой ткани растений выдерживают в воде. Общее содержание воды определяют весовым методом.

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

В природных условиях полное насыщение листьев водой наблюдается редко – после дождя, полива, обильной росы. В большинстве случаев растения испытывают водный дефицит, который колеблется от 10 до 35 %. Наибольший водный дефицит испытывают листья растений.

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

Ход работы

Используют растения подсолнечника или кукурузы, выращенные в разных условиях увлажнения (например, оптимальное увлажнение – полив до 70 % от полной влагоемкости и 3–5-дневная засуха – полив до 35 % от полной влагоемкости).

Берут по 2 г листьев в предварительно высушенные до постоянной массы и взвешенные сухие бюксы. Затем листья кладут в чашки Петри, заливают водой комнатной температуры и закрывают крышками. Через 2 ч

листья вынимают из воды, просушивают снаружи фильтровальной бумагой и взвешивают. Для контроля полноты насыщения листьев водой их на 30 мин снова помещают в воду и затем взвешивают. Если масса ткани при этом не изменится, значит, она полностью насыщена водой.

Затем определяют массу абсолютно сухой ткани. Рассчитывают показатели водообеспеченности растений по формулам

$$\text{водный дефицит} = 100 (B - Б)/(B - Г),$$

$$\text{относительная тургесцентность} = 100 (B - Г)/(B - Г),$$

где Б – Г – масса бюкса; с исходными листьями (Б), с листьями, насыщенными водой (B), с абсолютно сухими листьями (Г).

Результаты опыта представляют в форме таблицы.

Таблица 22

Вариант	Номер бюкса	Масса бюкса, г				Кол-во поглощенной воды, г (B – Б)	Общее содержание воды при полном насыщении, г (B – Г)	Показатели водообеспеченности, %	
		пустого А	с сырым материалом Б	с насыщенным водой материалом B	с сухим материалом Г			водный дефицит	относительная тургесцентность

Работа 38. Определение водоудерживающей способности тканей методом подсушивания

Материалы и оборудование

- 1) насыщенный раствор NaCl или KCl;
- 2) технические весы;
- 3) разновесы;
- 4) штативы;
- 5) ножницы;
- 6) большие эксикаторы.

Принципиальные основы метода

Водоудерживающую способность растительных объектов (листьев, корней) можно также определять методом подсушивания их на воздухе. Этот метод достаточно прост: потеря воды растениями происходит естественно в результате испарения. На основе учета потери воды тканями растений за определенное время получают данные о динамике водоотдачи, которую представляют графически.

Однако потеря воды в таких условиях зависит от переменных величин – температуры и относительной влажности воздуха. Поэтому результаты опытов, проведенных в разное время, трудно сопоставимы. Более постоянные и сопоставимые результаты можно получить при подсушивании растений в камерах с постоянной относительной влажностью воздуха, создаваемой над растворами солей (например, NaCl, KCl) или кислот. Но и при этом способе трудно сохранить постоянной относительную влажность воздуха в камерах. Она изменяется вследствие поглощения раствором паров воды из растительных объектов и попадания в камеру наружного воздуха при ее открывании.

Ход работы

Берут три примерно одинаковые навески листьев пшеницы (овса или кукурузы) растений исследуемых вариантов (например, растений, отличающихся по условиям питания или увлажнения, либо различных видов или сортов). После этого их помещают в эксикаторы: на дно эксикатора наливают насыщенный раствор NaCl или KCl, а на сетку раскладывают в один ряд листья растений. Далее через определенные промежутки времени – 30 мин, 1, 1,5 и 2 ч – листья снова взвешивают. Убыль массы соответствует количеству воды, потерянной листьями

растений за 30-минутные интервалы времени. В условиях экспериментальной работы интервалы увеличивают до одного часа, а общую продолжительность опыта доводят до 6–8 ч. Параллельно определяют общее содержание воды в листьях (работа № 33).

На основании полученных данных вычисляют количество испарившейся за время опыта воды в процентах от исходной массы листьев.

Результаты опыта записывают в форме таблицы.

Таблица 23

Вариант	Время, мин	Масса листьев, г	Общее количество воды, % от исходной массы	Количество испарившейся воды, г	Потеря воды, % от исходной массы
1	0				
	30				
	60				
	90				
	120				

Динамику водоотдачи представляют графически и делают заключение об изменении водоудерживающей способности растений в различных вариантах опыта.

Работа 39. Определение интенсивности транспирации по уменьшению массы срезанных листьев

Материалы и оборудование

- 1) комнатные растения (пеларгония, примула и др.);
- 2) торсионные весы;
- 3) технические весы с разновесом;
- 4) ножницы;
- 5) скальпель;
- 6) крышка чашки Петри;
- 7) нитки;
- 8) миллиметровая бумага;
- 9) фильтровальная бумага.

Принципиальные основы метода

Транспирация – процесс испарения воды надземными частями растений. Интенсивность транспирации – это количество воды, испаренной в единицу времени единицей листовой поверхности. Отношение интенсивности транспирации к интенсивности эвапорации (испарения со свободной водной поверхности) при тех же условиях называется относительной транспирацией; этот показатель характеризует способность растений регулировать транспирацию и выражается в виде десятичной дроби.

Наиболее простой и достаточно точный метод учета транспирации – метод быстрого взвешивания, предложенный Л.А. Ивановым: побег или отдельный лист срезают и дважды взвешивают с интервалом не более 5 мин, так как при более длительной экспозиции может начаться завядание листьев, снижающее транспирацию. Установленное этим методом уменьшение массы листьев соответствует количеству испаренной воды (увеличением массы в процессе фотосинтеза можно пренебречь, поскольку интенсивность фотосинтеза во много раз меньше интенсивности транспирации).

Ход работы

Установить торсионные весы в вертикальное положение (по уровню) и проверить их нулевую точку, после чего закрыть арретир и снять с крючка корзиночку. Срезать лист с небольшим отрезком черешка, немедленно подвесить его к крючку весов при помощи нитки с петлей на конце (привязав другой конец за черешок), быстро взвесить и записать время уравновешивания весов. Через 3–4 мин сделать второе взвешивание, также

отметив время. Если испарение идет слабо, можно увеличить экспозицию до 5 мин. Закрывать арретир и снять лист с крючка.

Для определения поверхности листа взвесить на технических весах квадрат миллиметровой бумаги известной площади (например, 100 см²), наложить на этот квадрат исследуемый лист, тщательно обвести карандашом листовую пластинку, вырезать и взвесить полученную бумажную фигуру. Площадь листа вычислить по пропорции $a/b = c/s$, где a – масса квадрата, b – масса бумажной фигуры, c – площадь квадрата, s – площадь листа.

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

Таблица 24

Объект	Время взвешивания		Экспозиция, мин	Масса, г		Испарено воды, г	Площадь, см ²
	1-го	2-го		1-я	2-я		
Лист							
Сосуд с водой							

Интенсивность транспирации IT (г/м², ч) вычислить по формуле

$$IT = n \cdot 10000 \cdot 60 / (s \cdot t),$$

где n – количество испарившейся воды, г; s – площадь, см²; t – экспозиция, мин; 10000 – коэффициент перевода см² в м²; 60 – коэффициент перевода минут в часы.

Вычислить интенсивность эвапорации (IE) по той же формуле. Найти относительную транспирацию IT/IE .

На основании величины относительной транспирации (IT/IE меньше 0,5 считается низкой) сделать вывод о регуляции листом процесса транспирации.

Работа 40. Влияние внешних условий на процесс гуттации

Материалы и оборудование

- 1) 5–8-дневные проростки кукурузы, овса или пшеницы, выращенные в темноте в глиняных горшочках или металлических стаканчиках с почвой (для опыта требуются 4 таких сосуда);
- 2) кристаллизаторы (3 шт.);
- 3) большие стеклянные химические стаканы с отверстием в дне (3 шт.);
- 4) снег или битый лед;
- 5) колба;
- 6) электроплитка;
- 7) термометр;
- 8) кусок проволоки;
- 9) кусочки фильтровальной бумаги.

Принципиальные основы метода

Корневая система не только всасывает воду из почвы, но и активно нагнетает ее в стебель с определенной силой, называемой корневым давлением. Если количество воды, нагнетаемой корневым давлением, больше количества воды, испаряемой надземными органами, то наблюдается гуттация – выделение капель жидкости на кончиках листьев.

Задача данной работы – изучение влияния температуры почвы и влажности воздуха на процесс гуттации.

Ход работы

Взять 4 сосуда с одинаковыми проростками, политыми за час до начала работы. Поставить три сосуда в кристаллизаторы: один заполнить снегом или битым льдом, во второй налить воду комнатной температуры (уровень воды должен быть ниже края сосуда с проростками), в третий – воду, нагретую до 30 °С. Четвертый сосуд оставить на столе. Удалить кусочками фильтровальной бумаги имеющиеся на проростках капли, после чего закрыть три первых сосуда стеклянными колпаками.

Наблюдать за скоростью выделения капель на концах проростков. Для большей точности после появления капель рекомендуется снять их через отверстие в дне колпака кусочком фильтровальной бумаги, прикрепленной к концу проволоки, и отметить, через какой промежуток времени появятся новые капли.

Результаты записать в таблицу, оценивая интенсивность гуттации по пятибалльной системе.

Таблица 25

Номер варианта	Условия опыта	Интенсивность гуттации, в баллах
1	Под колпаком, 0 °С	
2	Те же, комнатная t°	
3	Те же, 30 °С	
4	Без колпачка, комнатная t°	

В выводах объяснить, почему интенсивность гуттации неодинакова в разных условиях опыта, сопоставив варианты 1, 2 и 3, а затем варианты 2 и 4.

Работа 41. Водообмен ветки сосны

Материалы и оборудование

- 1) ветки сосны;
- 2) раствор эозина 30 мг/л;
- 3) весы технические большие или весы Беранже (магазинные, двухчашечные);
- 4) разновес от 0,1 г до 1 кг;
- 5) стеклянные банки на 500–1000 мл с пробками (2 шт.);
- 6) бритва;
- 7) скальпель;
- 8) пробочные сверла;
- 9) кристаллизатор большой;
- 10) вода кипяченая;
- 11) парафин;
- 12) электроплитка;
- 13) вата;
- 14) бумага;
- 15) клей;
- 16) цветные карандаши.

Принципиальные основы метода

Задача данной работы – количественный учет и изучение особенностей трех основных процессов, из которых складывается водообмен растений: поступления воды в растение, передвижения воды по проводящим тканям и транспирации. Растение помещают в банку с определенным количеством воды, принимают меры против испарения воды непосредственно из банки и взвешивают всю установку. Через несколько дней вторично взвешивают установку, учитывают количество оставшейся в банке воды и на основе полученных данных вычисляют количество поглощенной растением воды (по убыли ее в банке) и количество транспирированной воды (по уменьшению массы всей установки). Для получения ответа на вопрос, по

какой части стебля идет восходящий ток, к воде добавляют небольшое количество краски, а также ставят второй опыт с окольцованным стеблем.

Ход работы

Налить в банку примерно $\frac{3}{4}$ воды, подкрашенной эозином, наклеить этикетку и взвесить банку с водой. Взять двухлетнюю ветку сосны, очистить нижнюю часть стебля (до мутовки побегов) от хвои и вставить стебель в отверстие пробки. Если имеется резиновая пробка, то можно очень плотно зажать в ней ветку, для чего нужно просверлить в пробке отверстие немного меньше толщины стебля, вставить в отверстие с нижней стороны более крупное сверло, опустить в сверло с верхней стороны пробки стебель и, придерживая пробку и стебель пальцами, вытащить сверло из пробки. Если пробка корковая, то приходится делать отверстие немного больше толщины ветки, а затем закрыть ватой щели между веткой и пробкой. Вставив ветку в пробку, следует обновить срез стебля под водой: погрузить нижний конец стебля в кристаллизатор с кипяченой водой и отрезать наискось острой бритвой кусок стебля длиной 3–5 см. Продержав свежесрезанный конец стебля под водой не менее 2 мин, вставить пробку с веткой в банку так, чтобы нижний конец стебля не доходил до дна банки на 1–2 см. Залить пробку парафином (если пробка резиновая и плотно закрывает банку, то можно этого не делать) и взвесить всю установку с точностью до 0,1 г.

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

Оставить банки на свету в условиях, одинаковых для обоих вариантов опыта.

Через 1–2 недели взвесить всю установку, вынуть пробку с веткой и взвесить банку с оставшейся в ней водой (если пробку заливали парафином, то перед взвешиванием необходимо тщательно удалить весь оставшийся на банке парафин). Оборвать всю хвою и взвесить ее.

Записать результаты в таблицу. Испаряющую поверхность вычислить, исходя из того, что 1 г сырой хвои сосны обыкновенной соответствует поверхность 33 см² (поверхностью стебля пренебрегают). Интенсивность транспирации вычислить, разделив количество испаренной воды на площадь поверхности хвои и продолжительность опыта (в ч).

Таблица 26

Вариант опыта	Масса, г				Количество воды, г		Масса хвои, г	Поверхность хвои, см ²	Интенсивность транспирации, г/м ² ·ч
	банки с водой		всей установки		поглощенной	испаренной			
	исходная	через 7 дней	исходная	через 7 дней					
Неокольцованная ветка									
Окольцованная ветка									

Сделать бритвой или острым скальпелем поперечные и продольные разрезы стеблей (включая зону кольцевания второй ветки) и зарисовать, обозначив красным карандашом части, окрашенные эозином.

Ответить на следующие вопросы:

1. Совпадает ли количество поглощенной воды с количеством воды испаренной и, если нет, то как это объяснить?

2. По какой части стебля идет восходящий ток?
3. Мешает ли кольцевание передвижению воды по стеблю?
4. Велика ли интенсивность транспирации хвойных растений по сравнению с лиственными, как объяснить это различие?

Работа 42. Изучение устьичных движений

Материалы и оборудование

- 1) листья каких-либо растений;
- 2) 1М раствор сахарозы;
- 3) лезвия бритвы;
- 4) микроскоп;
- 5) предметные и покровные стекла;
- 6) препаровальная игла;
- 7) карандаши;
- 8) стакан с дистиллированной водой;
- 9) стеклянная палочка;
- 10) кусочки фильтровальной бумаги;
- 11) петролейный эфир, ксилол и этиловый спирт, 5%-й глицерин в пузырьках, закрытых пробками, в которые вставлены петли из тонкой проволоки.

Принципиальные основы метода

Газообмен между межклетниками листа и наружной атмосферой регулируется устьицами. Каждое устьице состоит из двух замыкающих клеток, у которых 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. Межклетники листа обычно заполнены воздухом, благодаря чему при рассматривании на свет лист кажется матовым. Если

произойдет инфильтрация, т.е. заполнение межклетников какой-либо жидкостью, то соответствующие участки листа становятся прозрачными.

Состояние устьиц определяется методом инфильтрации, основанным на способности жидкостей, смачивающих клеточные стенки, проникать в силу капиллярности через открытые устьичные щели в ближайшие межклетники, вытесняя из них воздух, в чем легко убедиться по появлению на листе прозрачных пятен. Жидкости проникают в устьичные щели в зависимости от их ширины: петролейный эфир проникает через слабо открытые устьица, ксилол – через средне открытые, а этиловый спирт – только через широко открытые. Данный метод очень прост и вполне применим даже в полевых условиях.

Ход работы

Опыт 1

Срез нижнего эпидермиса листа какого-либо растения 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, приложив с другой стороны кусочек фильтровальной бумаги, и сразу приступить к наблюдению за изменением ширины устьичных щелей. Зарисовать устьица в закрытом состоянии. Снова заменить раствор водой и наблюдать постепенное открывание устьиц.

Опыт 2

Приготовить срез эпидермиса листа какого-либо растения, поместить в каплю 5%-го раствора глицерина на предметное стекло, накрыть

покровным стеклом и сразу начать наблюдения плазмолиза под микроскопом как в замыкающих клетках, так и в остальных клетках эпидермиса. Устьичные щели при этом закрываются.

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

Заменить глицерин водой, для чего нанести рядом с покровным стеклом каплю воды, а с другой стороны оттянуть глицерин фильтровальной бумагой. 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 повысилось.

Записать результаты наблюдений и объяснить причины устьичных движений.

Опыт 3

Влияние внешних условий на состояние устьиц (по Молишу)

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

Исследовать листья, выдержанные в разных условиях (свежие и подвявшие, освещенные и затемненные и т.п.). Каждый раз исследовать 2–3 листа.

Результаты записать в таблицу, отмечая проникновение жидкости знаком «+», а отсутствие проникновения знаком «-».

Таблица 27

Объект	Условия опыта	Петролейный эфир	Ксилол	Спирт	Состояние устьиц

Сделать выводы о влиянии внешних условий на устьичные движения.

Постановка вегетационных опытов

Одним из приемов исследования поглощения минеральных веществ, их накопления и роли в жизнедеятельности растений является вегетационный метод. В зависимости от способа выращивания растений различают несколько его модификаций: почвенная, песчаная и водная культуры.

КОРНЕВОЕ ПИТАНИЕ РАСТЕНИЙ

Работа 43. Методика водной культуры

Материалы и оборудование

- 1) полный питательный раствор В.А. Чеснокова и сотр.;
- 2) раствор микроэлементов (2,9 г H_3BO_3 + 1,9 г $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0,2 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,2 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в небольшом количестве воды в мерной колбе на 1 л, добавляют 5 мл H_2SO_4 ($d=1,84$) и доводят объем раствора водой до метки);
- 3) раствор хелата железа;
- 4) стеклянные сосуды (банки) на 1 л;
- 5) полиэтиленовые крышки к ним с пятью отверстиями;
- 6) стеклянные трубки;
- 7) резиновые груши или микрокомпрессор;
- 8) пинцеты;
- 9) ножницы;
- 10) вата;
- 11) лейкопластырь;
- 12) фильтровальная бумага;
- 13) весы ВЛКТ-500;
- 14) рН-метр;
- 15) пипетки глазные;
- 16) колбы мерные на 0,5; 1 и 2л;
- 17) стаканы мерные на 1л;
- 18) воронки стеклянные;
- 19) бутылки стеклянные на 5 и 10 л;
- 20) пробирки на 10 мл.

Принципиальные основы метода

Наиболее широко в лабораторной практике применяется метод водной культуры, поскольку при таком способе выращивания минеральное питание осуществляется только за счет тех элементов, которые были внесены в питательный раствор.

Методика водных культур разработана в 60-е гг. XIX в. немецкими исследователями Ю. Саксом и В. Кнопом. Ими предложены первые

питательные смеси для выращивания растений без почвы, которые применяются до настоящего времени. С помощью водной культуры изучают влияние отдельных минеральных элементов на рост и физиологическое состояние растений. Она применяется при исследовании первичных процессов поглощения элементов на границе корневая система – питательный раствор, а также путей и способов передвижения минеральных элементов в растениях.

Для выращивания растений в водной культуре используют специальные вегетационные сосуды – стеклянные или полиэтиленовые широкогорлые банки емкостью 1–8 л, имеющие корковые или пластиковые крышки с отверстиями диаметром 1–2 см, которые служат для посадки растений, продувания воздуха и доливания воды или раствора в сосуд. Чтобы защитить корневую систему от попадания света и перегрева, сосуды покрывают снаружи битумным лаком, а затем белой краской или фольгой, либо надевают на них двойные чехлы: внутренний черный и наружный белый. В сосуды помещают пророщенные семена или рассаду. Растворы готовят на воде и обновляют один раз в 5–7 дней (в зависимости от конкретных условий опыта). Расходование воды на транспирацию компенсируют ежедневным добавлением воды от исходного уровня. Для лучшей обеспеченности корней кислородом растворы систематически продувают воздухом.

Рассмотрим методику водной культуры на примере исследования влияния концентрации питательного раствора на рост растений.

Ход работы

Полный питательный раствор В.А. Чеснокова и сотр. (обозначаемый далее 1 н. ППР) разбавляют водой для получения растворов: 0,5 н., 0,3 н.,

0,2 н. и 0,1 н. Готовят по 5 л каждого раствора, пользуясь мерными колбами.

Сосуды для растений и один (для последующего анализа состава исходного раствора) заливают по 1 л питательного раствора, например 1 н. ППР, вносят по 1 мл раствора микроэлементов и хелата железа, перемешивают, подводят рН до 5,6, отмечают рН полученный уровень раствора и маркируют «контроль». Аналогичным образом поступают с остальными вариантами опыта (0,5–0,1 н. ППР).

Для опытов используют 14-дневную рассаду огурцов. Отбирают 45 одинаковых растений, оборачивают нижнюю часть стебля и корневую шейку каждого растения ватой и с помощью пинцета закрепляют по три растения в крышке сосуда, так чтобы корни были полностью погружены в раствор. Вставляют стеклянные трубки для продувания воздуха и располагают сосуды с растениями на стеллажах вегетационного домика.

В ходе опыта систематически продувают питательные растворы воздухом с помощью груши (или микрокомпрессора), ежедневно доливают в сосуды воду до нанесенной метки и проводят контроль и коррекцию рН. Для коррекции рН (5,6–5,8) используют 0,1 н. растворы H_2SO_4 или $NaOH$.

Через 15–20 дней опыт заканчивают. Растения извлекают из сосудов, корни промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой. Растения расчлняют на органы (листья, стебли и корни) и взвешивают. Определяют сырой вес растений (в целом и по органам) для каждого варианта. Полученные результаты оформляют в виде таблицы.

Таблица 28

Вариант и номер растения	Надземная часть			Корни	Целое растение	Процент к контролю	Корни; надземная часть
	листья	стебли	сумма				
1 н. ППР							

В питательных растворах анализируют концентрации основных элементов минерального питания (N, P, K и др.) описанными выше методами.

Определяют сухой вес растений (сырой растительный материал измельчают ножницами, фиксируют при 105 °С в течение 1 ч и досушивают в термостате при 70 °С до постоянной массы), высушенные пробы подвергают мокрому или сухому озолению и оценивают содержание минеральных элементов описанными выше методами.

На основании полученных данных делают вывод о влиянии концентрации питательного раствора на накопление сырой и сухой биомассы, развитие надземной части и корневой системы растения, об особенностях поглотительной деятельности и накоплении минеральных элементов растениями в условиях измененного минерального питания.

Работа 44. Методика гравийной культуры

Материалы и оборудование

- 1) полный питательный раствор В.А. Чеснокова и сотр.;
- 2) 0,1 н. раствор H_2SO_4 ; 0,1 н. раствор $NaOH$;
- 3) сосуды Митчерлиха или полиэтиленовые ведра на 7 л;
- 4) почвенные сита с отверстиями диаметром 4 и 10 мм;
- 5) фильтровальная бумага;
- 6) весы ВЛКТ-500;
- 7) рН-метр;
- 8) пипетки глазные;
- 9) колбы мерные на 0,5; 1 и 2 л;
- 10) стаканы мерные на 1 л;
- 11) воронки стеклянные;
- 12) бутылки стеклянные на 1 и 5 л;
- 13) пробирки на 10 мл.

Принципиальные основы метода

Наряду с водной культурой в практике лабораторных исследований широко используется другая разновидность вегетационного метода – гравийная культура. Она удачно сочетает положительные моменты почвенной и водной культур. Применяемый в этом методе субстрат по своим механическим характеристикам близок к почве, а его химическая инертность позволяет, используя питательные растворы, строго регулировать минеральное питание растений. В этом случае растения выращивают в металлических эмалированных сосудах Митчерлиха (имеющих отверстие в дне), заполненных химически инертным субстратом – гравием. Сосуды имеют цилиндрическую форму (диаметр 20–30 см, высота 25–30 см). Гравий представляет собой крупнозернистую (4–9 мм) фракцию распада горных пород гранита, базальта, мергеля и т.п. Лучшим субстратом является речной, промытый гравий, содержащий до 70 % SiO_2 . Гравий не обладает пористостью. Его можно легко стерилизовать и при необходимости, промывая водой, менять режим питания растений. Гравий служит отличным субстратом для крепления корней, надежно защищая их от подсыхания и перегрева и обеспечивая хорошую аэрацию корневой системы. Влаги, капиллярно удерживаемой гравием, достаточно для водоснабжения и питания растений.

При выращивании в гравийной культуре растения поливают питательным раствором два-три раза в сутки (в зависимости от температуры воздуха) порциями 0,5–1,0 л на сосуд. При исследовании минерального питания вытекающий раствор собирают, анализируют на содержание минеральных элементов и, в случае малого их потребления, используют многократно. Если необходимо поддерживать строго заданный режим питания растений, то использованный раствор отбрасывают или проводят коррекцию его состава.

Ход работы

Опыт проводят по схеме, аналогичной приведенной выше. Подготавливают необходимое количество вегетационных сосудов. В сосуды (примерно на одну треть высоты) помещают щебень для осуществления дренажа. Далее насыпают гравий, предварительно отсеянный через почвенные сита (размер частиц 5–10 мм), так чтобы до верхнего края сосуда оставалось 4 см. Гравий промывают водой для уплотнения и высаживают в него предварительно подготовленные рассаду или семена растений.

В кратковременных опытах используют 14-дневную рассаду огурцов. Готовят по 5 л раствора на растение. На протяжении опыта (10 дней) растения поливают два-три раза в день питательными растворами разной концентрации. Сливы растворов собирают и используют для полива.

В питательных растворах определяют (один раз в два-три дня) концентрации основных элементов минерального питания (N, P, K и др.) описанными выше методами и проводят коррекцию pH. При необходимости готовят дополнительные порции раствора.

Через 10 дней опыт заканчивают. Растения извлекают из сосудов, корни промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой. Растения расчлениают на органы (листья, стебли и корни) и взвешивают. Определяют сырой вес растений (в целом и по органам) для каждого варианта.

Определяют сухой вес растений (сырой растительный материал измельчают ножницами, фиксируют при 105 °С в течение 1 ч и досушивают в термостате при 70 °С до постоянной массы), высушенные пробы подвергают мокрому или сухому озолению и оценивают содержание минеральных элементов описанными выше методами.

На основании полученных данных делают вывод о влиянии концентрации питательного раствора на накопление сырой и сухой биомассы, развитие надземной части и корневой системы растения, об особенностях поглотительной деятельности и накоплении минеральных элементов растениями в условиях измененного минерального питания.

Работа 45. Выращивание плесневого гриба на полном и неполном питательных растворах

Материалы и оборудование

- 1) чистая культура гриба *Aspergillus niger*;
- 2) растворы, приготовленные на дистиллированной воде: 20%-я сахара; 1,2%-й NH_4NO_3 ; 0,4%-й KH_2PO_4 ; 0,4%-й MgSO_4 ; 0,2%-й KCl ; 0,8%-й NaCl ; 5%-я лимонная кислота;
- 3) бюретки для указанных растворов с воронками (7 шт.);
- 4) 0,1%-й раствор FeSO_4 в капельнице;
- 5) колбы емкостью 100–250 мл с ватными пробками и резиновыми колечками (5 шт.);
- 6) микробиологическая петля;
- 7) спиртовка;
- 8) пробирка со стерильной водой;
- 9) стерильная пипетка (трубочка);
- 10) почвы разные (огородная, лесная и т.п.);
- 11) весы технические;
- 12) разновесы;
- 13) кусок кальки для отвешивания почвы;
- 14) спички;
- 15) стаканы химические (5 шт.);
- 16) бумажные фильтры (5 шт.);
- 17) препаровальная игла;
- 18) сушильный шкаф.

Принципиальные основы метода

Выращивание растений на искусственных питательных смесях (методы водных и песчаных культур) широко используют при изучении корневого питания растений.

Исключая из питательной смеси какой-либо элемент, можно узнать, необходим ли он растению. Если элемент необходим, то растение, исчерпав собственные запасы этого элемента, резко сокращает рост, а затем совсем перестает расти и даже отмирает, тогда как отсутствие ненужного растению элемента не влияет на рост. Удаляя из смеси соль, содержащую исключаемый элемент, нужно заменить ее другой с таким расчетом, чтобы остающиеся элементы были в том же количестве, как и в полной смеси, и чтобы раствор имел примерно такое же осмотическое давление.

Для кратковременных опытов с водными культурами удобно использовать плесневый гриб аспергилл (*Aspergillus niger*), для которого условия минерального питания примерно те же, что и для высших растений (отличие лишь в том, что он не нуждается в кальции).

Полная питательная смесь для выращивания гриба должна содержать источник углерода (сахар), N, P, K, Mg, S и Fe, а также микроэлементы (при использовании обычных реактивов добавлять микроэлементы не обязательно, так как они содержатся в виде небольших примесей в так называемых химически чистых солях).

При помощи культуры аспергилла можно также ориентировочно определить питательные достоинства почвы. Для этого гриб выращивают на растворе без фосфора, но с добавкой исследуемой почвы (10 г на 200 мл раствора). Если на этой среде развитие гриба будет хуже, чем на полном растворе, то это указывает на необходимость внесения в данную почву фосфорных удобрений. Аналогично ставят опыт в отношении калия (при этом вносят в смесь без калия 6 г почвы на 200 мл).

Лимонную кислоту добавляют для создания кислой среды, благоприятной для гриба, но препятствующей развитию других микроорганизмов. Элективность среды освобождает от необходимости стерилизации растворов.

После приготовления питательных смесей сделать посев гриба. Для этого из колбы с чистой культурой гриба захватить микробиологической петлей, проведенной через пламя спиртовки, кусочек мицелия или споры и перенести в пробирку со стерильной водой, а оставшийся на петле материал сжечь на пламени спиртовки. Перемещать содержимое пробирки, вращая ее между ладонями. Набрать стерильной пипеткой полученную суспензию и внести во все колбы одинаковое количество. Закрыть колбы ватными пробками, осторожно взболтать (не смачивая пробок) и поставить в термостат при температуре 30–35 °С.

Таблица 29

Вещества	Концентрация, %	Вариант опыта				
		№ 1 полная смесь	№ 2 без N	№ 3 без P	№ 4 без P + почва	№ 5 без минеральных веществ
Сахароза	20	10 мл	10 мл	10 мл	10 мл	40 мл
NH ₄ NO ₃	1,2	10 мл	—	10 мл	10 мл	—
KH ₂ PO ₄	0,4	10 мл	10 мл	—	—	—
MgSO ₄	0,4	10 мл	10 мл	10 мл	10 мл	—
KCl	0,2	—	—	10 мл	10 мл	—
NaCl	0,8	—	10 мл	—	—	—
FeSO ₄	0,1	2 капли	2 капли	2 капли	2 капли	—
Лимонная кислота	5	10 мл	10 мл	10 мл	10 мл	10 мл
Почва		—	—	—	2,5 г	—

Через неделю отметить состояние культуры: размер и характер мицелия, спороношение и т.п.

Определить массу мицелия. Для этого взять 5 сухих бумажных фильтров, пронумеровать их и взвесить. Сложить фильтры «гармошкой», проколоть центры фильтров иглой (для ускорения фильтрации), вложить их в воронки, вставленные в стаканы. Сначала слить на фильтр декантацией (не взбалтывая) раствор, затем перенести мицелий при помощи

микробиологической петли (петлю на стол не класть, не пропустив ее через пламя горелки!). При переносе мицелия из колбы № 4 не допускать попадания на фильтр частичек почвы. После полного стекания жидкости высушить фильтры в сушильном шкафу при 100–105 °С, подложив под влажные фильтры кусок бумаги. Взвесить фильтры с высушенным материалом и по разности с чистым фильтром определить сухую массу мицелия.

Записать результаты в таблицу, указав для 4-го варианта тип почвы (если исследовали разные почвы, записать данные для всех образцов).

Таблица 30

Вариант опыта	Состояние культуры	Масса, г		
		фильтра	фильтра и мицелия	мицелия
Полная смесь				
Без азота				
Без фосфора				
Без фосфора + почва				
Без минеральных веществ				

Ответить на контрольные вопросы

1. Являются ли азот и фосфор необходимыми для растения элементами?
2. Как реагирует растение на исключение этих элементов из питательной среды?
3. Относится ли натрий к числу необходимых элементов?
4. Содержит ли исследованная почва достаточное количество фосфора?

Работа 46. Определение содержания золы в разных частях растений

Материалы и оборудование

- 1) хорошо высушенные на воздухе части сосны и березы или других древесных растений – древесина, наколотая лучинками, листья (желательно собранные в конце лета, когда в них накапливается много зольных элементов), семена;
- 2) тигли с крышками, прокаленные и охлажденные в эксикаторе (перед прокаливанием написать на тиглях номера концентрированным раствором FeCl_3);
- 3) тигельные щипцы;
- 4) спиртовка или газовая горелка;
- 5) чугунный штатив с кольцом;
- 6) фарфоровый треугольник;
- 7) ступка;
- 8) весы с разновесами;
- 9) муфельная печь;
- 10) эксикатор;
- 11) скальпель;
- 12) препаровальные иглы (2 шт.);
- 13) этиловый спирт;
- 14) 10%-й раствор H_4NO_3 в капельнице;
- 15) электроплитка;
- 16) глянцевая бумага;
- 17) спички.

Принципиальные основы метода

При сжигании растительного материала углерод, азот и водород улетучиваются в виде CO_2 , воды и молекулярного азота. Остающийся после сжигания нелетучий остаток (зола) содержит элементы, называемые зольными. Содержание зольных элементов в разных растениях и в разных частях одного и того же растения неодинаково и зависит от состава почвы, физиологических особенностей и возраста растения. На количество золы, образующейся при сжигании разных частей растения, влияет также соотношение между живыми и мертвыми клетками: мертвые клетки состоят

из одних клеточных стенок, в которых находится небольшое количество кальция или кремния, тогда как в цитоплазме и органоидах живых клеток содержится много зольных элементов как в составе органических веществ (сера в белках, фосфор в нуклеиновых кислотах и фосфолипидах, магний в хлорофилле и т.п.), так и в форме минеральных ионов.

Ход работы

1. Озоление древесины

Взвесить с точностью до 0,01 г предварительно прокаленный и охлажденный в эксикаторе тигель (тигель рекомендуется взвешивать без крышки, которая может во время работы разбиться, что сделает невозможным определение массы золы). Отдельно взвесить 3 г тонко наколотых лучинок. В конец лучины воткнуть препаровальную иглу, зажечь другой конец и держать горящим концом несколько вверх над открытым тиглем, поставленным на лист глянцевой бумаги (для собирания золы, падающей мимо тигля). Остатки сгоревшей лучины собрать в тигель. Закрывать тигель крышкой и нагревать в течение 5–6 мин на электроплитке, а затем прокалить в муфельной печи до полного выжигания остатков угля. Муфельную печь следует довести до темно-красного каления, не допуская более сильного нагревания (чтобы кремниевая кислота не плавилась).

2. Озоление листьев и семян

Измельчить материал, растереть в ступке, поместить в предварительно прокаленный и взвешенный тигель и взвесить с точностью до 0,01 г (без крышки). Навеска должна составлять 0,5–1 г. Открытый тигель поместить на фарфоровый треугольник на штатив, добавить 1–2 мл спирта и поджечь. После прекращения горения повторить эту операцию еще раз. При отсутствии спирта материал можно обугливать, медленно нагревая

закрытый крышкой тигель на пламени спиртовки: сначала держать тигель на расстоянии 2–3 см от верхнего края пламени, а после прекращения выделения дыма нагревать на сильном огне, следя за тем, чтобы вместе с газами не выбрасывались частицы озоляемого материала. Закончить озоление в муфельной печи. Выставить тигли на металлическую полочку муфельной печи и проверить полноту сжигания, о которой судят по отсутствию в золе несгоревших частиц и угля. Перемешивать золу можно двумя тонкими препаровальными иглами или кусочками проволоки. Если после продолжительного прокаливания не происходит полного сторания (остаются кусочки спекшегося угля), тигель следует охладить, добавить несколько капель спирта и перемешать препаровальными иглами; после испарения спирта внести несколько капель 10%-го раствора NH_4NO_3 , осторожно нагреть до выпаривания воды (на слабо нагретой электроплитке или на спиртовке), закрыть тигель крышечкой и продолжать прокаливание при высокой температуре (нитрат аммония при нагревании полностью разлагается до газообразных продуктов, причем освобождающийся при этом кислород резко усиливает озоление). Во избежание угорания работающих все операции по сжиганию растительного материала проводят под тягой. После того как озоление закончено, перенести тигли в эксикатор, закрыв их крышками (чтобы движение воздуха не вызвало выдувания золы). После полного охлаждения тигли взвесить и найти содержание золы в исследуемом материале. Результаты представить в виде таблицы.

Таблица 31

Вид растения	Часть растения	Номер тигля	Масса, мг					Содержание золы, %
			пустого тигля	тигля с материалом	тигля с золой	материала	золы	

Сделать выводы, объяснив причины неодинакового содержания зольных элементов:

- 1) в различных частях одного и того же растения;
- 2) в одноименных частях разных растений.

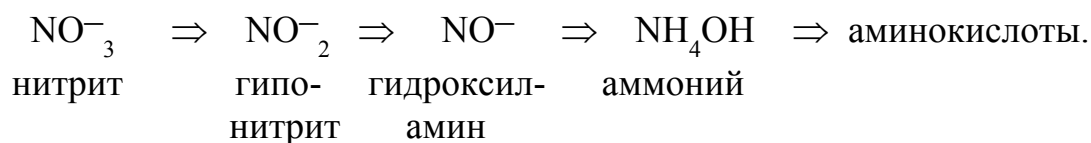
Работа 47. Обнаружение нитратов в растениях

Материалы и оборудование

- 1) растения, выращенные на питательном растворе или в почве;
- 2) 1%-й раствор дифениламина в концентрированной серной кислоте в капельнице (хранить в темноте; капельницу поставить на крышку чашки Петри, чтобы предотвратить попадание на стол капель этой едкой жидкости);
- 3) ножницы;
- 4) белая фарфоровая тарелка;
- 5) стеклянная палочка;
- 6) стакан с водой;
- 7) фильтровальная бумага.

Принципиальная основа метода

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 гидросиламинредуктаза). Аммиак связывается кетокислотами (альфа-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 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 NO_3^- образует синюю анилиновую краску. По интенсивности посинения можно приблизительно судить о количестве нитратов в исследуемом объекте.

Ход 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 записать в таблицу, оценивая посинение по пятибалльной шкале.

Растение	Условия	Количество нитратов	
		в черешке	в листовой пластинке

Работа 48. Определение нитратов в растительных тканях

Материалы и оборудование

- 1) ФЭК или спектрофотометр;
- 2) гомогенизатор;
- 3) водяная баня;
- 4) шейкер;
- 5) колбы на 1 л (3 шт.);
- 6) колбы на 250 мл (2 шт.);
- 7) колбы на 100 мл (1 шт.);
- 8) пипетки на 10 мл (2 шт.);
- 9) пипетки на 2 мл (1 шт.);
- 10) пипетки на 1 мл (1 шт.);
- 11) пробирки (8 шт.);
- 12) пипетка на 5 мл (1 шт.);
- 13) центрифужные пробирки;
- 14) колеоптили проростков пшеницы;
- 15) проростки пшеницы или клубни картофеля;
- 16) α -нафтиламин;
- 17) сульфаниловая кислота;
- 18) 12%-й раствор CH_3COOH ;
- 19) нитрат калия (KNO_3);
- 20) цинковая пыль;
- 21) сульфат марганца;
- 22) дистиллированная вода.

Принципиальные основы метода

Вначале нитраты экстрагируются из растительных тканей, а затем они восстанавливаются до нитритов металлическим цинком в растворе уксусной кислоты. В дальнейшем уже нитриты взаимодействуют с

соединениями реактива Грисса (α -нафтиламином и сульфаниловой кислотой) в кислой среде с образованием азосоединения, обуславливающего окраску раствора в розово-красный цвет с максимумом поглощения при 536 нм.

Ход работы

Приготовление растворов.

Реактив Грисса: 1) 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 12%-го раствора CH_3COOH ; 2) 0,1 г α -нафтиламина растворяют при нагревании в 20 мл дистиллированной воды и смешивают со 150 мл 12%-го раствора CH_3COOH . Перед употреблением растворы 1 и 2 в равных пропорциях смешивают.

Стандартный раствор нитрата калия готовят, растворяя 1,63 г навески в 1 л дистиллированной воды (1 мл раствора содержит 1 мг NO_3^-).

Рабочий стандартный раствор (РСР) нитрата калия готовят, растворяя 20 мл стандартного раствора нитрата калия в 0,1 л дистиллированной воды (1 мл раствора содержит 0,2 мг NO_3^-).

Смесь цинковой пыли с сульфатом марганца готовят в соотношении 1:100 (смесь содержит 1 г цинковой пыли и 100 г сульфата марганца).

Для построения калибровочного графика используют восемь пробирок, в которые последовательно вносят по 0, 0,2, 0,3, 0,4, 1,0, 1,5, 2,0 и 3,0 мл РСР. Объем всех пробирок доводят до 6,0 мл дистиллированной водой. Затем добавляют 2,0 мл 12%-й уксусной кислоты, после перемешивания вносят на кончике скальпеля смесь цинковой пыли с сульфатом марганца. Пробирки встряхивают 30 с и затем приливают 1,0 мл реактива Грисса. Опытную пробу перемешивают и через 10 мин определяют поглощение на ФЭЖе при 536 нм. Данные записывают в табл. 33.

Таблица 33

№ пробирки	Объем, мл		Содержание NO ₃ ⁻ , мг	Светопоглощение, усл. ед.
	РСР	дистиллированной воды		
1	0,0	6,0	0,00	
2	0,2	5,8	0,04	
3	0,3	5,7	0,06	
4	0,4	5,6	0,10	
5	1,0	5,0	0,20	
6	1,5	4,5	0,30	
7	2,0	4,0	0,40	
8	3,0	3,0	0,60	

На основании данных таблицы следует построить калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество NO₃⁻ (С, мг), а на оси ординат – значения светопоглощения растворов (D, усл. ед.).

Навеску растительного материала (10 г) измельчают и гомогенизируют. Гомогенат заливают 50 мл дистиллированной воды и выдерживают в течение 1 ч, постоянно перемешивая. Затем раствор фильтруют или центрифугируют в течение 15 мин при 7000 g. Фильтрат или супернатант сливают в мерную колбу на 100 мл, объем которой доводят до метки дистиллированной водой. Для определения нитратов из колбы в пробирку отбирают 6 мл супернатанта (фильтрата) и добавляют 2,0 мл 12%-й уксусной кислоты. После перемешивания в опытную пробирку вносят на кончике скальпеля смесь цинковой пыли с сульфатом марганца. Пробирку встряхивают 30 с и затем приливают 1,0 мл реактива Грисса. Опытную пробу перемешивают и через 10 мин определяют светопоглощение на ФЭКе при 536 нм.

Содержание нитратов C_{оп} (в мг/г влажной массы) в растительной ткани определяют по формуле

$$C_{\text{оп}} = \frac{C_{\text{к}} \cdot V_1}{P \cdot V_2},$$

где C_k – содержание нитратов, найденное по калибровочному графику, мг;
 P – навеска растительной ткани, г; V_1 – общий объем супернатанта, мл; V_2 –
объем супернатанта, вносимого в пробирку, мл.

Сделать выводы о содержании нитратов в растениях, а также
возможность их накопления в растительных тканях.

Работа 49. Определение объема корневой системы методом Сабинина и Колосова

Материалы и оборудование

- 1) проростки каких-либо растений;
- 2) объемомер Сабинина и Колосова, бюретки, корковая пробка
несколько большего диаметра, чем диаметр цилиндрического сосуда
объемомера;
- 3) вата;
- 4) суровые нитки.

Принципиальные основы метода

Разработанный Д.А. Сабининым и И.И. Колосовым метод позволяет
определять объем корней с ошибкой не более 5–7 %, что значительно
превышает точность метода установления объема по количеству
вытесненной воды из сосуда при погружении в него корней (ошибка
20–25 %). Объем корней определяют с помощью специального объемомера.
Прибор состоит из стеклянного цилиндра, нижняя часть которого вытянута
в трубку, соединенную каучуковой трубкой с градуированной пипеткой
(емкость пипетки 1–2 мл, цена деления 0,01–0,02 мл). Оттянутый конец
пипетки необходимо отрезать. Объем стеклянного цилиндра подбирают по
размеру корневой системы. Чем меньше диаметр цилиндра, тем
чувствительней прибор. Стеклянный цилиндр укрепляют в штативе
вертикально, а градуированную пипетку – под небольшим углом к
горизонту.

В прибор наливают воду или раствор, в котором росли растения. При погружении корней в сосуд уровень воды в нем поднимается и переходит из положения А в положение В. По закону сообщающихся сосудов водный мениск в пипетке также поднимается, но поскольку она наклонена к горизонтали, то водный мениск в ней передвигается на большее расстояние, чем уровень воды в цилиндре.

Передвижение уровня воды в цилиндре соответствует катету c треугольника, а передвижение мениска в капилляр равно его гипотенузе a :

$$c/a = \text{Sin}\alpha,$$

$$a = c/\text{Sin}\alpha.$$

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

Ход работы

Внутренние поверхности цилиндра и пипетки тщательно промывают свежеприготовленной хромовой смесью и водой. Прибор укрепляют в штативе и наливают дистиллированную воду или раствор, в котором росли растения. Уровень жидкости в цилиндре должен быть на 2–3 см ниже верхнего края. Пипетку укрепляют на такой высоте, чтобы уровень жидкости в ней находился у начала градуированной части. Вытесняют из прибора пузырьки воздуха. После проверки прибора определяют объем корней. Растения складывают в пучки так, чтобы корневые шейки были на одном уровне, и закрепляют при помощи ваты в отверстии разрезанной пополам пробки. Обе половинки пробки связывают по окружности ниткой и дают стечь раствору с корней. Затем остатки капельножидкой воды снимают с корней влажной фильтровальной бумагой, 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. Затем корни вынимают из цилиндра, дают стечь воде с них в цилиндр.

Если после стекания всей воды уровень ее в пипетке не достигнет вновь положения А, то, не меняя наклона пипетки, доливают воду 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 проводят 2–3 раза и рассчитывают среднюю величину.

Работу необходимо выполнять быстро, чтобы корни не подсыхали. Для устранения ошибки из-за разности в осмотическом давлении желательно измерять объем корней в питательном растворе, в котором они росли.

Работа 50. Определение общей и рабочей адсорбирующих поверхностей корневой системы методом Сабинина и Колосова

Материалы и оборудование

- 1) 10–14-дневные проростки каких-либо растений;
- 2) 0,0003 н. раствор метиленовой сини (на 1 л 112,0 мг предварительно подсушенной при 95–100 °С МС);
- 3) 0,2 М раствор CaCl_2 (22,2 г/л);
- 4) бюксы или стаканы на 25–50 мл;
- 5) ФЭК;
- 6) калибровочная кривая на МС в интервале концентраций 1–12 мг/л;
- 7) весы;
- 8) фильтровальная бумага.

Принципиальные основы метода

Одной из важнейших характеристик состояния корневой системы является ее масса и поглощающая поверхность. Считается, что в интервале между апикальной и базальной частями корня активное поглощение

меняется и даже выделяется специальная поглощающая зона корня. Поэтому бывает необходимым определить как общую, так и рабочую поверхность корня. Д.А. Сабининым и И.И. Колосовым, считавшими, что первичным актом поглотительного процесса является адсорбция, был разработан метод определения общей поверхности корней, включающей рабочую и недействительную их поверхности. Большинство поглощаемых корнем веществ не только адсорбируются, но и десорбируются с его поверхности. Поэтому размеры десорбции будут более значительными на тех участках корня, где отсутствует или замедлен процесс транспорта веществ внутрь корня. В качестве поглощаемого вещества, которое можно легко определить колориметрически, авторы метода выбрали метиленовую синь (МС). Было установлено, что 1 мг МС при мономолекулярной адсорбции покрывает $1,05 \text{ м}^2$ поверхности адсорбента. Зная исходную концентрацию раствора МС и после экспозиции в ней корней, по разности можно определить, какое количество миллиграммов сини адсорбировалось корневой системой. Умножение этого количества МС на $1,05 \text{ м}^2$ дает величину поглощающей поверхности. МС проникает в клетки эпидермиса в течение 90 с. При двукратном погружении корней (каждый раз по полторы минуты) в раствор МС происходит адсорбция красителя на деятельной и недействительной поверхности корней. При третьем погружении корня в раствор МС поглощается только деятельной (рабочей) поверхностью корня. Следовательно, по изменении концентрации МС в двух первых стаканах рассчитывается общая поверхность корневой системы, а результаты третьего определения дают представление о величине рабочей поглощающей поверхности. Концентрацию МС определяют колориметрически на фотоэлектроколориметре. Калибровочную кривую для количественного определения МС готовят заранее. Наряду с определением общей,

недеятельной и рабочей поверхностей корня желателно проследить изменение этих параметров на корнях нормальных растений и голодающих по одному из основных элементов минерального питания. Поэтому предусматривают два варианта:

- 1) контрольные растения, выращенные на полной смеси Хогланда;
- 2) опытные растения, выращенные при исключении из смеси одного из макроэлементов (N, P, K или Ca).

Ход работы

Для работы лучше использовать корни растений, выращенных в водной культуре. Вначале определяют объем корней. Затем в три бюкса наливают 0,0003н. раствор МС, объем которой должен быть примерно в 10 раз больше, чем объем корней.

В четвертый бюкс наливают раствор CaCl_2 . Слегка обсушив корни фильтровальной бумагой, последовательно погружают их в три бюкса с раствором МС на полторы минуты в каждый. После каждого погружения дают возможность раствору сини стечь в тот же бюкс, из которого были вынуты корни.

Уменьшение концентрации МС определяют путем сравнения найденной для каждого бюкса концентрации с исходной, т.е. с 0,0003 н. раствором (112 мг МС/л; молекулярная масса метиленовой сини с тремя молекулами воды равна 373,68 г), предварительно разбавленным, как и раствор МС в бюксах, в 10 раз. Разбавление МС перед установлением ее концентрации повышает точность определения.

По учету количества поглощенной сини в первых двух бюксах определяют общую адсорбирующую поверхность корней. МС, поглощенная в третьем бюксе, характеризует рабочую адсорбирующую поверхность.

Разница между общей и рабочей адсорбирующей поверхностями дает представление о масштабе недействительной поверхности корней. Частное от деления величин общей и рабочей поверхностей на объем корней (более грубо на их сырую массу в граммах) дает представление о соответствующих величинах удельной адсорбирующей поверхности корней.

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

Результаты опытов записывают по форме таблицы.

Делают выводы об относительных размерах общей и рабочей адсорбирующих поверхностей корней различных растений и о причинах наблюдаемых различий.

Таблица 34

Вариант	№ бюкса	Объем раствора MS в бюксе	Количество MS в бюксе, мг			Адсорбирующая поверхность, м ²						
			до погружения корней	после погружения корней	поглощенное	общая	рабочая	недействительная	Удельная			
									общая	рабочая	недействительная	
Контроль	1											
	2											
	3											
Опыт	1											
	2											
	3											

Работа 51. Диагностика заболеваний растений при голодании по элементам минерального питания

Материалы и оборудование

- 1) гербарные листы больных растений;
- 2) цветные карандаши;
- 3) атласы и книги с иллюстрациями признаков голодания;
- 4) растения: больные листья и побеги комнатных растений в зимний период; растения сада, огорода, поля, леса, пустырей и т.д. в период вегетации.

Принципиальные основы метода

Распознавание признаков голодания растений, вызываемых недостатком тех или иных элементов минерального питания, крайне важно для устранения признаков заболевания путем своевременной подкормки. Внимательное изучение признаков голодания у растений парка, леса, окрестных полей поможет сделать вывод о дефиците тех или иных элементов в данном районе и дать рекомендации о состоянии почв и внесении недостающих удобрений под культурные растения.

Цель работы: познакомиться с признаками голодания по отдельным элементам минерального питания у культивируемых и дикорастущих растений.

Ход работы

Заранее собирают больные листья и поврежденные побеги различных растений. С помощью преподавателя и с использованием имеющихся атласов, книг, пособий и табл. 35 ставят диагноз заболевания растений. Данные вносят в табл. 36.

Таблица 35

Элемент	Симптомы недостаточности
N	Слабый рост, карликовость, склероморфизм. Отношение побеги/корни сдвинуто в пользу корней. Преждевременное пожелтение более старых листьев, их некротические концы
P	Задержка цветения, отсутствие роста, фиолетовая окраска листьев и стеблей, тенденция к скручиванию и перевертыванию листьев
K	Белые и бурые пятна, рваный край листа, дырки, отверстия в листе, краевой ожог листьев (запал). По мере возрастания дефицита элемента повреждения увеличиваются. Сходны с симптомами азотной недостаточности
S	Отставание в росте растений. Листья от бледно-зеленой до кремовой и желтой окраски. При голодании по сере отсутствует характерный признак азотистого голодания – общее пожелтение всего растения
Mg	Белые или желтые пятна на листьях сливаются, лист буреет и отмирает. При глубоком дефиците листья узкие, по цвету – красные, оранжевые, пурпурные. Наблюдается слабый рост и межжилковый хлороз старых листьев
Ca	Гофрированные, сморщенные листья с некротическими зонами. Отсутствие верхушечных почек. Нарушение роста, связанного с делением и растяжением клеток
Fe	Бледно-желтая окраска ткани листьев между жилками у молодых листьев, жилки остаются зелеными. Хлороз. Малая мощность растения, неурожай. Старые листья поражаются позже сходным образом
Mn	Однородная желтизна старых и молодых листьев, а также верхушечной почки. Межжилкового хлороза на поздних стадиях нет. На ранних – имеется угнетение роста и межжилковый хлороз
B	Отмирание верхушечных почек, закрученные, деформированные листья; черная гниль у корнеплодов свеклы, моркови; полые кочерыжки капусты
Zn	Ярко-желтая окраска всей поверхности листьев и зеленый цвет жилок. Желтые полосы на листьях злаков. Мелколистность верхушечных побегов. «Розеточность», «желтуха», «мелколистность», «пятнистость листьев» – так называется дефицит Zn
Cu	Бледно-желтая окраска листьев или полосатые закрученные листья. Вдоль краев листьев хлороз с последующим некрозом

Таблица 36

Вид растения и место обитания	Орган (побег, лист: верхний, нижний)	Описание признаков голодания	Рисунок	Диагноз	Способы устранения заболевания

Задание: заполнить табл. 36; сделать рисунки; отметить расположение больных листьев на побеге (верхние, нижние); сделать выводы о типичных видах голодания у растений огорода, сада, леса, поля данного района.

Работа 52. Определение солеустойчивости злаков по всхожести их семян

Материалы и оборудование

- 1) чашки Петри;
- 2) фильтровальная бумага;
- 3) раствор формалина (1 мл формалина на 300 мл воды);
- 4) химические стаканы;
- 5) марлевые мешочки;
- 6) этикетки;
- 7) термостат;
- 8) сушильный шкаф;
- 9) пипетки на 10 мл;
- 10) раствор NaCl;
- 11) растения: семена ячменя, кукурузы и др.

Принципиальные основы метода

В условиях избыточной засоленности почвы всхожесть семян и интенсивность роста растений часто снижаются. При определении солеустойчивости показателем устойчивости служит сравнение числа проросших семян в растворах соли и в дистиллированной воде.

Цель работы: определить солеустойчивость злаков.

Ход работы

Подбирают здоровые семена растений, помещают их в разные марлевые мешочки с этикеткой внутри и обрабатывают раствором формалина в течение 3–5 мин. Затем слегка просушивают и раскладывают по 10–20 семян в каждую чашку Петри. Предварительно чашки Петри прокаливают в сушильном шкафу при 150 °С в течение 1 ч, на их дно укладывают фильтровальную бумагу. В каждую чашку наливают по 10 мл 7 или 10%-го раствора NaCl и 10 мл дистиллированной воды (контроль). Опыт проводят в трехкратной повторности.

Таблица 37

Растение	Вариант опыта	Число проросших семян	Всхожесть, %
Ячмень	H ₂ O		
	NaCl, %		
Кукуруза	H ₂ O		
	NaCl, %		

Чашки Петри с семенами помещают в термостат при температуре 26 °С для проращивания. На дно термостата ставят кювету с водой. Через семь дней в каждом варианте подсчитывают число проросших семян. Определяют процент всхожести. Результаты записывают в таблицу (табл. 37).

Задание: сделать вывод о солеустойчивости исследованных растений.

Работа 53. Изучение выделения протонов корневыми системами растений по смещению рН питательного раствора

Материалы и оборудование

- 1) Раствор Кнопа;
- 2) смешанный индикатор (метиленовый красный и бромтимоловый синий в соотношении 1:2);

- 3) 0,1 н. раствор NaOH;
- 4) стандартные буферные растворы для рН-метрии;
- 5) стаканчики на 50 мл;
- 6) стаканчики полиэтиленовые для приема лекарств;
- 7) секундомер;
- 8) пипетки Мора с делениями на 2 мл;
- 9) рН-метр или прибор Алямовского.

Принципиальные основы метода

Питательные растворы не обладают такой буферной емкостью, как почва, и поэтому их рН может быть легко сдвинут. Изменение кислотности питательного раствора может происходить в результате неравномерного поглощения из него катионов и анионов, а также вследствие выделения корневой системой растений ионов водорода в виде угольной и органических кислот. Для устранения влияния первого фактора в опытах используют наиболее сбалансированный раствор, т.е. такой, из которого катионы и анионы поглощаются с примерно одинаковыми скоростями.

Ход работы

Раствор Кнопа разбавляют в 4 раза, наливают в стаканчик и подщелачивают с помощью 0,1 н. раствора едкого натра до рН 7,6–7,8. Затем в этот стаканчик погружают корни проростков (кукурузы или пшеницы, 7–10-дневные). Наблюдения за смещением рН проводят сразу после погружения корней, а затем через определенные интервалы времени. Смещение рН в течение опыта несколько замедляется, поэтому рекомендуется использовать увеличивающиеся интервалы времени между определениями рН (5, 10, 15, 20, 25 мин). Полученные результаты записывают следующим образом:

Название растения	Длительность наблюдения, мин	pH
Пшеница	0	
	5	

Ход смещения pH с течением времени изображают графически.

Определение pH растворов проводят с помощью отбора проб из стаканчика с растениями, используя такие методы, как потенциометрический или шкалы окрасок (с реактивом Алямовского).

Работа 54. Определение фосфора с помощью аскорбиновой кислоты

Материалы и оборудование

- 1) ацетатный буфер (0,1 М, pH 4,0);
- 2) 1%-й раствор аскорбиновой кислоты в 0,001 М растворе $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (в мерную колбу на 25 мл берут 0,06 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, растворяют в 10–12 мл бидистиллированной воды, добавляют 0,25 г аскорбиновой кислоты и доводят объем бидистиллированной водой до метки, реактив готовят в день анализа);
- 3) 1%-й раствор $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ в 0,05 н. растворе H_2SO_4 , фотоэлектроколориметр, мерные колбы на 25, 50 и 500 мл, пипетки на 0,1, 1 и 5 мл, пробирки.

Принципиальные основы метода

Восстановление фосфорно-молибденового комплекса происходит под действием аскорбиновой кислоты (метод Лоури и Лопеса в модификации Скулачева). Ускорение реакции обеспечивает присутствие в инкубационной среде ионов меди. Этот метод применяют в тех случаях, когда в пробе содержатся лабильные фосфорорганические соединения. Поскольку эти соединения более устойчивы в кислой среде, восстановление фосфорно-молибденового комплекса проводят при pH 4.

Ход работы

Из полученного экстракта для определения неорганического фосфора берут 0,1 мл вытяжки, добавляют 5 мл ацетатного буфера, 0,5 мл раствора $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ и 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты (общий объем 6,1 мл). Через 10 мин раствор колориметрируют с красным светофильтром (660 нм), используя кюветы с длиной оптического пути 10 мм.

Для построения калибровочной кривой берут объемы фосфата от 0,05 до 0,5 мл. Объем ацетатного буфера изменяют от 5,45 до 5,0 мл в зависимости от взятого объема раствора фосфата (общий объем 6,5 мл).

Метод характеризуется более высокой чувствительностью, чем метод Фиске – Суббароу, и позволяет определить от 0,3 до 6 мкг неорганического фосфата в 1 мл колориметрируемого раствора.

Работа 55. Определение меди в гомогенатах растительных тканей

Материалы и оборудование

- 1) фотоэлектроколориметр;
- 2) пробирки;
- 3) колбы;
- 4) пипетки;
- 5) растворы 25 мг/мл гидроксилamina сернокислого (1,25 г);
- 6) 1,2 М трихлоруксусной кислоты (ТХУ);
- 7) 4 М соляной кислоты;
- 8) 0,88 М 4,7-дифенил-1,10-фенантролин-3,6-дисульфоновокислого натрия;
- 9) 4 М уксуснокислого натрия;
- 10) 3 мМ сульфита меди CuSO_3 .

Принципиальные основы метода

Ионы меди образуют с 4,7-дифенил-1,10-фенантролин-3,6-дисульфоновокислым натрием комплекс оранжевого цвета, который фотометрируют. Содержание меди в пробе определяют после осаждения белков.

Ход работы

Приготовление растворов.

Депротеинизирующую смесь готовят, растворяя 1,25 г гидроксиламина сернокислого в 50 мл раствора, полученного путем смешивания 25 мл 1,2 М ТХУ и 25 мл 4 М HCl. Смесь хранят в холодном месте без доступа света. Раствор устойчив не менее 3 месяцев.

Калибровочный раствор 30 мкМ CuSO₃ готовят, разбавляя в мерной колбе емкостью 100 мл 1 мл исходного 3 мМ раствора сульфита меди в дистиллированной воде (в 1 мл 0,0019 мг меди). Раствор устойчив несколько недель.

Цветной реактив готовят путем смешивания равных объемов 4,7-дифенил-1,10-фенантролин-3,6-дисульфоновой кислоты и уксуснокислого натрия.

Определение меди необходимо проводить в совершенно чистой лабораторной посуде, предназначенной исключительно для анализа меди, используя бидистиллированную воду, не содержащую медь. Применяемую посуду рекомендуется мыть кипячением в концентрированной соляной кислоте или хромовой смеси (хромпик), тщательно сполоснуть бидистиллированной водой и хорошо просушить. Рекомендуется слить супернатант в чистую пробирку и из нее брать пипеткой нужное количество. Это предохраняет от помутнения супернатант при прямом отборе пипеткой из слоя над осадком белков. Реактивы должны храниться в темноте.

В штатив помещают шесть центрифужных пробирок по три пробирки в ряд, обозначая их как опытная, эталонная и раствор сравнения. В каждую пробирку последовательно вносят реагенты согласно прописи, приведенной в табл. 39. Содержимое пробирок перемешивают и через 30 мин опытную

пробу центрифугируют (10 мин при 3000 об./мин). После этого из пробирок первого ряда вносят по 2 мл раствора в противоположные пробирки второго ряда, обозначенные как опытная, эталонная и раствор сравнения. Затем в пробирки второго ряда добавляют по 2 мл цветного реактива. Растворы перемешивают и через 10...20 мин измеряют поглощение опытной и эталонной проб против раствора сравнения в кюветах шириной 1,0 см при 480 нм (зеленый светофильтр).

Таблица 39

Порядок внесения растворов в аналитические пробирки

Реактивы	Пробирки		
	опытная проба	эталонная проба	раствор сравнения
Супернатант, мл	2,0	–	–
Калибровочный раствор, мл	–	2,0	–
Дистиллированная вода, мл	–	–	2,0
Депротенинизирующая смесь, мл	2,0	2,0	2,0
Светопоглощение, усл. ед.			

Содержание меди (в мг/г влажной массы) в опытном образце рассчитывают по следующей формуле:

$$C_{\text{оп}} = \frac{D_{\text{оп}} \cdot C_{\text{к}} \cdot V \cdot K}{D_{\text{ст}} \cdot P},$$

где $D_{\text{оп}}$ – светопоглощение опытного образца, усл. ед.; $D_{\text{ст}}$ – светопоглощение стандартного раствора, усл. ед.; $C_{\text{к}}$ – содержание меди в калибровочном растворе, мг/мл; P – масса навески, мг; V – объем гомогената, мл; K – коэффициент разбавления.

РОСТ, РАЗВИТИЕ И ДВИЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ

Работа 56. Влияние ауксинов на рост отрезков колеоптилей злаков

Материалы и оборудование

- 1) отрезки колеоптилей пшеницы (овса, кукурузы) в фазе растяжения;
- 2) 5 мМ калий-фосфатный буфер, рН 6,0;
- 3) раствор бета-индолилуксусной кислоты (ИУК) или 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты.

Принципиальные основы метода

Среди многочисленных эффектов, которые вызывают ауксины, наиболее изученным является их действие на рост растяжением у отрезков колеоптилей или стеблей, что и используют как чувствительный биотест на этот гормон. Установлено, что ауксины вызывают выделение ионов H^+ из клетки, гиперполяризацию мембранного потенциала, усиление поглощения K^+ , повышение рН цитоплазмы, накопление малата или других органических кислот. Во время растяжения в клетке появляется центральная вакуоль, занимающая большую часть ее объема. Образование вакуоли связано с увеличением поступления воды при понижении водного потенциала клетки, при этом осмотический потенциал поддерживается на постоянном уровне в результате гидролиза полимеров и накопления в клетке осмотически активных веществ. Потенциал давления снижается, так как под влиянием ауксина увеличивается растяжимость клеточной стенки. Ряд исследователей объясняют действие ауксина на рост подкислением клеточных стенок. Это приводит к разрушению кислотолабильных связей компонентов стенки и активации кислых гидролитических (чтобы удерживать отрезки на капилляре). Приготавливают набор концентраций ауксина (100, 20, 10, 5, 1, 0,5 мг/л) на калий-фосфатном буфере. Контрольный буфер не содержит ауксина. Измеряют на капилляре длину всех отрезков

колеоптилей, сложенных вместе, записывают и помещают капилляр в лодочку с определенной концентрацией ауксина. Лодочку ставят в термостат с температурой 25,5 °С и отмечают время. Через 2,5–3 ч с помощью пинцета вынимают капилляр и измеряют длину всех отрезков колеоптилей. Для определения динамики роста отрезков колеоптилей злаков под влиянием ауксинов проводят измерения прироста через каждые 10 мин в течение 60–80 мин. Чувствительность метода повышается, если прирост отрезков измерять в аппарате для чтения микрофильмов с увеличением в 16 раз.

Полученные результаты занесите в таблицу. Сделайте выводы. При определении динамики роста отрезков колеоптилей постройте график зависимости скорости роста от времени при оптимальной концентрации ауксина.

Таблица 40

Концентрация ауксина, мг/л	Длина отрезков, мм	Прирост в длину, мм	Прирост, % от контроля

Работа 57. Определение места восприятия силы земного притяжения у корня

Материалы и оборудование

- 1) кристаллизатор или кювета;
- 2) стеклянный колпак или банка;
- 3) пробковая пластинка;
- 4) булавки;
- 5) лезвие безопасной бритвы;
- 6) фильтровальная бумага;
- 7) пинцеты;
- 8) растения: проростки гороха, фасоли, кукурузы с прямыми корешками.

Цель работы: показать, что корень воспринимает геотропическое раздражение верхушкой.

Ход работы

Проростки с прямыми корешками прикрепляют булавками к пробковой пластине. У одних проростков отрезают кончик корня (зону деления, прикрытую чехликом), у других проростков сохраняют цельные корни. Пластинку с растениями помещают на дно кюветы с небольшим слоем воды так, чтобы проростки находились над водой. Верхнюю часть проростка прикрывают полоской фильтровальной бумаги, концы которой опускают в воду. Это позволяет избежать подсыхания проростков. Кювету накрывают стеклянным колпаком или банкой. Всю установку помещают в темное место. Через сутки проверяют результаты опыта, делают рисунки, формулируют выводы о значении верхушки корня в геотропической реакции.

Работа 58. Влияние фитогормонов на метаболизм изолированных семядолей тыквы

Материалы и оборудование

- 1) изолированные семядоли тыквы;
- 2) 6-БАП в концентрациях 10 и 100 мг/л;
- 3) АБК в концентрации 1 мг/л; CaCO_3 ;
- 4) 80%-й раствор этанола;
- 5) 0,005 М фосфатный буфер, pH 7,4;
- 6) свежеприготовленный 1%-й раствор крахмала в 0,005 М фосфатном буфере;
- 7) 3,5-динитросалициловая кислота;
- 8) 50 мМ трис-НСI буфер, pH 7,5, содержащий 5 мМ дитиотрейтола (ДТТ);
- 9) реакционная смесь для определения активности малик-энзима, содержащая 50 мМ трис-НСI буфер, pH 7,5;
- 10) 2 мМ раствор ДТТ;

- 11) 5 мМ раствор MgCl₂;
- 12) 0,3 мМ раствор НАДФ;
- 13) 2,5 мМ раствор яблочной кислоты;
- 14) ступки с пестиками;
- 15) стеклянный фильтр № 3;
- 16) мерные колбы объемом 25 мл;
- 17) цилиндры объемом 25 мл;
- 18) колба Бунзена;
- 19) пробирки, пипетки, стеклянные бюксы объемом 20 мл;
- 20) центрифужные пробирки;
- 21) мерные пробирки объемом 10 мл;
- 22) чашки Петри;
- 23) сверло (пробковое) диаметром 0,5 см;
- 24) фототермокамера с температурой 28 °С и освещенностью 750 лк;
- 25) вакуумный или водоструйный насос;
- 26) термостаты с температурой 25 и 37 °С;
- 27) водяная баня с температурой 100 °С;
- 28) технические весы;
- 29) торсионные весы;
- 30) центрифужные весы;
- 31) центрифуга;
- 32) спектрофотометр;
- 33) кондуктометр;
- 34) ФЭК;
- 35) холодная камера.

Принципиальные основы метода

Прорастание семян сопровождается активизацией в них метаболизма. В семядолях при прорастании происходит активация и новообразование ферментных систем, необходимых как для обеспечения использования запасных веществ, так и для превращения семядолей из запасящего органа в зеленый лист. Эти процессы протекают под контролем осевых частей зародыша. Большая роль в этом контроле принадлежит фитогормонам (интегративная функция).

При прорастании семян фитогормоны поступают в семядоли из осевых частей зародыша и влияют на развитие активности ферментов, участвующих в распаде запасных веществ. Образующиеся при этом продукты попадают в осевые части зародыша и обеспечивают их рост. Высокой чувствительностью к экзогенным фитогормонам обладают изолированные семядоли тыквы, так как после изоляции в них происходит быстрое истощение запаса эндогенных гормонов. Экзогенный цитокинин значительно активизирует рост семядолей. При этом влияние цитокинина распространяется на все стороны формирования внутриклеточных структур и обмен веществ семядолей.

Цитокинин резко ускоряет использование в клетках семядолей запасных веществ, ускоряет и усиливает формирование мембранного аппарата хлоропластов – гран и ламелл стромы, рост хлоропластов и их деление. Цитокинин стимулирует формирование митохондриального аппарата клеток семядолей, развитие эндоплазматического ретикулума (в основном шероховатого). В соответствии с активизацией роста семядолей и процессов внутриклеточной дифференциации, связанной с их превращением в зеленый лист, цитокинины запускают в семядолях синтез самых разных ферментов, необходимых для развертывания указанных физиологических программ.

Цитокинин увеличивает в семядолях активность эндопептидазы, участвующей в гидролизе белков, щелочной и кислой пирофосфатаз, которые разрушают пирофосфат, образующийся при синтезе различных биополимеров, и тем самым способствуют протеканию этих синтезов. Цитокинин активизирует малик-энзим, участвующий в обмене органических кислот, и рибулезо-бис-фосфаткарбоксилазу – ключевой фермент фотосинтеза.

Циклогексимид (ингибитор синтеза белка на цитоплазматических рибосомах) подавляет вызванный цитокинином рост активности ферментов. Следовательно, этот процесс связан с синтезом белка.

Ферменты по степени их активации цитокинином можно разделить на две группы: одна по своему ответу на фитогормон коррелирует с ростом семядолей, другая – с накоплением в них хлорофилла.

Ферменты первой группы более тесно связаны с программой роста, второй – с биохимической дифференциацией хлоропластов. Цитокинин стимулирует синтез белка в клетках, действуя на разных уровнях этого процесса. Гормон активирует синтез РНК, увеличивает число рибосом в клетке, повышает их активность в синтезе белка, значительно увеличивает долю полисом в препарате рибосом.

Антагонистом цитокинина во всех описанных выше процессах является АБК. Она прекращает рост изолированных семядолей тыквы, ингибируя как рост клеток, так и их деление, подавляет процессы внутриклеточной дифференциации, формирование мембранного аппарата хлоропластов, угнетает синтез ферментов, связанных как с ростом семядолей, так и с дифференциацией в них хлоропластов.

Между АБК и цитокинином проявляется четкий антагонизм: цитокинин снижает ингибирующее действие АБК, АБК подавляет вызванную цитокинином стимуляцию перечисленных процессов. Угнетение синтеза белка в изолированных семядолях тыквы под действием АБК происходит как за счет подавления синтеза РНК, так и путем торможения формирования полисом. АБК тормозит синтез хлорофилла, действуя на образование и транспорт аминокислоты и на ферменты, участвующие в ее синтезе. Действие и цитокинина, и АБК, как любого фитогормона, зависит от их концентрации.

Цель работы состоит в том, чтобы определить влияние фитогормонов: 6-бензиламино-пурина (6-БАП) и АБК на рост семядолей, количество хлорофилла, проницаемость клеточных мембран, активность ферментов (амилазы и малик-энзима) в изолированных семядолях тыквы.

Ход работы

1. Подготовка растительного материала

Семена тыквы проращивают в течение 96 ч на влажной фильтровальной бумаге в темноте при температуре 25 °С, затем отделяют семядоли от растения и помещают в чашку Петри на воду, ставят чашку в термостат при температуре 25 °С. В изолированных семядолях в темноте происходит быстрое истощение эндогенных гормонов. Через 24 ч семядоли переносят на исследуемые растворы и помещают в фототермокамеру при температуре 28 °С и круглосуточном освещении на 48 ч. Исследуемые растворы: контроль – дистиллированная вода; АБК – 1 мг/л; 6-БАП – 10 мг/л; 6-БАП – 100 мг/л.

2. Определение роста семядолей

Развитие семядолей представляет собой процесс, в течение которого одновременно идет новообразование структурных элементов клетки и расходование ее запасных веществ. Сухая масса при этом практически не меняется. В связи с этим рост изолированных семядолей тыквы удобно определять по изменению их сырой массы. Взвешивают на технических весах все семядоли каждого варианта, подсчитывают их количество и определяют среднюю массу каждой семядоли.

3. Определение количества хлорофилла в семядолях

Навеску семядолей (200 мг) растирают в ступке с небольшим количеством песка и CaCO_3 (на кончике скальпеля), экстрагируют пигменты раствором этанола, фильтруют экстракт через стеклянный фильтр и доводят объем в мерной колбе до 25 мл. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре $\lambda = 662$ и $\lambda = 642$ нм. Количество хлорофилла (a и b) определяют по формуле

$$Ca + b = 7,12E662 + 16,8E642, \text{ мг/л.}$$

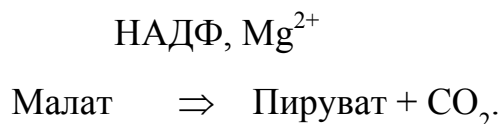
Пересчитывают количество хлорофилла на 1 г сырой массы.

4. Определение проницаемости клеточных мембран

Сверлом вырезают 60 дисков из семядолей каждого варианта, помещают по десять дисков в бюкс, который закрывают марлей. Последнюю закрепляют резинкой и ставят бюксы под холодную водопроводную воду на 15 мин, чтобы отмыть содержимое разрушенных клеток. После этого бюксы с дисками промывают 3 раза дистиллированной водой и переворачивают на чистую фильтровальную бумагу для удаления остатков воды. Затем с них снимают марлю, наливают по 10 мл дистиллированной воды, закрывают крышками и помещают три бюкса в термостат при температуре 25 °С на 1 ч. Для определения общего количества электролитов в дисках три других бюкса помещают в кипящую водяную баню на 15 мин. После инкубации содержимое бюксов фильтруют через марлю в чистые бюксы, остужают фильтраты до комнатной температуры и определяют их электропроводность кондуктометрическим методом. Рассчитывают выход электролитов в каждом варианте в процентах от общего их количества.

5. Определение активности малик-энзима

Малик-энзим осуществляет декарбоксилирование малата в присутствии НАДФ и ионов Mg^{2+} с образованием пирувата и восстановленного НАДФ:



Фермент играет важную роль в регуляции уровня малата и обеспечении НАДФ · Н многих биосинтетических процессов в клетке.

Активность фермента не обнаруживают в сухих семенах, она появляется при их прорастании.

Ход работы. Взвешивают по пять семядолей каждого варианта, растирают их в ступке с небольшим количеством песка, гомогенизируют в 5 мл раствора трис-НСI буфера с ДТТ. Работу проводят в холодной камере при температуре 2–4 °С. Гомогенат центрифугируют 30 мин при 20000 g; полученный супернатант используют для определения ферментативной активности. Для этого к 0,2 мл реакционной смеси приливают 0,1 мл раствора фермента. Реакцию начинают прибавлением 2,5 мМ малата. В контрольную кювету помещают те же реактивы, кроме малата. Измеряют оптическую плотность раствора последовательно в одних и тех же кюветах через каждую минуту в течение 5–7 мин при $l = 340$ нм.

За единицу активности фермента принимают количество фермента, которое вызывает увеличение оптической плотности раствора на 0,01 за 1 мин. За удельную ферментативную активность принимают количество фермента, которое вызывает увеличение оптической плотности раствора на 0,01 за 1 мин на 1 мг белка. Активность фермента рассчитывают для каждого варианта.

6. Определение активности амилаз

Ход работы. Навеску (1 г) семян тыквы измельчают и растирают в охлажденной ступке на льду. К гомогенату приливают 40 мл фосфатного буфера и центрифугируют 15 мин при 10000 g или фильтруют через плотный складчатый фильтр. Надосадочную жидкость или фильтрат сливают в чистую пробирку и используют для определения активности фермента.

В результате действия β -амилазы на крахмал образуются главным образом мальтоза и незначительное количество высокомолекулярных декстранов. Последние в дальнейшем гидролизуются α -амилазой. Мальтоза при взаимодействии с 3,5-динитросалициловой кислотой (ДНС) дает окраску, которая находится в прямой зависимости от содержания сахара.

Оптимальная температура действия фермента 37 °С, поэтому исследуемую вытяжку и раствор крахмала предварительно термостатируют при этой температуре. Для определения активности фермента проводят следующие варианты подготовки.

1. Контроль на реактивы: 0,5 мл 1%-го раствора крахмала; 0,5 мл 0,005М фосфатного буфера; 1 мл ДНС.
2. Контроль: 0,5 мл буфера; 0,5 мл вытяжки; 1 мл ДНС.
3. Опыт: 0,5 мл 1%-го раствора крахмала; 0,5 мл вытяжки; смесь перемешивают и помещают в термостат при 37 °С на 5 мин, затем сразу приливают 1 мл ДНС.

Все пробирки нагревают на кипящей водяной бане 5 мин, затем объем доводят до 10 мл водой. Оптическую плотность определяют при $\lambda = 535$ нм. Количество мальтозы вычисляют по калибровочной кривой. Активность фермента выражают в миллиграммах мальтозы на 1 г сырой массы за 1 мин.

Данные всех опытов представьте в виде сводной таблицы. Сделайте выводы.

Таблица 41

Варианты опыта	Контроль (H ₂ O)	6-БАП, 10 мг/л	6-БАП, 100 мг/л	6-БАП, 1 мг/л
Сырая масса 1 семядоли, г				
Количество хлорофилла, мг/г сырой массы				
Проницаемость клеточных мембран, % от полного выхода электролитов				
Активность малик-энзима, ед. на 1 г сырой массы или мг белка				
Активность амилазы, мг мальтозы на 1 г сырой массы за 1 мин				

Работа 59. Влияние индолил-3-уксусной кислоты на укоренение черенков фасоли

Материалы и оборудование

- 1) бритва;
- 2) линейка;
- 3) химические стаканы;
- 4) чашки Петри;
- 5) десятидневные проростки фасоли;
- 6) 0,4 мМ раствор индолил-3-уксусной кислоты;
- 7) дистиллированная вода.

Принципиальные основы метода

Индолил-3-уксусная кислота (ИУК) относится к фитогормонам, основной функцией которых является регулирование метаболическими процессами в растительных клетках, а также осуществление взаимодействия клеток, тканей и органов растения. Активность ИУК проявляется в тканях растений, в особенности в развивающихся почках и листьях, пыльце, камбии, в формирующихся семенах. Высокое содержание

ИУК отмечается в активно растущих растительных тканях, в верхушке главного побега. ИУК регулирует процесс деления и растяжения клеток, участвует в формировании проводящих пучков, корней и развитии околоплодника. Перенос ИУК через мембраны осуществляется с использованием механизмов активного и пассивного транспорта. Причем последний сопряжен с переносом ионов водорода. Действие ИУК в клетках осуществляется посредством связывания фитогормона с рецептором и в дальнейшем сопровождается активированием деятельности рибосом и нуклеопротеинов. Кроме того, ИУК ускоряет работу H^+ -АТФазы, что способствует накоплению H^+ -ионов и последующему закислению среды. Этот эффект способствует возрастанию активности гидролитических ферментов. Черенки фасоли при наличии соответствующих условий способны укореняться, то есть формировать придаточные корни. Однако этот процесс активно протекает под влиянием стимуляторов роста. Поэтому черенки фасоли можно использовать для определения физиологической активности различных биологически активных веществ.

Ход работы

Раствор индолил-3-уксусной кислоты (0,07 мг/мл) готовят, растворяя навеску в дистиллированной воде. Срезают бритвой несколько (4...6) проростков фасоли высотой 10...15 см. Половину проростков помещают в стакан с водопроводной водой (контроль), а другие черенки – в стакан с 0,4 мМ раствором ИУК (опыт). Через 3 ч черенки вынимают из раствора ауксина, ополаскивают основания водопроводной водой, а затем погружают в воду и оставляют вместе с контролем на свету при комнатной температуре до образования корней. В конце опыта, когда на стеблях отрастут придаточные корни, необходимо будет измерить их длину и количество на каждом черенке. Данные записывают в табл. 42.

Найти среднее значение количества и длины корней и сделать математическую обработку, результаты занести в таблицу.

Сделать вывод о физиологическом действии индолил-3-уксусной кислоты на корнеобразование и длину корней черенков фасоли.

Таблица 42

Варианты	Черенки	Количество корней	Длина корней, мм
Контроль	1		
	2		
	3		
Опыт	1		
	2		
	3		

Работа 60. Изучение тропизмов и настий

Материалы и оборудование

- 1) проростки овса высотой 3–4 см, выращенные в полной темноте в металлических или пластмассовых стаканчиках с почвой;
- 2) наклюнувшиеся семена льна или горчицы;
- 3) горшечный экземпляр гортензии;
- 4) растения томатов в возрасте около одного месяца;
- 5) фототропическая камера – светонепроницаемый ящик с зачерненными внутренними стенками и небольшим отверстием в одной из стенок на высоте 5–6 см от дна;
- 6) фольга;
- 7) тушь;
- 8) спички (одна из них заостренная);
- 9) стеклянные консервные банки или прямоугольные кюветки, закрытые куском стекла (3 шт.);
- 10) квадратная стеклянная пластинка размером немного меньше банки (3 шт.);
- 11) фильтровальная бумага;
- 12) ножницы;
- 13) лезвие бритвы;
- 14) пинцет;
- 15) ланолиновая паста с ИУК;
- 16) транспортир;
- 17) стеклянная палочка.

Принципиальные основы метода

Тропизмами называют процессы изгибания органов растений под влиянием односторонне действующих раздражителей. Тропизмы наблюдаются у органов с радиальной симметрией (стебель, корень, колеоптиль) и могут быть положительными (изгиб в сторону раздражителя) и отрицательными (изгиб в противоположную сторону). Тропизмы – ростовые движения, обусловленные неравномерным ростом двух противоположных сторон какого-либо органа, причем быстрее растущая сторона становится выпуклой. Один из видов тропизмов – фототропизм – изгибание растущих частей растения под влиянием одностороннего (бокового) освещения.

Явление фототропизма удобно наблюдать на колеоптилях злаков.

Геотропизм – процесс изгибания растущих частей растения под влиянием одностороннего действия силы земного притяжения. Для получения геотропических изгибов корни или стебли, росшие до этого строго вертикально, нужно поместить в горизонтальное или наклонное положение и создать благоприятные для роста условия.

Тропизм, вызываемый односторонним водоснабжением, называется гидротропизмом. Способность к положительным гидротропическим изгибам хорошо выражена у корней, которые при неравномерном распределении влаги в почве направляются в более влажные участки.

В отличие от тропизмов, которые вызываются односторонним действием какого-либо фактора, настии возникают под влиянием диффузно действующих раздражителей (изменение освещенности, температуры и др.). Настии характерны для органов с двусторонне-симметричным (дорзивентральным) строением и проявляются в опускании органа вниз (эпинастия) или изгибании вверх (гипонастия). В основе настических движений лежат или неодинаковые изменения тургора на двух сторонах

какого-либо органа, или (как при тропизмах) разная скорость роста его верхней и нижней сторон. Ростовые настические движения листьев – результат неравномерного распределения ауксинов на верхней и нижней сторонах черешка. Настические движения листьев можно вызвать искусственно, нанося на черешки пасту, содержащую индолилуксусную кислоту (ИУК).

Ход работы

1. Фототропизм

Осмотреть проростки овса, выращенные в темноте, и удалить изогнутые растения. Быстро нанести на одну сторону несколько колеоптилей метки тушью на равных расстояниях друг от друга. На верхушки других проростков надеть светонепроницаемые колпачки (для приготовления колпачка обернуть кусочек фольги шириной около 1 см вокруг спички и скрутить сверху).

Поместить проростки в фототропическую камеру так, чтобы нанесенные на колеоптили метки оказались на затененной стороне, т.е. были обращены к стенке противоположной той, в которой имеется отверстие.

Поставить камеру на подоконник или перед настольной лампой отверстием в сторону источника света.

Через сутки рассмотреть проростки, обратив внимание на расположение меток. Зарисовать проростки в начале опыта и в конце.

Сделать выводы, ответив на следующие вопросы:

1. Где находится место восприятия одностороннего освещения?
2. В какой зоне происходит фототропический изгиб?
3. Каков механизм фототропического изгиба?

2. Геотропизм

Обернуть квадратную стеклянную пластинку фильтровальной бумагой, смочить бумагу водой и разложить в верхней части пластинки едва наклюнувшиеся семена льна или горчицы на расстоянии около 1 см одно от другого корешками (острыми носиками) вниз. Семена благодаря ослизнению оболочек прилипают к бумаге.

Поместить пластинку с семенами в слегка наклонном положении в сосуд, на дно которого налито немного воды. Закрыть сосуд стеклом и поставить в темное место.

Через несколько дней, когда корешки вырастут до 2–3 см, вынуть пластинку, повернуть ее на 90° и снова вставить в сосуд так, чтобы все корни оказались в горизонтальном положении. Для выявления роли зоны деления в явлениях геотропизма у части проростков срезать острой бритвой кончик корня (1–2 мм). Закрыть сосуд и вновь поместить его в темноту. Через 1–2 дня рассмотреть и зарисовать проростки.

В выводах отметить место восприятия действия земного притяжения, зону геотропических изгибов и механизм этих изгибов.

3. Гидротропизм

Обернуть две стеклянные пластинки фильтровальной бумагой, смочить бумагу водой и разложить на одной стороне рядками семена льна или горчицы. Семена смачиваются и прилипают к бумаге.

Налить в банку или в стакан немного воды и поставить туда наклонно пластинку, так чтобы семена оказались на нижней стороне пластинки. Одну банку плотно закрыть стеклом, чтобы создать насыщенную водяными парами атмосферу, другую оставить открытой.

Через несколько дней рассмотреть и зарисовать положение корешков в обоих сосудах. В выводах объяснить причины неодинакового роста корней в разных вариантах опыта.

4. Настические изгибы черешков под действием ИУК

Выбрать два одинаковых супротивных листа гортензии или два соседних листа томатов и измерить транспортиром углы отхождения листьев от стебля. Нанести при помощи стеклянной палочки ланолиновую пасту с ИУК на нижнюю сторону черешка одного листа и на верхнюю сторону другого. Через час снова измерить углы отхождения листьев. Через несколько дней сделать еще одно измерение и зарисовать положение листьев с обработанными черешками. Результаты записать в таблицу, вычислив, насколько градусов изменились углы отхождения листьев (увеличение обозначить знаком «+», уменьшение – знаком «-»).

Таблица 43

Растение	Сторона черешка, обработанная пастой с ИУК	Угол отхождения листа от стебля,		Изменение угла отхождения листа, °
		до обработки	после обработки	

Сделать вывод о причинах эпи- и гипонастий черешков.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 1
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ К ПРАКТИЧЕСКИМ РАБОТАМ
И КОЛЛОКВИУМАМ

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

1. Клетка как структурная и функциональная единица растительного организма.
2. Химия клеточной стенки.
3. Формирование и строение клеточной стенки.
4. Мембраны: строение и функции.
5. Цитоплазма. Коллоидные свойства цитоплазмы.
6. Микротельца.
7. Вакуоль.
8. Осмос. Осмотическое давление. Осмометр.
9. Клетка как осмотическая система.
10. Критика представлений «клетка – осмотическая система».
11. Методы измерения осмотического давления.
12. Сосущая сила. График Уршпрунга.
13. Способы регулирования сосущей силы.
14. Методы определения сосущей силы растительной клетки.

ФОТОСИНТЕЗ

15. Предмет, задачи и методы физиологии растений.
16. Сущность и значение фотосинтеза.
17. Строение, онтогенез и происхождение хлоропластов.
18. Строение хлорофиллов.
19. Физико-химические свойства пигментов.
20. Биосинтез хлорофилла и его регуляция.
21. Фикобилины: строение, свойства и функции.
22. Каротиноиды: строение, свойства и функции.
23. Биосинтез каротиноидов.
24. Представление о светособирающем комплексе (ССК), реакционном центре, фотосинтетической единице.
25. Электронные уровни возбужденного хлорофилла.
26. Механизм транспорта энергии в светособирающем комплексе.

27. Циклический и нециклический транспорт электронов при фотосинтезе.

28. Типы фотофосфорилирования и его механизм (хемиосмотическая гипотеза).

29. Выделение O_2 при фотосинтезе.

30. Цикл Кальвина.

31. Цикл Хэтч – Слейка. Кооперативность C_3 - и C_4 -путей ассимиляции CO_2 .

32. Метаболизм сем. толстянковые (САМ-метаболизм).

33. Фотодыхание: биохимия и физиологическое значение.

34. Влияние света на фотосинтез.

35. Влияние CO_2 на фотосинтез.

36. Влияние на фотосинтез t , H_2O , O_2 , минерального питания.

37. Фотосинтез и урожай.

ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ

38. Сущность, значение и методы изучения.

39. Митохондрии: строение, биохимический состав, происхождение.

40. Общая характеристика ферментных систем дыхания растений.

41. Гликолиз: биохимия и регуляция.

42. Цикл Кребса: биохимия, значение и регуляция.

43. Дыхательная цепь (ЭТЦ).

44. Альтернативные пути терминального окисления.

45. Окислительное и субстратное фосфорилирование. Механизм окислительного фосфорилирования.

46. Глюконеогенез. Глиоксилатный цикл.

47. Окислительный пентозофосфатный путь.

48. Энергетика дыхания растений.

49. Влияние внешних факторов на дыхание растений.

ВОДООБМЕН

50. Физиологическая роль воды.

51. Типы гидратации. Состояние воды в растительной клетке.

52. Водообмен. Общее представление.
53. Корневое давление. Гуттация и плач растений.
54. Механизм возникновения корневого давления.
55. Передвижение воды по корню.
56. Транспирация. Суточный ход. Количественные показатели.
57. Методы определения транспирации.
58. Физиологическая роль транспирации.
59. Устьичная и кутикулярная транспирация. Строение устьиц.
60. Механизм движения устьиц.
61. Основные этапы транспирации.
62. Влияние внешних факторов на транспирацию.
63. Передвижение воды по растению. Механизм поднятия воды на большую высоту.
64. Адаптация к дефициту воды.
65. Характеристика основных экологических групп растений по отношению к воде.
66. Засухоустойчивость и закаливание засухоустойчивости.
67. Физиологические основы орошения.

КОРНЕВОЕ ПИТАНИЕ РАСТЕНИЙ

68. Методы изучения минерального питания. Гидропоника.
69. Требования, предъявляемые к питательному раствору.
70. Физиологическая роль азота и его круговорот.
71. Механизм восстановления нитратов.
72. Азотный обмен (образование аминокислот, амидов).
73. Физиологическая роль серы.
74. Превращение серы в растительной клетке.
75. Физиологическая роль фосфора.
76. Физиологическая роль калия, кальция, магния и железа.
77. Микроэлементы.
78. Основные способы проникновения минерального вещества в растительную клетку. Ионные насосы.
79. Метаболизм корней.
80. Влияние внешних факторов на минеральное питание.

81. Физиологические основы применения удобрений. Типы удобрений.

РОСТ, РАЗВИТИЕ И ДВИЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ

82. Рост растений.

83. Скорость и методы определения роста растений.

84. Три фазы роста.

85. Влияние температуры и света на рост растений.

86. Фитохромная система.

87. Ауксин.

88. Гиббереллины.

89. Цитокинин.

90. Абсцизовая кислота и этилен.

91. Фенольные ингибиторы.

92. Взаимодействие фитогормонов.

93. Синтетические регуляторы роста.

94. Развитие растений. Этапы развития.

95. Теории циклического старения и омоложения.

96. Влияние внешних факторов на развитие.

97. Фотопериодизм.

98. Гормоны цветения.

99. Тропизмы и настии.

УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ

(Для самостоятельной подготовки)

100. Устойчивость к низким температурам.

101. Солеустойчивость.

102. Устойчивость к другим неблагоприятным факторам.

ПРИЛОЖЕНИЕ № 2

ПРИГОТОВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ РАСТВОРОВ И РЕАКТИВОВ

Хлоркобальтовая бумага

Приготовить 5%-й раствор хлористого кобальта и погрузить в него на несколько минут куски белой фильтровальной бумаги размером 8 x 10 см. Просушить розовую бумагу между листами сухой фильтровальной бумаги, а затем на солнце или над электроплиткой до появления голубого цвета. Хранить хлоркобальтовую бумагу следует в эксикаторе над хлористым кальцием.

Раствор киноплёнки в ацетоне

Промыть киноплёнку в горячем растворе щелочи для удаления эмульсии, сполоснуть в теплой воде, нарезать мелкими кусочками и растворить в ацетоне до получения сиропообразного раствора, который хранят в банке с притертой пробкой.

Стандартный раствор Гетри для определения хлорофилла

Приготовить на дистиллированной воде три следующих раствора:

- 1) 1%-й раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (брать только синие кристаллы, после растворения профильтровать);
- 2) 2%-й раствор $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$;
- 3) 7%-й раствор аммиака.

Перенести в мерную колбу на 100 мл 28,5 мл 1-го раствора, 50 мл 2-го раствора и 10 мл 3-го раствора, довести до метки дистиллированной водой, перемешать и перелить в чистую сухую склянку с притертой пробкой.

Раствор Гетри по окраске эквивалентен раствору хлорофилла концентрации 85 мг/л.

Раствор йода в йодистом калии (J в KJ)

Растворить 2 г KJ в 5 мл дистиллированной воды, добавить 1 г металлического йода, после полного растворения последнего долить 295 мл воды. Хранить реактив в темной склянке с притертой пробкой.

Раствор барита

При определении интенсивности фотосинтеза используется 0,025 н. раствор барита, при определении дыхания – 0,1 н. раствор. Для приготовления 1 л этих растворов требуется соответственно 2,14 и 8,57 г чистого $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Однако обычно в реактиве содержится значительная примесь BaCO_3 , вследствие чего рекомендуется брать навеску примерно в 1,5 раза больше, т.е. 3 г для 1-го раствора и 12 г для 2-го. Перенести навеску в бутыл, залить соответствующим количеством дистиллированной воды, закрыть бутыл резиновой пробкой и оставить на несколько суток, время от времени взбалтывая раствор. После отстаивания осторожно слить прозрачный раствор в бутыл, соединенную с бюреткой. Закрыть бутыл пробкой, в которую вставлена трубка с патронной известью.

Фенолфталеин

Растворить 0,5 г фенолфталеина в 100 мл 96%-го спирта. Индикатор изменяет окраску от бесцветной к пурпурной при увеличении pH от 8,2 до 10,0.

Фелингова жидкость

Готовится непосредственно перед употреблением путем смешивания равных объемов двух растворов. 1-й раствор: 40 г медного купороса растворить в дистиллированной воде, довести объем до 1 л и профильтровать; 2-й раствор: растворить 200 г сегнетовой соли в дистиллированной воде, добавить 150 г KOH или NaOH и довести дистиллированной водой до 1 л.

Крахмальный агар

Поместить в колбу 2 г мелко нарезанного агар-агара, прилить 100 мл воды и осторожно кипятить до полного растворения агара, 2 г крахмала размешать стеклянной палочкой с 10 мл холодной воды, вылить в кипящий раствор агара и вновь довести до кипения. Горячую смесь разлить в чашки Петри.

Раствор краски судан III

Растворить в фарфоровой чашке 0,2 г краски судан III в 20 мл 96%-го спирта, добавить 20 мл глицерина, тщательно размешать и профильтровать.

0,01%-й раствор гетероауксина

0,1 г гетероауксина растворить в небольшом количестве горячей воды и долить холодной водой до 1 л.

Полный питательный раствор В.А. Чеснокова и сотр.

(9 г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, х.ч.; 6,5 г KNO_3 , х.ч.; 0,7 г NH_4NO_3 , х.ч. растворяют в мерной колбе на 2 л и доводят объем водой до метки; 2,5 г KH_2PO_4 , х.ч. и 2,0 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ растворяют в мерной колбе на 1 л и доводят объем водой до метки; оба раствора сливают в бутылку на 10 л и с помощью мерных колб приливают туда же еще 7 л воды; полученный раствор тщательно перемешивают);

раствор микроэлементов (2,9 г H_3BO_3 + 1,9 г $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0,2 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,2 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в небольшом количестве воды в мерной колбе на 1 л, добавляют 5 мл H_2SO_4 ($d=1,84$) и доводят объем раствора водой до метки);

раствор хелата железа (30,2 г ЭДТА растворяют в 134 мл 1 н. раствора NaOH, вносят 24,9 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, после полного растворения солей объем раствора доводят водой до метки и ставят его на сутки на аэрацию для окисления Fe^{2+} до Fe^{3+} ; 0,1 н. раствор и концентрированная H_2SO_4 ; 0,1 н. раствор NaOH.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Викторов Д.П.* Малый практикум по физиологии растений / Д.П. Викторов. – М., 1983.
2. *Гэлстон А.* Жизнь зеленого растения / А. Гэлстон, П. Девис, Р. Сэттер. – М., 1983.
3. *Живухина Г.М.* Методическое пособие к летнему практикуму по физиологии растений. Раздел «Водный режим» / Г.М. Живухина. – М., 1998.
4. *Клейн Р.М.* Методы исследования растений / Р.М. Клейн, Д.Т. Клейн. – М., 1974.
5. Малый практикум по физиологии растений : учеб. пособие / под ред. акад. А.Т. Мокроносова. – М., 1982.
6. *Полевой В.В.* Физиология растений / В.В. Полевой. – М., 1989.
7. Практикум по биохимии растений / под ред. В.В. Полевого и С.М. Щипарева. – СПб., 1996.
8. Практикум по физиологии растений / под ред. В.Б. Иванова. – М., 2001.
9. Практикум по фотосинтезу и дыханию растений / под ред. В.В. Полевого и Т.В. Чирковой. – СПб., 1997.
10. *Рогожин В.В.* Практикум по физиологии и биохимии растений / В.В. Рогожин, Т.В. Рогожина. – СПб. : ГИОРД, 2013. – 352 с.
11. Справочник биохимика / Р. Досон [и др.]. – М., 1991.
12. Фотосинтез и биопродуктивность : методы определения / под ред. А.Т. Мокроносова, А.Г. Ковалева. – М., 1989.

Учебное издание

**Епринцев Александр Трофимович,
Хожайнова Галина Николаевна**

**МАЛЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Учебно-методическое пособие

Корректор *М.С. Римская*
Электронная верстка *Е.В. Жеребцовой*

Подписано в печать 17.04.2018. Формат 60×84/16.
Уч.-изд. л. 7,9. Усл. п. л. 10,1. Тираж 100 экз. Заказ 80

Издательский дом ВГУ
394018 Воронеж, пл. Ленина, 10
Отпечатано в типографии Издательского дома ВГУ
394018 Воронеж, ул. Пушкинская, 3