

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Учебная программа дисциплины

Конспект лекций

- Методические указания по лабораторным работам
- Методические указания по самостоятельной работе
- Банк тестовых заданий в системе UniTest



УДК 574/577
ББК 28.57
Ф48

Электронный учебно-методический комплекс по дисциплине «Физиология растений» подготовлен в рамках инновационной образовательной программы «Создание и развитие департамента физико-химической биологии и фундаментальной экологии», реализованной в ФГОУ ВПО СФУ в 2007 г.

Рецензенты:

Красноярский краевой фонд науки;
Экспертная комиссия СФУ по подготовке учебно-методических комплексов дисциплин

Ф48 Физиология растений. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: метод. указания по лаб. работам / сост. : В. М. Гольд, Н. А. Гаевский, Т. И. Голованова и др. – Электрон. дан. (1 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – (Физиология растений : УМКД № 165-2007 / рук. творч. коллектива В. М. Гольд). – 1 электрон. опт. диск (DVD). – Систем. требования : *Intel Pentium* (или аналогичный процессор других производителей) 1 ГГц ; 512 Мб оперативной памяти ; 1 Мб свободного дискового пространства ; привод *DVD* ; операционная система *Microsoft Windows 2000 SP 4 / XP SP 2 / Vista* (32 бит) ; *Adobe Reader 7.0* (или аналогичный продукт для чтения файлов формата *pdf*).

ISBN 978-5-7638-1275-6 (комплекса)

Номер гос. регистрации в ФГУП НТЦ «Информрегистр» 0320802725 от 20.12.2008 г. (комплекса)

Настоящее издание является частью электронного учебно-методического комплекса по дисциплине «Физиология растений», включающего учебную программу, конспект лекций, методические указания по самостоятельной работе, контрольно-измерительные материалы «Физиология растений. Банк тестовых заданий», наглядное пособие «Физиология растений. Презентационные материалы».

Приведены методические указания к выполнению лабораторных работ по основным разделам дисциплины «Физиология растений». Рассмотрены вопросы физиологии растительной клетки, водного режима, минерального питания, дыхания, фотосинтеза, роста и развития, физиологических основ устойчивости растений.

Предназначены для студентов направления подготовки бакалавров 020200.62 «Биология» укрупненной группы 020000 «Естественные науки».

© Сибирский федеральный университет, 2008

Составители:

В. М. Гольд, Н. А. Гаевский, Т. И. Голованова, Н. П. Белоног, Т. Б. Горбанева

Рекомендовано к изданию

Инновационно-методическим управлением СФУ

Редактор В. Р. Наумова

Разработка и оформление электронного образовательного ресурса: Центр технологий электронного обучения информационно-аналитического департамента СФУ; лаборатория по разработке мультимедийных электронных образовательных ресурсов при КрЦНИТ

Содержимое ресурса охраняется законом об авторском праве. Несанкционированное копирование и использование данного продукта запрещается. Встречающиеся названия программного обеспечения, изделий, устройств или систем могут являться зарегистрированными товарными знаками тех или иных фирм.

Подп. к использованию 10.09.2008

Объем 1 Мб

Красноярск: СФУ, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

Оглавление

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ	6
ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ	7
Лабораторная работа № 1. Методы изучения растительной клетки .7	
Задание 1.1. Проницаемость живой и поврежденной протоплазмы для клеточного сока.....	7
Задание 1.2. Накопление красителей в вакуоли	8
Задание 1.3. Наблюдение колпачкового плазмолиза	10
Задание 1.4. Определение жизнеспособности семян по окрашиванию цитоплазмы.....	10
Задание 1.5. Определение осмотического давления клеточного сока методом плазмолиза	11
Задание 1.6. Определение водного потенциала растительной ткани методом полосок (по Лилиенштерн).....	13
Задание 1.7. Определение водного потенциала тканей листа методом Шардакова.....	14
ВОДООБМЕН РАСТЕНИЙ	16
Лабораторная работа № 2. Изучение водного режима растений	16
Задание 2.1. Определение форм воды в растительных тканях	16
Задание 2.2. Определение интенсивности транспирации хлоркобальтовым методом	19
Задание 2.3. Определение интенсивности транспирации весовым методом	20
Задание 2.4. Определение степени открытия устьиц методом инфильтрации	21
Задание 2.5. Определение водного дефицита растений	22
МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ	24
Лабораторная работа № 3. Изучение минерального питания растений.....	24
Задание 3.1. Обнаружение отдельных элементов, входящих в состав растений.....	24
Задание 3.2. Влияние азотации на поглощение питательных веществ корнями растений	27
Задание 3.3. Рост растений на растворах чистых солей и на их смеси (антагонизм ионов).....	27
Задание 3.4. Влияние анионов и катионов солей на форму и время плазмолиза.....	29
Задание 3.5. Физиологическая реакция солей	29
Задание 3.6. Смещение pH питательного раствора корнями растений	30
ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ	32



Лабораторная работа № 4. Изучение ферментов дыхания растений.....	32
Задание 4.1. Обнаружение дегидрогеназ в семенах гороха.....	32
Задание 4.2. Обнаружение пероксидазы в соке клубня картофеля	33
Задание 4.3. Определение активности каталазы газометрическим методом.....	34
Лабораторная работа № 5. Определение параметров дыхания.....	36
Задание 5.1. Упрощенный метод определения интенсивности дыхания (по Бойсен-Иенсену)	36
Задание 5.2. Определение дыхательного коэффициента прорастающих семян.....	37
ФОТОСИНТЕЗ	41
Лабораторная работа № 6. Изучение свойств фотосинтетических пигментов	42
Задание 6.1. Химические и оптические свойства пигментов листа.....	42
Задание 6.2. Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла на реакцию переноса водорода (по А. А. Гуревичу).....	46
Задание 6.3. Разделение фотосинтетических пигментов методом бумажной хроматографии.....	47
Задание 6.4. Определение количества хлорофилла в листьях колориметрическим методом	48
Лабораторная работа № 7. Определение интенсивности фотосинтеза	50
Задание 7.1. Определение интенсивности фотосинтеза по накоплению углерода в листьях	50
РОСТ И ДВИЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ	53
Лабораторная работа № 8. Изучение ростовых процессов растений	53
Задание 8.1. Определение зоны роста стебля	53
Задание 8.2. Периодичность роста древесных побегов.....	54
Задание 8.3. Задерживающее и стимулирующее действие гетероауксина на рост	54
Задание 8.4. Нарушение геотропизма корней эозином.....	56
Задание 8.5. Хемотропизм корней пшеницы	56
Задание 8.6. Эпинастические и гипонастические изгибы листьев под влиянием гетероауксина.....	57
УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ	
К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ	58
Лабораторная работа № 9. Изучение устойчивости растений к неблагоприятным факторам	58

Задание 9.1. Защитное действие сахаров на протоплазму при отрицательных температурах.....	58
Задание 9.2. Определение жароустойчивости по Ф. Ф. Мацкову.....	59
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	60
ПРИЛОЖЕНИЕ	61

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

При подготовке специалистов-биологов среди общих биологических дисциплин важное место занимает физиология растений – наука о жизни растений. Физиология растений – наука экспериментальная, поэтому в учебном плане подготовки биологов отводится время на лабораторные занятия.

В задачи данных методических указаний входят: проверка и закрепление некоторых теоретических положений, излагаемых в курсе лекций; ознакомление с наиболее простыми методами определения различных физиологических процессов у растений; привитие навыков научно-исследовательской работы (постановка цели опыта, проведение эксперимента, оформление первичной научной документации, обсуждение результатов опытов, оформление выводов).

Лабораторные работы выполняются согласно графика учебного процесса и самостоятельной работы студентов по дисциплине, который приведен в [6]. На выполнение лабораторной работы отводится 2 академических часа. При этом соблюдается принцип индивидуального выполнения работ. Каждый студент ведет рабочую тетрадь, оформление которой должно отвечать требованиям [7], основные из которых следующие:

- на титульном листе указывают предмет, курс, группу, подгруппу, фамилию, имя, отчество студента;

- каждую работу нумеруют в соответствии с методическими указаниями, указывают дату выполнения работы;

- полностью записывают название работы, цель и принцип метода, кратко характеризуют ход эксперимента и объект исследования; при необходимости приводят рисунок установки;

- результаты опытов фиксируют в виде рисунков с обязательными подписями к ним, а также таблиц или описывают словесно (характер оформления работы обычно указан в методических указаниях к самостоятельным работам);

- в конце каждой работы делают вывод или заключение, которые обсуждаются при подведении итогов занятия.

Все первичные записи необходимо делать в тетради по ходу эксперимента. Для проверки академической активности и качества работы студента рабочую тетрадь периодически проверяет преподаватель.

К лабораторным работам студент допускается только после инструктажа по технике безопасности. Положения техники безопасности изложены в инструкциях, которые должны находиться на видном месте в лаборатории. Основные требования при выполнении работ по физиологии растений изложены в приложении.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

В курсе ботаники студенты подробно изучают строение клетки. Перед физиологией растений стоит задача познакомить с функционированием клеток, важнейшим свойством которых является постоянный обмен веществ. Этот процесс осуществляется при непосредственном участии живой протоплазмы и зависит от ее состояния и свойств. Проникновение веществ в клетку и выход наружу – это сложный физиологический процесс. Он обусловлен структурой и функцией поверхностных мембран цитоплазмы, зависит от химической природы окружающих и поступающих в клетку веществ (от размера и формы молекул, величины электрического разряда, способности к адсорбции и т. д.). Именно сложность процесса поступления веществ в клетку определила возникновение ряда теорий проницаемости, обсуждаемых в теоретической части курса.

Целью данного раздела является практическое подтверждение избирательности поступления веществ в клетку. В регуляции водообмена растительной клетки важную роль играют осмотические явления – осмотическое давление и сосущая сила.

В данный раздел входят две лабораторные работы продолжительностью по 2 часа. Преподаватель выдает студенту соответствующие времени выполнения индивидуальные задания.

Лабораторная работа № 1. Методы изучения растительной клетки

Цель работы: показать, что только живая протоплазма растительных клеток обладает свойством избирательной проницаемости.

Задание 1.1. Проницаемость живой и поврежденной протоплазмы для клеточного сока

Все важнейшие проявления жизнедеятельности клетки связаны с мембранами. Одним из наиболее общих, неспецифических и быстрых ответов растительного организма на воздействие различных факторов внешней среды является изменение проницаемости клеточных мембран.

Удобным объектом для наблюдения служат ткани растений, клетки которых содержат в вакуолях красящие вещества, например, бетацианин. Этот пигмент находится в клеточном соке, хорошо растворим в воде и его молекула имеет достаточно большие размеры (M_{564}). 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 мембран.

Ход работы: нарезать соломкой корнеплод красной свеклы. Для удаления содержимого поврежденных клеток полоски промыть в проточной воде. В пять пробирок поместить предварительно нарезанные и отмытые в воде полоски корнеплода красной свеклы длиной 1,5–2 см и залить растворами согласно схеме опыта, приведенной в [табл. 1](#). Кусочки должны быть полностью погружены в растворы.

Содержимое второй пробирки вскипятить, третьей – сильно встряхнуть для перемешивания наркотика (хлороформа) с водой. Через 30 мин определить оптическую плотность полученных растворов за сине-зеленым светофильтром (490 нм), полученные значения занести в рабочую тетрадь, в [табл. 1](#), в качестве показателя «Степень окраски раствора».

Таблица 1

Схема записи опыта

№ пробирки	1.	2.	3.	4.	5.
Вариант опыта	Водопроводная вода	Водопроводная вода (кипячение)	Водопроводная вода + несколько капель хлороформа	30%-ный раствор уксусной кислоты	50%-ный раствор этилового спирта
Степень окраски раствора					

Распределите номера пробирок по нарастанию степени окраски. Проанализируйте полученные результаты, исходя из условий проведения эксперимента, и запишите вывод о проницаемости живой, наркотизированной или мертвой протоплазмы для клеточного сока.

Задание 1.2. Накопление красителей в вакуоли

Одним из способов изучения проницаемости мембран является прижизненное окрашивание, т. е. проникновение красителя из наружной среды во внутренние области живой клетки и постепенное их окрашивание. Катионные (основные) красители (нейтральный красный или метиленовый синий) проникают в живую клетку в молекулярной форме и проходят через плазмалемму, основной цитоплазматический матрикс, тонопласт в вакуоль, где они под влиянием кислой среды переходят в ионную форму. Поскольку мембраны не пропускают ионы красителя, они накапливаются в вакуоли и окрашивают её.

Клетки могут оставаться живыми в окрашенном состоянии в течение нескольких часов или дней. В мертвых клетках мембраны легкопроницае-

мы для любой формы красителя, поэтому в вакуоли не происходит его накопления.

Об избирательности проницаемости мембран свидетельствует также плазмолиз (рис. 1). В гипертоническом растворе вода выходит из клетки, вакуоль сокращается в результате потери воды, цитоплазма отстает от жесткой клеточной стенки и сжимается вслед за вакуолью. Однако если плазмалемма и тонопласт проницаемы для плазмолитика, то через некоторое время он проникает в вакуоль и происходит деплазмолиз. Скорость деплазмолиза зависит от проницаемости мембран для данного вещества, поэтому её можно использовать для определения проницаемости мембраны.

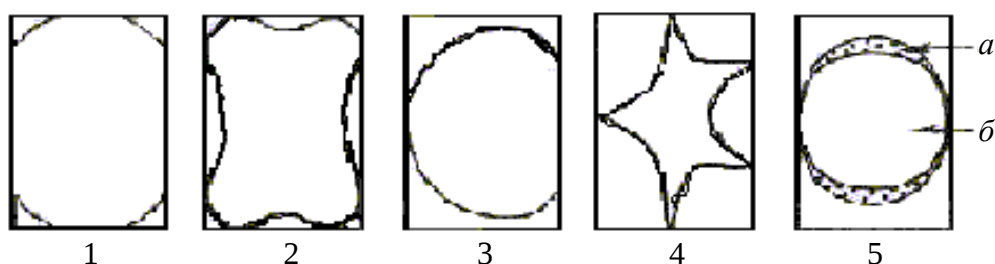


Рис. 1. Степени плазмолиза: *a* – цитоплазма; *б* – вакуоль; 1 – угловый; 2 – вогнутый; 3 – выпуклый; 4 – судорожный; 5 – колпачковый

Ход работы: на предметное стекло в каплю 0,01%-ного водного раствора нейтрального красного поместить эпидермис с выпуклой поверхности неокрашенного лука, закрыть препарат покровным стеклом и сразу же рассмотреть под микроскопом при малом увеличении. Если видны равномерно окрашенные в розовый цвет клетки, значит, краситель проник в вакуоль. Для доказательства того, что краска проникла через плазму, надо вызвать плазмолиз содержимого клеток. Для этого, не поднимая покровного стекла, в препарат вводится плазмолитик, например, 1 М раствор KNO_3 . Наступивший плазмолиз говорит о том, что клетки, окрашенные нейтральным красным, – живые, краситель проник через живую протоплазму. Мертвые клетки имеют окрашенную протоплазму и ядро и не плазмолизируются в растворе солей.

Пользуясь тем, что в работе применяется нейтральный красный, обладающий индикаторными свойствами, можно определить, какова реакция клеточного сока. Для этого под покровное стекло вводят каплю щелочи, например, NH_4OH . Если окраска препарата изменится, значит, клеточный сок имеет кислую реакцию.

При оформлении работы зарисовать клетку, накопившую краску, плазмолизованную клетку и клетку при действии на нее аммиака, сделать подписи к рисункам и выводы из наблюдений.

Задание 1.3. Наблюдение колпачкового плазмолиза

Колпачковый плазмолиз возникает под действием солей, проникающих через плазмалемму в мезоплазму и вызывающих её набухание. Сквозь тонопласт за время опыта соли не проникают.

Ход работы: срез эпидермиса выпуклой стороны чешуи окрашенного лука поместить на предметное стекло в каплю 1 М раствора KCNS и накрыть покровным стеклом. Следить, чтобы на срезе были клетки, содержащие в клеточном соке антоциан. Препарат рассмотреть под микроскопом сначала на малом увеличении (окуляр $\times 15$, объектив $\times 8$), а затем – на большом (окуляр $\times 15$, объектив $\times 40$).

Поскольку взят гипертонический раствор, во всех клетках будет наблюдаться сильный плазмолиз. Слой протоплазмы, окружающий вакуоль, имеет заметную толщину. Со стороны поперечных стенок протоплазма имеет вид колпачков на полюсах.

Зарисовать клетку в состоянии колпачкового плазмолиза, сделать вывод о проницаемости мембран протоплазмы.

Задание 1.4. Определение жизнеспособности семян по окрашиванию цитоплазмы

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

Ход работы (по Нелюбову): семена гороха намочить в течение 18 ч при комнатной температуре, затем освободить их от семенной оболочки и залить в стакане 0,2%-ным раствором индигокармина на 2–3 часа. Через установленное время краску слить, промыть семена водой и установить их жизнеспособность. Семена с неокрашенными зародышами и частично окрашенными семядолями относятся к жизнеспособным. Семена с полностью окрашенными зародышами и семядолями нежизнеспособны. Для большей наглядности работу можно провести в двух вариантах: партию семян разделить на две части, одну из которых убить кипячением, другую оставить неповрежденной. В конце опыта сравнить, как выглядят живые и убитые кипячением семена.

Ход работы (по Иванову): для определения взять семена пшеницы, замоченные на 10 часов. Часть семян убить кипячением, опыт проводить в два варианта – с живыми и мертвыми. Взять по 8–10 зерновок каждого варианта, разрезать бритвой бороздки пополам и поместить на 15 мин в 0,2%-ный раствор фуксина кислого, налитый в стаканчики. Далее краску слить, семена

пинцетом поместить на фильтровальную бумагу и определить у них жизнеспособность. У жизнеспособных семян зародыши не окрашены или окрашены только верхний слой, который легко стирается пальцем. У нежизнеспособных семян краска глубоко проникает в ткань зародыша, сильно окрашивает их.

При оформлении работы зарисовать жизнеспособные и мертвые семена и сделать вывод по результатам наблюдений.

Задание 1.5. Определение осмотического давления клеточного сока методом плазмолиза

В природе широко распространено явление диффузии, т.е. тепловое движение частиц вещества из области его большей концентрации в область меньшей концентрации. При возникновении на пути диффундирующего вещества полупроницаемой мембраны движение вещества становится ограниченным, возникает односторонний ток воды через мембрану. Это явление называется осмосом. Чтобы воспрепятствовать поступлению растворителя через мембрану в раствор, надо приложить определенное давление, которое и называется осмотическим давлением, или потенциалом.

По Вант-Гоффу, осмотическое давление в случае разбавленных растворов подчиняется газовым законам. Поэтому для определения осмотического потенциала раствора можно применять формулу

$$P = RTCi, \quad (1)$$

где P – осмотический потенциал, атм; R – газовая постоянная (0,082); T – абсолютная температура ($273 + t$ °C); C – концентрация раствора, моли; i – изотонический коэффициент Вант-Гоффа, характеризующий степень диссоциации растворенного вещества.

Взрослая растительная клетка представляет собой осмотически активную систему, у которой роль полупроницаемой мембраны выполняет живая протоплазма, а осмотически активного раствора – клеточный сок вакуоли; поэтому каждая клетка обладает осмотическим потенциалом, который важен при водообмене растений.

Как видно из приведенной выше формулы, осмотическое давление можно рассчитать, зная концентрацию раствора C . Поэтому все методы определения осмотического давления сводятся к установлению равновесной концентрации раствора.

Принцип предлагаемого в настоящей работе метода основан на подборе концентрации наружного раствора, равной концентрации клеточного сока; ее находят по наблюдению степени плазмолиза, т. е. отставания содержимого клетки от клеточной оболочки.

Ход работы: в стеклянных бюксах с крышками приготовить по 10 мл 0,5 М; 0,4 М; 0,3 М; 0,2 М; 0,1 М растворов азотнокислого калия, разбавляя

одномолярный раствор этой соли дистиллированной водой в соответствии со схемой записи опыта. Растворы тщательно перемешать, бюксы отметить этикетками с указанием концентрации раствора в них.

В каждый раствор последовательно от большей концентрации к меньшей поместить срез эпидермиса окрашенного лука. Следить, чтобы препараты были окрашены и смочены раствором! Через 30 мин после погружения срезов в первую бюксу просмотреть их под микроскопом в капле раствора, в котором находился срез. Определить степень плазмолиза клеток и сделать записи в соответствующую графу схемы записи опыта (сильный, слабый, чуть заметный, по уголкам клетки, нет плазмолиза).

По результатам наблюдений определить изотоническую концентрацию, значение которой подставить в расчетную формулу. Изотоническую концентрацию найти как среднее арифметическое концентрации, при которой плазмолиз еле заметен, и той, которая не вызывает плазмолиза.

Расчеты осмотического потенциала делать по формуле (1).

Таблица 2

Схема записи опыта

Концентрация растворов	На 10 мл раствора		Продолжительность экспозиции		Степень плазмолиза	Изотоническая концентрация
	1 М KNO ₃ , мл	H ₂ O, мл	время погружения	время наблюдения		
0,5 М	5	5				
0,4 М	4	6				
0,3 М	3	7				
0,2 М	2	8				
0,1 М	1	9				

Изотонический коэффициент определять по формуле

$$i = 1 + \alpha (n - 1), \quad (2)$$

где α – степень диссоциации электролита (значение ее для различных концентраций растворов KNO₃ приведено в [табл. 2](#); n – число ионов, на которое диссоциирует молекула вещества.

В [табл. 3](#) отражена степень диссоциации растворов.

Таблица 3

Степень диссоциации растворов

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

На основе полученных результатов необходимо определить изотоническую концентрацию, изотонический коэффициент и рассчитать значение осмотического давления.

Задание 1.6. Определение водного потенциала растительной ткани методом полосок (по Лилиенштерн)

Важным термодинамическим показателем состояния воды в системе является водный потенциал (ψ). Он показывает способность воды в системе совершать работу, необходимую для того, чтобы поднять потенциал связанной воды до потенциала чистой, т. е. свободной, воды.

Водный потенциал имеет размерность энергия/объем, Дж/м³, что эквивалентно н/м², т. е. давлению, поэтому его выражают в паскалях (Па) или других единицах давления (1 атм = 101,325 Па). Химический потенциал воды связан с её активностью, которая в растворе всегда меньше 1. Потенциал чистой воды или системы, находящейся в равновесии с чистой водой, равен 0. Чем ниже потенциал системы, тем с большей силой она поглощает воду. Поэтому водный потенциал, взятый с отрицательным знаком, обозначают термином «сосущая сила» (S).

Сосущая сила – это способность растительной ткани поглощать воду. Она зависит от степени насыщенности клеток водой и является разницей между осмотическим потенциалом P и тургорным давлением T :

$$P - T = S. \quad (3)$$

Принцип метода основан на подборе такой концентрации наружного раствора, при которой погруженные в раствор полоски растительной ткани не меняют своей длины, так как в поступлении воды наступает динамическое равновесие и объем клеток остается неизменным.

При более высокой концентрации раствора длина полосок уменьшается. Если осмотическое давление меньше величины сосущей силы клетки, то клетка насыщается водой из раствора, увеличивается в объеме и длина полосок становится больше.

Ход работы: в пробирках с пробками приготовить по 10 мл 0,4 М; 0,3М; 0,2 М; 0,1 М растворов KNO₃. В последнюю пробирку налить дистиллированную воду (10 мл). Растворы тщательно перемешать, пробирки пометить этикетками.

Из клубня картофеля вырезать полоски одинаковой длины по 4–6 см, сечением 0,5х0,5 см. Один конец полоски необходимо срезать наискось так, чтобы ее вид сбоку был в виде трапеции.

Измерить с точностью до 1 мм длинную сторону полоски, значение записать в [табл. 4](#), в стб. «до погружения в раствор».

Схема записи опыта

Концентрация KNO_3 , М	На 10 мл раствора		Длина полосок, мм		Концентрация, при которой длина полоски не изменилась
	1 М KNO_3 , мл	H_2O , мл	до погружения в раствор	после погружения	
0,4	4	6			
0,3	3	7			
0,2	2	8			
0,1	1	9			
0	0	10			

Полоски ткани картофеля по две штуки поместить в пробирки с растворами KNO_3 различной концентрации. Через 20 мин извлечь полоски из пробирок, обсушить фильтровальной бумагой, измерить длину маркированной стороны полоски, сделать записи в [табл. 4](#), в стб. «после погружения».

Сопоставив длину полосок до и после пребывания в растворе KNO_3 , определите изотоническую концентрацию раствора.

Рассчитайте значение сосущей силы тканей взятого для опыта клубня картофеля по формуле (4). Обозначения в формуле те же, что и в формуле (1):

$$S = RTC_i. \quad (4)$$

Сформулируйте и запишите вывод.

Задание 1.7. Определение водного потенциала тканей листа методом Шардакова

Принцип метода основан на подборе внешнего раствора, концентрация которого не меняется при погружении в него растительной ткани. Изменение концентрации можно наблюдать по удельному весу раствора.

Ход работы: в четырех пробирках с пробками подготовить по 10 мл 0,4 М; 0,3 М; 0,2 М; 0,1 М растворов KNO_3 , разбавляя одномолярный раствор этой соли дистиллированной водой. Пробирки отметить этикетками, растворы тщательно перемешать.

На дно специальных пробирок со вздутием ([рис. 2](#)) на боковой стенке внести пипеткой по 6 капель раствора. Эту операцию целесообразно начинать с раствора меньшей концентрации: тогда необходимость ополаскивания пипеток водой отпадает, достаточно обмыть их тем раствором, который будут вносить в пробирки.

Пробочным сверлом вырезать 8 дисков из листьев герани и поместить их по 2 штуки в каждую пробирку со вздутиями так, чтобы



Рис. 2. Специальная пробирка со вздутием

они смочились раствором. Пробирки закрыть пробками, отметить этикетками и периодически встряхивать. Через 30 мин, начиная с раствора меньшей концентрации (0,1 М), определить изменения удельного веса растворов. Для этого следует вынуть пробку из пробирки со вздутием и подкрасить раствор метиленовой синью следующим образом: сухим стеклянным шпателем коснуться порошка метиленовой сини, внести шпатель до половины пробирки и аккуратно стукнуть о её стенку. Для интенсивного окрашивания раствора достаточно нескольких кристаллов сини, которые упадут со шпателя. Для равномерного окрашивания раствора пробирку встряхнуть. Далее поместить её горизонтально вздутием вниз и пипеткой на 1 мл заполнить вздутие тем раствором, который вносили в пробирку до опыта. Чистой сухой стеклянной палочкой осторожно направить струйку окрашенного раствора в бесцветный исходный раствор и наблюдать за тем, как она будет себя вести. Результаты записать в [табл. 5](#).

Струйка может опуститься на дно; значит, удельный вес раствора увеличился за счет отнятия от него воды тканями растения, имеющими большую величину сосущей силы, чем осмотический потенциал внешнего раствора. Если сосущая сила меньше осмотического потенциала внешнего раствора, то ткань будет отдавать воду в раствор, удельный вес его уменьшится и струйка всплывет наверх.

Таблица 5

Схема записи опыта

Объект	Концентрация опытного раствора KNO_3 , М	Продолжительность опыта		Направление движения струйки	Концентрация внешнего раствора, осмотическое давление которого равно сосущей силе
		время погружения	время на- блюдения		
Листья герани	0,4				
	0,3				
	0,2				
	0,1				

В том случае, когда сосущая сила клетки и осмотическое давление внешнего раствора равны, концентрация последнего не изменится и струйка равномерно распределится в исходном растворе. Значение этой концентрации подставить в формулу (3) и рассчитать величину сосущей силы (атм).

Если для эксперимента нет специальных пробирок со вздутиями, его можно провести в другой модификации. Приготовленные растворы KNO_3 различной концентрации внести на дно обычных пробирок, в них поместить по 2 диска ткани листа герани. Пробирки закрыть пробками и отметить этикетками. Так же, как и в первом случае, через 30 мин, начиная с варианта 0,1 М, окрасить синью раствор с высечками, затем чистой пипеткой на 1 мл взять небольшое его количество и внести в исходный раствор. Пронаблюдать за поведением струйки. В обоих вариантах нельзя заблаговременно окрашивать растворы, так как метиленовая синь может оказать влияние на живые ткани и изменить их осмотические свойства.

Студенты должны освоить обе модификации и в конце занятия сравнить результаты, полученные разными методами.

ВОДООБМЕН РАСТЕНИЙ

Лабораторная работа № 2. Изучение водного режима растений

Вода – обязательная составная часть живой материи. Роль воды в жизни растений проявляется во всех аспектах их жизнедеятельности. В тканях растений содержание ее колеблется в широких пределах: от 5 до 95 % от сырой массы тканей. Для процессов жизнедеятельности важным условием является не только общее содержание воды, но и ее состояние. Вода является и средой, и непосредственным участником большинства биохимических реакций.

Водный режим растений состоит из трех элементов: поглощение воды, ее передвижение и расходование (главным образом – в процессе транспирации). Нормальная обеспеченность клеток водой необходима для поддержания их оболочек в упругом состоянии, в состоянии тургора. Благодаря этому поддерживается форма органов растений со слабо развитой механической тканью. С изменением тургорного давления связаны и некоторые движения частей растений. Вода способна переносить по растению как минеральные, так и органические соединения. Испарение воды (транспирация) служит основным средством терморегуляции у растений, так как удельная теплота испарения воды очень велика. Высокое поверхностное натяжение способствует передвижению воды по капиллярам.

Метаболизм и продуктивность растений в сильной степени зависят от состояния воды и ее баланса в тканях. Поэтому различные показатели водобмена часто служат предметом исследования. Настоящий раздел включает некоторые из них.

Цель работы: изучить основные реакции клеток, вызываемые изменениями водного потенциала внешнего раствора, подтвердить справедливость положения о различиях форм воды в растениях.

Задание 2.1. Определение форм воды в растительных тканях

Содержащаяся в растительных тканях вода (общая вода) условно подразделяется на две формы: свободную (или рыхло связанную) и связанную (или прочно связанную). Под связыванием подразумевается возникновение взаимодействий между молекулами воды и неводного компонента, ведущих к снижению подвижности молекул воды, отчего изменяются и другие её свойства. Свободной, по существу, является более подвижная фракция воды, которая может составлять до 90 % общего количества воды в клетке. Она активно участвует в физиологических процессах.

Количество свободной воды определяют в растительных объектах при помощи дилатометра. Он представляет собой стеклянный сосуд, который в верхней части снабжен длинной капиллярной трубкой с делениями. Дилато-

метр дает возможность найти количество льда, которое образуется в тканях растений при температуре $-3...-7^{\circ}\text{C}$. Определение количества свободной воды при помощи этого прибора основано на измерении увеличения объема воды при переходе ее в лёд.

Ход работы: сначала необходимо проградуировать дилиатометр. Для этого необходимо налить в него 5 мл дистиллированной воды и бензин (или петролейный эфир), который не смешивается с водой и не замерзает при низких температурах. Закрывать пробку с капиллярной трубкой так, чтобы мениск бензина высоко поднялся по трубке.

Прибор поместить в смесь льда (или снега) с поваренной солью. Сначала дать возможность бензину и воде переохладиться до температуры криогидратного раствора; при этом уровень бензина в трубке упадет, а затем станет постоянным. В этот момент сделать первый отсчет, после чего потряхиванием дилиатометра вызвать замерзание воды. Объем воды увеличится, что приведет к подъему уровня бензина в трубке. Когда вода замерзнет полностью и движение мениска бензина прекратится, сделать второй отсчет.

После градуировки взять навеску растительной ткани, например 5 г мелко нарезанного картофеля, поместить в дилиатометр и залить бензином. Прибор поместить в охлаждающую смесь, при этом уровень бензина в трубке начнет падать и затем останется постоянным. Сделать первый отсчет. После этого потряхиванием дилиатометра вызвать замерзание воды, находящейся в тканях растения. Сделать второй отсчет. По результатам опыта рассчитать содержание свободной воды в процентах к сырому веществу.

Пример расчета содержания свободной воды

При замерзании 5 мл воды бензин поднялся на 7 делений в трубке, при замерзании 5 г картофеля – на 4 деления. Составить пропорцию и определить количество свободной воды в навеске в мл:

5 мл – 7 делений

X мл – 4 деления

$$X = 5 \cdot 4 / 7 = 2,89 \text{ мл}$$

Далее рассчитать содержание свободной воды в процентах к сырому веществу:

5 г – 100 %

2,89 г – X %

$$X = 2,89 \cdot 100 / 5 = 57,8 \%$$

Для определения общего количества воды необходимо взять навеску из того же клубня картофеля в 5–10 г, поместить в алюминиевую бюксу и высушить в сушильном шкафу при температуре $100-105^{\circ}\text{C}$ до постоянной массы.

Вычитанием из взятой навески массы, полученной после ее сушки, найти вес испарившейся воды. Рассчитать процент от сырого вещества тканей:

навеска – 100 %

испарившаяся вода – X % $X = \text{испарившаяся вода} \cdot 100 / \text{навеска} \%$.

Процент связанной воды к сырому веществу найти по разности между общим содержанием и количеством свободной воды:

$$\begin{aligned} \% \text{ связанной воды (к сырому веществу)} &= \\ &= \% \text{ общей воды} - \% \text{ свободной воды.} \end{aligned} \quad (5)$$

Для определения доли свободной и связанной воды в ее общем количестве надо провести следующие расчеты:

количество общей воды (в % к сырому веществу) – 100 %;

количество свободной воды (в % к сырому веществу) – X %;

$$\begin{aligned} X &= \text{свободная вода (\%)} \cdot 100 / \text{общая вода (\%)} = \\ &= \% \text{ свободной воды от общего содержания воды.} \end{aligned}$$

Вычитанием от 100 % количества свободной воды определить содержание связанной воды в % от ее общего содержания.

Результаты занести в [табл. 6](#) и [табл. 7](#).

Таблица 6

Общее содержание воды

Масса пустой бюксы, г	Масса бюксы с сырой навеской, г	Масса сырой навески, г	Масса бюксы с навеской после сушки, г	Количество испарившейся при сушке воды, г	Содержание общей воды к сырому веществу, %

Таблица 7

Определение свободной и связанной воды

Количество делений, на которое поднялся бензин при замерзании		Количество свободной воды в тканях		Общее содержание воды к сырому веществу, %	Количество связанной воды к сырому веществу, %	Содержание воды от общей, %	
5 мл воды	ткани растений	мл в 5 г ткани	в % к сырому веществу			свободной	связанной

Сделать вывод о содержании воды в ткани клубня картофеля.

**Задание 2.2. Определение интенсивности транспирации
хлоркобальтовым методом**

Надземная часть растений все время находится в воздушной среде (за исключением водных растений). В воздухе существует дефицит упругости водяного пара; поэтому его водный потенциал низок, т. е. высока сосущая сила. У взрослых растений испарение воды происходит главным образом через устьичные щели. Но вода также может испаряться с кутикуляризированной поверхности эпидермиса (кутикулярная транспирация) и с опробковевших поверхностей (перидермальная транспирация). От количества устьиц и степени их открытия зависит интенсивность транспирации.

В работе ставится задача пронаблюдать интенсивность транспирации с верхней и нижней стороны листа и связать ее с количеством устьиц на испаряющей поверхности. Хлоркобальтовый метод основан на способности фильтровальной бумаги, пропитанной хлористым кобальтом, в зависимости от влажности менять свою окраску от голубой (в абсолютно сухом состоянии) до розовой (при сильном увлажнении).

По скорости смены окраски хлоркобальтовой бумаги от голубой к розовой можно судить об интенсивности транспирации листа.

Ход работы: хлоркобальтовые бумаги подсушить над электрической плитой до равномерного голубого окрашивания, приложить к нижней и верхней сторонам листа герани и во избежание увлажнения прикрыть сверху предметным стеклом. Стекла слегка прижать пальцами или зажимом, но делать это очень осторожно, чтобы не нарушить ткани листа и не выжать на бумажку клеточный сок. Наблюдение продолжать несколько минут до тех пор, пока не будет четко заметна разница в окраске бумаги с верхней и нижней стороны листа растения. Сделать вывод об интенсивности транспирации.

В предложенной модификации метод носит качественно-количественный характер, то есть результат можно выразить словами «слабее», «сильнее». Можно также засечь время, в течение которого бумажка порозовеет до одинаковой степени, но в данном случае время – довольно субъективный показатель наблюдаемого процесса, так как зависит от внимания и терпения экспериментатора.

После наблюдения транспирации сделать подсчет устьиц на испаряющей поверхности листа. Для этого с нижней и верхней стороны листа снять эпидермис, поместить его на предметное стекло в каплю воды, закрыть покровным стеклом и посмотреть при малом увеличении микроскопа. Затем микроскоп перевести на большое увеличение (окуляр x15, объектив x40) и подсчитать количество устьиц в поле зрения микроскопа. При этом микровинтом слегка менять фокусировку, чтобы обнаружить все устьица на рассматриваемом участке. Подсчет сделать в трех – четырех полях зрения, рассчитать среднее количество устьиц для данного препарата.

Результаты наблюдений по транспирации и числу устьиц записать в табл. 8 и сделать вывод об интенсивности транспирации с нижней и верхней стороны листа растения и ее зависимости от количества устьиц.

Схема записи опыта

Сторона листа	Скорость порозовения бумажки	Количество устьиц при большом увеличении микроскопа в поле зрения	
		по повторностям	среднее
Верхняя			
Нижняя			

По результатам работы сделать вывод о зависимости интенсивности транспирации от количества устьиц.

Задание 2.3. Определение интенсивности транспирации весовым методом

Транспирация, как и испарение, – диффузионный процесс, а потому определяется градиентом водного потенциала в системе «растение-воздух». Поэтому все факторы, влияющие на этот градиент, влияют и на общую (устьичную и кутикулярную) транспирацию в той же мере, в какой и на процесс испарения воды. Транспирация как физический процесс зависит от дефицита насыщения воздуха водяными парами, температуры, освещенности, ветра (движения воздуха), а также величины и формы испаряющей поверхности, определяемой особенностями строения растения.

В настоящей работе ставится задача определить интенсивность транспирации листьев (в зависимости от их расположения по стеблю) и связать ее с особенностями анатомического строения листа, в частности с количеством устьиц на нижнем эпидермисе и степенью их открытия.

Весовой метод основан на учете убыли массы растений за счет испарения воды. Чаще всего этим методом определяют транспирацию отдельного срезанного листа.

Ход работы: наблюдения ведутся за листьями с одного стебля растения. Каждый студент получает лист герани определенного яруса. Срезанный лист необходимо вставить черешком в отверстие в пробке. Черешок на 1–1,5 см подрезать под водой, чтобы на конце в сосудах не образовалось воздушной пробки. Только после этого пробку вставить в колбу так, чтобы черешок был погружен в воду, но вода не вытеснялась из колбы. Горлышко колбы вокруг пробки и отверстие в ней замазать вазелином для предотвращения испарения воды из колбы. Последняя с внешней стороны должна быть сухой.

Смонтированный прибор взвесить на технических весах с точностью до 0,01 г и поставить к источнику света или под струю воздуха. Через 1 ч прибор снова взвесить и определить убыль в его массе, произошедшую за счет транспирации.

Чтобы рассчитать интенсивность транспирации, то есть количество воды (г), потерянной за 1 ч одним квадратным метром поверхности листа, надо определить площадь листовой пластинки весовым методом. Для этого надо

из листа бумаги вырезать квадрат площадью 100 см^2 ($10 \times 10 \text{ см}$) и взвесить. После экспозиции опыта лист герани вынуть из пробки, поместить на бумажный квадрат и обвести его контуры, по которым вырезать фигуру площадью, равной площади листа растения, и также взвесить. Зная массу квадрата в 100 см^2 А и массу контура листа В, составить пропорцию

$$100 \text{ см}^2 - А, \text{ г}$$

$$S \text{ см}^2 - В, \text{ г}; \text{ отсюда } S = 100 \cdot В/А \text{ см}^2.$$

Интенсивность транспирации рассчитать по формуле

$$I = (1000 \cdot C)/(St), \text{ г/см}^2/\text{ч}, \quad (6)$$

где C – убыль массы за время опыта, г; S – площадь листа, см^2 ; t – время опыта, ч.

У листа, использованного в опыте по определению транспирации, сделать подсчет числа устьиц на эпидермисе нижней стороны. Результаты занести в [табл. 9](#).

Таблица 9

Схема записи опыта

Ярус листа	Масса прибора с листом, г		Потеря воды листом за время опыта, г	Определение площади листа			Продолжительность опыта, ч	Интенсивность транспирации, г/ $\text{см}^2/\text{ч}$
	до опыта	после опыта		масса 100 см^2 , г	масса контура листа, г	S листа, см^2		

Сопоставить данные всех членов группы и сделать вывод о зависимости транспирации и количества устьиц на нижней стороне листа от расположения последнего по высоте стебля.

Задание 2.4. Определение степени открытия устьиц методом инфильтрации

Органические жидкости обладают различной способностью смачивать клеточные стенки и проникать в устьичные щели листа. Это явление называется инфильтрацией. Прошедшая через устьичные щели жидкость вытесняет воздух из межклетников, вызывая изменение окраски инфильтрованного участка: в отраженном свете он кажется более темным, в проходящем – прозрачным.

В работе используются три жидкости: спирт, проникающий только в сильно раскрытые устьица, ксилол, проникающий в среднеоткрытые устьица, бензин, проникающий в слабо открытые. Наблюдая проникновение этих жидкостей в ткани листа, можно сделать вывод о степени раскрытия устьиц.

Если при проникновении спирта в лист пройдут и ксилол, и бензин, значит, устьица открыты сильно. Если степень раскрытия устьиц средняя, то

проникнут ксилол и бензин. При инфильтрации только бензина устьица открыты слабо.

Ход работы: на участки нижней стороны листа, разделенные жилками, стеклянной палочкой или пипеткой нанести три жидкости (спирт, ксилол, бензин). Если капля жидкости исчезает, но цвет листа не меняется, значит, жидкость просто испарилась. Изменение окраски на месте нанесения капли реактива свидетельствует об инфильтрации жидкости. Результаты наблюдений написать в [табл. 10](#), на основании их сделать вывод о степени раскрытия устьиц у использованного в опыте листа.

Таблица 10

Схема записи опыта

Проникновение жидкостей			Степень раскрытия устьиц
спирт	ксилол	бензин	

Сделать вывод о степени открытия устьиц исследуемого растения.

Задание 2.5. Определение водного дефицита растений

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

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

Для полного насыщения клеток влагой листья выдерживают в воде или увлажненной атмосфере. Общее содержание воды определяют высушиванием листьев при 100–150 °С.

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

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

Ход работы: взять примерно 1 г высечек из листьев и поместить в предварительно взвешенные абсолютно сухие бюксы, закрыть и немедленно взвесить. Затем диски поместить на поверхность воды в закрытые чашки Петри и оставить для насыщения водой на 2 часа. Далее тургесцентные высечки из листьев достать, просушить снаружи фильтровальной бумагой и взвесить. Для контроля диски поместить в воду и через 30 мин повторить взвешивание. Если масса ткани не изменится, значит, она полностью тургесцентная, т. е. полностью насыщена водой. После этого определить массу абсолютно сухой ткани.

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

На основании полученных данных вычисляют водный дефицит растений:

$$d = 100(b - a)/(b - c), \quad (7)$$

где a – масса бюксы с растительной пробой до насыщения; b – масса бюксы с растительной пробой после насыщения; c – масса бюксы с высушенной пробой до абсолютно сухого веса.

Результаты опыта записать в виде [табл. 11](#).

Таблица 11

Определение водообеспеченности растений

Вариант опыта	№ бюксы	Масса бюксы, г	Навеска листьев, г	Масса тургесцентной ткани, г	Масса абсолютно сухой ткани, г	Содержание воды, г	Количество воды, насыщающей листья, г	Водный дефицит, %

МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ

Лабораторная работа № 3. Изучение минерального питания растений

Минеральное питание – необходимое условие жизни растений. Минеральные элементы поглощаются главным образом корнями растений. В природной обстановке источником минерального питания является почва, в искусственных условиях растения могут выращиваться на жидких питательных средах. Но в любом случае в составе питательного раствора должны содержаться макроэлементы и микроэлементы, которые называются необходимыми. К необходимым макроэлементам относятся азот, фосфор, калий, кальций, магний и сера. Из микроэлементов наиболее изучена физиологическая роль железа, бора, цинка, меди, марганца и молибдена.

В почвенном растворе ионы либо находятся в свободном состоянии, либо связаны с почвенными коллоидами. Поглощаются элементы минерального питания чаще всего в ионной форме.

Физиологи растений разрабатывают теоретические основы минерального питания. Практические вопросы питания растений и применения удобрений изучают агрохимики.

Цель работы: познакомиться с методами обнаружения минеральных веществ в растительной клетке.

Задание 3.1. Обнаружение отдельных элементов, входящих в состав растений

При сжигании растений поглощенные ими минеральные элементы остаются в несгораемой части – золе, – которая может составлять от 5 до 20 % от общей массы растений. Качественный состав золы неодинаков и зависит от видовых особенностей растений и условий произрастания. Практически в золе растений можно обнаружить все элементы земной коры, но в разных количествах: от целых процентов до едва уловимых следов. Качественный зольный анализ очень трудоемок и в задачу нашего практикума не входит. Работа знакомит с качественным микроскопическим методом обнаружения отдельных элементов.

Ход работы: щепотку растительной золы поместить в стеклянную бюксу и небольшими порциями залить раствором 10%-ной соляной кислоты. Кислоту приливать до тех пор, пока зола не перестанет вскипать от очередной порции. Полученный раствор отфильтровать через фильтр с белой лентой в стеклянную бюксу с крышкой. В фильтрате, пользуясь качественными реакциями, необходимо обнаружить кристаллы солей кальция, магния, фосфора, серы и железа.

Все реакции производить на предметном стекле, на которое нанести маленькие капельки исследуемого раствора и реактива на расстоянии 1 см друг от друга. Затем чистым стеклянным капилляром соединить капельки тоненьким дугообразным каналцем. В месте соединения произойдет реакция, а по краям канала раньше, чем на других участках, начнется кристаллизация продуктов реакции ([рис. 3](#)).

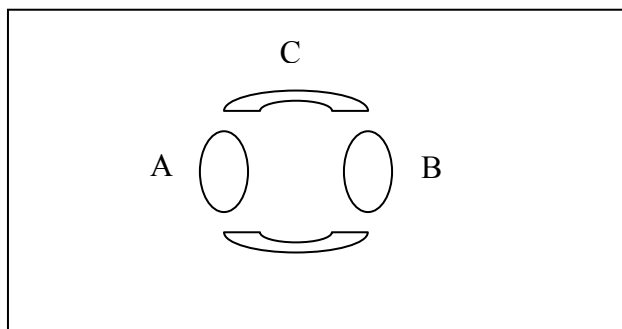


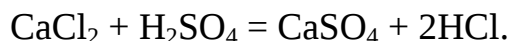
Рис. 3. Схема расположения капель исследуемого раствора и реактивов: А – капля зольного раствора; В – капля требуемого реактива; С – каналцы, соединяющие капли

Кристаллы следует рассмотреть под микроскопом при малом увеличении и без покровного стекла и сделать зарисовки их форм.

Обнаружение кристаллов соли кальция



На предметное стекло нанести каплю фильтрата и каплю серной кислоты:



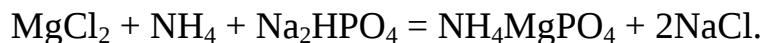
В результате реакции выпадают пучки игольчатых кристаллов гипса ([рис. 4](#)).

Рис. 4. Кристаллы гипса

Обнаружение кристаллов соли магния

Капельку испытуемого раствора сначала нейтрализовать аммиаком, а затем соединить с капелькой фосфорнокислого натрия. Важно полностью нейтрализовать кислоту и дать избыток аммиака.

Индикатором полной нейтрализации и создания щелочной реакции является выпадение осадка полуторных окислов, от которых капля мутнеет:



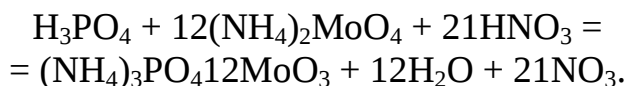
Кристаллы фосфорно-аммиачно-магнезиальной соли имеют вид ящичков, крышек, звезд или крыльев ([рис. 5](#)).



Рис. 5. Кристаллы фосфата магния-аммония, полученные при медленной (слева) и быстрой (справа) кристаллизации

Обнаружение кристаллов соли фосфора

Капельку испытуемого раствора соединить с 1%-ным раствором молибденово-кислого аммония в азотной кислоте:



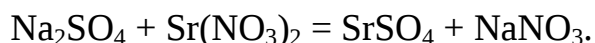
Выпадает зеленовато-желтый скрытокристаллический осадок фосфорно-молибденово-кислого аммония (рис. 6), принимающий постепенно все более и более интенсивную зеленую окраску.



Рис. 6. Кристаллы фосфат-молибдата аммония

Обнаружение серы

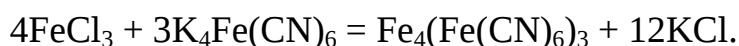
К испытуемому раствору добавляем каплю азотно-кислого стронция:



Образуются мелкие закругленные кристаллы желтоватого цвета серно-кислого стронция.

Обнаружение железа

Реакцию проводить в фарфоровой чашке:



В результате образуется интенсивно-синий осадок, так называемая «берлинская лазурь», которая хорошо видна без микроскопа на белом фарфоровом фоне.

Зарисовать обнаруженные кристаллы, подписать рисунки и сделать вывод о содержании минеральных элементов в золе.

Задание 3.2. Влияние аэрации на поглощение питательных веществ корнями растений

Поглощение минеральных элементов корнями растений является активным физиологическим процессом. Об этом свидетельствует большая скорость поглощения, поступление веществ против градиента концентрации, зависимость поглотительной деятельности корней от условий окружающей среды и т. д.

Как любой активный процесс, поглощение минеральных элементов осуществляется с затратой энергии, источником которой в живых организмах служит процесс дыхания. Условия, затормаживающие дыхание, будут отрицательно действовать и на поглотительную деятельность корней. В этом можно убедиться на опыте, помещая корни растений в анаэробные условия.

Ход работы: в две конические колбы на 50–100 мл налить раствор KNO_3 . Одну из них поставить на электроплитку, раствор довести до кипения, чтобы удалить из него воздух. Когда раствор остынет, в него высадить 2–3 проростка пшеницы, смонтированных с помощью ваты в вырез резиновой пробки. Вату вокруг пробки обмазать вазелином. Таким образом, в первой колбе создаются анаэробные условия для корней растений. Во вторую колбу также высадить проростки пшеницы, но укрепить их в горлышке колбы с помощью ваты, а раствор в течение опыта продувать воздухом с помощью резиновой груши, что обеспечивает хорошую аэрацию в зоне корней.

Через 1–2 ч опыт закончить. Листья растений обоих вариантов срезать (следить, чтобы они не были смочены раствором азотнокислого калия), поместить в фарфоровые чашечки и слегка растереть стеклянной палочкой, после чего обработать раствором дифениламина в концентрированной серной кислоте. Дифениламин с нитратами образует соединение синего цвета. По интенсивности синего окрашивания можно судить о количестве поглощенных растениями нитратов в условиях хорошей и плохой аэрации, а следовательно, о зависимости поглотительной деятельности корней от интенсивности дыхания.

Задание 3.3. Рост растений на растворах чистых солей и на их смеси (антагонизм ионов)

Антагонизмом называется такое взаимодействие веществ в растворе, когда действие одного из них ослабляет действие другого. При выращивании растений в водной культуре было замечено, что чистые растворы солей – яд для растений, т. к. сильно угнетают их рост или приводят к их гибели. При добавлении другой соли в раствор ослабляет это действие, то есть наблюдается

явление антагонизма. Поэтому в питательном растворе должно быть определенное соотношение солей. Такой раствор называется физиологически уравновешенным.

Наиболее изучено взаимодействие одновалентных и двухвалентных катионов. В ряде случаев наблюдается антагонизм и при взаимодействии анионов. Двухвалентные катионы обладают более сильным антагонистическим действием, чем одновалентные. Явление антагонизма можно наблюдать при проведении вегетационного опыта с водной культурой растений.

Ход работы: в качестве вегетационных сосудов можно использовать стеклянные банки емкостью 200 мл. Снаружи их необходимо закрыть чехлами из плотной бумаги для предотвращения отрицательного действия света на рост корней, сверху – парафиновыми крышками из марли, в отверстия которых высадить проростки пшеницы (по 10 шт. на сосуд). Перед высадкой растений сосуды заполнить 0,12 N растворами солей по схеме опыта, приведенной в [табл. 12](#), и долить до 200 мл водой. Корешки проростков должны касаться растворов. Первые 2–3 дня проростки сверху защищать от высыхания влажной фильтровальной бумагой. Затем бумагу снять и сосуды разместить у источника света (у окна или под электрическими лампами).

Опыт длится 10–15 дней. В этот период в сосуды доливать воду до уровня 200 мл, проводить наблюдения за состоянием растений. В конце опыта измерить длину корней и надземных органов растений во всех вариантах. Среднее значение по варианту записать в [табл. 12](#).

Таблица 12

Схема записи опыта

№	Варианты	Количество раствора, мл	Длина надземных органов, см	Длина корней, см
1.	Na Cl	100,0		
	CaCl ₂	1,0		
	KCl	2,2		
2.	CaCl ₂	100,0		
3.	Na Cl	100,0		
4.	KCl	100,0		

По результатам работы провести статистическую обработку данных и сделать вывод о влиянии чистых солей и их смеси на рост растений.

Задание 3.4. Влияние анионов и катионов солей на форму и время плазмолиза

Одной из причин антагонизма одновалентных и двухвалентных катионов считается их противоположное действие на вязкость и гидрофильность протоплазмы клеток. Например, калий повышает гидрофильность и понижает вязкость плазмы. Преобладание кальция приводит к увеличению вязкости и снижению гидрофильности.

О вязкости плазмы можно судить по времени плазмолиза клеток в растворах солей. Временем плазмолиза называется период с момента помещения ткани растения в раствор до наступления выпуклого плазмолиза. Оно зависит от природы как катиона, так и аниона.

Ход работы: на предметное стекло в каплю исследуемого раствора поместить кусочек эпидермиса с выпуклой стороны окрашенной чешуи лука, отметить время начала опыта. Препарат накрыть покровным стеклом и рассмотреть под микроскопом при малом увеличении. Пронаблюдать за изменением формы плазмолиза. Сначала он может быть вогнутым и даже судорожным, а потом принимает выпуклую форму. Чем меньше вязкость плазмы, тем быстрее достигается выпуклый плазмолиз. Отметить время наступления выпуклого плазмолиза у большинства клеток препарата.

Результаты наблюдения записать в [табл. 13](#), определить время плазмолиза и сделать выводы о влиянии катионов и анионов солей на вязкость плазмы.

Таблица 13

Схема записи опыта

№	Варианты	Концентрация растворов солей, М	Время погружения ткани в раствор	Время наступления выпуклого плазмолиза	Время плазмолиза, мин
1.	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,7			
2.	KNO_3	1,0			
3.	KCl	1,0			

Задание 3.5. Физиологическая реакция солей

Корневые системы растений способны поглощать катионы и анионы избирательно, т. е. не в том соотношении, в котором они находятся в питательном растворе. При этом происходит изменение pH среды. Если из растворов солей растение поглощает больше катионов, а анионы накапливаются в среде, то pH раствора смещается в кислую сторону. Такая соль называется физиологически кислой. Физиологически щелочной солью называется такая

соль, из раствора которой корни берут анионы, а катионы накапливаются в среде и подщелачивают ее.

Физиологическую реакцию солей необходимо учитывать при выращивании растений на искусственных питательных смесях и внесении удобрений в полевых условиях. В последнем случае надо знать реакцию почвенного раствора.

Ход работы: в опыте использовать растворы двух солей, отличающихся по физиологической реакции, например $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и NaNO_3 . Сначала необходимо определить исходное значение pH этих растворов, для чего пипеткой отмерить 2,5 мл раствора в чистую пробирку, туда же долить 0,15 мл универсального индикатора, окраска которого меняется в зависимости от реакций исследуемого раствора. Сравнив ее со шкалой Алямовского, можно определить pH раствора.

Затем в чистые пробирки на 2/3 их объема налить растворы солей и поместить в них корни 4–6 проростков пшеницы. Через 1,5–2 ч снова определить значение pH исследуемых растворов и сделать вывод о физиологической реакции солей.

Для удобства записи результатов наблюдений можно пользоваться приведенной схемой, см. [табл. 14](#).

Таблица 14

Схема записи опыта

№	Растворы солей	Значение pH		Физиологическая реакция солей
		заданное	исходное	
1.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
2.	NaNO_3			

По результатам работы сделать вывод о физиологической реакции каждой из исследуемых солей.

Задание 3.6. Смещение pH питательного раствора корнями растений

Одно из требований к питательному раствору – определенная реакция среды. Для большинства высших растений оптимальная реакция среды лежит в области слабокислой, близко к нейтральной, то есть при pH 6–7. Корневые системы обладают способностью изменять pH окружающего их раствора, смещая его реакцию близко к оптимуму. Это активный физиологический процесс, связанный с жизнедеятельностью всего растения, выделительными и метаболическими функциями корней, амфолитическими свойствами цитоплазмы, проницаемостью живых мембран. В природной обстановке реакция

участков почвы, непосредственно примыкающих к живым корням растений, может существенно отличаться от pH всей массы почвенного горизонта. Еще сильнее происходит сдвиг pH растворов при выращивании растений гидропонным методом (в водной культуре). В этом можно убедиться, выполнив предлагаемую ниже работу.

Ход работы: в четырех конических колбах приготовить питательную смесь Кнопа, для чего в каждую слить в равных объемах (обычно по 10 мл) растворы солей – компонентов смеси: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , KCl .

После тщательного перемешивания растворов в одной из колб определить pH смеси Кнопа. Так как во всех четырех колбах смесь приготовлена одинаково, можно считать, что pH всех четырех растворов имеет близкое значение. Для определения pH взять пипеткой 2,5 мл смеси, поместить в чистую пробирку, добавить 0,15 мл универсального индикатора. Окраску раствора в пробирке сравнить со шкалой Алямовского.

Для постановки опыта в каждой колбе приготовить раствор с определенным значением pH: 5, 6, 7, 8. Делается это добавлением в раствор 0,01 н щелочи NaOH или кислоты HCl. После каждого добавления двух-трех капель кислоты или щелочи растворы перемешивать и брать пробы для определения pH. Окрашенные пробы в общий раствор не сливать. Так, эмпирически, постепенно подкисляя или подщелачивая растворы, добиться заданного значения pH. Для ускорения работы допускаются отклонения от заданной величины на $\pm 0,2$. Например, для первого варианта можно взять смесь Кнопа с pH 4,8, или 5,0, или 5,2. Когда все растворы будут готовы, часть их отлить в чистые пробирки с этикетками, на которых указать pH взятого раствора. В пробирки высадить по 4–5 проростков пшеницы или других растений.

Через 0,5–1,0 ч снова определить значения pH растворов. Результаты записать в [табл. 15](#), сделать выводы о способности корней смещать реакцию растворов.

Таблица 15

Схема записи опыта

Номер варианта	Значение pH		
	исходное	заданное	конечное
1.		5,0	
2.		6,0	
3.		7,0	
4.		8,0	

Сравнив направления и степень смещения pH в каждом варианте, определить оптимальную реакцию среды для использованного в опыте растения.

ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ

Дыханием называется сложная цепь окислительно-восстановительных реакций, в ходе которых преобразуются органические вещества и накапливается энергия в виде макроэргических соединений. В аэробных условиях при дыхании органические вещества распадаются до углекислого газа и воды при участии кислорода воздуха по уравнению



Дыхание – это процесс, который осуществляется в любой живой клетке. Интенсивность его различна и зависит как от внутренних особенностей клеток, тканей, органов и целого организма, так и от условий среды. По интенсивности дыхания можно судить об общей активности жизнедеятельности организма.

Интенсивность дыхания, исходя из приведенного выше уравнения, можно определить по скорости газообмена – количеству поглощенного кислорода и выделенного углекислого газа, – а также по расходованию органического вещества в результате биологического окисления. Чаще применяются методы учета газообмена при дыхании, среди которых наиболее простой – определение углекислого газа, выделяющегося при дыхании исследуемого объекта.

В процессе дыхания участвует большое количество биологических катализаторов – ферментов. Специфическими дыхательными ферментами являются дегидрогеназы и оксидазы, которые работают в комплексе с промежуточными переносчиками электронов и со вспомогательными ферментами.

Лабораторная работа № 4. Изучение ферментов дыхания растений

Цель работы: провести экспериментальное определение активности основных дыхательных ферментов.

Задание 4.1. Обнаружение дегидрогеназ в семенах гороха

Дегидрогеназы – это ферменты, активирующие и отщепляющие водород от окисляемого субстрата. Обнаружение дегидрогеназ основано на их способности передавать водород какому-нибудь акцептору, который, восстанавливаясь, меняет свою окраску. В качестве акцептора водорода может быть взята метиленовая синь, переходящая в восстановленном состоянии в бесцветную лейкоформу.

Ход работы: с семян набухшего гороха снять кожуру. Семена поместить в две пробирки. В одну из них налить воду и довести до кипения, чтобы убить ткани семян. После охлаждения воду слить и обе партии горошин (ки-

пяченные и непрокипяченные) залить 1%-ным раствором метиленовой сини для окрашивания. Через 5–10 мин синь из пробирок слить, семена промыть водопроводной водой. После промывания все семена должны иметь темно-синюю окраску.

Окрашенные семена залить отстоянной водопроводной водой, пробирки закрыть резиновыми пробками, то есть создать анаэробные условия, и поместить их в термостат или водяную баню с оптимальной для работы дегидрогеназ температурой (около 30–35 °С).

Через 1,5–2 ч можно заметить, что непрокипяченные семена теряют синюю окраску. Это происходит потому, что дегидрогеназы, участвующие в дыхании клеток, активировали и сняли водород с дыхательного материала, а затем передали его на метиленовую синь, которая восстановилась и обесцветилась. Если с обесцвеченных семян слить воду, то на воздухе они снова синеют, так как лейкоформа метиленовой сини окисляется.

Семена в контрольной пробирке остаются синими, поскольку при кипячении дегидрогеназы разрушились. Аналогичные опыты можно провести с любым неокрашенным растительным материалом. После проведения опыта зарисовать живые и мертвые семена, описать и объяснить полученный результат.

Задание 4.2. Обнаружение пероксидазы в соке клубня картофеля

Пероксидаза относится к группе ферментов оксидаз. По химической природе это гемопротеид, который с помощью перекиси водорода катализирует дегидрирование различных субстратов, например фенолов, которые при окислении превращаются в хиноны. Пероксидаза широко распространена в растительных тканях. В этом легко убедиться, выполнив предлагаемую ниже работу.

Ход работы: клубни картофеля измельчить на пластмассовой терке и из полученной массы через марлю отжать сок, который богат пероксидазой. В три пробирки налить по 5 мл 1%-ного раствора гидрохинона, приготовленного на прокипяченной дистиллированной воде (перед началом опыта). В первую пробирку добавить по 1 мл 3%-ного раствора перекиси водорода и картофельного сока, во вторую – внести только перекись водорода, а в третью – сок клубня картофеля.

Интенсивное побурение наблюдается только в первой пробирке, где происходит окисление гидрохинона в хинон за счет кислорода перекиси (при участии пероксидазы). Во второй пробирке окраска раствора почти не изменяется, но при длительном стоянии может появиться слабое побурение, так как гидрохинон окисляется кислородом, образующимся при спонтанном разложении перекиси водорода. Медленное побурение может наблюдаться и в третьей пробирке за счет окисления гидрохинона кислородом воздуха при участии полифенолоксидазы, также в небольшом количестве содержащейся в соке клубня картофеля.

Результаты наблюдений записать в [табл. 16](#), на их основании сделать вывод о характере действия фермента пероксидазы.

Таблица 16

Схема записи опыта

Варианты	Состав смеси в пробирках			Окраска раствора в пробирках
	гидрохинон	H ₂ O ₂	сок клубня	
1.	+	+	+	
2.	+	+	–	
3.	+	–	+	

Задание 4.3. Определение активности каталазы газометрическим методом

Каталаза так же, как и пероксидаза, относится к оксидазам, окисляющим субстрат кислородом перекиси водорода. Но главная функция каталазы – расщепление перекиси водорода на воду и молекулярный кислород. Ядовитый для живых тканей продукт обмена веществ H₂O₂ обезвреживается при участии каталазы. По химической природе каталаза – гемопротеид. Содержится она во всех тканях и органах растений, но активность её различна и часто коррелирует с активностью процессов жизнедеятельности организма.

Принцип метода определения активности каталазы основан на учете количества кислорода, выделяющегося при разложении перекиси водорода. Если непосредственно измеряется объем газа, то такой метод называется газометрическим.

Ход работы: при определении активности каталазы газометрическим методом нужно использовать прибор «каталазник» ([рис. 7](#)). Он состоит из реактора – двух соединенных пробирок, – где происходит расщепление перекиси водорода за счет каталазы изучаемого субстрата. Резиновой трубкой реактор соединяется с бюреткой, с помощью которой измеряют объем кислорода. Бюретку заполняют водой, слегка подкрашенной, например, метиленовой синью, чтобы заметнее был её мениск. По вытеснению воды из бюретки можно судить о количестве освобождающегося кислорода в реакторе. Для установления мениска на определенном уровне к бюретке резиновой трубкой присоединена стеклянная груша. Бюретка и груша являются сообщающимися сосудами.

Обязательным условием работы прибора служит его герметичность. Для проверки на герметичность присоединить к прибору реактор, закрыть зажим у бюретки и поднять вверх грушу. Если мениск в бюретке не поднимается до мениска воды в груше, то прибор герметичен и на нем можно работать.

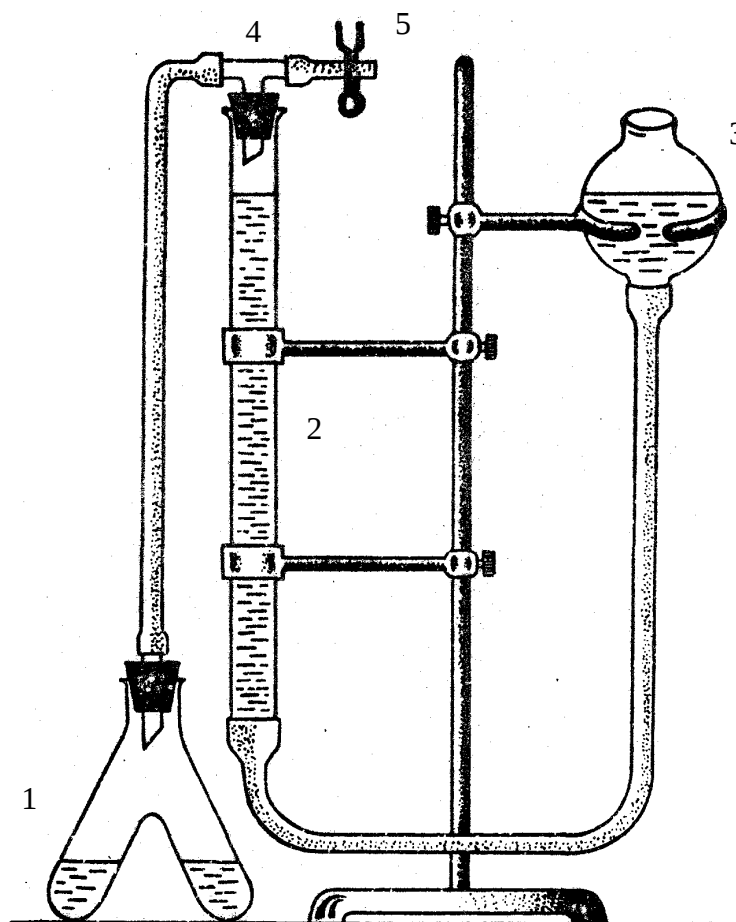


Рис. 7. Прибор для определения активности каталазы: 1 – каталазник; 2 – бюретка на 100 мл; 3 – стеклянная груша; 4 – стеклянный тройник; 5 – зажим Мора

Активность каталазы неодинакова в различных тканях, поэтому вначале надо определить оптимальный размер навески (от 0,25 г до 5,0 г и более). Взятую навеску поместить в фарфоровую ступку и растереть с добавлением небольшого количества битого стекла (для лучшего измельчения растительной ткани) и щепотки мела (для создания слабощелочной среды, оптимальной для работы каталазы).

Однородную кашицу количественно перенести через воронку строго в одно колено реактора. При этом затратить 20 мл воды, которую отмерить цилиндром. Воду добавлять в ступку небольшими порциями. В другое колено реактора пипеткой налить 5 мл 3%-ной перекиси водорода. Заряженный реактор присоединить к прибору.

При открытом зажиме, то есть при атмосферном давлении, поднимая или опуская грушу, установить в бюретке уровень жидкости на нулевом делении. Зажим закрыть, суспензию растительной ткани в реакторе смешать с перекисью водорода. С этого момента начать отсчет времени. Время отмерять по песочным часам. Начнется выделение кислорода, который поступит в бюретку, и жидкость в ней опустится. Для равномерного выделения кислорода смесь в реакторе постоянно переливать из одного колена в другое. Реакция должна происходить при атмосферном давлении, для создания которого

жидкости в бюретке и груше поддерживать на одном уровне. Кислород будет выделяться до тех пор, пока не разложится вся перекись водорода, но обычно активность каталазы измеряется в первые 3–5 минут.

Как только закончится время наблюдения, особенно тщательно установить мениски жидкости в бюретке и груше и по бюретке определить количество выделенного кислорода. Активность каталазы выражается в миллилитрах O_2 , выделенного за время опыта, в расчете на 1 г сырой растительной ткани. Результаты оформить в виде [табл. 17](#).

Таблица 17

Схема записи опыта

Объект	Навеска, г	Время опыта, мин	O_2 , выделенный за время опыта, мл	Активность каталазы, мл O_2 , на г сырого вещества за время опыта

В выводе указать активность каталазы исследуемого объекта и сравнить с активностью других объектов.

Лабораторная работа № 5. Определение параметров дыхания

Цель работы: познакомиться с основами экспериментального изучения интенсивности дыхания у растений.

Задание 5.1. Упрощенный метод определения интенсивности дыхания (по Бойсен-Иенсену)

Настоящий метод основан на учете количества углекислого газа, выделяемого растением в замкнутом пространстве и поглощаемого баритом. Удобным объектом для работы служат семена. Нужно сравнить интенсивность дыхания прорастающих и покоящихся семян пшеницы.

Следует иметь в виду, что у этого метода есть недостаток: объект находится в замкнутой атмосфере, где может возникнуть дефицит кислорода, и в парах барита, ядовитого для организмов.

Ход работы: в три конические колбы с пробками емкостью на 100–200 мл с помощью бюретки налить по 10 мл 0,1N $Ba(OH)_2$. **Барит ядовит для человека, и пипеткой брать его небезопасно!** Колбы закрыть пробками, чтобы избежать попадания в барит углекислоты из воздуха.

На технических весах взять навески по 3 г сухих и прорастающих семян пшеницы и поместить их в марлевые мешочки. Мешочки подвесить в колбы над баритом с помощью крючков, вставленных в резиновые пробки. Необходимо следить, чтобы марля не касалась раствора барита. Третью колбу (без семян) использовать в качестве контроля.

Экспозиция опыта не должна превышать одного часа, так как семена могут оказаться в анаэробных условиях. В ходе опыта колбы надо аккуратно покачивать, чтобы разрушить пленку углекислого бария, образующегося на поверхности раствора при поглощении CO_2 . Время опыта должно быть точно учтено.

В конце опыта барит в колбах оттитровать 0,1 N раствором щавелевой кислоты. Титрование лучше начать с контрольной колбы. Сначала установить мениск раствора щавелевой кислоты в бюретке, только после этого открыть пробку и вынуть мешочек с семенами. В раствор барита внести 2–3 капли фенолфталеина, который в щелочи приобретает розовую окраску. Титрование проводить по возможности быстро, чтобы барит не успел поглотить много CO_2 из воздуха. Конец титрования определяется по обесцвечиванию фенолфталеина от одной капли щавелевой кислоты. Раствор становится молочно-белым, и при дальнейшем прибавлении щавелевой кислоты окраска его не меняется. Поэтому важно не пропустить конец титрования. Для проверки точности титрования в обесцвеченный раствор можно капнуть бариту: при хорошей работе от одной капли $\text{Ba}(\text{OH})_2$ раствор снова порозовеет.

Расчет интенсивности дыхания сделать по формуле

$$J = [2,2 \cdot 60(a - b)] / (nt), \text{ мг } \text{CO}_2/\text{г/ч}, \quad (8)$$

где a – количество щавелевой кислоты, пошедшей на титрование при контроле, мл; b – количество щавелевой кислоты, пошедшей на титрование в опытном варианте, мл; 2,2 – мг CO_2 , соответствует 1 мл 0,1 N щавелевой кислоты; n – вес сухих семян, г; t – время опыта, мин.

Результаты титрования и расчетов записать в [табл. 18](#).

Таблица 18

Схема записи опыта

Объект	Навеска семян, г	Продолжительность опыта, мин	Пошло на титрование 0,1N щавелевой кислоты, мл		Интенсивность дыхания семян, мг $\text{CO}_2/\text{г/ч}$
			контроль	опыт	
Сухие семена					
Прорастающие семена					

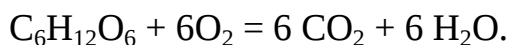
В конце работы сделать вывод о зависимости интенсивности дыхания от влажности семян.

Задание 5.2. Определение дыхательного коэффициента прорастающих семян

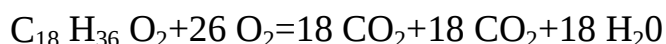
Дыхательный коэффициент (ДК) – это показатель газообмена живых тканей. Он означает отношение количества выделенного при дыхании углекислого газа к количеству поглощенного при этом кислорода:

$$\text{ДК} = \text{CO}_2 / \text{O}_2.$$

Величина дыхательного коэффициента зависит от ряда причин. Первый фактор – химическая природа окисляемого при дыхании субстрата. Если используются углеводы, то ДК близок к единице:

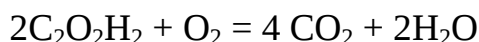


Если окисляются более восстановленные вещества, жиры и белки, то кислорода потребляется больше, чем выделяется углекислого газа, и ДК меньше единицы. Например, при окислении стеариновой кислоты реакция идет по формуле



и отношение $\text{CO}_2:\text{O}_2$ равно 18:26, то есть 0,69.

При окислении веществ, содержащих в себе больше кислорода, чем в углеводах, дыхательный коэффициент больше единицы. Так, при дыхании за счет щавелевой кислоты по уравнению



дыхательный коэффициент равен четырем.

Вторым фактором, определяющим величину ДК, являются условия аэрации. При недостатке кислорода в воздухе, то есть в анаэробных условиях, ДК повышается и в случае окисления углеводов становится выше единицы.

Наконец, величина дыхательного коэффициента свидетельствует о полноте окисления субстрата. Если при окислении углеводов процесс распада идет не до конца, а накапливаются промежуточные, более окисленные, чем углеводы, продукты, то величина ДК становится меньше единицы. Подобное явление наблюдается у интенсивно растущих объектов. В работе предлагается один из наиболее простых методов определения ДК прорастающих семян – метод Рихтера.

Ход работы: в опыте используют прибор, состоящий из пробирки, которая плотно закрыта каучуковой пробкой, со вставленной в неё горизонтальной трубкой с делениями. Пробирку поместить в колбу, которая является одновременно и штативом, и термоизолятором.

Прорастающими семенами пшеницы или подсолнечника заполнить 1/2–2/3 объема пробирки и плотно закрыть ее пробкой с измерительной трубкой. Обязательное условие правильного наблюдения – постоянство температуры прибора, так как его работа связана с изменением объемов газов. Поэтому смонтированный прибор должен принять комнатную температуру, что достигается в течение 5–7 минут.

В конец измерительной трубки ввести каплю жидкости (например подкрашенную метиленовой синью воду). Для этого, не вынимая пробирку из

колбы, погрузить конец трубки в стаканчик с жидкостью. Если жидкость плохо поступает в отверстие, можно слегка постучать кончиком трубки о дно стакана или, вынув трубку из стакана, протереть кончик её фильтровальной бумагой. Если эти меры не помогают, то надо капилляр трубки промыть спиртом и водой. Капля должна подняться по трубке на расстояние 1 см. Таким образом, в приборе создается замкнутое пространство. Всякое изменение в нем объема газов приведет каплю в движение. По скорости этого движения можно судить о газообмене.

При равенстве объемов выделяющегося углекислого газа и поглощающегося кислорода общий объем газов в пробирке останется неизменным и капля не будет менять своего положения. В том случае, когда поглощается больше O_2 , чем выделяется CO_2 , в пробирке возникает разрежение газов и капля передвигается внутри по трубке. При условии более интенсивного выделения CO_2 по сравнению с поглощением кислорода капля будет выбрасываться из трубки. Требуется пронаблюдать за поведением капли и, если она перемещается, рассчитать скорость ее движения, определяемую разностью объемов O_2 и CO_2 . С этой целью, как только в кончик трубки будет введена капля, необходимо засечь время и ждать, через сколько минут капля пройдет какой-то отрезок пути S . Зная путь S и время t , затраченное на преодоление этого пути, можно рассчитать скорость движения капли:

$$V = \frac{S}{t}.$$

Эту скорость обозначить буквой A . Определить ее 2–3 раза, для дальнейших расчетов взять среднюю величину.

Затем пробирку раскрыть и ввести в нее фильтровальную бумажку, смоченную концентрированным раствором щелочи, которая будет поглощать выделяющийся при дыхании углекислый газ. Пробирку снова закрыть пробкой, дать прибору принять комнатную температуру и 2–3 раза определить скорость движения капли после введения щелочи, обозначить её B . Она зависит от объема поглощенного при дыхании семян кислорода:

$$B = O_2.$$

Значения A и B записать в [табл. 19](#) и рассчитать величину дыхательного коэффициента объекта, используемого в опыте. Расчет делать по формуле

$$ДК = \frac{B - A}{B}. \quad (9)$$

Эта дробь дает величину отношения CO_2 к O_2 , т. к.

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

Схема записи опыта

Объект	Скорость движения капли						Дыхательный коэффициент
	до введения щелочи (А)			после введения щелочи (В)			
	1	2	ср.	1	2	ср.	

В конце работы объяснить, от чего зависит полученная величина ДК.

ФОТОСИНТЕЗ

Фотосинтез – это процесс аккумуляции световой энергии растением и использования её для синтеза органических соединений из минеральных веществ (углекислого газа и воды). За счет фотосинтеза обеспечиваются следующие потребности: человека – в запасах пищи, топлива, кислорода; разных отраслей промышленности – в сырье.

Необходимыми компонентами фотосинтезирующих систем являются пигменты, которые служат первичными фотосенсибилизаторами. Поглощение пигментами световой энергии обусловлено наличием в их молекуле хромофорных групп. Хромофорные группы представляют собой систему сопряженных двойных связей, включающих большое число легко возбуждаемых светом π -электронов.

У всех растений пигменты локализованы в хлоропластах. У прокариотных водорослей и фотосинтезирующих бактерий хлоропластов нет, их пигменты локализованы в мембранных структурах – тилакоидах и ламеллах.

Основные фотосинтезирующие пигменты – хлорофиллы, фикобилины и каротиноиды. Хлорофиллы по своей природе являются Mg – порфиринами. Наиболее распространены формы хлорофиллов *a*, *b*. Хлорофилл *a* входит в состав пигментного аппарата всех фототрофов, включая цианобактерии. Пурпурные и зеленые серные бактерии содержат бактериохлорофиллы. Хлорофилл *b* находится в хлоропластах высших растений и в зеленых водорослях. Порфириновое кольцо хлорофилла поглощает красные и сине-фиолетовые лучи, пропуская значительную часть зеленых. Этим объясняется зеленый цвет хлорофиллов. Молекулы хлорофиллов входят в реакционные центры и принимают участие в преобразовании световой энергии.

Фикобилинпротеиды – водорастворимые пигменты красного или голубого цвета. По химической природе фикобилинпротеиды близки к желчным пигментам. Фикобилины входят в пигментный аппарат цианобактерий и красных водорослей. Хромофорами фикобилинпротеидов являются фикоцианолин и фикоэритробилин. Они поглощают световую энергию в зеленой и желтой областях. Поглощенную энергию с высокой эффективностью передают фотохимически активным формам хлорофилла *a*.

Каротиноиды – большая группа пигментов желтого, оранжевого, красного цвета. По химическому строению каротины – ненасыщенные углеводороды, содержащие только углерод и водород, а ксантофиллы содержат еще и кислород. Поглощают свет в сине-фиолетовой области.

Пигментный комплекс представляет собой сложную и лабильную систему, которая чутко реагирует на изменение внешней среды и приспосабливается к ним в пределах своей наследственной программы.

Лабораторная работа № 6. Изучение свойств фотосинтетических пигментов

Цель работы: изучить основные химические и физические свойства фотосинтетических пигментов на основе опытов *in vitro*.

Задание 6.1. Химические и оптические свойства пигментов листа

В процессе фотосинтеза высших растений участвуют две группы пигментов: зеленые – хлорофиллы *a* и *b*; желтые – каротины и ксантофиллы. Мы познакомимся с методом выделения пигментов, разделения по методу Крауса, с основными химическими и оптическими свойствами пигментов. Работа состоит из отдельных этапов, которые выполняются в приведенной ниже последовательности.

1. Получение спиртового раствора пигментов

С этой целью можно использовать как сухие листья, так и свежий растительный материал. При работе с сухими листьями рекомендуется увлажнить их перед экстракцией пигментов. При работе с сырым материалом удобны листья герани, гороха, фасоли.

Ход работы: 1–2 г листьев герани поместить в фарфоровую ступку, добавить немного кварцевого песка (для лучшего измельчения растительных тканей) и щепотку мела (для создания нейтральной или слабощелочной реакции среды). Листья растереть до однородной массы, в которую добавить 10–15 мл 96%-ного этанола. После тщательного перемешивания гомогенат отфильтровать в пробирку через бумажный фильтр с белой лентой. Чтобы жидкость при выливании из ступки не стекала по стенке, приставить стеклянную палочку к носику ступки, смазанному снаружи вазелином. Ступку и пестик можно ополоснуть несколькими миллилитрами этанола, который надо сливать на этот же фильтр. Работа носит качественный характер; поэтому можно не добиваться полного переноса пигментов в раствор. Если первые порции фильтрата получились мутными, их снова надо профильтровать, не меняя фильтра. Полученный экстракт зеленого цвета пригоден для последующих опытов.

2. Разделение пигментов по методу Крауса

Метод основан на различной растворимости пигментов в спирте и бензине, которые при сливании не смешиваются, образуя два слоя: верхний – бензин; нижний – спирт. Эмпирическая формула хлорофилла *a* – $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$, хлорофилла *b* – $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$. Хлорофилл является сложным эфиром дикарбоновой кислоты хлорофиллина и двух спиртов – метанола и фитола. Фитол имеет длинную углеводородную цепочку ($C_{20}H_{39}$), которая и

определяет гидрофобность молекулы хлорофилла. Он лучше растворяется в гидрофобном растворителе – бензине. Каротин, будучи углеводородом ($C_{40}H_{56}$), также обладает гидрофобными свойствами и имеет большое сродство с бензином. Ксантофиллы – спирты ($C_{40}H_{56}O_2$), и поэтому они лучше растворяются в этаноле, чем в бензине.

Ход работы: в пробирку налить 2–3 мл спиртовой вытяжки пигментов и добавить 3–4 мл бензина Калоша (вместо бензина можно использовать петролейный эфир). Пробирку встряхнуть и дать отстояться содержимому. Происходит отслоение эмульсии. Сверху собирается бензин с перешедшими в него хлорофиллами, которые окрашивают данный слой в зеленый цвет. Каротин также находится в бензине, но его желтая окраска маскируется хлорофиллом. Нижний спиртовой слой содержит пигмент ксантофилл, который окрашен в желтый цвет.

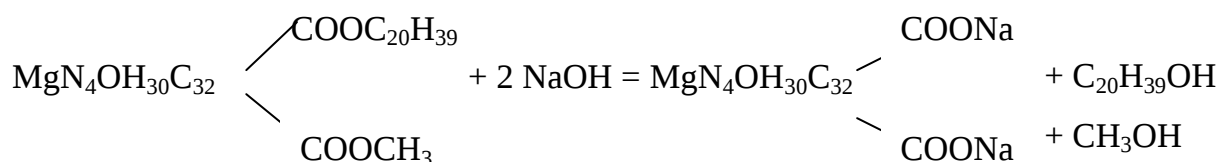
Если разделение пигментов происходит недостаточно четко, в пробирку надо добавить 1–2 капли воды и снова сильно встряхнуть ее. Избытка воды следует избегать, так как может произойти помутнение раствора.

Результат работы зафиксировать в виде рисунка.

В заключение следует дать объяснение различной растворимости пигментов в спирте и бензине.

3. Омыление хлорофилла щёлочью

Сложные эфиры способны к реакции со щелочью (реакция омыления), при этом их молекула расщепляется на кислоту и спирт. Из пигментов листа омыляется только хлорофилл, от молекулы которого под влиянием щелочи отщепляются метанол и фитол:



Образующаяся при омылении натриевая соль хлорофиллиновой кислоты сохраняет зеленую окраску, но приобретает гидрофильные свойства, а значит, и большее сродство к спирту. Желтые пигменты при действии щелочи не изменяют своей химической природы.

Ход работы: в пробирку с 2–3 мл вытяжки пигментов добавить 1–2 капли 20%-ного раствора NaOH. Пробирку нагреть на водяной бане до закипания в ней раствора. После охлаждения добавить в пробирку 2–3 мл бензина и 2–3 капли воды (для лучшего разделения смеси). Затем содержимое пробирки сильно встряхнуть и дать отстояться. В пробирке должны присутствовать два слоя: нижний (спиртовый), окрашенный в зеленый цвет; верхний (бензиновый), окрашенный в желтый цвет. В спиртовом слое растворены натриевая

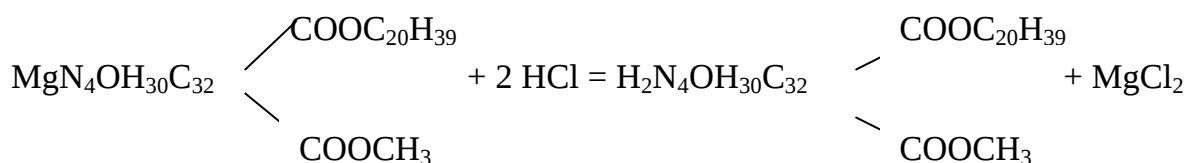
соль хлорофиллиновой кислоты и ксантофиллы, окраска которых маскируется хлорофиллом. В бензиновом слое растворен каротин.

В конце работы зарисовать картину разделения пигментов после омыления хлорофилла.

В заключение необходимо объяснить распределение окраски в спиртовом и бензиновом слоях.

4. Получение феофитина и обратное замещение водорода атомом металла

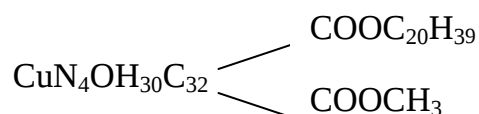
Хлорофилл относится к Mg-порфиринам. Главной частью его молекулы является порфириновое ядро, состоящее из четырех пиррольных колец. Их вершины с атомами азота направлены к центру порфиринового ядра и взаимодействуют с атомом магния, занимающим центральное положение. Магний в порфириновом ядре удерживается непрочно и при осторожном воздействии сильных кислот может быть замещен на два атома водорода. Водородзамещенный хлорофилл называется феофитином и имеет бурый цвет:



Водород феофитина можно заменить снова металлом, если подействовать солями меди или цинка; при этом восстанавливается зеленая окраска пигмента. Следовательно, цвет хлорофилла зависит от наличия металлорганической связи в молекуле.

Процесс феофитинизации часто наблюдается в природе и свидетельствует об увеличении проницаемости живых мембран, а значит, о повреждении и гибели клеток.

Ход работы: в две пробирки налить по 2–3 мл спиртового раствора пигментов и прибавить по одной-две капли 10%-ной соляной кислоты. Зеленая окраска раствора переходит в бурую, так как образовался феофитин. Одну пробирку оставить для контроля, во вторую внести небольшой кристаллик уксуснокислой меди и нагреть раствор на водяной бане до кипения. Бурый цвет раствора изменится на зеленый, так как произошло образование хлорофиллпроизводного меди:



В конце работы зарисовать картину разделения пигментов после омыления хлорофилла.

В заключение необходимо объяснить изменение окраски.

5. Спектр поглощения пигментов

Пигменты листа поглощают свет в пределах видимой части спектра от 400 до 700 нм, получившей название фотосинтетически активной радиации (ФАР). Для спектра хлорофилла *a* характерно наличие двух максимумов поглощения: в красной (680 нм) и сине-фиолетовой (430 нм) области. Желтые пигменты поглощают свет только в области сине-фиолетовых лучей.

Ход работы: для качественного определения спектра поглощения пигментов используется спектроскоп. Главный элемент спектроскопа – призма, разлагающая белый свет на составные цвета, которые видны в окуляр прибора. Если на пути светового потока поместить окрашенный раствор, то в зависимости от его оптических свойств отдельные участки спектра будут ослаблены, что свидетельствует об избирательном поглощении света.

Для наблюдения спектра поглощения зеленых пигментов на входную щель необходимо направить параллельный пучок белого цвета, перед входной щелью спектроскопа поместить пробирку (кювету) с экстрактом. Концентрация раствора не должна быть высокой, чтобы не допустить поглощения во всем видимом диапазоне.

Для наблюдения спектров поглощения каротина и ксантофиллов к щели прибора поднести пробирку, имеющую желтый бензиновый слой, содержащий каротин, или желтый спиртовой слой, в котором растворен ксантофилл.

В конце работы зарисовать спектры белого света и спектры поглощения хлорофиллов, каротина и ксантофиллов.

Для количественного определения спектра поглощения используют регистрирующие спектрофотометры.

6. Флуоресценция хлорофилла

Флуоресценция хлорофилла возникает при переходе электрона с возбужденного уровня S_1^* на основной уровень S_0 . Хлорофилл флуоресцирует в красной части спектра (максимум испускания 686 нм). Квантовый выход флуоресценции хлорофилла в растворе доходит до 30 %; у зеленых листьев, клеток водорослей или изолированных хлоропластов он гораздо ниже (1–3 %). Спектр возбуждения флуоресценции совпадает со спектром поглощения пигмента и характеризуется двумя максимумами в синей и красной области спектра.

Ход работы: пробирку с раствором хлорофилла рассмотреть в отраженном свете; при этом цвет раствора кажется темно-красным, бурым, коричневым. Другой способ наблюдения флуоресценции заключается в использовании двух светофильтров. Сине-зеленый светофильтр служит для выделения области возбуждающего света 400–620 нм, красный светофильтр выделяет область флуоресценции хлорофилла 680–710 нм. Для этого потребуются светонепроницаемая камера и источник белого света (рис. 8).

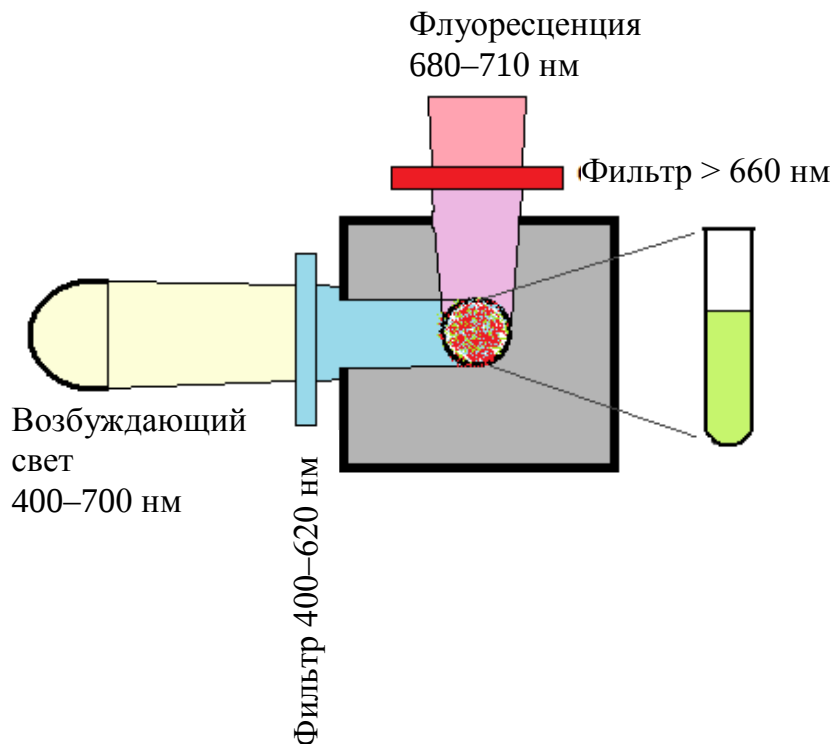
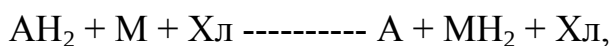


Рис. 8. Схема ячейки для наблюдения флуоресценции хлорофилла

В конце работы описать явление флуоресценции. По окончании всех этапов работы перечислить изученные химические и оптические свойства зеленых и желтых пигментов.

Задание 6.2. Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла на реакцию переноса водорода (по А. А. Гуревичу)

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



где АН₂ – аскорбиновая кислота; М – метиловый красный; МН₂ – лейкоформа метилового красного; Хл – хлорофилл.

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

Берут 4 пробирки. В 1-ю, 2-ю и 4-ю наливают по 1,5 мл спиртовой вытяжки пигментов, в 3-ю – такое же количество чистого спирта. Затем в 1-ю, 2-ю и 3-ю добавляют кристаллическую аскорбиновую кислоту и все пробирки хорошенько встряхивают, чтобы кислота растворилась до насыщения. Нерастворенная аскорбиновая кислота осядет на дно. После этого во все пробирки добавляют отфильтрованный спиртовой раствор метилового красного в таком количестве, чтобы зеленая окраска перешла в красную. Смесь встряхивают и первую пробирку помещают в темноту, а остальные – на свет. Пробирки освещают электрической лампой мощностью 200–300 Вт, расположенной на расстоянии примерно 15 см от пробирок. Для удаления тепловых инфракрасных лучей между лампой и пробирками помещают водный экран толщиной не менее 7–8 см.

Результаты работы оформляют в виде [табл. 20](#).

Таблица 20

Схема записи опыта

№	Вариант опыта	Окраска до световой экспозиции	Окраска после световой экспозиции
1.			
2.			
3.			
4.			

В выводе отмечают способность хлорофилла выступать в роли фотосенсибилизатора окислительно-восстановительной реакции переноса электрона от первичного донора к первичному акцептору.

Задание 6.3. Разделение фотосинтетических пигментов методом бумажной хроматографии

Разделение пигментов в настоящем задании основано на различной скорости их продвижения с растворителем. Это обусловлено различной адсорбцией пигментов на бумаге и частично – разной растворимостью в бензине и массой молекул. Эмпирическая формула хлорофилла *a* – $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$, хлорофилла *b* – $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$. Каротин ($C_{40}H_{56}$) имеет большое сродство с бензином. Ксантофиллы ($C_{40}H_{56}O_2$) лучше растворяются в этаноле, чем в бензине.

Ход работы: приготовить ацетоновую (или спиртовую) вытяжку из свежих листьев любых растений. Навеска растительного материала должна составлять 2–3 г, объем ацетонового экстракта – 25 мл (100%-ный ацетон).

Из хроматографической бумаги (ленинградской) вырезать полоску шириной 1,5–2,0 см, длиной 20 см. Держа полоску вертикально, опустить ее кончик на несколько секунд в вытяжку пигментов, налитую в бюкс. При

кратковременном погружении вытяжка поднимается по бумаге на 1–1,5 см. Затем бумагу высушить в токе воздуха и снова погрузить в раствор пигментов. Эту операцию повторить 5–7 раз, пока у верхней границы не образуется полоска ярко-зеленого цвета. После этого нижний конец хроматограммы опустить на несколько секунд в чистый ацетон, чтобы все пигменты поднялись на 1–1,5 см. Таким образом на бумаге получают окрашенную зону в виде зеленой полоски, где сконцентрирована смесь пигментов, которую необходимо разделить.

Хорошо высушенную хроматограмму (до исчезновения запаха ацетона) поместить в строго вертикальном положении в камеру, на дне которой находится чашка Петри с растворителем (смесь бензин:бензол – 1:2), так, чтобы растворитель не касался зоны пигментов. Камеру герметично закрыть. Через 10–15 мин растворитель поднимется на 10–12 см. Смесь пигментов при этом разделится на отдельные компоненты в виде полос, расположенных в следующем порядке: первый снизу – хлорофилл *b*, над ним – хлорофилл *a*, затем – ксантофилл (рис. 9). Каротин продвигается вместе с фронтом растворителя быстрее других компонентов, и зона его на бумаге располагается выше всех других пигментов.

Полученную хроматограмму зарисовать.

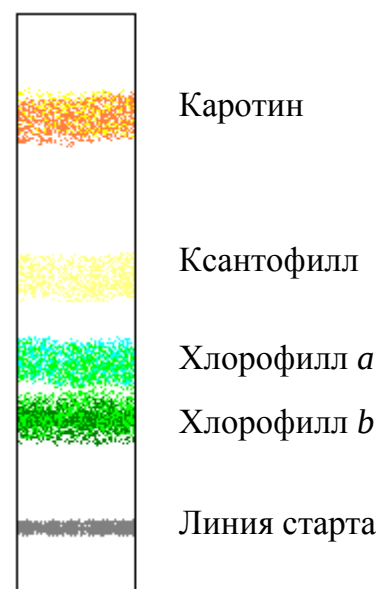


Рис. 9. Вид хроматограммы с разделенными пигментами

Задание 6.4. Определение количества хлорофилла в листьях колориметрическим методом

Количество хлорофилла в листьях растений подвергается значительным колебаниям, которые определяются внутренними особенностями (вид растения, возраст органа) и условиями внешней среды (интенсивность света, температура, минеральное питание и др.). Содержание зеленых пигментов и его динамика в растениях существенно влияют на интенсивность фотосинтеза и продуктивность организма. Поэтому в эксперименте часто ставят задачу учета количества хлорофилла, для чего применяют колориметры и спектрофотометры различных систем.

Ход работы: работа состоит из двух этапов: 1) получение спиртового экстракта пигментов; 2) определение его концентрации. Для приготовления раствора хлорофилла используют свежие листья растений. Величина навески зависит от количества хлорофилла в листе. При работе с интенсивно зелеными листьями достаточно 0,25–0,50 г; слабоокрашенных тканей брать в пробу 1 г и более. Навеску поместить в фарфоровую ступку и растереть пестиком

до однородной массы. Для лучшего измельчения тканей необходимо перед растиранием к навеске добавить немного кварцевого песка или битого стекла. Чтобы не произошло феофитинизации хлорофилла за счет эндогенных кислот, для нейтрализации последних добавить щепотку мела.

К растертой массе прилить небольшое количество этанола, снова тщательно растереть. Содержимое ступки количественно перенести на воронку с фильтром. Использовать фильтр с белой лентой. Его размер подбирать так, чтобы края фильтра не были выше краев воронки. Особое внимание обратить на аккуратное перенесение зеленой массы на фильтр. Эту операцию надо осуществлять без потерь, соблюдая следующие правила:

носик ступки с внешней стороны смазать тонким слоем вазелина;

переносить жидкость по стеклянной палочке;

ступку при сливании жидкости наклонять резко, а значит, порция спирта не должна приливаться больше той, что вместится в воронку за один прием.

Ступку и пестик ополаскивать небольшими порциями спирта и переносить его на фильтр до тех пор, пока не останется следов зеленых пигментов на ступке, пестике и фильтре. Фильтрат собрать в мерную колбу на 25–50 мл, после полного извлечения пигментов довести этанолом до метки, тщательно перемешать и использовать для количественного определения хлорофилла с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) или спектрофотометра.

Определение содержания хлорофилла на ФЭКе

Прежде чем определять оптическую плотность исследуемого раствора, измеряют плотность серии стандартных растворов со стандартной концентрацией. По результатам этих определений строится калибровочная кривая. При работе с хлорофиллом используют раствор Гетри в качестве стандартного раствора.

Раствор зеленых пигментов следует колориметрировать с красным светофильтром. Описание устройства прибора и работы на нем дано в дополнительной инструкции, прилагаемой к ФЭКу.

Таблица 21

Схема записи опыта

Объект	Навеска, г	Объем вытяжки, мл	Оптическая плотность раствора (D)	Концентрация хлорофилла (мг) в 1 мл раствора, определенная по калибровочному графику	Содержание хлорофилла в вытяжке, мг	Содержание хлорофилла в сыром веществе, %

По шкале прибора определите оптическую плотность раствора; по плотности на калибровочном графике найдите количество хлорофилла (мг) в 1 мл вытяжки. Зная навеску листьев и количество в ней хлорофилла, рассчитайте процентное содержание пигментов в свежих листьях.

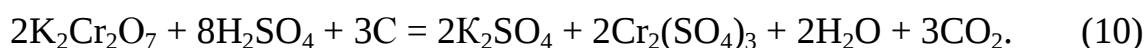
Лабораторная работа № 7. Определение интенсивности фотосинтеза

Цель работы: ознакомиться с основами экспериментального изучения интенсивности фотосинтеза у растений.

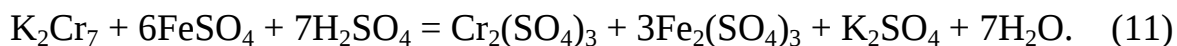
Задание 7.1. Определение интенсивности фотосинтеза по накоплению углерода в листьях

Интенсивность фотосинтеза можно определять по различным параметрам: по поглощению углекислого газа, по выделению кислорода, по накоплению органического вещества в процессе фотоассимиляции. Методы последней группы наиболее просты, не требуют сложных приборов и могут быть использованы в лабораторных и полевых условиях.

Для определения органического вещества в листьях растений по количеству содержащегося в них углерода был предложен метод Ф. З. Бородулиной, принцип которого был разработан ранее И. В. Тюриным для учета углерода в почве. Он основан на окислении органического вещества раствором калия двуххромовокислого в смеси с концентрированной серной кислотой (хромовой смесью). При взаимодействии с углеродом бихромат разрушается, реакция идет по следующему уравнению:



Израсходованный на окисление углерода бихромат оттитровывается раствором соли Мора:



Ход работы: для опыта использовать растения герани, предварительно выдержанные в темноте в течение суток для обеднения ассимилятами. У таких «голодных» растений на свету можно наблюдать более интенсивный фотосинтез.

Из листа герани пробочным сверлом высечь 3–4 диска. Лучше это сделать на одной половине листа. Высечки использовать для анализа на содержание в них углерода. Лист поместить черенком в воду, выставить на свет, выдержать в течение 1–2 ч, снова высечь 3–4 диска и определить в них коли-

чество углерода. Высечки до и после световой экспозиции следует брать одним и тем же сверлом с известным диаметром. Зная диаметр сверла, можно определить площадь высечек, взятых для анализа (πr^2 умножить на число дисков). Фотосинтез определять в двух-трех биологических повторностях, для чего до и после освещения листа при определении углерода брать 2–3 пробы. Это можно сделать на одном листе или использовать разные листья.

Чтобы определить углерод, диски из листьев нужно поместить в конические колбы на 100 мл. Туда же с помощью бюретки со стеклянным краном налить точно 10 мл 0,4 N раствора бихромата калия. Так как хромовая смесь является сильнейшим окислителем, то работать с ней надо очень осторожно.

Недопустимо отмеривать хромовую смесь пипеткой!

Колбы закрыть стеклянными воронками и поместить на электрическую плитку для ускорения реакции окисления органического вещества. Нагревание следует вести в течение строго определенного времени: 5 мин (по песочным часам). Отсчет времени начать с момента появления пузырьков углекислого газа около дисков. Нагревание должно быть умеренным. Нельзя допускать бурного кипения смеси и выделения паров из воронки. При перегреве смесь может разрушиться.

При 5-минутном слабом кипении высечки должны полностью раствориться, окислиться. Колбы снять с плитки и охладить. Воронки снаружи и изнутри ополоснуть небольшим количеством воды (около 10 мл). В колбу добавить 5–6 капель индикатора (фенилантраниловая кислота) и оттитровать содержимое 0,2 N раствором соли Мора. В присутствии хромовой смеси фенилантраниловая кислота дает бурую окраску раствора. По мере добавления соли Мора содержимое колбы светлеет, приобретает грязно-сиреневую окраску, которая от одной капли соли Мора может резко перейти в изумрудно-зеленую. Это конец титрования, важно его не пропустить, так как последующее прибавление соли Мора никаких изменений окраски не вызовет.

Иногда при титровании индикатор разрушается (особенно если раствор недостаточно охлажден). Поэтому целесообразно в середине титрования добавить еще 1–2 капли фенилантраниловой кислоты.

Параллельно с опытным титрованием провести контрольное (без высечек), чтобы найти соотношение 0,4 N раствора хромовой смеси и 0,2 N раствора соли Мора. Методика титрования та же самая. Количество углерода определить по формуле

$$C = \frac{0,6 \cdot 100k(a - b)}{S}, \quad (12)$$

где C – количество углерода, мг/дм²; a – количество соли Мора при контрольном титровании, мл; b – количество соли Мора при титровании опытного образца, мл; k – поправка к титру соли Мора (ее можно не учитывать, если

всю работу проводить с одним и тем же раствором соли Мора и бихромата); 0,6 – коэффициент пересчета количества соли Мора на количество углерода: 1 мл 0,2 N раствора соли Мора соответствует 0,6 мг углерода; S – площадь высечек, см^2 .

Результаты оформить в виде [табл. 22](#).

Таблица 22

Схема записи опыта

Момент взятия проб	По- втор- ность	Взято $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, мл		Пошло на тит- рование соли Мора, мл		Пло- щадь высе- чек, см^2	Коли- чество угле- рода, мг/дм^2	Накоп- ление углерода за 2 ч опыта, мг/дм^2	Интен- сивность фотосин- теза, $\text{мг С/дм}^2/\text{ч}$
		кон- троль	опыт	кон- троль	опыт				
До освеще- ния листа	1								
	2								
	ср.								
После освеще- ния лис- та	1								
	2								
	ср.								

По окончании работы рассчитать интенсивность фотосинтеза и сделать вывод.

РОСТ И ДВИЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ

Рост – это необратимое увеличение размеров, связанное с новообразованием протоплазмы, клеток, тканей и органов растений. Он осуществляется за счет работы меристем. У большинства растений линейный рост корней и стеблей происходит за счет деления меристематических клеток, расположенных на кончике корня и в верхушке стебля. Это апикальный рост. У злаков, гвоздичных и гречишных рост стебля в длину происходит за счет вставочных меристем, расположенных в узлах стебля. Это вставочный, или интеркалярный, рост.

Важную роль в регулировании роста играют физиологически активные вещества (фитогормоны) – регуляторы роста, стимулирующие или ингибирующие его. К ним относятся ауксины, гиббереллины, цитокинины и ингибиторы – фенольные соединения и абсцизовая кислота.

С ростом связана способность растений к движению, которое заключается в перемещении органов в пространстве под влиянием изменяющихся условий внешней среды. Движения подразделяются на тропические и настические. Тропизмы – это ориентированные ростовые движения отдельных органов растений в ответ на одностороннее воздействие внешнего раздражителя. Раздражителем может быть свет (фототропизмы), земное притяжение (геотропизмы), вода (гидротропизмы) и другие факторы внешней среды. Те органы, которые поворачиваются к источнику раздражения, проявляют положительный тропизм, при противоположной реакции – налицо отрицательный тропизм. Нاستии – движение органов с дорсо-вентральным строением в ответ на изменение диффузно действующих факторов, таких, как свет, температура и т. д.

Лабораторная работа № 8. Изучение ростовых процессов растений

Цель работы: знакомство с методами определения интенсивности роста и определения характера действия регуляторов роста.

Задание 8.1. Определение зоны роста стебля

Зону роста отдельного органа растения можно определить методом маркировки, который заключается в нанесении меток на изучаемый орган на равных расстояниях друг от друга. В процессе роста ткани расстояния между метками увеличиваются. Чем интенсивнее рост участка стебля, корня или листа, тем сильнее раздвигаются на нем метки.

Ход работы: на этиолированном стебле проростка подсолнечника, начиная от семядолей, нанести тушью 15–20 меток на расстоянии 2 мм друг от

друга. Маркированные проростки поместить в темноту при температуре 20°C. Через одни сутки замерить расстояния между метками.

Результаты измерений записать в тетрадь и по ним построить график: на оси абсцисс отложить порядковый номер метки, на оси ординат – прирост. На основании графика сделать вывод о расположении зоны наибольшего роста стебля.

Задание 8.2. Периодичность роста древесных побегов

Рост отдельного органа и всего растения происходит неравномерно. Сначала наблюдается медленный рост, потом он усиливается, достигает максимума, после чего снова замедляется и прекращается совсем.

Эта закономерность была открыта Саксом и получила название закона Сакса, или закона большого периода роста. Ее можно пронаблюдать, если измерить междоузлия древесного побега.

Ход работы: удобным объектом для наблюдения периодичности роста являются побеги бузины и клена остролистного, у которых супротивно расположены листья и четко заметны узлы, ограниченные междоузлиями.

С помощью линейки измерить у побега длину всех междоузлий. Особое внимание обратить на междоузлия у основания побега: здесь они часто бывают короткими, плохо заметными. Иногда подобное сближение узлов встречается и в средней части побега.

Результаты измерений записать в [табл. 23](#).

Таблица 23

Схема записи опыта

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

Построить график: на оси абсцисс отложить порядковые номера междоузлий, на оси ординат – длину междоузлий. Сделать вывод о периодичности роста побега.

Задание 8.3. Задерживающее и стимулирующее действие гетероауксина на рост

Гетероауксин, или β-индолилуксусная кислота, служит природным стимулятором роста, относящимся к группе ауксинов. Он встречается в тканях всех высших растений, регулируя рост, движения и корреляцию органов. Гетероауксин прост по химическому строению, поэтому синтезируется промышленным способом. В продажу поступает калиевая или натриевая соль гетероауксина. В практике растениеводства гетероауксин чаще всего применяют для стимулирования укоренения черенков и улучшения роста корневых систем.

Гетероауксин, как любой регулятор роста, в зависимости от концентрации раствора может не только активировать рост, но и задерживать или полностью приостанавливать его. С этим свойством гетероауксина мы и познакомимся.

Ход работы: опыт закладывают в чашках Петри, в пяти вариантах, отличающихся по концентрации гетероауксина. В качестве контроля используют воду. Дно и крышки чашек выстилают фильтровальной бумагой, на которой простым карандашом делают надписи с указанием исполнителя, даты закладки опыта и варианта. Надпись на фильтре, помещенном на дно чашки, надо расположить от стекла, на крышке – к стеклу. В каждую чашку Петри поместить по 20 зерен пшеницы и залить водой или растворами гетероауксина. В первую чашку налить цилиндром 9 мл водопроводной воды. Для более равномерного увлажнения среды прорастания семян жидкость сначала влить на крышку. Когда фильтр на крышке полностью увлажнится, остатки жидкости осторожно, т. е. без потерь, слить на донце чашки.

Для увлажнения второй чашки отмерить цилиндром 10 мл 0,01%-ного раствора гетероауксина, из которого пипеткой отобрать 9 мл и этим объемом смочить фильтры сначала на крышке, а потом на донце чашки. Оставшийся в цилиндре 1 мл раствора развести в 10 раз, то есть в цилиндр долить 9 мл водопроводной воды. Получится 10 мл 0,001%-ного раствора гетероауксина, из которого 9 мл использовать для увлажнения фильтров в третьей чашке Петри. Оставшийся в цилиндре 1 мл снова разбавить в 10 раз и т. д.

Закрытые чашки Петри поместить в термостат при температуре 20–25 °С в темноту. Через 3–5 дней у проростков пшеницы измерить длину всех корешков и coleoptилей. Результаты записать в тетрадь. Рассчитать среднюю длину корней и coleoptилей одного растения каждого варианта. Данные занести в [табл. 24](#).

Таблица 24

Схема записи опыта

Варианты опыта	Количество семян			Средняя длина проростка, см		Длина к контролю, %	
	проросших	наклюнувшихся	непроросших	корешков	coleoptиля	корешков	coleoptиля
Контроль, %							
0,01							
0,001							
0,0001							
0,00001							

Сделать вывод о влиянии растворов гетероауксина различной концентрации на рост проростков пшеницы.

Задание 8.4. Нарушение геотропизма корней эозином

Геотропизм – это движение органов растений под влиянием одностороннего действия силы земного тяготения. Стержневой корень обладает положительным геотропизмом, вертикальный стебель – отрицательным. Это свойство осевых органов растений может быть нарушено различными физическими и химическими факторами, влияющими на жизнедеятельность организмов. Так, геотропизм корней нарушается при обработке их эозином.

Ход работы: проросшие семена гороха с прямыми корешками длиной 1–1,5 см поместить в два стаканчика. В одном семена залить водопроводной водой, в другом – 0,05%-ным раствором эозина. Через час горошины вынуть и прикрепить к подставке из пробки или пенопласта таким образом, чтобы кончик корня находился в горизонтальной плоскости и несколько свисал над подставкой.

Чтобы проростки не высыхали, положить их на влажные полоски фильтровальной бумаги, концы которых опустить в поддоны с водой; подставки с проростками накрыть стеклянными колпаками.

Через 2–3 суток пронаблюдать, при каком варианте корешки дали геотропический изгиб.

Зарисовать результаты и сделать выводы.

Задание 8.5. Хемотропизм корней пшеницы

Хемотропизм – это движение органов растений под влиянием одностороннего действия химического раздражителя. Если орган поворачивается в сторону химического фактора, наблюдается положительный хемотропизм, если в противоположную – отрицательный. Предлагаемый опыт дает возможность пронаблюдать явление хемотропизма.

Ход работы: в чашки Петри налить 2%-ный раствор агар-агара. В него вставить три пробирки так, чтобы они не касались дна чашки. Когда агар-агар застынет, в пробирки налить горячей воды и свободно их вынуть. В агар-агаре образуются три лунки. Важно, чтобы стенки и дно лунок не имели трещин.

В каждую лунку налить соответствующий раствор: 0,1%-ный раствор NH_4NO_3 , 3%-ный раствор NH_4NO_3 и 1%-ный раствор формалина. На поверхность агара возле лунок поместить проростки пшеницы. Чашки Петри закрыть крышками и на 2–3 дня поместить в темное, теплое место.

В конце опыта пронаблюдать за характером и направлением корней и сделать выводы.

**Задание 8.6. Эпинастические и гипонастические изгибы листьев
под влиянием гетероауксина**

Настии (настические движения) могут быть связаны с неравномерным ростом морфологически противоположных сторон органа или с изменением тургора. Если более быстрый рост происходит на морфологически верхней стороне, то орган опускается вниз и движение называется эпинастией. Более быстрый рост морфологически нижней стороны приводит к подъему органа вверх, что называется гипонастией.

Ход работы: у двух листьев герани измерить угол отклонения черешков от стебля. У основания черешка одного листа нанести вазелиновую пасту с гетероауксином (20 мг гетероауксина на 1 г вазелина) на морфологически нижнюю сторону, у основания черенка другого листа – на верхнюю. Через 30–40 мин измерение углов повторить. Результаты записать в [табл. 25](#).

Таблица 25

Схема записи опыта

Паста нанесена	Угол отклонения листа		Изменение угла отклонения черешка от стебля в гр.	Тип движения
	до опыта	после опыта		
с верхней стороны черешка				
с нижней стороны черешка				

Сделать выводы о влиянии гетероауксина на настические движения.

УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ

В естественных условиях растения подвергаются действию целого комплекса внешних факторов, часть которых может отличаться от нормы и вызывать повреждения растений. Способность растений адаптироваться к неблагоприятным факторам среды, сохраняя стабильность всех физиологических процессов, называется устойчивостью растений. Чем меньше отклонение какого-либо процесса или реакции от нормы в результате воздействия экстремального фактора и чем быстрее идет возвращение к норме, тем выше устойчивость растений. Виды устойчивости различны: морозо- и жароустойчивость, засухоустойчивость, устойчивость к засолению почвы и загрязнению воздуха, радиоустойчивость и т. д. Механизмы достижения устойчивости различны и могут происходить как на генетическом, так и на физиолого-биохимическом и морфологическом уровне.

Важно знать устойчивость растений к тем или иным неблагоприятным факторам среды. Существуют различные методы определения устойчивости: полевые, вегетационные и лабораторные, прямые и косвенные. При работе по прямым методам растения подвергаются непосредственному воздействию неблагоприятного фактора. Косвенные методы дают представление о некоторых физиолого-биохимических свойствах растений, с которыми связана устойчивость организма.

В настоящий раздел включена работа, которую можно выполнить в лабораторных и полевых условиях.

Лабораторная работа № 9. Изучение устойчивости растений к неблагоприятным факторам

Цель работы: изучить устойчивость растений к воздействию некоторых факторов.

Задание 9.1. Защитное действие сахаров на протоплазму при отрицательных температурах

Повреждение тканей при замораживании растений связано с образованием льда как внутри клеток, так и снаружи. Внеклеточный лед вызывает дегидратацию клеток. Кристаллы внутриклеточного льда механически повреждают мембраны цитоплазмы. По теории Н. А. Максимова, накапливающиеся в тканях растений сахара могут оказывать защитное действие при замерзании. В этом можно убедиться, если замораживать кусочки столовой свеклы в дистиллированной воде и в растворах сахарозы. О гибели или повреждении тканей можно судить по увеличению проницаемости протоплазмы для клеточного сока.



Ход работы: в три пробирки поместить кусочки столовой свеклы, предварительно нарезанные и отмытые от вытекшего из поврежденных клеток сока. В первую пробирку залить дистиллированную воду, во вторую – 0,5 М раствор сахарозы, в третью – 1 М раствор сахарозы. Отмеченные этикетками пробирки поместить в смесь снега и поваренной соли и выдержать около 20 мин (до полного замерзания в них жидкости). После этого пробирки перенести в стакан с водой комнатной температуры для медленного оттаивания.

Определить оптическую плотность каждого раствора, используя фотоэлектроколориметр, при длине волны 490 нм.

При замерзании по интенсивности окрашивания раствора определить степень повреждения клеток.

Сделать вывод о роли сахаров в сохранении жизнеспособности клеток растительных тканей при замораживании.

Задание 9.2. Определение жароустойчивости по Ф. Ф. Мацкову

Метод основан на способности протоплазмы клеток до определенной степени противостоять действию повышенных температур. При некотором уровне температур, различном у разных растений, белки протоплазмы коагулируют, в силу чего нарушается проницаемость мембранных слоев и клетки отмирают.

При действии кислоты на листья, протоплазма которых лишена полупроницаемости, происходит феофитинизация, так как кислота легко проникает в клетки и вытесняет магний из молекул хлорофилла, заменяя его водородом.

Ход работы: в водяную баню, нагретую до 40 °С, погрузить листья растений, испытываемых на жароустойчивость. Температуру воды поддерживать на этом уровне. Через 30 мин взять первую пробу листьев, для чего их вынуть и погрузить в кристаллизатор с водой комнатной температуры. Температуру в бане поднять на 5 °С и через 10 мин взять вторую пробу листьев.

Так постепенно поднимать температуру воды в бане, пробы брать каждый раз при повышении температуры на 5 °С через 10 мин и помещать в кристаллизатор с водой. Затем воду в кристаллизаторах заменить соляной кислотой 0,2 N и через 20 мин учесть результаты.

Живые участки листа останутся зелеными, отмершие – побуреют. Различную степень повреждения определить по появлению на листьях большего или меньшего количества побуревших участков поврежденной ткани.

У растений, имеющих кислый клеточный сок, явление побурения (феофитинизация) происходит без добавления кислоты.

Итогом выполнения задания является критическая температура, выше которой растение не может противостоять действию высоких температур.

В заключение необходимо отметить критическую температуру для изучаемого вида растения. Полученные результаты представить в виде вывода.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Физиология растений : конспект лекций / В. М. Гольд, Н. А. Гаевский, Т. И. Голованова и др. – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – 148 с.
2. Физиология растений. Версия 1.0 [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс / В. М. Гольд, Н. А. Гаевский, Т. И. Голованова, Н. П. Белоног, Т. Б. Горбанева. – Электрон. дан. (180 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – (Физиология растений: УМКД № 165-2007 / рук. творч. коллектива В. М. Гольд). – 1 электрон. опт. диск (DVD). – Систем. требования : *Intel Pentium* (или аналогичный процессор других производителей) 1 ГГц ; 512 Мб оперативной памяти ; 180 Мб свободного дискового пространства ; привод *DVD* ; операционная система *Microsoft Windows 2000 SP 4 / XP SP 2 / Vista* (32 бит) ; *Adobe Reader 7.0* (или аналогичный продукт для чтения файлов формата *pdf*).
3. Малый практикум по физиологии растений / под ред. А. Т. Мокроносова. – 9-е изд., перераб. и доп. – М. : Изд-во Моск. ун-та, 1994. – 183 с.
4. Голованова, Т. И. Физиология растений : учеб. пособие с грифом СибРУМЦ / Т. И. Голованова, Н. П. Белоног, Т. Б. Горбанева. – Красноярск : КГУ, 2002. – 55 с.
5. Третьяков, Н. Н. Практикум по физиологии растений / Н. Н. Третьяков, Т. В. Карнаухов, Л. А. Паничкин [и др.] ; под общ. ред. Н. Н. Третьякова. – М. : Агропромиздат, 1990. – 271 с.
6. Физиология растений : учеб. программа дисциплины / сост. : В. М. Гольд, Н. А. Гаевский, Т. И. Голованова и др. – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – 30 с. – (Физиология растений : УМКД № 165-2007 / рук. творч. коллектива В. М. Гольд).
7. СТО 4.2-07–2008. Система менеджмента качества. Общие требования к построению, изложению и оформлению документов учебной и научной деятельности [Текст] / разработ. Т. В. Сильченко, Л. В. Белошапко, В. К. Младенцева, М. И. Губанова. – Введ. впервые 09.12.2008. – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – 47 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

1. К работе в лаборатории допускаются студенты, прошедшие инструктаж по технике безопасности.
2. Нужно работать в белом халате из хлопчатобумажной ткани и иметь личное полотенце.
3. На каждом занятии назначается дежурный, который отвечает за чистоту и порядок.
4. За каждым студентом закрепляется рабочее место, которое необходимо содержать в чистоте и порядке.
5. Запрещается держать в лаборатории пищевые продукты, принимать пищу, пить воду из химической посуды.
6. Перед работой следует проверить исправность нагревательных приборов, вентиляции, защитных средств. Ремонт оборудования может производить только инженер.
7. Запрещается работать с разбитой посудой, пользоваться реактивами из банок без этикеток.
8. Необходимо переливать приготовленные растворы в склянки с надписями. Нельзя оставлять без присмотра включенные приборы и электрооборудование.
9. Работать с летучими и ядовитыми веществами можно только под тягой.
10. Для отмеривания кислот, щелочей и ядовитых реактивов использовать цилиндры либо пипетки с резиновой грушей или ватным тампоном.
11. При работе с едкими веществами следует надевать предохранительные очки, резиновые перчатки и фартуки.
12. Кислые и щелочные реактивы в раковину можно сливать только после их нейтрализации.
13. Для нагревания горючих и летучих реактивов нужно пользоваться водяными банями. Их нельзя нагревать на открытом огне или вблизи пламени.
14. При внезапном отключении тока необходимо выключить все электроприборы.
15. Тушить огонь при загорании легковоспламеняющихся жидкостей нужно углекислотным огнетушителем, песком или кошмой.
16. При загорании проводов следует немедленно их обесточить, тушить огонь углекислотным огнетушителем или асбестовым покрывалом.
17. Работать с ртутными термометрами нужно очень осторожно.
18. После окончания работы привести в порядок рабочее место (убрать со стола реактивы и оборудование, из ящиков стола – мусор, стол вымыть, протереть сухой тряпкой) и сдать дежурному.