

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
ФГБОУ ВПО Иркутская государственная сельскохозяйственная академия

Кафедра Агроэкологии, агрохимии, физиологии и защиты растений

Илли И.Э.  
Назарова Г.Д.  
Клименко Н.Н.

## ***Физиология и биохимия растений***

***ПРАКТИКУМ  
К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ  
СТУДЕНТОВ АГРОНОМИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА  
направления 110400.62 «Агрономия»  
очной и заочной формы обучения***

УДК581.1+581.19[(076.5)]

И 442

Печатается по решению научно-методического совета ФГБОУ ВПО Иркутской государственной сельскохозяйственной академии

Протокол №

Практикум для лабораторных занятий со студентами 2-го курса агрономического факультета направления 110400.62 «Агрономия» очной и заочной формы обучения.

2-е издание, переработанное и дополненное

Составители: Илли И.Э., Назарова Г.Д., Клименко Н.Н.

Иркутск: ФГБОУ ВПО ИрГСХА, 2013г., 102 страницы

Практикум содержит различные методики по выполнению лабораторно-аналитических работ по предмету «Физиология и биохимия растений» для направления «Агрономия».

Рекомендуется в качестве дополнительного материала при проведении лабораторных занятий у студентов агрономического факультета.

Рецензенты:

д.с.-х.н., профессор кафедры Земледелия и растениеводства В.И. Солодун

к.б.н., доцент кафедры ботаники, плодородства и ландшафтной архитектуры, зав. лаб. НПЛ «Пшеница» ИрГСХА С.В. Половинкина

## История изучения растительной клетки

Клетка - это элементарная живая система, способная к самостоятельному существованию, самовоспроизведению и развитию, основа строения и жизнедеятельности всех животных и растений.

Клетки существуют и как самостоятельные организмы (простейшие или одноклеточные), и в составе многоклеточных организмов.

Изучение жизни на клеточном уровне лежит в основе современных биологических исследований.

Клетка впервые описана в 1665 году английским натуралистом Робертом Гуком и в течение всего XVII века утверждалось учение о клеточном строении живого. До конца XVII века появились работы Марчелло Мальпиги (по микроскопическому строению растений, насекомых, а также органов позвоночных — кожи, почек, легких), Ноэмии Грю (микроскопическое строение высших растений), Антония Левенгука (описание эритроцитов, ткани сердечной мышцы, одноклеточных организмов - простейших и бактерии, открытие сперматозоида и других. Открытия Левенгука положили начало таким отраслям биологии как гистология, протистология и эмбриология. Первые ученые-микроскописты XVII-XVIII вв. работали с сухими препаратами, пользовались микроскопами с увеличением в 270 раз. В это время главную роль приписывали клеточной оболочке, не придавая значения ее содержимому.

Систематическое изучение клетки началось в XIX веке. В начале века было описано превращение клеток в проводящие сосуды растений. Были открыты одноклеточные водоросли. Работы французского ученого Анри Мильн-Эдвардса, чешского ученого Яна Пуркине и других дали большой материал по микроскопической структуре животных тканей. Я. Пуркине принадлежит термин «протоплазма». В его лаборатории был сконструирован первый микротом (прибор для получения тонких срезов препарата, позволяющих увидеть мелкие детали строения ткани в проходящем свете). В 1831-1833 гг. английский ботаник Р. Броун описал ядро как составную часть клетки. Начинает складываться представление о ведущей роли содержимого клетки.

Обобщением прежних представлений и толчком для дальнейшего изучения клетки послужила клеточная теория М. Шлейдена и Т. Шванна, сформулированная в 1839 г. Суть ее сводится к следующим положениям:

1. Клетка - основная единица жизни.
2. Наличие клеток - общая структурная черта любой биологической организации.
3. Рост организма осуществляется путем клеткообразования.

С середины XIX века цитология начинает развиваться всё более интенсивно в тесной связи с развитием микроскопической техники. Начали применяться разные методы фиксации и окраски тканей, заливки и резки препаратов. С семидесятых годов микротом становится

общеупотребительным инструментом в большинстве биологических лабораторий.

В последней четверти XIX века один за другим были открыты основные структурные элементы клеточной морфологии - органоиды клетки.

В первые десятилетия XX в. исследовались функции отдельных органоидов, открытых в конце XIX в, и продолжалось описание частных органоидов специализированных клеток (И.К. Кольцов, 1903-1911 гг.).

В начале XX в. на стыке цитологии и генетики сформировалась новая наука - цитогенетика, предметом изучения которой являются структура, химическая организация, функции и поведение в клетке хромосом.

В 1902 г. У. Сеттоп и Г. Бовери предположили, что хромосомы являются носителями факторов наследственности - генов - и обеспечивают преемственность признаков в ряду поколений, а позднее Т.Г. Морган и ученые его школы создали хромосомную теорию наследственности. Цитогенетические исследования позволили изучить и классифицировать хромосомные перестройки, установить их генетические последствия Эти знания легли в основу разработки новых методов селекции растений (Т.Д. Карпеченко, 1927 г.) и положили начало изучению хромосомных болезней человека.

В шестидесятых годах получила развитие гипотеза Джона Гёрдена об избирательной активности генов как основе клеточной дифференцировки. Все эти исследования создали базу для развития генной и клеточной инженерии - науки об управлении наследственными свойствами организмов.

Микроскопическая техника с начала века продолжает совершенствоваться. Наряду со световыми микроскопами, дающими увеличение в 1500-2000 раз и имеющими разрешающую способность в 200-300 нм, начали использовать конденсор темного поля, флуоресцентное микроскопирование и микроскопирование в ультрафиолетовом свете. Эти методы стали впоследствии использовать для изучения химизма клетки. При работе с конденсором темного поля объект рассматривается при боковом освещении, благодаря чему видны частицы размером менее 0,2 мкм (как пылинки в луче света).

В двадцатых-тридцатых годах в цитологии начали применять методы биохимии и цитохимического анализа. Одни из первых опытов в этом направлении - проба Р. Фёльгена на обнаружение ДНК (1924 г.).

В 1934 г. американцы Ф. Уэнсли и М. Герр предложили метод фракционного центрифугирования клеточного гомогената. В пятидесятых годах двадцатого столетия произошел синтез цитологии с биохимией и биофизикой.

Использование электронного микроскопа с высочайшей разрешающей способностью до 0,5 нм и увеличением до  $2 \times 10^6$  раз

позволило создать картину субмикроскопической морфологии клетки, детально изучить структуры мембран, цитоскелета и других элементов клеточного строения.

Важнейшие открытия середины XX в. связаны с изучением структуры и биологической роли нуклеиновых кислот. До 1941г. считалось, что генетическую информацию несут хромосомные белки. После работ Освальда Эвери, показавшего генетическую роль ДНК, последовала серия экспериментов, подтвердивших этот вывод, и началось интенсивное изучение нуклеиновых кислот. Эти работы заложили основу концепции наследования генетической информации.

Блестящим достижением биологии XX в. было установление в 1953г. структуры ДНК. Это открытие по праву считается самым важным в биологии 20 века. За нею получили Нобелевскую премию Дж. Уотсон, Ф. Крик и М. Уилкинс.

В 1965 году была отмечена Нобелевской премией концепция оперона Франсуа Жакоба, Жана Моно и Андре Львова, объяснившая механизм генетической регуляции синтеза белка в клетке.

Особое место в истории изучения энергетических процессов на клеточном уровне занимает проблема фотосинтеза.

Фотосинтез - это образование зелёными растениями и фотосинтезирующими бактериями сложных органических веществ из простых соединений (углекислого газа и воды) за счет энергии света. Это один из важнейших биологических процессов, постоянно и в огромных масштабах происходящих на планете. Фотосинтез - единственный биологический процесс, который идёт с увеличением свободной энергии системы. Все остальные (за исключением хемосинтеза) осуществляются за счёт потенциальной энергии, запасённой в продуктах фотосинтеза.

Начало изучения процесса фотосинтеза относится к концу XVIII в. - началу XIX в. Работами Дж. Пристли, Ж. Сенебье, Т. де Соссюра, Я. Ингенхауза. Ю.Р. Майера было показано, что растения на свету усваивают углекислый газ, выделяют кислород и образуют в результате этого органические вещества, запасая в них энергию солнечного света.

В конце XIX в. К.Л. Тимирязев показал роль зеленого пигмента хлорофилла в этом процессе и зависимость фотосинтеза от интенсивности и спектрального состава света.

Физиологи изучают процесс, происходящие в растении, на всех уровнях организации. При изучении процесса на любом уровне нужно всегда помнить, что как в клетке, так и в целом организме все процессы взаимосвязаны. Изменение любого процесса отражается на жизнедеятельности всего организма. Сложность физиологических исследований состоит в том, что организм нельзя отделить от среды, в которой он живет, все физиологические процессы связаны с внешними условиями.

## ТЕМА 1. Физиология растительной клетки

Растительная клетка, равно как и клетка, любого организма, представляет собой открытую биологическую систему. Это означает, что она способна обмениваться с окружающей средой веществами (химическими строительными блоками), энергией и информацией. Эти функции выполняет биологическая мембрана. Наряду с этим на биологической мембране осуществляются практически все процессы, связанные с жизнедеятельностью клетки и организма в целом.

По этой причине мембрана окружает не только цитоплазму клетки, но и каждая органелла клетки (исключение рибосома) окружена в свою очередь своей собственной мембраной. Более того, мембраны составляют также внутреннюю структуру таких органелл, как хлоропласты и митохондрии, увеличивая тем самым поверхность, на которой происходят важнейшие процессы обмена веществ и энергии.

Каркас биологической мембраны состоит из двойного слоя фосфолипидных молекул. В него встроены молекулы функциональных белков, которые по своей специализации можно разделить на три группы: белки-ферменты, белки-переносчики и белки-рецепторы (рис.1).

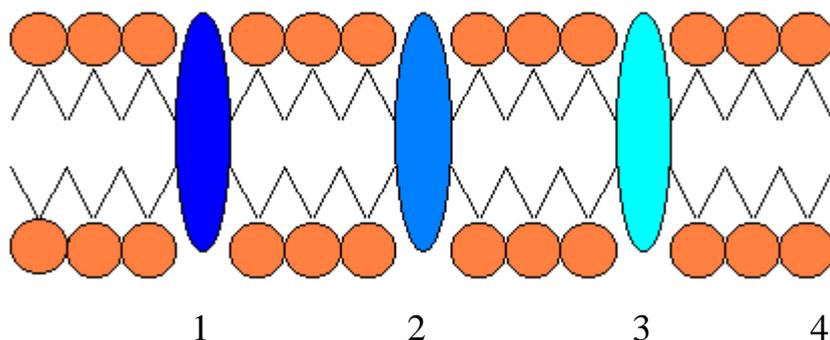


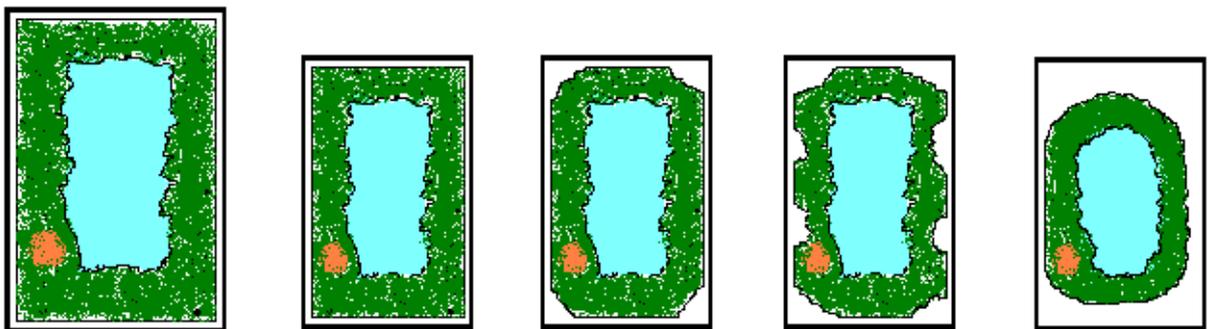
Рисунок 1. - Биологическая мембрана: 1,2,3-белки мембраны (ферменты, переносчики и рецепторы), 4- молекулы фосфолипидов.

Мембрана, окружающая цитоплазму клетки называется плазмалеммой, а вакуоль – тонопластом.

На лабораторных занятиях, посвященных этому разделу, представляется возможным экспериментально показать, что механизм прохождения молекул воды через мембрану растительной клетки принципиально отличен от механизма преодоления этого барьера молекулами органических веществ и ионами неорганических молекул. Наряду с этим все лабораторные работы этого раздела могут быть использованы в агрономической практике как приемы научного контроля водообеспеченности растений при поливном земледелии, а также для определения устойчивости растений к повреждающим воздействиям засухи, переувлажнения почвы, физиологически низкой либо высокой концентрации токсических веществ в воздухе или почве.

## Работа 1. Действие гипертонических растворов на цитоплазму клетки

**Вводные пояснения.** Гипертонические растворы солей хорошо проникают через наружную цитоплазматическую мембрану клетки - *плазмалемму*, в то время как вероятность их проникновения через *тонопласт* (мембрану вакуоли) ничтожно мала. Молекулы воды проходят через клеточную мембрану только в случае возникновения разности концентрации растворов веществ по обе стороны мембраны и поступать они будут на ту сторону поверхности мембраны, где концентрация веществ выше. Этот эффект можно продемонстрировать на опыте. Так, если ткань растения поместить в высококонцентрированный солевой раствор (*гипертонический*), то молекулы воды будут выходить из клеток в раствор до тех пор пока не возникнет ситуация выравнивания осмотического давления клеточного сока и внешнего раствора. В результате процесса обезвоживания клеточной цитоплазмы ее объем уменьшается и она, под действием клеточной мембраны (*плазмалеммы*), начинает отходить от клеточной оболочки к центру клетки. Этот процесс называется *плазмолизом* и его можно обнаружить под микроскопом (рис.1). Этот метод используется в практике орошаемого земледелия как показатель для определения начала очередного срока полива растений.



1 2 3 4 5

Рисунок 1. - Последовательные стадии плазмолиза: 1 - тургорисцентная клетка; 2 - общее сокращение размера клетки; 3- угловый плазмолиз; 4- вогнутый плазмолиз; 5- выпуклый плазмолиз.

**Объекты исследования.** Листья элодеи, листья других растений или лук.

**Реактивы.** Хлорид натрия (NaCl), дистиллированная вода.

**Оборудование.** Пинцет, стеклянная палочка, микроскоп, предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага, пробирки, пипетки, цветные карандаши.

### ***Последовательность выполнения работы.***

1. Приготовить гипертонический (1М) раствор NaCl.
2. На предметное стекло нанести по две капли воды (контроль) и на расстоянии приблизительно 2 см от них - две капли гипертонического раствора.
3. Листья элодеи либо другое исследуемое растение поместить в воду и раствор NaCl и накрыть их покровным стеклом.
4. Отметить время погружения исследуемых объектов в капли воды и раствора NaCl.
5. Препараты рассматривать под микроскопом вначале при малом, а затем при большом увеличении, наблюдая за изменениями, происходящими в клетках исследуемых объектов.

***Оформление работы.*** Зарисовать клетки с хорошо выраженным колпачковым плазмолизом.

***Выводы.*** Сделать выводы о свойстве цитоплазмы и ее мембран.

### ***Контрольные вопросы.***

1. Что такое осмос?
2. Что называется экзоосмосом и эндоосмосом?
3. Что такое плазмолиз и диплазмолиз? Выпуклый, вогнутый, уголкового плазмолиз?
4. Как поступает вода в растительные клетки?
5. Что такое плазмалемма, тонопласт, мезоплазма?
6. Назовите причины возникновения различных видов плазмолиза: выпуклого, вогнутого и уголкового.
7. Для каких целей используется метод выполненной работы в сельскохозяйственной практике?

## Работа 2. Определение водного потенциала клеток растений методом плазмолиза

**Вводные пояснения.** Клеточный сок представляет собой водный раствор различных органических и неорганических веществ цитоплазмы и вакуоли. Концентрация этих веществ определяет потенциальное осмотическое давление клетки и выражает максимальную возможность ее всасывать воду из окружающей среды. Чем выше концентрация веществ в клетке, тем больше ее всасывающая сила и, следовательно, такие растения являются более засухоустойчивыми.

Сущность предлагаемого метода заключается в том, чтобы определить изотонический раствор. Это такой раствор, при котором осмотическое давление клеточного сока примерно равно осмотическому давлению внешнего раствора. Концентрация изотонического раствора будет находиться между концентрацией гипертонического раствора, вызывающего уголкоый плазмолиз не менее чем у 50% клеток исследуемой ткани растений и концентрацией следующего (более слабого) раствора, что соответствует концентрации среднего арифметического между концентрациями указанных соседних растворов. Потенциальное осмотическое давление клеточного сока используется в практике орошаемого земледелия.

**Объекты исследования.** Высечки листьев различных видов растений или лук.

**Реактивы.** Хлорид натрия (NaCl), дистиллированная вода.

**Оборудование.** Микроскоп, предметные и покровные стекла, часовое стекло, бюксы, пипетки, стеклянная палочка, фильтровальная бумага, карандаш по стеклу, стакан, термометр, сверло для пробок, цветные карандаши.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 1М раствор хлорида натрия (NaCl).
2. В соответствии с вариантами разведения приготовить в бюксах по 10 мл раствора NaCl с концентрацией от 0 до 1.0 моль/л (табл.1).
3. Бюксы тщательно взболтать и закрыть крышками для того, чтобы предотвратить испарение.
4. С помощью сверла для пробок приготовить высечки (диски) из листьев из расчета по две высечки на исследуемый вариант опыта. Высечки необходимо делать из ткани листьев, расположенной между жилками.
5. Высечки поместить в кипяченую воду (на часовое стекло), чтобы удалить пузырьки воздуха. При погружении высечек в воду (наряду с удалением пузырьков воздуха) из поврежденных клеток вытекает сок, в результате чего достигается одинаковое состояние всех срезов.
6. Через (2-3) мин высечки извлечь из воды и обсушить фильтровальной бумагой.

Таблица 1. - Приготовление различных концентраций раствора NaCl

Концентрация исследуемого раствора, моль / л	На 10 мл раствора	
	1 М раствора NaCl, мл	воды, мл
0.0	0	10
0.1	1	9
0.2	2	8
0.3	3	7
0.4	4	6
0.5	5	5
0.6	6	4
0.7	7	3
0.8	8	2
0.9	9	1
1.0	10	0

7. Затем в каждый раствор, начиная с наиболее концентрированного, погрузить по 2 диска с интервалом в 3-5 мин (в случае всплывания диска его необходимо стеклянной палочкой вновь погрузить в раствор).
8. Через 20-30 мин диски рассмотреть под микроскопом в капле соответствующего раствора в последовательности, аналогичной погружению. Стеклянную палочку и предметное стекло перед внесением каждого последующего диска необходимо промывать водой и тщательно обсушивать фильтровальной бумагой.
9. Определить изотоническую концентрацию и рассчитать осмотическое давление клеточного сока по уравнению Вант – Гоффа:

$$P=101,3 R T C i, \text{ где}$$

P – осмотическое давление, кПА;

101,3 – множитель для перевода атмосферного давления в килопаскалы;

R – универсальная газовая постоянная (0.00831 кДж / град .моль);

T – абсолютная температура по Кельвину ( $273^0 + t^0C$ );

t – температура проведения эксперимента;

C – изотоническая концентрация, моль/ л;

i – изотонический коэффициент, показывающий отношение числа частиц (молекул и ионов) в растворе к исходному количеству молекул растворенного вещества. Значения i для растворов NaCl приведены ниже:

Концентрация NaCl, моль / л	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0
Изотонический коэффициент	1.62	1.63	1.64	1.66	1.68	1.70	1.73	1.75	1.78	1.83	-

**Оформление работы.** Результаты эксперимента оформить в виде таблицы и рисунка одной клетки для каждого из его вариантов. В таблице 2 отметить состояние большинства клеток диска: сильный плазмолиз, слабый плазмолиз, уголковый плазмолиз или отсутствие плазмолиза.

Таблица 2. - Потенциальное осмотическое давление клеточного сока у листьев \_\_\_\_\_  
(название растения)

Концентрация раствора, моль / л	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0
Степень плазмолиза											
Рисунок клетки											

**Примечание.** Для вычисления осмотического давления в атмосферах можно воспользоваться соотношением:  $1 \text{ мПа} = 10^6 \text{ Па} = 9,87 \text{ атм.}$  Осмотическое давление клеточного сока можно вычислить в атмосферах исходя также из положения, что осмотическое давление 1М раствора NaCl равно 33,6 атм.

**Расчет осмотического давления клеточного сока.**

**Выводы:** Сделать выводы о зависимости степени плазмолиза клеток исследуемого растения от концентрации внешнего раствора. Для клеток этого же растения определить изотоническую концентрацию.

**Контрольные вопросы.**

1. Дайте определение понятию «осмотическое давление».
2. Какое значение имеет осмотическое давление в жизни растений?
3. Какая концентрация называется гипертонической, изотонической и гипотонической?

### **Работа 3. Определение водного потенциала клеток растений по изменению концентрации растворов (метод Шардакова)**

**Вводные пояснения.** Силу, с которой клетка способна поглотить воду, ранее принято было называть сосущей силой клетки. Сосущая сила растительной клетки равна разности между осмотическим давлением клеточного сока ( $\pi$ ) и тургорным противодействием клеточной стенки ( $P$ ):

$$S = \pi - P, \text{ где}$$

$S$  – сосущая сила растительной клетки,

$\pi$  – осмотическое давление клеточного сока

$P$  – тургорное противодействие клеточной стенки.

Осмотическое давление клеточного сока рассчитывают по уравнению Вант-Гоффа (см. работу №2).

В настоящее время в физиологии растений используют термодинамический показатель – водный потенциал  $\Psi$ , отражающий способность  $H_2O$  испаряться или диффундировать. Водный потенциал для чистой  $H_2O$  принять за нуль ( $H_2O = 0$ ), а для любого раствора он меньше нуля.

Водный потенциал клеток растений можно определить не только по методу указанному в работе 2, но и на основе окрашенных растворов. Метод основан на том, что если в приготовленный солевой раствор опустить ткань растения, то концентрация раствора изменится, так как, в зависимости от концентрации веществ в клетках ткани вода из клеток будет выходить в раствор, понижая его концентрацию, либо входить в клетку – повышая концентрацию раствора. В изотоническом растворе концентрация не изменится. Этот метод также как и в работе 2 можно использовать как показатель засухоустойчивости растений.

**Объекты исследования.** Листья различных видов растений.

**Реактивы.** Сахароза ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), метиленовая синь.

**Оборудование.** Пробочное сверло (диаметр 0,9см), штатив, пробирки на 10 и 2 мл, пипетки на 0,5 и 10 мл, пипетки с капиллярным концом в 1мм, карандаш по стеклу, фильтрованная бумага, термометр.

**Последовательность выполнения работы.**

1. В штативе расставить в два ряда тщательно вымытые пробирки объемом на 10 и 2 мл. Количество пробирок каждого ряда соответствует количеству вариантов опыта.
2. По схеме, приведенной в работе 2, приготовить по 10 мл растворов сахарозы следующих концентраций (моль на л): 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1, смешивая соответствующие количества молярного раствора сахарозы и дистиллированной воды.

3. После тщательного перемешивания отлить в маленькие пробирки по 0,5 – 1 мл приготовленных растворов и пробирки с исходными растворами закрыть пробками.
4. Вырезать острым пробочным сверлом диски из листьев недалеко от средней жилки, не захватывая по возможности крупных жилок ( для этого повернуть листья нижней стороной вверх и подложить под листья пробку).
5. Разложить по три диска в маленькие пробирки, закрыв их пробками. Выдержать диски в растворах 30 – 40 мин, время от времени встряхивая пробирки и следя затем, чтобы диски были все время погружены в растворы.
6. По истечении указанного времени вынуть пробы листьев из растворов препаровальной иглой и закрыть пробирки пробками.
7. Определить изменение концентрации растворов после пребывания в них дисков из листьев.
8. Перед определением подкрасить растворы, для чего внести в маленькие пробирки по кристаллику метиленовой сини на кончике препаровальной иглы.
9. Встряхнув содержимое пробирок, набрать окрашенную жидкость в пипетку с оттянутым в капилляр концом и опустить в соответствующую пробирку с раствором исходной концентрации так, чтобы нижний конец пипетки был погружен в раствор на 2 – 3 см. Каждый раствор следует брать чистой сухой пипеткой.
10. Медленно выпуская раствор, проследить за направлением струйки окрашенной жидкости. Движение струйки вверх указывает, что концентрация раствора уменьшилась, а вниз – свидетельствует об увеличении концентрации раствора. Если струйка останется на месте, то, следовательно, плотность раствора не изменилась.

**Оформление работы.** Полученные результаты записывают в таблицу.

Таблица 1. - Водный потенциал растений различных видов

Объект исследования	Вариант (сахароза, моль/л)	На 10 мл		Осмотическое давление сахарозы при 20°C, кПа	Направление движения струйки	Водный потенциал при изотонической концентрации раствора, кПа
		1 М раствора сахарозы, мл	воды, мл			
	0,1	1	9	0,263		
	0,2	2	8	0,537		
	0,3	3	7	0,821		
	0,4	4	6	1,125		
	0,5	5	5	1,449		

***Примечание.***

1. мПа =  $10^6$  Па = 9,87 атм.;

100 300 – множитель для перевода атмосфер в Па;

101,3 в кПа; 0,1013 – в мПа.

2. Для определения водного потенциала клеток растений возможно использование и солевых растворов (NaCl). Однако при этом следует иметь информацию об осмотическом давлении используемых растворов при температуре проведения эксперимента.

***Выводы.*** Сделать выводы о причине изменения концентрации растворов и водном потенциале клеток. Сравнить величину водного потенциала у различных видов растений.

***Контрольные вопросы.***

1. Дайте определение понятию «сосущая сила клетки».
2. От чего зависит величина сосущей силы клетки?
3. На чем основано определение сосущей силы клеток по методу Шардакова?
4. Какое значение имеет сосущая сила клеток тканей в жизни растений?
5. Для каких целей в агрономической практике используется метод Шардакова?

## Работа 4. Диагностика повреждения растительной ткани по увеличению ее проницаемости

**Вводные пояснения.** Белки–переносчики расположены на мембранах и регулируют обмен веществ между всеми ультраструктурами клетки и окружающей средой. Если структура белков нарушается, то вещества выходят из клетки в окружающую среду. В природе нарушение структуры белков происходит при действии на растения засухи, высокой температуры или различных токсических веществ. В агрономической практике в основе всех методов определения устойчивости растений к повреждающему действию упомянутых факторов лежит способ определения интенсивности выхода веществ из растительных тканей.

**Объекты исследования.** Корнеплод красной столовой свеклы.

**Реактивы.** Водопроводная вода, уксусная кислота ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), этанол ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ).

**Оборудование.** Сверло для пробок, линейка, скальпель, пинцет, фарфоровая чашка, тарелка, штатив, пробирки на 10 мл, карандаш по стеклу, пипетки, химический стакан, держатель для пробирок, спички, спиртовка.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 30%-ный раствор уксусной кислоты и 50 %-ный раствор этилового спирта.
2. Из очищенного корнеплода красной свеклы взять сверлом, диаметр которого составляет 0.7-0.8 см, куски свеклы цилиндрической формы.
3. Из свекольных цилиндров, используя линейку, нарезать диски толщиной 0.5 см.
4. Диски поместить в фарфоровую чашку и тщательно промыть под струей водопроводной воды с целью удаления выделившихся из поврежденных клеток красящих веществ (основное красящее вещество свеклы антоциан).
5. В две пробирки налить воду комнатной температуры, в третью - этанол, а в четвертую – уксусную кислоту. Объем воды и растворов во всех пробирках должен быть равным и составлять 10 мл.
6. Два диска поместить в пробирку с водой (объем воды составляет 2/3 объема пробирки) и прокипятить на спиртовке в течение 2 мин.
7. Прокипяченные диски перенести во вторую пробирку с водой комнатной температуры.
8. В первую, третью и четвертую пробирки также поместить по два диска.
9. Через 30 - 60 мин после начала экспозиции все пробирки интенсивно встряхнуть и диски извлечь из растворов.
10. Визуально (или использовать фотоэлектроколориметр) сравнить интенсивность окрашивания растворов, и также визуально отметить интенсивность обесцвечивания дисков.

**Оформление работы.** Данные, полученные в эксперименте занести в таблицу.

Таблица 1. - Интенсивность окрашивания экстрагирующих растворов и обесцвечивания дисков свеклы после экстракции

Критерий	Экстрагирующий раствор			
	Водопроводная вода (контроль)	Кипящая (в течение 2 мин) вода	50 %-ный этанол	30%-ная уксусная кислота
Интенсивность окрашивания растворов				
Интенсивность обесцвечивания дисков				

Для оценки интенсивности окрашивания экстрагирующих растворов и степени обесцвечивания дисков использовать знаки «+» или « - ». Наиболее окрашенный раствор или наименее обесцвеченный диск оцениваются «++++», а затем количество знаков последовательно уменьшается в соответствии со снижением интенсивности окрашивания растворов или увеличением обесцвечивания дисков.

**Выводы.** На основании полученных в эксперименте данных сделать выводы о не специфичности ответной реакции клетки на воздействие повреждающих факторов внешней среды. Обсудить степень воздействия каждого повреждающего фактора на уровне структуры мембран цитоплазмы.

### **Контрольные вопросы.**

1. На чем основан механизм избирательной проницаемости веществ в растительную клетку?
2. Какие из использованных в опыте веществ оказались наиболее токсичными?
3. Какой пигмент окрашивает вакуоль столовой свеклы?
4. Для какой цели используется метод данной работы в агрономической практике?

## **Работа 5. Определение жизнеспособности семян по окрашиванию цитоплазмы**

**Вводные пояснения.** Плазмалемма жизнеспособной клетки, благодаря белкам переносчикам, обладает уникальным свойством регуляции поступления воды и различных веществ в цитоплазму. Однако, у нежизнеспособной клетки или клетки, находящейся в состоянии покоя (первичного или вторичного), эта регуляция в первом случае отсутствует, а во втором весьма ограничена. На этом свойстве мембран цитоплазмы и основан метод определения жизнеспособности семян по окрашиванию их тканей красителями, не оказывающими негативного действия на белки мембран.

В опыте работы 4 было показано, что при нарушении структуры белков – переносчиков вещества бесконтрольно выходят из клетки во внешнюю среду. В работе 5 показано, что в этом случае вещества также беспрепятственно могут из внешней среды пройти во внутрь клетки. Этот эффект широко используется в агрономической практике для определения жизнеспособности семян. При проведении опыта хорошо видно, что молекулы раствора органического красителя легко проникают в мертвые ткани семени. Обратите внимание на то, что эндосперм даже у жизнеспособных семян злаков окрашивается. Это значит, что у злаков эндосперм так переполнен запасными веществами, что клетки его отмирают, живым остается только зародыш и наружный слой клеток эндосперма – *алейроновый слой*.

**Объекты исследования.** Семена гороха и пшеницы.

**Реактивы.** Дистиллированная вода, 0.1% раствор индиго – кармина, 0.2% раствор кислого фуксина.

**Оборудование.**

Растильня, фильтровальная бумага, пинцет, скальпель (или бритва), фарфоровая чашка, препаровальная игла, химический стакан, карандаш по стеклу.

**Метод Иванова.** Этим методом устанавливают жизнеспособность семян пшеницы.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 0,1 или 0,2%-ный раствор индиго – кармина или 0,2%-ный раствор кислого фуксина.
2. Зерновки пшеницы замочить предварительно в воде в течение 10 час при комнатной температуре.
3. Десять зерновок пшеницы разрезать вдоль бороздки пополам (желательно две половинки зерновки до конца не разделять).
4. Подготовленные таким образом к окрашиванию зерновки поместить в бюкс с одним из красителей (для достоверности получения результатов вторую партию зерновок можно поместить в бюкс со вторым

- красителем).
5. Зерновки в красителе выдержать в течение 15 мин.
  6. По истечению экспозиции раствор красителя осторожно слить, а семена пшеницы тщательно промыть под струей водопроводной воды.
  7. Промытые зерновки пшеницы разложить пинцетом на фильтровальной бумаге и определить жизнеспособность семян. У жизнеспособных семян (в том числе и у находящихся в покое) зародыши не окрашиваются, а у нежизнеспособных или сильно поврежденных семян зародыши в большей или меньшей степени окрашены. Эндосперм зерновок у жизнеспособных и нежизнеспособных семян окрашен.

**Оформление работы.** Результаты эксперимента оформить в виде таблицы. Зарисовать жизнеспособные и нежизнеспособные семена.

Таблица 1. - Жизнеспособность семян пшеницы сорта \_\_\_\_\_

Визуальный анализ семени	Семена		%(название) % жизнеспособных семян от общего количества
	жизнеспособные	нежизнеспособные	
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
Всего			

Для определения жизнеспособности семян использовать знаки: «+» (жизнеспособные семена) и «-» (нежизнеспособные семена).

**Выводы:** На основании данных, полученных в эксперименте, сделать, выводы, соответствующие его результатам.

**Метод Нелюбова:** Метод позволяет устанавливать жизнеспособность у семян тыквенных, конопляных и бобовых культур.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 0,2%-ный раствор индиго – кармина.
2. Семена гороха предварительно замочить в воде в течение 18 час при 20°.
3. У десяти набухших семян гороха осторожно снять семенную оболочку.

4. Освобожденные от семенной оболочки семена гороха поместить в бюкс с (предварительно налитым) 0.2% - ным раствором индиго – кармина.
5. Семена выдержать в красителе в течение 2-3 час при 30 °.
6. По окончании экспозиции раствор красителя осторожно слить, а семена тщательно промыть под струей водопроводной воды.
7. Семена гороха разложить в фарфоровой чашке на фильтровальную бумагу и определить их жизнеспособность. К жизнеспособным следует отнести семена с неокрашенными корешками и слабо окрашенными семядолями. Семена с полностью окрашенными корешками и семядолями – нежизнеспособные.

**Оформление работы.** Результаты работы оформить в виде таблицы.

Таблица 2. - Жизнеспособность семян гороха сорта \_\_\_\_\_.  
(название)

Визуальный анализ семени	Семена		% жизнеспособных семян от общего количества
	жизнеспособные	нежизнеспособные	
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
Всего			

Для определения жизнеспособности семян использовать знаки: «+» (жизнеспособные семена) и «-» (нежизнеспособные семена).

**Выводы.** По результатам проведенного эксперимента сделать выводы о жизнеспособности семян сорта (партии).

**Контрольные вопросы.**

1. Как в живой клетке регулируется поступление воды и различных веществ в цитоплазму?
2. На чем основано определение жизнеспособности семян по методам Нелюбова и Иванова?
3. Какие семена можно считать жизнеспособными и какие нежизнеспособными?
4. Описать строение клеточной мембраны?

## **ТЕМА 2. Обмен веществ**

Живая система (биосистема) может существовать лишь благодаря тому, что постоянно обменивается с окружающей средой энергией и химическими элементами. Наряду с этим живая система существует благодаря наличию в ней различных органических молекул, которые создают структуру этой системы и функционируют как средство обмена различных веществ. Все они относятся к тому или иному классу веществ и являются производными этих классов. В целом органическая система функционирует на основе веществ, относящихся к четырем классам: углеводам, жирам, белкам и нуклеиновым кислотам. Эти классы веществ в процессе жизнедеятельности (метаболизма) организма постоянно обновляются, и это осуществляется за счет их взаимопревращения.

### **Углеводы**

Углеводы очень широко распространены в живых системах. Если взять биомассу в биосфере, то углеводы составляют в среднем 90% от сухого вещества и лишь 10% приходится на белки, жиры и нуклеиновые кислоты. В растениях углеводы распространены значительно шире, чем у животных и микроорганизмов. Это обусловлено двумя обстоятельствами:

1. Растения единственные организмы, которые в широких масштабах из неорганических веществ сами синтезируют углеводы заново. В этой связи растения никогда не испытывают недостатка в углеводах и тем самым широко используют их для различных целей жизнедеятельности.

2. Растения ведут прикрепленный образ жизни, и не имеют скелета, что вынуждает их каждую клетку облачать в оболочку. Оболочка клетки состоит из целлюлозы (углевод).

Наряду с этим все растения, где бы они ни произрастали, имеют период покоя. Для выхода из этого состояния им нужны запасы энергии и веществ. Растения их откладывают в виде углеводов.

### **Липиды**

Любой жир, который накапливается в организме растений или животных, представляет собой смесь различных жировых молекул. Обычно жиры делят на твердые жиры и жидкие. Если в углеводородной цепи имеются ненасыщенные связи, то такие жиры жидкие, а если ненасыщенных связей мало, то такие жиры имеют твердую консистенцию. Необходимо помнить, что как в жидких, так и в твердых жирах присутствуют те и другие молекулы. Все зависит от их соотношения. В растениях преимущественно накапливаются жидкие жиры. Однако у растений тропических зон, где температура среды высокая, накапливается больше твердых жиров.

Молекулы жира в организме растений используются, прежде всего, в метаболическом обороте для получения энергии. Известно, что в каждой молекуле жира заключено в два раза больше энергии, чем в молекуле глюкозы (углеводов) и в три раза больше, чем в молекулах белков.

Запасающую роль жиров следует рассматривать в нескольких аспектах: с одной стороны - роль запасов жира для материнского растения в период активного роста, а с другой - роль запасов жира для материнского растения в период покоя и, наконец – роль запасов жира для дочерних растений (семян).

Структурная роль жиров заключается, прежде всего, в том, что они в большом количестве используются для образования мембран, а также для образования различных восков, предотвращающих испарение воды с листьев, стеблей, а, иногда, и с поверхности семян. Кроме того воска предотвращают проникновение патогенных микроорганизмов внутрь растения.

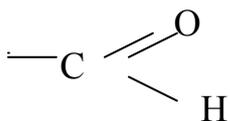
## **Белки**

Белки, как и липиды, и нуклеиновые кислоты служат химической основой жизненных процессов. Белки выполняют не только метаболическую функцию в организме растений и животных, но в растениях им присуща еще и запасающая функция. У растений белки откладываются в запас в семенах, при прорастании которых отложенный в запас белок необходим прорастающему зародышу для синтеза новых белков. Обычно в семенах содержится в среднем 9 – 12% белка. У современных культурных злаков содержание белка в зерне составляет 17 – 20% , а в семенах культурных бобовых содержится 20 –40% белка. Наряду с этим запасные белки откладывается в почках зимующих древесных растений и в корневой шейке многолетних растений.

Белки в растениях не играют широкой структурной роли как углеводы и жиры. Это связано с тем, что растения в отличие от других организмов очень экономно относятся к азоту. По этой причине они экономно относятся и к белкам. Это обусловлено тем, что растения не могут усваивать азот из воздуха в молекулярном виде. Структуры, состоящие из белков, в чистом виде в растениях не существуют. Структурные единственные чисто белковые конструкции – это белки мембран, задачей которых является фиксировать на мембранах функциональные белки специального назначения: белки – переносчики, белки – ферменты и белки – рецепторы.

## Работа 6. Изучение свойств моно-, ди- и полисахаридов

**Вводные пояснения.** Углеводы в растениях находятся в виде мономеров (глюкоза, фруктоза, пентоза и триоза) и в виде полимеров (крахмал, целлюлоза и гемицеллюлоза). Все моносахариды, а также дисахариды благодаря присутствию альдегидной или кетонной группы являются редуцирующими, т.е. обладают восстанавливающими свойствами.



Альдегидная группа



Кетонная группа

Большинство химических методов определения редуцирующих сахаридов основано на легкой окисляемости их, и способности восстанавливать различные соединения. Наиболее распространенный метод определения сахаров – это метод Бертрана. Для анализа используется реактив Фелинга – смесь медного купороса с сегнетовой солью в щелочной среде.

### **Приготовление реактива Фелинга.**

1. Приготовить раствор сегнетовой соли ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{K} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) из расчета 200 г соли на 1 л дистиллированной воды.
2. Приготовить щелочной раствор (KOH или NaOH) из расчета 150 г щелочи на 1 л дистиллированной воды.
3. Приготовить 4%-ный раствор медного купороса ( $\text{CuSO}_4$ ).
4. Приготовленные растворы (1 + 2 + 3) перед определением моносахаров смешать в равных количествах.

### **Приготовить раствор йода в йодистом калии.**

Для этого растворить 2 г KI в 5 мл дистиллированной воды, добавить 1 г металлического йода и после полного растворения последнего прилить 295 мл дистиллированной воды. Хранить реактив в темной склянке с притертой пробкой.

**Объекты исследования.** Морковь (корнеплод), сахарная свекла (корнеплод) или сахар, ячмень (солод из пророщенных семян), картофель.

**Реактивы.** Реактив Фелинга; соляная кислота (HCl) 20% - ный раствор; карбонат натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) – порошок; раствор йода в йодистом калии.

**Оборудование.** Чашка Петри (3 шт.), скальпель (3 шт.), терка, штатив для пробирок, водяная баня, спиртовка, мерный цилиндр на 100-200 мл, пипетки на 2-3 мл (2-3 шт.), воронка (3 шт.), держатель для пробирок, химический стакан, бумажные фильтры, спички.

### **Последовательность выполнения работы.**

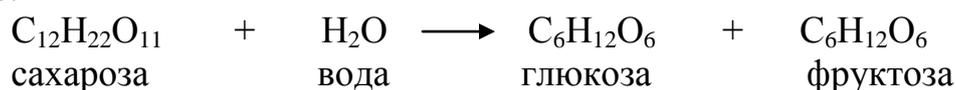
#### **Моносахариды ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) – глюкоза**

1. На мелкой терке натереть тщательно промытый корнеплод моркови.

2. Заполнить 1/4 часть пробирки натертой морковью и залить ее небольшим количеством дистиллированной воды (при точном количественном определении сахаров объем воды дозируется).
3. Пробирку с морковью нагреть на водяной бане в течение 5 мин (не менее).
4. По окончании экспозиции вытяжку из моркови профильтровать.
5. Одинаковые порции фильтрата моркови, используя пипетку, перенести в две чистые пробирки.
6. К фильтрату моркови в одной из пробирок прилить равный объем реактива Фелинга. Фильтрат в другой пробирке использовать для определения сахарозы (п.8 Дисахариды).
7. Отметить образование в первой пробирке осадка кирпично-красного цвета.

### Дисахариды (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) – сахароза

- 1-5. Последовательность получения экстракта сахарозы из корнеплода сахарной свеклы аналогична, как и в случае получения экстракта моносахаров и дисахаров из корнеплода моркови.
6. Одинаковые порции фильтрата сахарной свеклы с помощью пипетки перенести в две чистые пробирки.
7. Фильтрат в одной из пробирок не гидролизовать (контроль).
8. К фильтрату моркови (см. пункт 6, вторая пробирка предыдущей работы), либо к экстракту сахарной свеклы (вторая пробирка), либо к раствору сахарозы, прилить 20% -ный раствор соляной кислоты с целью гидролиза сахарозы. Процесс гидролиза сахарозы идет по следующей схеме:



9. Кислый раствор сахарозы нейтрализовать, добавляя сухой порошок Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> до полного прекращения выделения CO<sub>2</sub>.
10. После нейтрализации раствора сахарозы прилить равный объем реактива Фелинга и содержимое пробирки нагреть до 100 °.
11. Отметить образование осадка кирпично-красного цвета в растворах, подвергшихся гидролизу, или отсутствие его в негидролизованных растворах сахарозы.

### Мальтоза - (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>)

1. В колбу поместить 10 г солода (проросших в течение суток и измельченных семян злаков) и залить 50 мл теплой воды, температура которой составляет 35- 40 °.
2. Суспензию периодически перемешивать и настаивать не менее 30 мин.
3. По окончании экспозиции суспензию профильтровать (фильтрат содержит мальтозу).
4. К 1 мл солодовой вытяжки добавить равный объем реактива Фелинга и суспензию прокипятить.

5. Отметить выпадение осадка закиси меди кирпично-красного цвета.

**Оформление работы.** Результаты проведенных экспериментов по изучению свойств моно – и дисахаров оформить в виде таблицы.

Таблица 1. - Редуцирующие свойства моно – и дисахаров

Объект	Количество $Cu_2O$	
	без гидролиза	после гидролиза
Экстракт моркови		
Экстракт свеклы		
Сахароза		
Мальтоза		

Для визуальной количественной оценки образовавшегося осадка целесообразно использовать знаки «+» или «-».

**Выводы.** Сделать выводы, соответствующие результатам проведенных экспериментов.

### Полисахариды $(C_6H_{10}O_5)_n \cdot nH_2O$ – крахмал

1. Отрезать полоску (кубик) картофеля.
2. На картофельную полоску (кубик) нанести каплю раствора йода в йодистом калии.
3. Отметить изменение окраски в месте нанесения йода на картофельную пластинку (кубик).

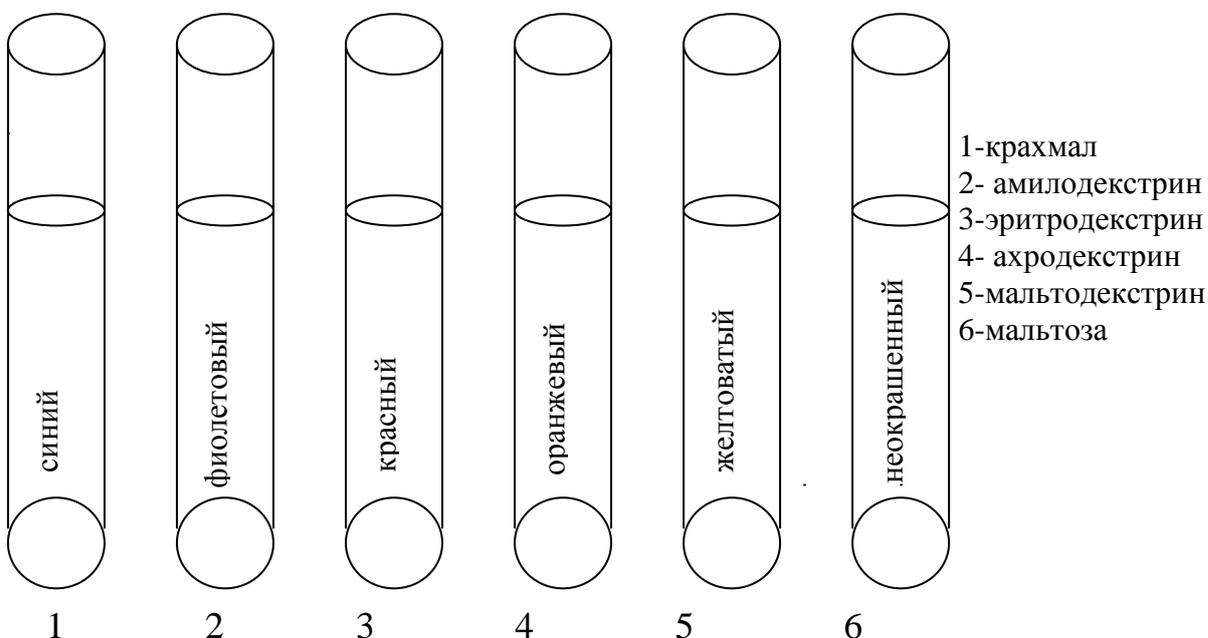
**Выводы.** По степени интенсивности окрашивания зоны (фиолетовый цвет) сделать выводы о количественном содержании крахмала в объекте исследования.

### Контрольные вопросы.

1. Какие углеводы называются редуцирующими сахарами?
2. На чем основан метод Бертрена?
3. Физиологическая роль углеводов в жизни растений.



- проведения опыта подобрать для того, чтобы последовательно получить в достаточной степени полный набор компонентов гидролиза крахмала.
9. Пробирки с суспензией (крахмальный клейстер + солодовая вытяжка) быстро и тщательно встряхнуть.
  10. Из каждой пробирки взять по 0,5 мл суспензии и внести ее в первую пару пробирок с йодовым раствором.
  11. Одну из двух пробирок (п.9) оставить в штативе (температура 15-20<sup>0</sup>), а другую вместе с пипеткой поместить в предварительно нагретую до 45<sup>0</sup> водяную баню.
  12. Через 3 мин из каждой пробирки отобрать пипеткой по 0.5 мл суспензии и внести в соответствии с вариантами опыта в следующую пару пробирок с раствором йода.
  13. Последующий отбор проб проводить через каждые 3 мин. Интервал отбора проб может быть изменен в соответствии со степенью активности ферментов. Однако важно при этом соблюдать равнозначный интервал между предыдущим и последующим отборами проб.
  14. Отметить окраску раствора в каждой пробирке соответствующего варианта проведенного эксперимента.
  15. Обозначить (исходя из окраски) полученные компоненты гидролиза крахмала в соответствии с последовательностью их образования: амилодекстрин, эритродекстрин, ахродекстрин, мальтодекстрин и мальтоза либо их промежуточные формы на рисунке.



**Оформление работы.** Результаты эксперимента оформить в виде таблицы 1.

Таблица 1. - Шкала гидролиза крахмала амилазой при различной температуре

Продолжительность гидролиза, мин	Окраска раствора и компонент гидролиза при t°	
	15 – 20° С	45° С
0		
2		
4		
6		
8		
10		
12		

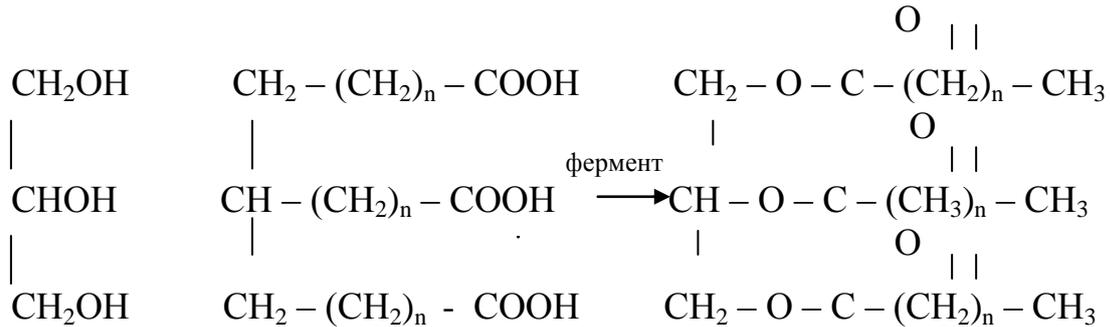
**Выводы.** Сделать выводы об активности амилаз при различной температуре и обозначить (исходя из окраски) полученные компоненты гидролиза крахмала в соответствии с последовательностью их образования (амилодекстрин, эритродекстрин, ахродекстрин, мальтодекстрин и мальтоза либо их промежуточные формы).

**Контрольные вопросы.**

1. Какие ферменты участвуют в гидролизе крахмала до глюкозы?
2. Перечислите промежуточные продукты крахмала (декстрины)?
3. Что такое солод?
4. Что такое каталитическая активность фермента?
5. При какой температуре у амилазы наблюдается наивысшая активность?

## Работа 8. Определение жира

**Вводные пояснения.** Жиры в растениях и в организме животных в принципе сходны между собой. Сами жиры как молекулы образованы из молекул двух других классов веществ, а именно из многоатомных спиртов и карбоновых кислот. Среди многоатомных спиртов у растений и животных для создания жиров избран один спирт – глицерин (CH<sub>2</sub>OH – CHOH – CH<sub>2</sub>OH). К этой молекуле присоединяется всегда три молекулы карбоновой кислоты:



В результате такой реакции образуется молекула, которая с точки зрения химии является сложным эфиром. В ходе реакции выделяется еще и вода.

**Объекты исследования.** Семена масличных растений (подсолнечника, льна, конопли, клещевины, арахиса и других растений), отличающиеся по содержанию жира.

**Реактивы.** Судан-3, этиловый спирт (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), молочная кислота [CH<sub>3</sub>CH(OH)COOH].

**Оборудование.** Микроскоп, предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага.

### **Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 0.5%-ный раствор красителя судан-3 в 96%-ном этиловом спирте или концентрированной молочной кислоте.
2. Семена подсолнечника (и других масличных культур) освободить от семенной оболочки и разрезать вдоль семени на тонкие пластинки.
3. Пластинку семян поместить на предметное стекло в каплю воды и покрыть покровным стеклом.
4. Наблюдать в микроскопе блестящие неокрашенные капли (шарики) жира.
5. С предметного стекла фильтровальной бумагой оттянуть воду (обсушить пластинку семени).
6. На предметное стекло с обсушенной пластинкой семени нанести 2-3 капли раствора судан-3.

7. Под микроскопом на пластинках семени найти капли (шарики) жира, окрашенные раствором судан-3 в желтый (золотистый) цвет.

**Оформление работы.** Результаты работы оформить в виде рисунка, отмечая размер и цвет капель жира в неокрашенном варианте опыта и отметить интенсивность их окраски после окрашивания.

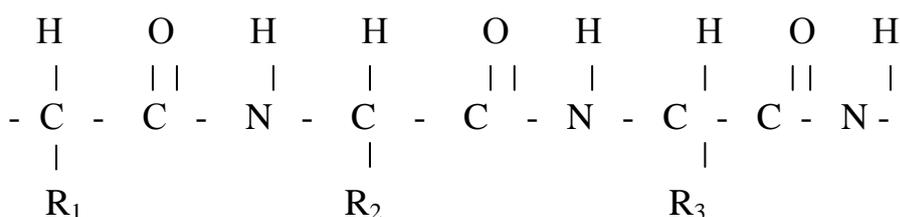
**Выводы.** На основе визуальных наблюдений сделать выводы о содержании жира у различных масличных растений.

**Контрольные вопросы.**

1. Дайте определение понятию «липиды» (жиры)?
2. Какие группы жиров Вы знаете?
3. Чем отличаются твердые жиры от жидких?
4. Физиологическая роль жиров в жизни растений.

## Работа 9. Обнаружение белков

**Вводные пояснения.** Молекулы белка образованы из молекул аминокислот, т.е. это своеобразный полимер, состоящий из молекул аминокислотных остатков. Скелет молекулы белка совершенно отличается от скелета молекул других органических веществ. Обычно органическое вещество содержит скелет, состоящий из последовательно расположенных атомов углерода, который называется углеродным скелетом. В молекуле белка этот скелет выглядит иначе и перемеживается с атомами азота.



Такая четкая последовательность перемеживания в скелете белка атомов углерода и азота, получается, из-за того, что для образования белков используются аминокислоты только L-ряда.

При распаде белков образуются аминокислоты, т.е. их мономеры, которые в дальнейшем используются либо для создания новых белков, либо дезаминируются, в результате чего образуются карбоновые кислоты, последние необходимы для синтеза углеводов, спиртов, жиров и т. д.

**Объекты исследования.** Семена растений культурных злаков.

**Реактивы.** Сернокислый аммоний  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , гидроокись натрия (NaOH), сернокислая медь  $(\text{CuSO}_4)$ , соляная (HCl), либо серная  $(\text{H}_2\text{SO}_4)$  или азотная  $(\text{HNO}_3)$  кислота.

**Оборудование.** Колбы (100-200 мл), пробирки (10-20 мл), пипетки (2мл), бумажные фильтры, спиртовая горелка.

**Последовательность выполнения работы.**

### Биуретовая реакция

1. Приготовить необходимые для анализа белков реактивы: 10% раствор сернокислого аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , гидроокись натрия (NaOH), 1% раствор сернокислой меди  $(\text{CuSO}_4)$ , соляная (HCl), либо серная  $(\text{H}_2\text{SO}_4)$  или азотная  $(\text{HNO}_3)$  кислота.
2. Взвесить 3 г гороховой муки, основные белки которой глобулины-легумины, и перенести ее в колбу.
3. В колбу прилить 20 мл 10% раствора сернокислого аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .
4. Колбу тщательно встряхивать в течение 3-5 мин, а затем продолжить экстракцию белков еще в течение 30 мин.
5. Глобулины, перешедшие в раствор, фильтруют через складчатый бумажный фильтр (не исключена другая форма экстракции), смоченный экстрагирующим раствором. В случае мутного экстракта фильтрацию белков проводят повторно.

6. Взять 2 мл субстрата, поместить его в пробирку и прилить равный (2 мл) объем 20%-ного раствора NaOH и по одной капле (во избежание передозировки) добавлять 1% раствор  $\text{CuSO}_4$ .
7. Наблюдать появление фиолетового окрашивания раствора (или так называемую биуретовую реакцию, получившую свое название от вещества биурета). При избыточном добавлении медного купороса ( $\text{CuSO}_4$ ) фиолетовая окраска маскируется синей. В случае, если в растворе будут пептоны или такие белки как альбумины или гистоны, то раствор окрашивается в розовый цвет.

### **Денатурация белков**

1. Поместить в пробирку 2 мл белкового экстракта и нагреть его до кипения и наблюдать появления аморфного осадка.
2. Поместить в пробирку 2 мл белкового экстракта и приливать по каплям любую из минеральных кислот ( $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) до появления осадка.

**Примечание.** Растворение осадка в экстрагирующем белки растворе сернокислого аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  исключено, что свидетельствует о полной коагуляции белков в результате нагревания или воздействия кислоты.

**Оформление работы.** Результаты работы оформить в виде цветных рисунков, свидетельствующих о наличии в растениях белков и их денатурирующих свойствах.

**Выводы.** По результатам проведенного эксперимента сделать выводы о наличии белков в растениях и их способности к коагуляции (денатурации) в результате температурного или кислотного воздействия.

### **Контрольные вопросы.**

1. Физиологическая роль белков в жизни растений.
2. Дайте определение понятию «денатурация белка».
3. Какие факторы вызывают денатурацию белка?

## Работа 10. Микрохимическое определение алкалоидов

**Вводные пояснения.** Алкалоиды относятся к группе соединений с гетероциклическим строением. Общим для большинства алкалоидов является наличие в их молекуле атома азота, содержащегося в составе циклов. В большинстве случаев алкалоиды содержатся в растениях в виде солей органических кислот: яблочной, лимонной, винной, щавелевой и других кислот. Алкалоиды - физиологически чрезвычайно активные вещества, оказывают сильное действие на живые организмы. Многие алкалоиды являются ядами, в малых дозах они возбуждают нервную систему живых организмов, а в больших оказывают угнетающее действие на нее.

Алкалоиды у различных видов растений хорошо изучены. Они содержатся в различных частях растений: листьях, семенах, плодах, коре. Содержание алкалоидов зависит не только от генетических факторов и возраста растений, но и от климатических и экологических условий. Физиологическая роль алкалоидов для самого растения остается до сих пор малоизученной. Известно, что алкалоиды придают растениям горьковатый вкус. Это явилось основанием предположить, что одна из многих возможных функций алкалоидов – это защита растений от насекомых и других животных. Показано, что колорадские жуки и их личинки очень активно пожирающие *Solanum auriculatum* вскоре после этого погибают от отравления.

О метаболизме алкалоидов известно немного. Однако азот алкалоидов следует рассматривать, прежде всего, своеобразной формой, через которую идет превращение азотистых соединений и в виде которой азот сохраняется и обезвреживается.

**Объекты исследования.** Семена растений с высоким и низким содержанием алкалоидов, а также семена растений, не содержащие алкалоидов.

**Реактивы.** Йод ( $I_2$ ), йодида калия (KI).

**Оборудование.** Пробирки, стеклянные палочки, чашки Петри, колбочки, ступка, бритва, фильтровальная бумага, микроскоп, предметные и покровные стекла.

### **Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 5%-ный раствор йода ( $I_2$ ) в 10%-ном водном растворе йодида калия (KI). *При высоком содержании алкалоидов в семенах растений возможно использование и менее концентрированного реактива: 20 г йодида калия растворить в 30 мл дистиллированной воды, затем в него внести 13 г йода и после его растворения объем довести дистиллированной водой до 1 л.*
2. Семена выбранных объектов исследования (табак, люпин и другие растения) освободить от семенной оболочки.

3. Из сухих (или предварительно замоченных на 1-2 суток семян) с помощью острой бритвы получить тонкие пластинки (срезы) семян.
4. На стеклянную пластинку поместить срезы семян и прибавить 1-2 капли йодистого раствора.
5. Визуально отметить, предварительно подложив под стеклянную пластинку белую бумагу, красно-коричневый осадок алкалоидов.
6. На предметное стекло поместить срезы семян, прибавить 1-2 капли раствора йода в йодистом калии (п.1) и накрыть срезы покровным стеклом.
7. Под микроскопом наблюдать осадок алкалоидов в виде красноватых зерен, расположенных по периферии клетки, или вне клетки. *Последний факт обусловлен выходом алкалоидов из клеток под действием воды и последующим их осаждением йодом.*

**Оформление работы.** Результаты работы оформить в виде цветных рисунков.

**Выводы.** На основании визуальных наблюдений и наблюдений под микроскопом сделать выводы о содержании алкалоидов в семенах различных растений.

**Контрольные вопросы.**

1. Что такое алкалоиды?
2. К какой группе веществ относятся алкалоиды растений?
3. Какое биологическое значение имеют алкалоиды?
4. Каково химическое строение молекул алкалоидов?

## Работа 11. Определение дубильных веществ

**Вводные пояснения.** Дубильные вещества – это полимеры фенольных соединений, близких по составу. Природные дубильные вещества имеют молекулярную массу 1000 – 5000. Термин « дубильные вещества» полимеры фенольной природы получили благодаря их способности к истинному дублению шкуры животных, превращая ее в кожу. Эта способность дубильных веществ основана на их взаимодействии с коллагеном (белком кожных покровов), приводящих к образованию устойчивой поперечно связанной структуры.

Дубильные вещества подразделяют на конденсированные и гидролизуемые. Гидролизуемые дубильные вещества при обработке разбавленными кислотами распадаются с образованием более простых соединений фенольной и не фенольной природы. Гидролизуемые дубильные вещества подразделяют на подгруппы галловых и эллаговых дубильных веществ. При гидролизе галловых дубильных веществ кислотой или специфическими гидролитическими ферментами образуются сахара (глюкоза, гамамелоза и другие сахара) и галловая кислота. При гидролизе эллаговых дубильных веществ образуется нерастворимая эллаговая кислота. Конденсированные же дубильные вещества при обработке разбавленными кислотами подвергаются дальнейшему уплотнению. Строение конденсированных дубильных веществ до сих пор изучено недостаточно. Галловые дубильные вещества можно встретить у различных видов сумаха, каштана и других растений. Эллаговые дубильные вещества содержатся в коре граната, кожуре незрелых грецких орехов, древесине эвкалипта и других растениях. Конденсированные дубильные вещества содержатся в коре ивы, сосны, ели, лиственницы, в древесине некоторых видов акации, каштана и дуба.

Дубильные вещества выполняют защитную функцию против проникновения микроорганизмов в ткани растений.

**Объекты исследования.** Листья чая, табака и других растений с относительно высоким и относительно низким содержанием дубильных веществ.

**Реактивы.** Хлорное железо ( $\text{FeCl}_3$ ).

**Оборудование.** Пробирки, пипетки, фарфоровые чашки и ступки, спиртовка, весы, фильтры (бумажные, стеклянные).

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 5 % - ный раствор хлорного железа.
2. Взвесить 0.25 г измельченной массы листьев выбранного объекта исследования и поместить ее в пробирку.
3. В пробирку с массой листьев добавить 5 мл воды и кипятить в течение 5 мин.
4. Экстракт отфильтровать через бумажный или стеклянный фильтр.

5. Прозрачный фильтрат (2 – 3 капли) поместить в фарфоровую чашку и к нему добавить 1 каплю 5 % - ного раствора хлорного железа (FeCl<sub>3</sub>).
6. Отметить появление черной окраски экстракта.
7. Из листьев 2-х растений с относительно высоким и относительно низким содержанием дубильных веществ выдавить клеточный сок, используя ступку с пестиком.
8. Повторить процедуру определения дубильных веществ в измельченной клеточной массе растений, аналогично определению их в водном экстракте (п. 5-6).

**Оформление работы.** Результаты работы оформить в виде таблицы, в которой содержание дубильных веществ в исследуемом фильтрате отметить знаком плюс (+), а знаком минус (-) их отсутствие.

Таблица 1. - Содержание дубильных веществ в листьях различных растений

Вариант опыта	Объект исследования	Содержание дубильных веществ
1		
2		
3		
4		
и т. д.		

**Выводы.** На основании результатов проведенного эксперимента сделать выводы о содержании дубильных веществ у различных объектов исследования.

**Контрольные вопросы.**

1. Что такое дубильные вещества?
2. На какие группы подразделяются дубильные вещества?
3. Какое биологическое значение имеют дубильные вещества?

### ТЕМА 3. Фотосинтез

Фотосинтез у растений - процесс поглощения энергии солнца и образование на основе этой энергии органических веществ из неорганических элементов: диоксида углерода и воды.

Весь процесс фотосинтеза обычно делят на две фазы: световую и темновую. При световой фазе в хлоропластах происходит процесс поглощения энергии солнца и превращение ее в энергию химических связей в форме АТФ и НАДФН. В темновой фазе происходит процесс образования органических веществ из неорганических элементов, благодаря использованию энергии АТФ и НАДФН.

Растения используют энергию для выполнения различной работы, в частности для химических реакций, т.е. для сборки и разборки молекул, для создания химического потенциала на разных сторонах мембраны, необходимого для создания на поверхности мембраны определенного значения рН среды. Известно, что функциональные белки, расположенные на мембранах (на внешней и внутренней стороне) выполняют работу лишь при определенном значении рН.

Энергия также необходима для транспорта веществ через мембрану. Наконец часть химической энергии превращается в тепловую, которая регулирует температуру тела растений и испарение воды.

Темновая фаза выполняется в хлоропластах непосредственно на тилакоидах, а точнее в гранах, расположенных между тилакоидами. Она называется темновой не потому, что нуждается в темноте, а потому, что для ее прохождения нет необходимости в свете. Этот процесс происходит одновременно с поглощением энергии. По этой причине темновая фаза и в пространстве и во времени тесно связана со светом. Темновая фаза делится условно на 4 стадии или этапа. На *первом этапе* происходит процесс поглощения углекислого газа из воздуха. Поглощенный растением углекислый газ через устьица проникает в клетки мезофилла листа, а из клеток в хлоропласт, где и поглощается пяти - углеродным фосфорилированным углеводом (рибулезо – ди – фосфатом). Эта молекула после фиксации  $\text{CO}_2$  превращается в шести – углеродный углевод. Последний, будучи неустойчивым, по своей природе, соединением распадается на две триозы (фосфоглицериновая кислота), которая затем (*вторая стадия*) восстанавливается с использованием АТФ и НАДФН до фосфоглицеринового альдегида. На следующем этапе (*третья стадия*) темновой фазы фотосинтеза происходит регенерация (восстановление) молекулы рибулезо – ди - фосфата. Процесс регенерации молекулы рибулезо – ди – фосфата проходит через целую систему биохимических реакций. Оставшиеся молекулы фосфоглицеринового альдегида после восстановления рибулезо – ди – фосфата используются для синтеза различных органических веществ. Это - заключительная (четвертая) фаза темнового фотосинтеза.

## Работа 12. Химические свойства пигментов

### Получение экстракта листьев растений

**Вводные пояснения.** Спектр поглощения энергии солнца для растений лежит в диапазоне 350-850 нм. Для того, чтобы уловить энергию в таком диапазоне нужна не одна форма молекулы, а целая система. Такими молекулами являются пигменты: хлорофиллы, каротиноиды, фикобилины. Все они устроены по единому принципу – чередование в молекуле двойной и одинарной связи между атомами углерода. Они могут быть развернуты в виде цепи и тогда они называются каротиноидами, либо образуют углеродные циклы и тогда они называются фикобилинами и, наконец, эти циклические строения могут быть объединены в единую схему циклов. Такие пигменты называют хлорофиллами. Каждый из этих пигментов: хлорофиллы, каротиноиды, фикобилины имеет множественную форму. Например, хлорофилл *a* насчитывает около 20 различных форм. Такое же множество форм имеют хлорофиллы *a*, *b* и *d*. Такой большой спектр пигментов позволяет улавливать солнечную энергию в диапазоне 350-850 нм.

Энергия солнца усваивается у растений в основном молекулами хлорофилла. Хлорофилл *a* ( $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ ) – зеленый с синеватым оттенком имеет следующую структуру:

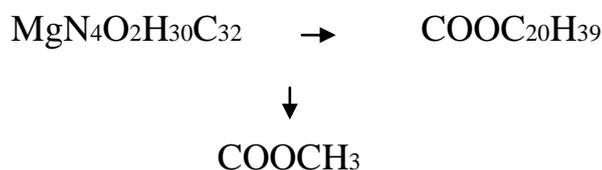


Рис 1. - Структура хлорофилла *a*

Хлорофилл *b* ( $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ ) – зеленый с желтоватым оттенком. Он отличается от хлорофилла *a* лишь тем, что у второго пиррольного кольца вместо метильной группы имеется альдегидная (рис 2.).

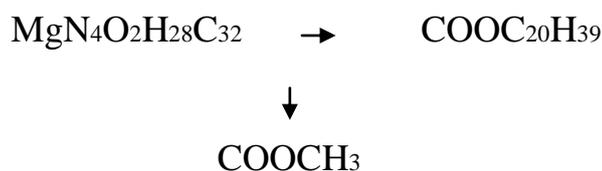


Рис 2. - Структура хлорофилла *b*

**Каротиноиды** – группа желтых пигментов. Наиболее распространенный у высших растений  $\beta$  - каротин ( $C_{40}H_{56}$ ) – желто-

оранжевый, а наиболее известный ксантофилл у высших растений лютеин ( $C_{40}H_{56}O_2$ ) – золотисто – желтый.

**Объекты исследования.** Зеленые листья растений.

**Реактивы.** Этиловый спирт ( $C_2H_5OH$ ) или любой другой полярный растворитель, кварцевый песок или тонко толченое стекло, углекислый кальций ( $CaCO_3$ ), вазелин.

**Оборудование.** Ножницы, фарфоровая ступка с пестиком, стеклянная палочка, пробирка, колба Бунзена, стеклянный фильтр с резиновой пробкой, диаметр которой соответствует диаметру колбы Бунзена, водоструйный насос (возможны другие модели насоса).

**Последовательность выполнения работы.**

1. Свежие зеленые листья растений без крупных жилок и черешка измельчить ножницами на мелкие полоски (кусочки).
2. Измельченную массу листьев поместить в ступку и прилить небольшое (только для смачивания листьев) количество спирта.
3. В ступку на кончике ножа добавить  $CaCO_3$  (для нейтрализации кислот клеточного сока) и немного кварцевого песка или толченого стекла для улучшения растирания листьев.
4. Листья тщательно растереть до получения однородной массы (кашицы), приливая понемногу этиловый спирт.
5. Смазать носик ступки с внешней стороны вазелином и слить полученный темно зеленый экстракт пигментов, используя палочку, на стеклянный фильтр (при не количественном определении возможно перенесение экстракта на воронку с бумажным фильтром).
6. Прилить в ступку еще немного спирта и повторить процедуру растирания пробы листьев и экстракции пигментов.
7. Повторить экстракцию пигментов многократно до полного их извлечения (о полноте экстракции судить по обесцвечиванию листовой массы).

Спиртовую вытяжку использовать в последующих работах при изучении физических и химических свойств пигментов.

## Разделение пигментов по методу Крауса

**Вводные пояснения.** Метод Крауса основан на различной растворимости пигментов в спирте и бензине. Хлорофилл, имеющий длинный углеводородный «хвост», и каротин, являющийся углеводородом имеют большее сродство к неполярному растворителю (бензину), в то время как ксантофилл (лютеин), будучи двухосновным спиртом, практически нерастворим в бензине, но хорошо растворим в спирте.

**Объекты исследования.** Спиртовая вытяжка зеленого листа.

**Реактивы.** Бензин (фракция нефти с  $C_5$ - $C_{10}$  атомами углерода), этиловый спирт ( $C_2H_5OH$ ).

**Оборудование.** Пробирка с притертой пробкой, цветные карандаши или фломастеры.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Налить в пробирку 2...3 мл спиртового экстракта пигментов.
2. В пробирку с экстрактом пигментов прилить бензин, объем которого должен несколько превышать объем взятого для исследования экстракта пигментов (3...4 мл).
3. Закрыть пробирку стеклянной пробкой (резиновой, корковой в случае использования обычных пробирок).
4. Пробирку, содержащую спиртовой экстракт пигментов и бензин, тщательно встряхнуть и оставить эмульсию на короткое время (1-2 мин) для отстаивания.
5. В случае нечеткого расслоения эмульсии на слои в пробирку добавить несколько капель воды и содержимое пробирки тщательно встряхнуть. В случае помутнения нижнего слоя, что происходит при избыточном добавлении воды, для просветления последнего следует внести в эмульсию этиловый спирт и пробирку вновь тщательно встряхнуть.
6. Визуально отметить расслоение эмульсии и определить состав пигментов в верхнем бензиновом и нижнем спиртовом слоях.
7. Спиртовой экстракт пигментов, представленный ксантофиллами, сохранить в холодильнике для последующего изучения их оптических свойств.

**Оформление работы.** Результаты работы оформить в виде цветного рисунка распределения пигментов. Верхний зеленый бензиновый слой - это хлорофиллы и каротин, желтый цвет последнего маскируется зеленым цветом хлорофиллов, а нижний спиртовой слой золотисто-желтого цвета содержит ксантофиллы.

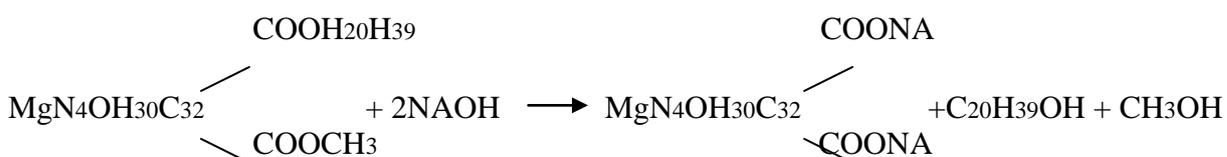
**Выводы.** Сделать выводы, соответствующие результатам проведенного исследования.

**Контрольные вопросы.**

1. Какие пигменты содержатся в спиртовой вытяжке из листьев растений?
2. На чем основан метод Крауса?

## Омыление хлорофилла щелочью

**Вводные пояснения.** Хлорофилл – сложный эфир дикарбоновой кислоты хлорофиллина  $C_{32}H_{30}ON_4Mg(COOH)_2$  и двух спиртов – метилового  $CH_3OH$  и фитола  $C_{20}H_{39}OH$ . При действии на хлорофилл щелочи эфирные связи его омыляются и в результате этой реакции образуются спирты (метиловый и фитол) и соль хлорофиллиновой кислоты. Последняя хорошо растворима в воде, но в отличие от хлорофилла нерастворима в бензине. Реакция омыления хлорофилла выглядит следующим образом:



**Объекты исследования.** Спиртовая вытяжка пигментов.

**Реактивы.** Гидроксид KOH или NaOH, бензин (фракция нефти с  $C_5$ - $C_{10}$  атомами углерода).

**Оборудование.** Капельница (с 20% раствором щелочи), пробирка с притертой пробкой, цветные карандаши или фломастеры.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 20% раствор щелочи и заполнить ею капельницу.
2. В пробирку с притертой пробкой налить 3-4 мл спиртовой вытяжки пигментов.
3. К раствору пигментов добавить 1 мл (несколько капель) 20% - ного раствора щелочи.
4. Пробирку со смесью раствора пигментов и щелочи тщательно встряхнуть и дать отстояться.
5. Отметить окраску верхнего бензинового и нижнего спиртового слоев исследуемого раствора.

**Оформление работы.** Результаты работы оформить в виде рисунка, отметив окраску верхнего бензинового и нижнего спиртового слоев исследуемого раствора.

Указать вещества, растворенные в верхнем и нижнем слое раствора, памятуя о том, что каротиноиды (каротины и ксантофиллы) со щелочью не реагируют.

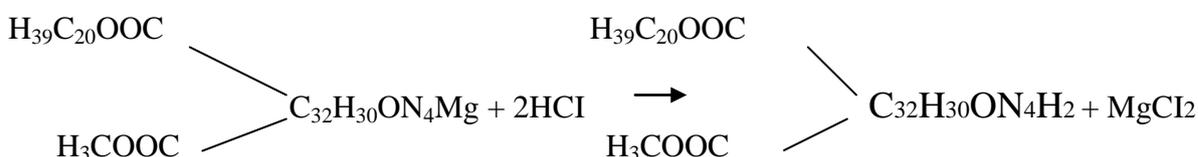
**Выводы.** Сделать выводы, соответствующие результатам проведенной работы.

### **Контрольные вопросы.**

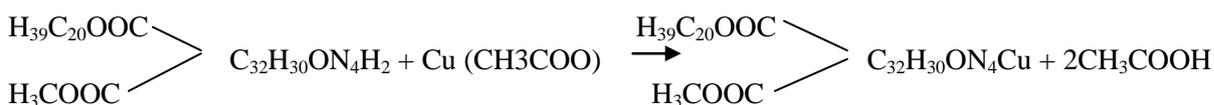
1. Чем отличается соль хлорофиллиной кислоты от пигмента хлорофилла?
2. Какие пигменты перейдут в бензиновый слой, а какие в спиртовой?

## **Получение феофитина и восстановление металлорганической связи в молекуле хлорофилла**

**Вводные пояснения.** Атом Mg в порфириновом ядре хлорофилла удерживается относительно слабо и при воздействии сильных кислот (соляной, серной или других минеральных кислот) в молекуле хлорофилла происходит замещение атома магния двумя атомами водорода. В результате реакции возникает новое вещество – феофитин буровато-оливкового цвета.



Металлорганическую связь возможно восстановить, подействовав на раствор феофитина солями меди, цинка или ртути. В этом случае в ядре молекулы феофитина происходит замена двух протонов металлом. Продукт реакции замещения протонов медью (хлорофиллоподобное вещество - производное меди) по окраске не идентичен хлорофиллу, а имеет голубовато-зеленоватый оттенок.



**Объекты исследования.** Спиртовая вытяжка пигментов.

**Реактивы.** Соляная кислота (HCl), ацетат меди  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , либо ацетат цинка или ацетат ртути.

**Оборудование.** Пробирки, держатель для пробирок, спиртовка, спички, цветные карандаши или фломастеры.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 10% раствор соляная кислоты.
2. Налить в две пробирки 3-4 мл спиртового экстракта пигментов зеленого листа.
3. В каждую из пробирок добавить по 2-3 капли 10% соляной кислоты.
4. Отметить окраску раствора в обеих пробирках.
5. В одну из пробирок внести несколько кристаллов уксуснокислой меди (ацетата меди).

6. Пробирку с раствором пигментов и внесенной в нее солью осторожно нагревать на спиртовке до кипения, не допуская выброса раствора из нее. При недостаточном внесении ацетата меди окраска может не измениться. В этом случае необходимо добавить еще соли и продолжить нагревание.
7. Отметить изменение цвета раствора, произошедшего в результате замещения в феофитине двух атомов водорода на атом меди.

**Оформление работы.** Результаты работы оформить в виде рисунков, один из которых соответствует получению феофитина из хлорофилла, а другой отражает восстановление металлорганической связи в нем.

**Выводы.** Сделать выводы о химических свойствах хлорофилла.

**Контрольные вопросы.**

1. Какие производные молекулы хлорофилла образуются под действием неорганических кислот?
2. Чем отличается строение молекулы феофитина от молекулы хлорофилла?
3. Восстанавливаются ли все свойства хлорофилла **а** и **б** при замене Mg в ядре молекулы другим двухвалентным металлом?

## Работа 13. Определение спектров поглощения пигментов

**Вводные пояснения.** В процессе фотосинтеза пигменты пластид поглощают свет видимой части спектра (380...720 нм). Излучение этой области спектра – это фотосинтетически активная радиация (ФАР). Пигменты поглощают свет не полностью, а избирательно, т.е. отдельными участками. Следует отметить, что спектр поглощения пигментов живого листа значительно шире спектра поглощения пигментной вытяжки. Так, для пигментного экстракта (хлорофилл *a* + хлорофилл *b*) характерно наличие в красной области спектра двух четко обозначенных пиков - 660 и 640 нм и двух в сине-фиолетовой области - 430 и 450 нм. Минимум поглощения приходится на зеленую часть спектра. В живом листе для красной области поглощения хлорофилла *a* характерно четыре максимума – 670, 683, 700 и 710 нм, а для хлорофилла *b* пики поглощения приходятся на длины волн 650...655 нм. Различие в спектре поглощения экстрагированных пигментов и пигментов живого листа обусловлены различной степенью агрегированности молекул и характером их связи с липопротеиновым комплексом в ламеллах тилакоидов.

Каротины и ксантофиллы поглощают только коротковолновую (до 540 нм) часть спектра т.е. сине-фиолетовую область его.

Оптические свойства пигментов определяются особенностью их химической структуры. Так наличие системы конъюгированных двойных связей в молекулах хлорофилла и каротиноидов определяет поглощение сине-фиолетовых лучей спектра. Появление полосы поглощения в красной области спектра и более слабое поглощение в желто-зеленой части его обуславливает гидрирование связи между атомами углерода в положении седьмого и восьмого атомов углерода четвертого пиррольного кольца хлорофилла. Еще большее усиление поглощения в красной области спектра и ослабление поглощения в зеленой части его обуславливает присутствие в ядре хлорофилла магния.

Для изучения спектра поглощения пигментов используют спектроскоп. В спектроскоп одновременно поступают два световых потока. Один поток света, поступающий от источника света (лампы), проходя через кювету с пигментом, разлагается призмой на составные части, а другой отражается зеркалом в боковую щель, попадая на грань второй призмы. В результате возникают два параллельных спектра, расположенных один над другим. Контролем служит спектр отраженного света. По положению темных полос в опытном варианте спектра судят о том, какие лучи поглощаются исследуемыми пигментами.

**Объекты исследования.** Концентрированный спиртовой экстракт хлорофиллов (*a+b*), бензиновый экстракт каротина из моркови или другого объекта, экстракт ксантофиллов, полученный при выполнении работы «Разделение пигментов по методу Крауса».

**Реактивы.** Этанол (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH).

**Оборудование.** Спектроскоп, настольная лампа (100 Вт), чугунный штатив с лапками, штатив для пробирок, пробирки (10-20 мл), пипетки (5-10 мл), цветные карандаши.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Закрепить лампу на чугунном штативе.
2. Спектроскоп направить на источник света (лампу) и отрегулировать его таким образом, чтобы все области спектра имели достаточно четкую одинаковую яркость.
3. Исследуемый раствор пигментов поместить в пробирку и закрепить последнюю в лапке штатива перед щелью спектроскопа.
4. Изучить спектр поглощения концентрированного пигментного экстракта.
5. Приготовить разведение концентрированной пигментной вытяжки в соотношениях 1: 1, 1: 3, 1: 5, 1: 15.
6. Изучить спектры поглощения пигментной вытяжки при различном разведении (п. 5).
7. Поместить перед щелью спектроскопа экстракт каротинов и изучить спектр его поглощения.
8. Затем для сравнения исследовать спектр поглощения спиртового экстракта ксантофиллов.
9. Участки спектра, поглощенные пигментами закрасить черным цветом, а видимые участки закрасить цветными карандашами.

**Оформление работы.** Результаты работы оформить в виде таблицы.

Таблица 1. – Спектр поглощения пигментов

Пигменты	Спектр поглощения						
	К	О	Ж	З	Г	С	Ф
Концентрированный экстракт хлорофилла (а+б)							
Разведенный экстракт хлорофилла (а+б)							
1:1							
1:3							
1:5							
1:15							
Каротины							
Ксантофиллы							

**Выводы.** Сделать выводы о специфичности поглощения лучей хлорофиллами, каротинами и ксантофиллами.

**Примечание.** Спектр поглощения экстракта хлорофилла можно записать на регистрирующем спектрофотометре СФ-10 (или другой марки), получив кривую спектра, отражающую процесс превращения хлорофилла в феофитин. Другой параллельно полученный спектр отражает процесс восстановления металлорганической связи в феофитине.

**Выводы.** Сделать выводы о химических свойствах хлорофилла.

**Контрольные вопросы.**

1. Какую роль выполняет свет в процессе фотосинтеза?
2. Какие лучи электромагнитного спектра солнца используются в фотосинтезе?
3. Как объясняются явления флуоресценции хлорофилла

## Работа 14. Флуоресценция хлорофилла

Флуоресценция – испускание света возбужденной молекулой хлорофилла **а** и хлорофилла **б**. При переходе молекулы хлорофилла из возбужденного состояния в основное энергия электронов может расходоваться либо на фотохимическую работу, либо на возбуждение соседних молекул хлорофилла, либо теряется в виде тепла или, наконец, происходит флуоресцентное излучение. Наибольшая флуоресценция хлорофилла наблюдается в растворах. В живом листе флуоресценция менее выражена. Однако при неблагоприятных для растения условиях эффект флуоресценции возрастает и этот показатель можно использовать для определения устойчивости растений к среде обитания.

**Объекты исследования.** Спиртовая вытяжка пигментов зеленого листа.

**Оборудование.** Пробирка, настольная лампа, лист черной бумаги.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Пробирку с вытяжкой пигментов (спиртовой или бензиновой) поместить на темную бумагу у настольной лампы.
2. Рассматривать вытяжку со стороны отраженного свет.
3. Отметить окраску раствора.

**Оформление работы.** Результаты работы оформить в виде рисунка, отметив окраску контрольного (зеленую) и опытного (темно-красную) раствора.

**Выводы.** Сделать выводы о причине флуоресценции.

**Контрольные вопросы**

1. Как объясняются явления флуоресценции хлорофиллов
2. При каких условиях у растений усиливается эффект флуоресценции

## Работа 15. Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла

**Вводные пояснения.** В процессе фотосинтеза, как известно, происходит поглощение световой энергии и превращение ее в энергию химическую, т. е. осуществляется фотохимический процесс. В ходе этого фотохимического процесса образуются активные или возбужденные (обладающие избыточной энергией) молекулы, принимающие участие в первичных фотохимических реакциях. Продукты последних, т. е. фотохимических реакций, принимают участие в темновых химических реакциях.

Сущность световой стадии фотосинтеза сводится к окислению воды до молекулярного кислорода за счет энергии, поглощенной хлорофиллом. При этом электроны, освободившиеся в процессе фотоокисления воды, передаются на НАДФ<sup>+</sup>, который восстанавливается до НАДФН. В переносе электронов от воды к НАДФ<sup>+</sup> последовательно участвуют две фотосистемы: фотосистема 11 и фотосистема 1.

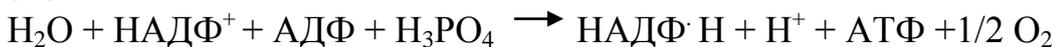
Каждая из упомянутых выше фотосистем включает в себя светособирающие антенны, которые содержат различные формы хлорофилла а, отличающиеся максимумами спектра поглощения в длинноволновой его части. Во вторую фотосистему входит еще и хлорофилл б. Обе фотосистемы содержат также каротиноиды. Наряду с пигментами, выполняющими роль светособирающих антенн, в фотосистемах 11 и 1 имеются реакционные центры, содержащие молекулы хлорофилла а максимум поглощения которых соответствует 700 (P700) и 680 (P680) нм и акцепторы электронов. Антенные пигменты передают энергию возбуждения в реакционные центры.

Фотоокисление воды и выделение кислорода происходит в процессе реакций, осуществляемых в фотосистеме 11, в то время как восстановление НАДФ<sup>+</sup> происходит в фотосистеме 1. Фотосистемы связаны между собою последовательно расположенными переносчиками электронов, образующих между ними «мост», идущий как бы «под гору». Таким образом, путь электронов от воды имеет Z – образную форму. Поток электронов, индуцированный светом, обуславливает трансмембранный протонный градиент, в результате этого среда с внутренней стороны тилакоидной мембраны становится более кислой, чем с наружной. Возврат ионов H<sup>+</sup> из тилакоидов в строму осуществляется благодаря наличию в мембране АТФ – фазы, что приводит к образованию АТФ из АДФ и фосфата.

Таким образом, фотоокисление воды сопровождается выделением кислорода и образованием богатых энергией и восстановительной силой соединений – АТФ и НАДФН, которые необходимы для последующего восстановления диоксида углерода.

Схематично фотолиз воды можно представить следующим образом:

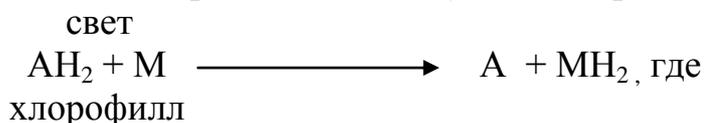
свет



хлорофилл

Из приведенной схемы видно, что хлорофилл в этом случае является фотосенсибилизатором, индуцирующим перенос электрона к НАДФ<sup>+</sup>.

Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла можно наблюдать в модельных системах, содержащих спиртовой экстракт пигментов из зеленого листа. В качестве источника водорода в этом случае берут аскорбиновую кислоту (АН<sub>2</sub>), а акцептором водорода является метиловый красный (М), который, присоединяя водород, восстанавливается до неокрашенного лейко соединения (МН<sub>2</sub>). Аскорбиновая кислота в ходе этой реакции окисляется в дегидроаскорбиновую кислоту (А). Схематически это можно представить следующим образом:



АН<sub>2</sub> – донор электронов (аскорбиновая кислота);

М – акцептор электронов (метиловый красный);

А – дегидроаскорбиновая кислота;

МН<sub>2</sub> – бесцветная лейко форма (метиловый красный)

Чтобы убедиться в том, что восстановление метилового красного действительно является реакцией, фотосенсибилизированной светом в опыт вводят варианты, исключаящие либо свет, либо аскорбиновую кислоту, либо хлорофилл.

**Объекты исследования.** Спиртовой экстракт пигментов из зеленых листьев растений.

**Реактивы.** Метиловый красный (0.04%- спиртовой раствор), аскорбиновая кислота (С<sub>6</sub>Н<sub>8</sub>О<sub>6</sub>) кристаллическая, этанол (С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>ОН).

**Оборудование.** Пробирки (10 мл) – 4 шт., штатив для пробирок, пипетки (5 мл) – 2 шт., настольная лампа (200 – 300 Вт), светонепроницаемая (черная) бумага, скальпель, карандаш по стеклу.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 0.04%-ный спиртовой раствор метилового красного.
2. Прозэкстрагировать этанолом пигменты из зеленого листа любых растений (экстракт должен быть относительно концентрированным). Условия экстракции см. в соответствующей работе.
3. В три пронумерованные пробирки (1, 2, 3) налить по 5 мл спиртового экстракта пигментов, а в четвертую (4) налить 5 мл этилового спирта.
4. В пробирки 1, 2 и 4 внести кристаллическую аскорбиновую кислоту до полного насыщения (о полноте насыщения раствора судит по нерастворимому осадку последней, осевшей на дно пробирки).

5. Во все пробирки (1, 2, 3 ,4) по каплям добавить метиловый красный до появления красно-бурой окраски в первых трех пробирках и ярко - розовой в последней – четвертой.
6. Содержимое пробирок тщательно встряхнуть.
7. Пробирку 2 обернуть черной (светонепроницаемой) бумагой.
8. Пробирки 1, 3, и 4 выставить на яркий свет (вблизи включенной лампы).
9. Экспозиция в эксперименте 15 – 20 мин.
10. Отметить в каждом из вариантов опыта окраску раствора.

**Оформление работы.** Результаты работы оформить в виде таблицы.

Таблица 1. – Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла

Вариант опыта (пробирка, N)	Реакционная смесь	Условия проведения опыта	Цвет раствора
1	Хлорофилл + аскорбиновая кислота + метиловый красный	Свет	
2	Хлорофилл + аскорбиновая кислота + метиловый красный	Темнота	
3	Хлорофилл + метиловый красный	Свет	
4	Спирт + аскорбиновая кислота + метиловый красный	Свет	

**Выводы.** Сделать выводы о роли хлорофилла и аскорбиновой кислоты в восстановлении метилового красного.

**Контрольные вопросы.**

1. Какова сущность световой фазы фотосинтеза?
2. В чем заключена фотосенсибилизирующая роль хлорофилла?
3. Какие лучи спектра входят в ФАР?

## Работа 16. Определение интенсивности фотосинтеза методом ассимиляционной колбы (по Л. А. Иванову и Н. Л. Коссович)

**Вводные пояснения.** Согласно общему уравнению фотосинтеза, показателями, характеризующими течение этого процесса, могут служить: количество поглощенного углекислого газа, выделяющегося кислорода, образовавшихся веществ и энергии, поглощаемой пигментами или связанной в ассимилянтах:



Но обычно интенсивность фотосинтеза измеряют по поглощаемому углекислому газу, выделяемому кислороду и количеству синтезируемого органического вещества.

Метод, применяемый в данной работе, основан на учете количества  $\text{CO}_2$ , поглощенного листом, и позволяет установить не общий, а наблюдаемый, или чистый, фотосинтез. Чтобы выявить общий фотосинтез, обычно находят количество выделяемого листом  $\text{CO}_2$  в темноте и прибавляют его к количеству поглощенного на свету. Основная трудность заключается в том, что еще не ясен вопрос, происходит ли дыхание в одинаковой степени на свету и в темноте. Как правило, поправку на дыхание вводят лишь при малых интенсивностях фотосинтеза.

**Объекты исследования.** Комнатные растения (светлюбивые и теневыносливые).

**Реактивы.** Гидроокись натрия ( $\text{NaOH}$ ), соляная кислота ( $\text{HCl}$ ), фенолфталеин.

**Оборудование.** Круглодонные колбы (1 - 1.5 л) – 2 шт., резиновые пробки к колбам, бритва, кристаллизатор, электрическая лампа (200-300 Вт), кипяченая вода, технические весы, разновесы, ножницы, фильтровальная бумага, бюретка для титрования (25-50 мл).

### **Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить растворы: гидроокись натрия – 0,025 н., соляная кислота – 0,025 н., 60%-ный этиловый спирт, фенолфталеин – 0,1%-ный (раствор фенолфталеина готовится в растворе 60%-ного этилового спирта).
2. Для сохранения в процессе проведения эксперимента идентичной в обеих колбах температуры горло экспериментальных колб обернуть бумажными салфетками (полосками бумаги).
3. Открытые колбы для заполнения их воздухом (углекислым газом) в течение 20 – 30 мин выдержать в одинаковых условиях.
4. Затем в одну из колб поместить пробирку с фотосинтезирующим листом, (предварительно подрезав черешок его во избежание пузырьков

воздуха под холодной кипяченой водой). Пробирка с листом крепится к пробке с помощью палочки, вставленной в пробку (возможны и другие варианты закрепления фотосинтезирующего листа).

5. Обе колбы одновременно закрыть резиновыми, хорошо притертыми пробками, и выставить на свет. Контрольную колбу необходимо выставить на свет для поддержания идентичной с экспериментальной колбой температуры. В течение проведения эксперимента следить за сохранением идентичной в начале и в конце проведения эксперимента температуры, чтобы не допустить из-за разницы температуры в начале и конце эксперимента поступления или выхода воздуха из колбы.
6. Экспозиция опыта, проводимого в 1 л колбах, не должна превышать 5 мин (при хорошем освещении за этот период времени поглощается 25% углекислого газа, содержащегося в колбе).
7. По окончании экспозиции из экспериментальной колбы быстро извлечь растение и колбу закрыть пробкой, отметив время.
8. Контрольную колбу также приоткрыть на несколько секунд (на время, затраченное для извлечения растения из экспериментальной колбы).
9. Налить в колбы (желательно через отверстие в пробке) по 40 мл гидроксида натрия и 2 –3 капли фенолфталеина. Для полноты растворения углекислого газа стенки колбы вращательными движениями смочить щелочью и затем в течение 20 мин их периодически встряхивать.
10. Растворы в колбах титровать 0.025н (0.1н) раствором соляной кислоты до полного исчезновения розового окрашивания.
11. Определить площадь листа весовым методом (см. примечание 2).
12. Рассчитать интенсивность фотосинтеза.

**Оформление работы.** Результаты опыта оформить в виде таблицы.

Таблица 1. – Интенсивность фотосинтеза у разных видов растений

Растение	Время			Площадь листа, дм <sup>2</sup>	Объем прилитого NaOH, мл	Расход HCl, мл		Интенсивность фотосинтеза, мг/дм <sup>2</sup> .ч
	начало	конец	экспозиция, мин			опыт	контроль	
Светлюбивое								
Теневыносливое								

Интенсивность фотосинтеза ( $I_{\phi}$ ) вычислить по формуле:

$$I_{\phi} = (A - B) \cdot 0.55 \cdot 60 / st ,$$

где  $I_{\text{ф}}$  – интенсивность фотосинтеза, мг  $\text{CO}_2/\text{дм}^2 \cdot \text{ч}$ ;

A – количество HCl (мл), пошедших на титрование гидрата окиси натрия в опытной колбе;

B – количество HCl (мл), пошедшие на титрование гидрата окиси натрия в контрольной колбе;

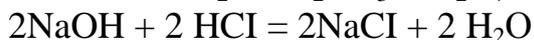
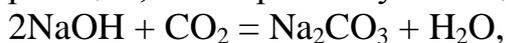
0.55 – число мг  $\text{CO}_2$ , соответствующее 1 мл 0.025 н. HCl; (4,4 мг  $\text{CO}_2$  - 0.1 н HCl);

S – площадь листа,  $\text{дм}^2$ ;

t – экспозиция, мин;

60 – коэффициент перевода минут в часы.

**Примечание 1:** Для установления количества  $\text{CO}_2$  соответствующего 1 мл используемой для титрования кислоты необходимо сопоставить реакции, в которые вступает щелочь:



Из приведенных уравнений видно, что 1 молю HCl соответствует 0.5 моля  $\text{CO}_2$ , т.е.  $44 : 2 = 22$  г  $\text{CO}_2$ .

При концентрации HCl 0.025 н. в 1 мл этого раствора содержится 0.000025 моля HCl, что эквивалентно  $22 \cdot 0.000025 = 0.00055$  г или 0.55 мг  $\text{CO}_2$ .

### **Примечание 2. Определение площади листа весовым методом**

Для определения площади листа необходимо его положить на миллиметровую бумагу и обвести контур карандашом. Контур листа вырезать ножницами и взвесить на весах. Взвесить квадрат, вырезанный из такой же бумаги с известной площадью. Из полученных данных составить пропорцию:

$$A : B = C : X,$$

Где A – вес квадрата,

B – вес бумажной фигуры листа,

C – площадь квадрата,

X – искомая площадь листа.

Подставляя числовые значения букв, найти величину площади листа.

**Выводы.** Сделать вывод об интенсивности фотосинтеза у разных видов растений (светолюбивые и теневыносливые).

### **Контрольные вопросы.**

1. Что называется интенсивностью фотосинтеза?
2. Какой газообмен наблюдается при фотосинтезе?
3. В каких условиях интенсивность фотосинтеза выше?

## Работа 17. Определение первичного крахмала на свету (проба Сакса)

**Вводные пояснения.** В световой фазе растения поглощают значительно больше энергии, чем это им необходимо в данный момент времени. Избыток энергии используется растениями для образования молекул крахмала, который расходуется в темный период суток на образование всех необходимых органических молекул. Для того чтобы установить образование крахмала на свету, необходимо удалить крахмал, уже имеющийся в листьях. Для этого растения подготавливают к опыту, помещая их на сутки и (больше) в темноту. В темноте крахмал вновь не образуется, имеющийся же крахмал частью оттекает от листа (превращаясь в растворимые формы углеводов) в другие органы растений, частью же потребляется в процессе дыхания.

**Объекты исследования.** Растение после пребывания в темноте с обескрахмаленными листьями.

**Реактивы.** Спирт, раствор  $I_2$  в КJ, вода, серная кислота ( $H_2SO_4$ ).

**Оборудование.** Спиртовка, чашка Петри, темная бумага, скрепки.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить раствор йода в йоде калия ( $I_2$  в КJ). Растворить 2г КJ в 5 мл дистиллированной воды, добавить 1г металлического йода, после полного растворения последнего прилить 295 мл воды. Хранить в темной склянке.
  2. Для того чтобы убедиться в отсутствии крахмала отрезать часть листа и кипятить в воде несколько минут.
  3. Перенести лист в пробирку со спиртом, поставить на горячую водяную баню и выдержать до обесцвечивания ткани.
  4. Обесцвеченную ткань листа для размягчения промыть водой.
  5. Затем в чашке Петри хорошо расправленный лист обработать раствором йода в йодистом калии\*.
- \*Примечание. Отсутствие синего окрашивания свидетельствует о полноте обескрахмаливания.
6. С этого же растения срезать лист и опустить его черешком в воду (возобновить срез под водой).
  7. На пластинке листа укрепить скрепками непрозрачный экран из темной бумаги, в котором вырезать какую-либо фигуру. Лист выставить на свет или поместить под электрическую лампу 250-500 Вт. Для исключения перегрева листа он должен находиться на расстоянии не менее 30 см. от лампы накаливания. Продолжительность экспозиции 2 часа.
  8. Чтобы создать лучшие условия влажности и увеличить содержание  $CO_2$ , опыт можно поставить под стеклянным колпаком и поместить под него кусочки мрамора, увлажненные концентрированной серной кислотой.
  9. По окончании опыта лист освободить от экрана.

10. Извлечь хлорофилл из листа для получения отчетливой йодной пробы, так как зеленая окраска маскирует реакцию крахмала с йодом. Для этого лист убить погружением на 1 минуту в кипящую воду, чтобы произошло размягчение тканей листа.
11. Лист опустить в спирт и выдержать до обесцвечивания, которое можно ускорить нагреванием на водяной бане. Затем лист снова погружают в кипящую воду (для размягчения тканей).
12. Пластинку листа тщательно расправить в чашке Петри и залить раствором йода с йодистым калием.
13. Отметить участки листа с образованием крахмала и участки с его отсутствием.

**Оформление работы.** Результаты работы оформить в виде рисунка листа растения.

**Выводы.** Сделать вывод о том, почему в освещенных местах обнаруживается обильное образование крахмала (синяя или черная окраска), а в местах, закрытых экраном крахмал не обнаруживается, и они окрашиваются от йода в желтый цвет.

**Контрольные вопросы.**

1. Какие продукты фотосинтеза образуются в листьях в темновой фазе фотосинтеза?
2. В чем разница между первичным крахмалом и вторичным?
3. Что происходит с углеводами листа в темноте?

## ТЕМА 4. Дыхание

Дыхание-это процесс поэтапного окислительно-восстановительного распада органических молекул до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . При этом выделяется свободная энергия, которая в основном аккумулируется в молекулах АТФ. На примере глюкозы общее уравнение этого процесса имеет следующий вид:

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + \text{энергия (2875 кдж/моль, т.е. 38 молекул АТФ)}$ .

Промежуточные продукты распада молекул используются для биосинтеза новых органических веществ (углеводов, белков, жиров, нуклеиновых кислот и др.). Энергия, полученная в результате дыхания, используется для биосинтеза упомянутых веществ и других процессов жизнедеятельности растительного организма.

У растений в отличие от животных эволюционно хорошо организован и функционально четко отлажен фотосинтетический аппарат, благодаря которому растения способны поглощать и аккумулировать солнечную энергию. Этот мощный приток энергии из внешней среды позволяет растениям синтезировать любые необходимые им органические молекулы из простых неорганических соединений. В таком случае казалось бы, что растениям, в принципе не нужен аппарат дыхания. Между тем в растительных клетках процессы дыхания играют такую же значимую роль, как и в клетках животных. Это связано с рядом обстоятельств.

*Во-первых*, не во всех растительных клетках функционирует фотосинтетический аппарат. Например, в клетках корневой системы фотосинтетические процессы отсутствуют, и метаболические процессы осуществляются за счет дыхания.

*Во-вторых*, растения в определенный период годового сезона уходят в состояние покоя. Этому процессу подвержены как сами материнские растения (покой у них в форме клубней, корнеплодов, луковиц, а также в состоянии почек у ряда травянистых и древесных растений), так и их половое потомство (семена). В период выхода из состояния покоя растущий зародыш семян и отрастающие почки растений используют гетеротрофный способ питания, мобилизуя запасные вещества (белки, жиры, и углеводы) через процесс дыхания.

*В-третьих*, значительная часть органических молекул, осуществляющих работу по реализации метаболизма в растительных клетках (белки-ферменты, белки-переносчики, белки-рецепторы, белки цитохромной системы, фосфолипиды биологических мембран и другие) со временем «изнашиваются». Они заменяются новыми, а устаревшие молекулы подвергаются «переработке» в дыхательном пути растительных клеток.

Наконец, *в-четвертых*, в темное время суток все растительные клетки переходят на гетеротрофный способ питания, который осуществляется за счет процессов дыхания.

Таким образом, наряду с фотосинтезом, дыхание составляет основу биоэнергетики у растений.

В настоящее время разработан ряд методов, который позволяет косвенно или непосредственно определить у растений активность дыхательных процессов. Часть из них представлена в предлагаемом руководстве.

## **Работа 18. Определение интенсивности дыхания семян в закрытом сосуде**

**Вводные пояснения.** Интенсивность дыхания можно определить по количеству CO<sub>2</sub>, выделившейся в единицу времени (1 час) единицей веса растения. Для определения интенсивности дыхания могут использоваться: проросшие семена, листья, соцветия и другие органы растения. Наиболее простой установкой для определения дыхания может служить колба с плотной резиновой пробкой.

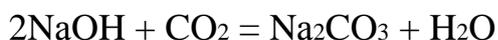
**Объекты исследования.** Семена пшеницы или других культур, заранее пророщенные.

**Реактивы.** Соляная кислота (HCl), гидроокись натрия (NaOH) и фенолфталеина.

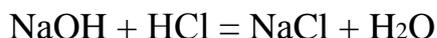
**Оборудование.** Колбы (3шт.) на 250-300 мл, марлевые мешочки (2шт.), резиновые пробки для колб с крючками для подвешивания мешочков с семенами, пробки для титрования (снабжены двумя трубками для внесения фенолфталеина и подсоединения к бюретке для титрования), бюретка для титрования, весы с разновесом, термостат, капельница.

### **Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 0,1н раствор соляной кислоты (HCl), 0,1н раствор гидроокиси натрия (NaOH) и 1%-ный раствор фенолфталеина.
2. Взвесить на весах (с точностью до 0,1 г) 5 – 10 г растительного материала, поместить его в марлевый мешочек, завязать ниткой и прикрепить к крючку на пробке опытной колбы.
3. В две одинаковых колбы налить по 30 мл NaOH и быстро одновременно закрыть, причем в опытной колбе мешочек с семенами не должен соприкасаться со щелочью.
4. Колбы поставить в темное место (для исключения процесса ассимиляции) с определенной температурой на 30 минут. При этом растительный материал дышит, выделяя CO<sub>2</sub>, которая поглощается щелочью по реакции:



5. Во время опыта колбы нужно осторожно покачивать, чтобы не допустить образования пленки  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , мешающей дальнейшему поглощению  $\text{CO}_2$ .
6. По окончании время экспозиции оттитровать остаток  $\text{NaOH}$  соляной кислотой.



Для этого необходимо быстро извлечь из опытных колб мешочек с семенами, и колбы плотно закрыть пробками для титрования. В каждую опытную колбу через одну из трубок внести 2-3 капли фенолфталеина, а вторую трубку соединить с бюреткой для титрования. Титрование проводить 0.1 н раствором  $\text{HCl}$  до слабо розового окрашивания.

7. Открыть контрольную колбу на период, равный открыванию опытных колб, и провести титрование контрольной колбы по аналогии с опытными вариантами (п.6).

**Оформление работы.** Интенсивность дыхания рассчитать по формуле:

$$X = 100 * d * (a - b) / n * z$$

где, X – интенсивность дыхания 100г растительного материала за 1 ч;

a – количество соляной кислоты ( $\text{HCl}$ ), израсходованной на титрование щелочи в контрольной колбе, мл;

b - количество раствора, связанного  $\text{NaOH}$  углекислотой в опытной колбе, т. е. количество  $\text{HCl}$ , пошедшего на титрование;

n – вес (в граммах) навески растительного материала;

z – продолжительность опыта (в час);

d – титр раствора щелочи.

**Выводы.**

### **Контрольные вопросы.**

1. Дайте определение понятию «дыхание».
2. Что такое интенсивность дыхания?
3. Какой газообмен наблюдается при дыхании?

## Работа 19. Определение дыхательного коэффициента у прорастающих семян

**Вводные пояснения.** Дыхательный коэффициент (ДК) - это отношение объема выделенного диоксида углерода ( $V \text{ CO}_2$ ) к объему поглощенного кислорода ( $V \text{ O}_2$ ). При окислении углеводов дыхательный коэффициент равен 1, при окислении жиров (более восстановленных соединений) кислорода поглощается больше, чем выделяется диоксида углерода и в связи с этим  $\text{ДК} < 1$ . При окислении органических кислот (менее окисленных соединений)  $\text{ДК} > 1$ .

Величина дыхательного коэффициента обусловлена, прежде всего, полнотой окисляемого субстрата. Повышение значения ДК происходит в некоторых тканях из-за затрудненного доступа кислорода. В этом случае возникает анаэробное дыхание, не сопровождающееся поглощением кислорода. В случае, когда наряду с конечными продуктами накапливаются в значительных количествах еще и органические кислоты (менее окисленные соединения)  $\text{ДК} < 1$ .

**Объекты исследования.** Прорастающие семена подсолнечника, пшеницы (фаза наклевывания семян).

**Реактивы.** Гидроксид натрия (NaOH), вода, метиленовая синь.

**Оборудование.** Прибор для определения дыхательного коэффициента (пробирка с плотно пригнанной каучуковой пробкой, в которую вставлена изогнутая под прямым углом измерительная трубка со шкалой из миллиметровой бумаги), пипетка с оттянутым концом.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 20% - ный раствор NaOH.
2. Заполнить пробирку семенами изучаемого объекта (примерно до половины) и плотно закрыть (вращательным движением) пробкой с градуированной трубкой, предварительно смочив слегка пробку водой.
3. Дать пробирке остыть от прикосновения рук и в конец трубки при помощи пипетки ввести небольшую каплю воды, подкрашенную метиленовой синью (внутри прибора создается в результате этого замкнутая атмосфера). Во время опыта необходимо поддерживать постоянную температуру. С этой целью пробирку помещают в штатив или стакан, избегая нагрева ее руками или дыханием.
4. Отметить положение внутреннего мениска капли (капля должна оторваться от края трубки). Наряду с этим отметить время начатого эксперимента.
5. После 2-5 (в зависимости от выбранного объекта) минут экспозиции отметить число делений, пройденных каплей, а затем еще 2 раза отметить число делений, пройденных каплей за такой же промежуток времени.
6. Для получения более точных результатов вычислить среднюю величину

- отсчетов (А), которая соответствует разности между объемами поглощенного кислорода и выделенного диоксида углерода.
- Открыть пробирку с семенами, проветрить ее и пинцетом вложить в верхнюю часть пробирки свернутую в кольцо полоску фильтровальной бумаги, смоченной 20%-ным раствором щелочи, таким образом, чтобы щелочь во время проведения эксперимента не попала на семена.
  - Пробирку закрыть пробкой с измерительной трубкой, в которую необходимо ввести новую каплю воды и продолжить эксперимент при соблюдении условий, аналогичных при получении величины (А).
  - Вычислить среднюю величину (Б), соответствующую объему поглощенного при дыхании кислорода, так как выделенный диоксид углерода поглощается щелочью. Средние значения величин А и Б позволяют рассчитать дыхательный коэффициент:  $A=V_{CO_2}-V_{CO_2}$ ;  $B=V_{O_2}$ ;  $V_{CO_2}=VB-VA$ . Следовательно, дыхательный коэффициент:  $V_{CO_2}/V_{O_2}=(B-A)/B$ .
  - Рассчитать (теоретически) дыхательный коэффициент при окислении до  $CO_2$  и  $H_2O$  известных химических соединений (жира, углевода или органической кислоты).

**Оформление работы.** Результаты записать в таблицу:

Таблица 1. - Дыхательный коэффициент у прорастающих семян растений

Вариант опыта	Отсчеты за 2-5 мин, мм				ДК (Б-А)/Б
	1	2	3	Среднее	
Без щелочи (А)					
Со щелочью (Б)					

**Выводы.** Сравнить экспериментально полученные результаты с теоретически рассчитанными данными и определить преобладающий субстрат (углеводы, жиры, белки и т.д.) дыхания.

**Контрольные вопросы.**

- Что называется дыхательным коэффициентом?
- Для чего растениям необходимо дыхание?

## Работа 20. Ферменты дыхания растений

### Определение активности дегидрогеназ в растительных объектах

**Вводные пояснения.** Дегидрогеназы катализируют реакцию дегидрирования, т.е. отнятия водорода от окисляемого субстрата дыхания и перенос его на акцептор, имеющий более высокий окислительно-восстановительный потенциал. В этой реакции участвует катализатор, являющийся промежуточным переносчиком водорода. В живой ткани роль промежуточного переносчика выполняют различные дегидрогеназы, которые отщепляют **H** от субстрата дыхания. В растительных тканях присутствуют аэробные и анаэробные формы дегидрогеназ. Первые из них переносят водород и электроны на молекулярный кислород, а вторые - на какой - либо промежуточный переносчик. Обнаружение дегидрогеназ основано на введении в живую ткань метиленовой сини, восстановление которой сопровождается изменением окраски. Метиленовая синь не содержит кислорода и, присоединяя два атома водорода, превращается в бесцветное восстановленное соединение - лейкоформу по следующей схеме:



Эксперимент следует проводить без доступа воздуха, так как при соприкосновении с молекулярным кислородом лейкоформа метиленовой сини самопроизвольно окисляется и вновь приобретает окраску:



**Объекты исследования.** Элодея (старые и молодые листья).

**Реактивы.** Метиленовая синь, 3%-ный раствор перекиси водорода, вода.

**Оборудование.** Микроскоп, предметное стекло, спиртовка, часовое стекло, пробирки.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить раствор метиленовой сини (0,05 г на 1 л водопроводной воды) и 3%-ный раствор пероксида водорода.
2. Часть листьев (молодые, старые) поместить в колбу с водой и кипятить в течение 3 мин для инактивации ферментов.
3. Затем обе партии листьев (контрольных, не подверженных кипячению, и прокипяченных) поместить в пробирки и залить раствором метиленовой сини.
4. Через 5-10 мин, раствор метиленовой сини слить и листья тщательно промыть водой для удаления красителя.

5. Листья элодеи различного возраста (контрольного и прокипяченного вариантов опыта) разложить на предметном стекле в воде, покрыть покровным стеклом и рассмотреть под малым увеличением микроскопа.
6. Определить степень окрашивания тканей у разновозрастных листьев элодеи (контрольного варианта и варианта с инактивированными ферментами).

**Оформление работы.** Результаты проведенного эксперимента записать в форме таблицы.

Таблица 1. - Активность дегидрогеназ у разновозрастных листьев элодеи.

Листья	Вариант	
	контроль	инактивирование ферментов
Молодые		
Зрелые		
Старые		

Для визуальной оценки степени активности ферментов у разновозрастных листьев элодеи использовать знаки «+» или «-»

**Выводы.** По результатам таблицы сделать соответствующие выводы.

### Определение активности пероксидазы в растительных тканях

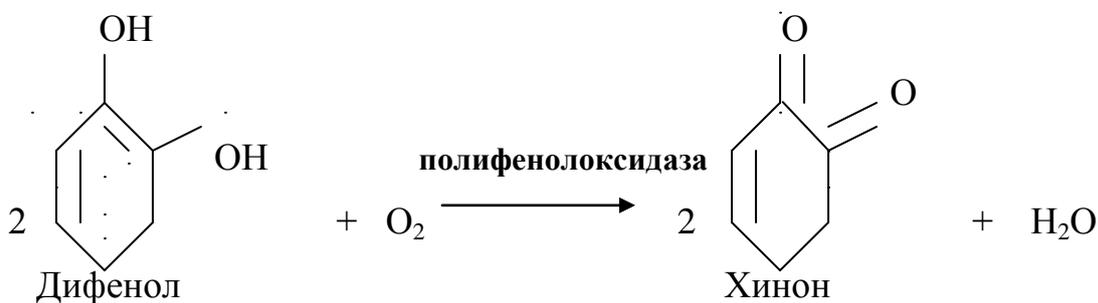
**Вводные пояснения.** Пероксидаза, равно как, и полифенолоксидаза и каталаза, относится к оксидазам-ферментам, переносящим электроны от окисляемого вещества на молекулярный кислород. Кислород, активированный таким образом, соединяется с отщепляемым от субстрата водородом, образуя воду или пероксид водорода по следующей схеме:



Пероксидаза – фермент, окисляющий полифенолы и ароматические амины кислородом пероксида водорода:



Полифенолоксидаза (о-дифенолоксидаза) окисляет полифенолы (ингибиторы метаболизма) кислородом воздуха с образованием соответствующих хинонов:



**Объекты исследования.** Клубни картофеля.

**Реактивы.** Гидрохинон [ $n - \text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$ ], пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

**Оборудование.** Скальпель, терка, марля, воронка, коническая колба (на 50 мл), штатив, пробирки (на 10 мл), пипетки (на 1 и 10 мл).

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 1%-ный водный раствор гидрохинона и 3%-ный раствор пероксида водорода.
2. Натереть на терке очищенный клубень картофеля.
3. В четыре пробирки внести по 5 мл 1% -го раствора гидрохинона.
4. Из мезги отжать через марлю картофельный сок в коническую колбу (используя воронку).
5. Затем в первую пробирку внести 1 мл 3%-го раствора перекиси водорода и 1 мл картофельного сока.
6. Во вторую пробирку к гидрохинону добавить только 1 мл 3% -го раствора перекиси водорода.
7. В третью пробирку внести только 1 мл картофельного сока.
8. В четвертую пробирку к гидрохинону добавить 1 мл, предварительно прокипяченного в течение 1 мин картофельного сока и 1 мл 3% - го раствора перекиси водорода.
9. Отметить изменение цвета раствора в пробирках.

**Оформление работы.** Результаты опыта оформить в виде таблицы.

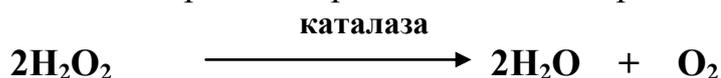
Таблица 1. - Активность пероксидазы в картофельном соке.

Вариант	Состав смеси в пробирках			Окраска раствора в пробирках
	картофельный сок	перекись водорода	гидрохинон	
1	+	+	+	
2	-	+	+	
3	+	-	+	
4	+	+	+	

**Выводы:** На основании визуальной оценки изменения окраски раствора в пробирках сделать выводы о наличии в картофельном соке фермента пероксидазы и ориентировочно оценить степень его активности. Наряду с этим визуально отметить изменение окраски (побурение) картофельного сока в колбе и сделать вывод о наличии и активности фермента полифенолоксидазы.

### Определение активности каталазы в растительных объектах

**Вводные пояснения.** При окислении субстрата дыхания в клетках растений образуется пероксид водорода, высокие концентрации которого оказывают токсическое действие на метаболизм клетки. Фермент каталаза расщепляет пероксид водорода с образованием кислорода и воды:



Наряду с этим каталаза выполняет и функцию поставщика кислорода в ткани отдельных органов растений с затрудненным доступом кислорода (плоды, корнеплоды, клубни картофеля). Об активности каталазы судят по интенсивности выделения кислорода, выделяющегося при разложении пероксида водорода.

**Объекты исследования.** Элодея (молодые, старые листья).

**Реактивы.** Пероксида водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), вода.

**Оборудование.** Спиртовка, пробирки, пипетки, микроскоп, предметное стекло.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 3%-ный раствор пероксида водорода.
2. Отделить молодые листья элодеи от старовозрастных и каждую партию из них разделить на две части.
3. Одну часть молодых и старовозрастных листьев прокипятить для инактивации фермента.
4. На предметное стекло нанести последовательно четыре капли 3%-ного пероксида водорода.
5. Листья элодеи (молодые, старые) прокипяченные и не прокипяченные последовательно поместить в капли пероксида водорода.
6. Под микроскопом при малом увеличении оценить интенсивность выделения пузырьков кислорода в каждом из исследуемых вариантов опыта.

**Оформление работы.** Результаты опыта оформить в виде таблицы.

Таблица 1. - Активность каталазы у разновозрастных листьев элодеи.

Вариант опыта	Активность выделения пузырьков кислорода
Молодые листья	
Молодые прокипяченные листья	
Старые листья	
Старые прокипяченные листья	

Для визуальной оценки активности каталазы у разновозрастных листьев элодеи использовать знаки «+» или «-».

**Выводы.** Сделать выводы, соответствующие результатам эксперимента.

**Контрольные вопросы.**

1. Что такое фермент?
2. Почему кипячение прекращает работу фермента?
3. Какова роль пероксидазы в дыхании?
4. Какое значение имеет каталаза в жизни растений?
5. На чем основано определение дегидрогеназы?

## ***ТЕМА 5. Водный обмен растений***

Все физиологические процессы в растении нормально протекают лишь при полном его обеспечении водой. Вода не только растворитель, но и активный структурный компонент клетки. Она участвует в биологических превращениях, например, облегчает взаимодействие между молекулами, служит субстратом для фотосинтеза, участвует в дыхании и в многочисленных гидролитических и синтетических процессах.

Вода обладает очень высокой теплоемкостью, поэтому способствует стабилизации температуры растения. Пронизывая все его органы, она создает в нем непрерывную фазу, обеспечивая связь органов друг с другом, а также возможность передвижения по растению питательных веществ. Вода играет существенную роль в сохранении формы травянистых растений, поддерживая их клетки в состоянии тургора.

Водный баланс растения определяется соотношением между поглощением и отдачей воды. Для сведения водного баланса без дефицита необходимо, чтобы расхождение влаги листьями компенсировалось ее поглощением через корни.

При выращивании сельскохозяйственных культур большое значение имеет эффективность использования воды растениями, показателем которой служит *транспирационный коэффициент* - количество воды, расходуемое растением на создание единицы веса сухого вещества.

Сильно влияют на величину транспирационного коэффициента условия минерального питания, обеспеченность водой, интенсивность освещения и многие другие факторы. Поэтому продуктивное использование воды растением можно повысить, создавая для него оптимальные условия водоснабжения и питания.

Познание закономерностей водного режима растений очень важно при разработке рациональных агротехнических приемов, направленных на получение высоких урожаев.

### **Работа 21. Определение интенсивности транспирации весовым методом**

***Вводные пояснения.*** *Транспирация* – это верхний концевой двигатель водообмена у растений. Интенсивность транспирации изучают, используя либо культурные, либо дикорастущие виды растений, подвергающиеся в естественных условиях разнообразной степени воздействия факторов внешней среды, приводящих к усилению транспирации растений.

***Объекты исследования.*** Срезанные листья различных видов

растений.

**Оборудование.** Технические весы, ножницы, скальпель, чашки Петри, фильтровальная бумага, миллиметровая бумага, часы, прибор Веска, линейка.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Срезать лист растения и быстро взвесить его.
2. Аналогично (по первому или второму способу) взвесить листья одного и того же яруса с десяти растений.
3. Через 3 – 5 минут после взвешивания первого листа повторно взвесить все листья в первоначальном порядке.
4. Рассчитать простым арифметическим вычитанием из массы листьев при первом взвешивании массы их при повторном взвешивании и определить сколько воды испарилось за период между первым и вторым взвешиванием.
5. Рассчитать количество воды, испарившейся из 1г свежесрезанных листьев за 1 час.
6. Определить площадь листа весовым методом (см. примечание 2, работа 16).
7. Интенсивность транспирации ( $\text{г/м}^2\text{ч}$ ) рассчитать по формуле:

$$I_T = n * 100000 * 60 * (s * t),$$

где n – количество испарившейся воды, г;

s – площадь листа,  $\text{см}^2$ ;

t – экспозиция, мин;

100000 – коэффициент перевода  $\text{см}^2$  в  $\text{м}^2$ ;

60 - коэффициент перевода минут в часы.

8. Одновременно при тех же условиях определить интенсивность эвапарации (свободного испарения). Для этого на технических весах взвесить чашку, наполненную почти до краев водой комнатной температуры (наружная поверхность чашки должна быть абсолютно сухой), и через любое время, например через 30 мин, сделать повторное взвешивание.
9. Определить испаряющую поверхность, измерив, внутренний диаметр чашки.
10. Вычислить интенсивность эвапарации ( $I_F$ ) по той же формуле, что и интенсивность транспирации (п.7).
11. Вычислить относительную транспирацию ( $I_T/I_F$ ).

**Оформление работы.** Результаты опыта оформить в виде таблицы.

Таблица 1. - Интенсивность транспирации у различных видов растений, (г/м<sup>2</sup>)

Объект	Вариант	Экспозиция, мин	Масса, г		Потеря воды, г	Площадь, см <sup>2</sup>	I <sub>T</sub>	I <sub>F</sub>	I <sub>T</sub> /I <sub>F</sub>
			начальная	через <b>n</b> мин					
Растение	Лист								
	Сосуд с водой								

**Выводы.** Сделать выводы о зависимости транспирации у растений от факторов внешней среды. Предложить способы избегания негативных последствий отрицательного воздействия факторов внешней среды.

**Контрольные вопросы.**

1. Что называется интенсивностью транспирации?
2. Какие внешние факторы влияют на интенсивность транспирации?
3. Что такое водообмен растений?

## Работа 22. Изучение состояния и количества устьиц методом отпечатков (по Полаччи)

**Вводные пояснения.** Метод отпечатков (реплики) позволяет оценить количество устьиц на единице листовой поверхности у различных видов растений.

**Объекты исследования.** Листья одного яруса крупно - и мелколистных видов засухо – и незасухоустойчивых видов растений.

**Реактивы.** Раствор коллодия или лак для ногтей.

**Оборудование.** Пинцет, кисточка для лака, микроскоп, окулярный микрометр, объективный микрометр, предметные стекла.

### **Последовательность выполнения работы.**

1. Нанести на нижнюю сторону листа кисточкой тонкий слой коллодия
1. .
2. После полного высыхания коллодия (через 2 –3 мин) пленку с отпечатками устьиц снять пинцетом.
3. Отпечатки устьиц с листа различных видов растений рассмотреть под микроскопом.
4. с помощью окулярного микрометра измерить ширину и длину не менее чем у десяти устьиц и вычислить средние значения.
5. Определить среднее число устьиц в поле зрения микроскопа, исследовав, пять полей зрения в различных местах среза (отпечатка).
6. Определить цену деления окулярного микрометра. Для этого поместить на предметный столик микроскопа объективный микрометр, каждое деление которого равно 0.01 мм, т. е. 10 мкм. Поворачивая окуляр, совместить обе шкалы так, чтобы нуль окулярного микрометра совпал с какой – либо линией объективного микрометра. На другом конце поля зрения также найти совпадающие линии и определить сколько делений окулярного микрометра соответствует делениям объективного микрометра, находящимися между совмещенными точками. Цена деления окулярного микрометра определяется по формуле:

$$B * 10 / A \text{ мкм}$$

7. Рассчитать абсолютные размеры устьиц, умножив их длину и ширину, выраженных в делениях окулярного микрометра, на цену одного деления.
8. Вычислить площадь устьиц с некоторым приближением, принимая его форму за ромб, по формуле:

$$S = 0,7 * a * b, \text{ где}$$

S - площадь устьица, мкм<sup>2</sup>;

a – ширина мкм;

b - длина щели мкм.

**Оформление работы.** Результаты работы представить в виде таблицы.

Таблица 1. - Количество и размеры устьиц у засухоустойчивых (1) и незасухоустойчивых (2) видов растений

Растение	Число устьиц, шт.	Цена деления окулярного микрометра, мкм	Размер устьица				Общая площадь (S) устьиц, мкм <sup>2</sup>	Средняя S устьица, мкм <sup>2</sup>
			в делениях окулярного микрометра, ед.		в мкм			
			длина	ширина	длина	ширина		
1								
2								

**Выводы.** Сделать выводы о количестве и размере устьиц у различных видов растений и оценить их транспирационную возможность. На основе полученных данных сделать вывод об отличительных особенностях транспирационного аппарата у засухо- и незасухоустойчивых растений.

**Контрольные вопросы.**

1. Что такое устьице?
2. Для чего необходим подсчет количества устьиц?
3. Каков механизм открывания и закрывания устьиц?
4. Чем отличается устьичная от внеустьичной транспирации?

## Работа 23. Определение степени открытости устьиц методом инфильтрации (по Молишу)

**Вводные пояснения.** Степень открытости устьиц у растений в различные периоды суток в достаточной степени хорошо отражает обеспеченность растений влагой и служит простым критерием водообмена.

**Объекты исследования.** Различные виды растений.

**Реактивы.** Этиловый спирт ( $C_2H_5OH$ ), петролейный эфир (фракция нефти с  $C_5$ - $C_{10}$  атомами углерода), ксилол [ $C_6H_4(CH_3)_2$ ].

**Оборудование.** Капельница (3шт), микроскоп.

**Последовательность выполнения работы.**

1. На идентичные участки нижней стороны листа нанести последовательно петролейный эфир, ксилол, этиловый спирт.
2. Выдержать лист в горизонтальном положении до полного исчезновения капель, которые либо могут испариться, либо проникнуть внутрь листа.
3. Рассмотреть лист (визуально или под микроскопом) в проходящем свете. В случае проникновения жидкости в межклетники листа на нем появляются прозрачные пятна.

**Оформление работы.**

Результаты опыта оформляют в виде таблицы.

Таблица 1. - Влияние внешних условий среды на состояние устьиц

Растение	Объект исследования	Инфильтрация			Степень раскрытия устьиц
		петролейный эфир	ксилол	этиловый спирт	
	лист				

В таблице знаком плюс (+) отметить проникновение жидкости, а знаком минус (-) - отсутствие инфильтрации испытуемых жидкостей.

**Примечание.** Относительно легко проникает в межклетники петролейный эфир, труднее – ксилол и значительно труднее – этиловый спирт.

**Выводы.** Сделать выводы о степени открытости устьиц в связи с проникновением испытуемых веществ или отсутствием их инфильтрации в межклетники. На основании степени открытости устьиц сделать вывод об оптимальном водоснабжении или недостаточной водообеспеченности растений, а также о возможности использования степени открытости устьиц в качестве критерия для регулирования обеспеченности растений водой.

**Контрольные вопросы**

1. На чем основан метод определения степени открытости устьиц?
2. О чем свидетельствует степень открытия устьиц у растений?

## **ТЕМА 6. Физиология минерального питания**

Растения в процессе фотосинтеза накапливают такое большое количество энергии, что это позволяет им создавать органические молекулы из неорганических молекул. Обычный состав органических молекул обусловлен небольшим набором элементов. Это - азот, фосфор, калий, углерод, кислород, водород и сера. Остальное разнообразие элементов питания исполняет роль микроэлементов. Из названных элементов углерод вместе с кислородом в форме углекислого газа растения поглощают из воздуха. Это так называемое «воздушное питание». Весь водород, сосредоточенный в конструкциях органических молекул растения получают из воды. Все остальные элементы растения получают из почвы через корневую систему и благодаря водному транспорту. Так как вода вместе с растворенными в ней веществами перемещается по апопласту, то и для клеток корня и для клеток листо-стеблевой части растения создаются равновозможные условия снабжения элементами минерального питания.

### **Работа 24. Качественный микрохимический анализ золы растений**

**Вводные пояснения.** Микрохимический метод служит для качественного анализа золы растений. Качественный микрохимический метод удобен тем, что выполнение его непродолжительно по времени, и он не требует большого количества золы и реактивов. Метод основан на том, что при кристаллизации солей образуются кристаллы форма и цвет которых специфичны для определенной соли.

**Объекты исследования.** Зола листьев растений, зола стеблей растений

**Реактивы.** Дистиллированная вода, соляная кислота (HCl), аммиак (NH<sub>3</sub>), азотнокислое серебро (AgNO<sub>3</sub>), серная кислота (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фосфорнокислый натрий (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), азотная кислота (HNO<sub>3</sub>), молибденово кислый аммоний (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, азотная кислота (HNO<sub>3</sub>), желтая кровяная соль K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>].

**Оборудование.** Пробирки (5шт.) –10 мл, воронки (2шт.), стеклянные палочки (2шт), штатив, фильтры бумажные, микроскоп, предметные стекла (3шт.), салфетки бумажные, цветные карандаши, линейка, фарфоровый тигель, фильтровальная бумага

#### **Последовательность выполнения работы**

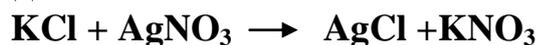
1. Дистиллированная вода, 10% - ный раствор соляной кислоты (HCl), 10% - раствор аммиака (NH<sub>3</sub>), 1% - ный раствор азотнокислого серебра (AgNO<sub>3</sub>), 1% - ный раствор серной кислоты (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1% - ный раствор фосфорнокислого натрия (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 1%–ный раствор молибденово

кислого аммония  $(\text{NH})_2\text{O}_4$  в 15% - ной азотной кислоте  $(\text{HNO}_3)$ , 1% -ный раствор желтой кровяной соли  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

2. В две чистые сухие пробирки насыпать по 0,25 г изучаемой золы.
3. В одну из пробирок налить 2 мл дистиллированной воды, а во вторую – 2 мл 10% соляной кислоты
4. Для наиболее полного извлечения солей суспензию в обеих пробирках тщательно взболтать и дать отстояться в течение 15 мин
5. По истечению экспозиции вытяжки из обеих пробирок профильтровать в чистые пробирки. В водном фильтрате золы содержатся хлориды, а в солянокислом экстракте – остальные соли

### **Обнаружение хлоридов( $\text{KCl}$ , $\text{NaCl}$ и другие соли)**

1. В пробирку налить 0.5 мл водной вытяжки золы.
2. К водной вытяжке золы добавить (1-2 капли) 1% - ный раствор азотнокислого серебра
3. Наблюдать выпадение белого осадка. Реакция между хлоридами и азотнокислым серебром протекает с образованием хлористого серебра, выпадающего в осадок:



**Оформление работы.** Форму и цвет кристаллов, специфических для определяемого элемента зарисовать цветными карандашами.

### **Обнаружение солей Ca**

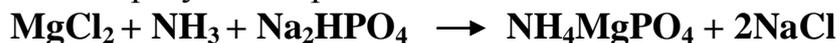
1. Взять чистое сухое предметное стекло и положить его на белую бумагу
2. На стекло нанести стеклянной палочкой 1% - ный раствор серной кислоты
3. Палочку промыть, просушить фильтровальной бумагой
4. В 2-3 мм от капли серной кислоты стеклянной палочкой нанести каплю изучаемой солянокислой вытяжки золы
5. Обе капли тщательно смешать стеклянной палочкой и размазать смесь их в середине предметного стекла
6. Стекло оставить на бумаге до полного высыхания капли
7. Образовавшиеся на предметном стекле соли Ca рассматривать при малом и большом увеличении микроскопа без покровного стекла
8. Обнаружить игольчатые кристаллы гипса или их сростки, образующиеся в результате следующей реакции:



**Оформление работы.** Форму и цвет кристаллов, специфических для определяемого элемента зарисовать цветными карандашами.

### **Обнаружение солей Mg**

1. Взять чистое сухое предметное стекло и положить его на белую бумагу
2. На предметное стекло нанести стеклянной палочкой каплю солянокислого субстрата
3. Нейтрализовать солянокислый фильтрат золы. Для этого к капле солянокислого субстрата на стекле добавить небольшую каплю 10% - раствора аммиака
4. На стекло (в 2 –3 мм от изучаемого нейтрализованного экстракта золы) нанести чистой сухой стеклянной палочкой 1% – ный раствор фосфорнокислого натрия
5. Каплю зольной вытяжки соединить мостиком с каплей 1%-ного раствора молибденово кислого аммония в 15 % – ной соляной кислоте
6. Предметное стекло оставить на бумаге до полного высыхания капли
7. Образовавшиеся на предметном стекле соли Mg рассматривать при малом и большом увеличении микроскопа без покровного стекла
8. Обнаружить кристаллы фосфорно-аммиачно-магнезиальной соли, имеющие вид квадратов, прямоугольников, крышек, крыльев, образовавшихся в результате реакции:



**Оформление работы.** Форму и цвет кристаллов, специфических для определяемого элемента зарисовать цветными карандашами.

### **Обнаружение солей P**

1. Взять чистое сухое предметное стекло и положить его на белую бумагу
2. На предметное стекло чистой сухой стеклянной палочкой нанести каплю солянокислого субстрата
3. На это же стекло (в 2 –3 мм от изучаемого экстракта золы) нанести чистой сухой стеклянной палочкой каплю 1% – ного раствора молибденово кислого аммония в 15 % - ном растворе азотной кислоты
4. Обе капли тщательно смешать стеклянной палочкой и размазать смесь их в середине предметного стекла

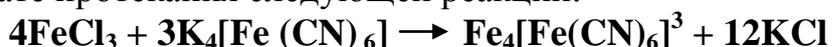
5. После подсыхания смеси жидкости наблюдать при малом и большом увеличении микроскопа без покровного стекла скрытно кристаллический осадок, принимающего по мере подсыхания смеси все более интенсивную зеленую окраску в результате образования аммонийно-фосфорного молибдена:



**Оформление работы.** Форму и цвет кристаллов, специфических для определяемого элемента зарисовать цветными карандашами.

### Обнаружение солей Fe

1. В чистый сухой фарфоровый тигель (возможно использование пробирки) налить 0.5 мл изучаемой солянокислой вытяжки золы.
2. К вытяжке добавить равное количество (0.5 мл) 1%-ного раствора желтой кровяной соли.
3. Наблюдать образование берлинской лазури интенсивно голубого цвета в результате протекания следующей реакции:



**Оформление работы.** Форму и цвет кристаллов, специфических для определяемого элемента зарисовать цветными карандашами.

**Выводы.** Сделать выводы о возможности тестирования с помощью метода качественного микрохимического анализа состава золы необходимых для растений питательных элементов.

### Контрольные вопросы.

1. На чем основана методика качественного микрохимического анализа золы растений?
2. Можно ли подобным микрохимическим анализом определить количество того или иного элемента в золе?
3. Можно ли качественным и количественным анализом состава золы растений определить необходимые для питания химические элементы?

## Работа 25. Антагонизм ионов водорода и кальция

**Вводные пояснения.** Отдельные соли (как правило) могут оказывать негативное действие на живые клетки, в то время как их смесь оказывается безвредной. Это обусловлено тем, что необходимая величина рН среды на поверхности мембраны достигается лишь за счет сочетания ионов различных валентностей. Раствор с оптимальным соотношением ионов называется уравновешенным.

**Объекты исследования.** Корнеплоды красной столовой свеклы.

**Реактивы.** Соляная кислота (HCl, хлористый кальций (CaCl<sub>2</sub>).

**Оборудование.** Лупы, пинцет, капельница, фильтровальная бумага, карандаш по стеклу, химические стаканы (3шт.) на 100мл, пипетки (2 шт.) на 10 мл, пипетки (2шт.) на 5 мл

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить соляную кислоту (HCl) – 0.002 н. раствор, хлористый кальций (CaCl<sub>2</sub>) – 0.002 н. раствор, сахарозу – 1М раствор.
2. Химические пробирки пронумеровать (1,2,3,4).
3. В 1 пробирку налить 4 мл соляной кислоты (0.002 н.), во вторую 4 мл хлористого кальция (0.002 н.), в 3 пробирку – смесь растворов, состоящую из 2 мл соляной кислоты (0.002 н.) и 2 мл хлористого кальция (0.002 н.), в 4 пробирку 4 мл воды (контроль).
4. В каждый из изучаемых растворов поместить по два среза красной свеклы.
5. С этого момента отметить начало опыта и следить за временем, когда срезы в том или ином растворе обесцветятся (в ядовитом растворе клетки быстро гибнут и клеточный сок, окрашенный антоцианом, быстро выходит из мертвых клеток в раствор).
6. Установить скорость обесцвечивания срезов в растворе в минутах для получения сравнительной токсичности раствора (если ядовитость ионов H<sup>+</sup> полностью аннулирована ионами Ca<sup>2+</sup>, то срезы свеклы очень долго не обесцвечиваются, так как антоциан остается в вакуоли клетки. Такие растворы солей называются уравновешенными).
7. Скорость обесцвечивания срезов свеклы определить с помощью лупы или невооруженным глазом.

**Выводы.** На основании полученных результатов сделать выводы о степени воздействия (нередко негативном) каждого из изученных ионов на жизнеспособность клеток свеклы и об исключении этого эффекта в случае их взаимного воздействия

**Контрольные вопросы.**

1. Что такое антагонизм ионов?
2. Какие растворы называются физиологически уравновешенными?

## Работа 26. Антагонизм ионов калия и кальция

**Вводные пояснения.** Элементы минеральных веществ, поступив в цитоплазму в виде катионов и анионов, выполняют в клетке ряд важных функций. Они используются как исходные элементы для образования различных органических молекул. Они создают осмотические системы клетки. Они, наконец, все без исключения используются для регуляции РН – среды на внешней и внутренней стороне всех мембран.

При выращивании проростков семян на однокомпонентной среде питания нередко происходит угнетение роста растений (очень редко стимулирование его), в то время как в многокомпонентной системе питания эффект угнетения практически отсутствует.

**Объекты исследования.** Семена пшеницы, ячменя в начальной стадии прорастания (стадия наклевывания).

**Реактивы.** Хлорный калий (KCl) х.ч., хлорный кальций (CaCl<sub>2</sub>) х.ч., бидистиллированная вода.

**Оборудование.** Чашка Петри (3шт.), фарфоровая чашка, пипетка на 10 мл (2шт.), фильтровальная бумага, пинцет, ножницы, карандаш по стеклу, миллиметровая линейка.

**Примечание.** х.ч. – химически чистые соли.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить растворы солей KCl (9 г/л), CaCl<sub>2</sub> (6.7 г/л) на бидистиллированной воде.
2. Отобрать в фарфоровую чашку 80 одинаковых по размеру и стадии наклевывания семян.
3. Наклюнувшиеся семена не менее 3 раз промыть бидистиллированной водой.
4. Чашки Петри (4шт.) перед тем как разложить в них семена необходимо промыть бидистиллированной водой.
5. На дно чашек Петри положить вырезанную по их размеру фильтровальную бумагу.
6. В чашки Петри разложить пинцетом (ни в коем случае руками) по 20 шт. наклюнувшихся семян.
7. Чашки Петри пронумеровать карандашом по стеклу.
8. В первую чашку Петри налить 15 мл раствора KCl, во вторую – 15 мл раствора CaCl<sub>2</sub>, в третью – 13 мл раствора KCl и 2мл раствора CaCl<sub>2</sub>, а в четвертую – воду.
9. Чашки Петри закрыть крышками и оставить при комнатной температуре.
10. Через каждые 2 дня чашки Петри необходимо проветривать, оставляя их открытыми в течение нескольких секунд.
11. Через 7 дней измерить длину всех стеблей и корней (у каждого экземпляра измерить самый длинный корешок).
12. Вычислить средние величины стеблей и корней.

**Оформление работы.** Результаты исследований оформить в виде таблицы.

Таблица 1. - Влияние однокомпонентной и двухкомпонентной системы растворов и их смеси на рост проростков

Вариант опыта	Чашка Петри (номер)	Средняя длина, мм	
		стеблей	корней
KCl	1		
CaCl <sub>2</sub>	2		
KCl + CaCl <sub>2</sub>	3		
Вода	4		

**Выводы.** На основании полученных результатов сделать выводы о влиянии растворов отдельных солей, а также их смеси на рост растений. Сделать также выводы о различной чувствительности отдельных органов растений к изученным системам растворов.

**Контрольные вопросы.**

1. Какой раствор оказался наиболее токсичным?
2. Рост какого органа больше подавляется ядовитыми ионами?
3. Обладают ли антагонизмом ионы?

## Работа 27. Физиологически кислые и щелочные соли

**Вводные пояснения.** Растения поглощают из почвенного раствора элементы минерального питания в виде соответствующих ионов (катионов и анионов). Соли, [например,  $KCl$ ,  $K_2SO_4$ ,  $(NH)_2SO_4$ ] равно как и удобрения (например, калийные соли, сульфат калия, кали магнезия), у которых катион поглощается быстрее, чем анион и в большем количестве и вследствие этого реакция раствора или почвы сдвигается в кислую сторону, являются физиологически кислыми.

Физиологически щелочные соли [например,  $NaNO_3$ ,  $Ca(NO_3)_2$ ] или удобрения (например, кальциевая селитра, калиевая селитра) – это соединения, у которых анион поглощается быстрее и в большем количестве, чем катион, благодаря этому реакция раствора или почвы сдвигается в щелочную сторону повышения значения рН среды.

**Объекты исследования.** Проростки пшеницы или других растений с хорошо развитыми корнями (4-6 см)

**Реактивы.** Хлористый аммоний ( $NH_4Cl$ ), азотнокислый натрий ( $NaNO_3$ ).

**Оборудование.** Универсальный индикатор, пробирки (10 – 20 мл) – 3 шт., штатив, вата негигроскопическая, светонепроницаемая бумага, карандаш по стеклу.

### **Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 0.02%-ные растворы хлористого аммония ( $NH_4Cl$ ) и азотнокислого натрия ( $NaNO_3$ )
2. Налить в пробирки последовательно водопроводную воду (вариант 1), хлористый аммоний (вариант 2) и, наконец, азотнокислый натрий (вариант 3).
3. С помощью универсального индикатора определить рН – раствора контрольного (1) и испытуемых (2,3)
4. В каждую из пробирок высадить по 3 проростка пшеницы (или иных проростков), закрепив их ватной пробкой таким образом, чтобы она (пробка) не соприкасалась с раствором. Пробирки этикетировать.
5. Во избежание доступа света к корням завернуть пробирки светонепроницаемой бумагой.
6. Поместить пробирки на 1 неделю в хорошо освещенное место.
7. По окончании экспозиции с помощью универсальной индикаторной бумаги определить рН – растворов.

**Оформление работы.** Результаты опыта оформить в виде таблицы.

Таблица 1. - Изменение РН – раствора в зависимости от физиологически кислой или щелочной соли

Объект исследования	Вариант опыта	Пробирка (номер)	РН - раствора	
			исходная	Через 7 дней
	Водопроводная вода	1		
	$\text{NH}_4\text{Cl}$	2		
	$\text{NaNO}_3$	3		

**Выводы.** Сделать выводы о преимущественном поглощении корнями растений катионов или анионов из растворов испытуемых солей.

**Контрольные вопросы.**

1. Какие питательные соли называются физиологически кислыми и, какие физиологически щелочными?
2. В каком состоянии минеральные вещества поглощаются корнями?

## ***ТЕМА 7. Рост и развитие растений***

Рост и развитие растений — главные физиологические процессы, определяющие структуру, величину и качество урожая. Поэтому агроном должен хорошо знать эти процессы, уметь их исследовать и контролировать.

В жизненном цикле (онтогенезе) растения различают пять периодов: эмбриональный (зародышевый), юности (ювенильный или вирганильный), полового созревания, полной зрелости и размножения, старения и умирания.

Первый и второй периоды онтогенеза, характеризующиеся увеличением числа и размеров вегетативных органов, объединяют общим понятием вегетативного развития, а третий и четвертый — генеративного развития растения.

Общий закон роста — его неравномерность, или периодичность, обусловленная внутренними причинами. Вначале рост органа или всего растения происходит медленно, затем быстрее и потом замедляется. Нарастание общей массы органа или растения графически выражают в виде плавной S-образной кривой, а скорость роста, или прироста массы, в виде плавной, более или менее симметричной кривой с одним максимумом. К важному внутреннему фактору роста и развития растений относятся вещества высокой физиологической активности, объединяемые под названием регуляторов роста и развития. К ним принадлежат ауксины, гиббереллины, кинины и ингибиторы роста. Поскольку эти вещества образуются в одних тканях и органах растения и, передвигаясь, действуют на другие ткани и органы, их называют также фитогормонами. В зависимости от физиологического состояния растения и концентрации фитогормонов и их соотношений они могут стимулировать или прекращать тот или иной физиологический процесс, ускорять или замедлять его.

Синтезировано много искусственных регуляторов роста растений, которые широко применяют для подавления развития сорняков, укоренения черенков, нарушения или создания покоя растений, опадания листьев, ускорения опадания излишних завязей и предупреждения предуборочного опадания плодов, увеличения их размеров, получения партенокарпических (бессемянных) плодов.

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

## Работа 28. Определение зоны роста корня и стебля

**Вводные пояснения.** Для изучения ростовых процессов обычно используют метод нанесения меток на поверхность изучаемых органов (стебли, корни) через одинаковые расстояния. По мере роста органа расстояние между метками увеличивается, но в разных зонах роста происходит это с неодинаковой скоростью, что и взято за основу метода определения зон роста. В этой связи этот метод широко используется физиологами растений как тест на устойчивость растений к неблагоприятным условиям среды. Данная работа не предполагает изучения устойчивости растений. Она направлена на освоение метода выявления зон роста. Для нанесения меток используют различные материалы, но чаще всего используют тушь (сухую тушь растирают в 5% - ном декстрине или альбумине). Метки наносят либо тонкой щетинкой, прикрепленной к палочке, либо тонкой заточенной деревянной палочкой (спичкой), либо ниткой, смоченной тушью.

**Объекты исследования.** Проростки гороха, бобов или кукурузы с прямыми корешками, длина которых приблизительно 2 см, проростки подсолнечника или фасоли с подсемядольным коленом длиной 4 –5 см.

**Реактивы.** Черная тушь (в 5% - ном альбумине или декстрине).

**Оборудование.** Фильтровальная бумага, ножницы, тонкие булавки (3 шт.), пинцет, этикетка, полоска миллиметровой бумаги, заостренная спичка, тарелка, миллиметровая линейка.

### Определение зоны роста корня

#### **Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить камеру для изучения зон роста растений. Камера – это либо банка, либо пробирка на 20 мл, стенки которой выложены фильтровальной бумагой, а на дно ее налито небольшое количество воды. Чтобы обеспечить благоприятные условия для роста семени (оно не должно подсыхать) подложить под него узкую полоску фильтровальной бумаги, верхний конец которой закрепить вместе с семенем, а нижний - опустить в воду. Крышкой для камеры служит либо корковая пробка, что в достаточной степени удобно для закрепления семени булавкой, либо (менее удобный вариант) пробка из ваты.

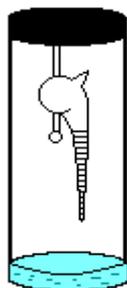


Рисунок 1. – Камера для изучения роста корня

- Взять из сосуда (растительни) 3 проросших семени и осторожно фильтровальной бумагой удалить с поверхности корешков влагу. Корешки семени должны быть абсолютно прямыми. Это достигается путем высаживания наклюнувшихся семян растений в достаточной степени глубокий сосуд с влажными опилками, в которых стеклянной палочкой сделаны углубления для вертикального роста корней.
- Подложить под корешок полоску миллиметровой бумаги и нанести заостренной спичкой первую метку на расстоянии 1 мм от кончика корня, а последующие метки наносить на расстоянии 2 см друг от друга.
- Проращивать проростки (в камере для изучения роста растений) в течение суток в темноте при температуре 20 –25 °С.
- Через сутки измерить расстояния между метками. В случае растянувшихся во время роста меток (полоски вместо линий) измерения проводить от их середины.
- Вычислить для каждого участка корня средний суточный прирост, вычитая из полученных величин исходные интервалы, т.е. 1 см для первого участка и 2 см для всех последующих. Первый участок – это расстояние от кончика корня до первой метки.

**Оформление работы.**

Результаты проведенного эксперимента оформить в виде таблицы и графика. На графике, на оси абсцисс откладывать номер участка, а на оси ординат – средние данные прироста корня за сутки.

Среднесуточный прирост корня, мм

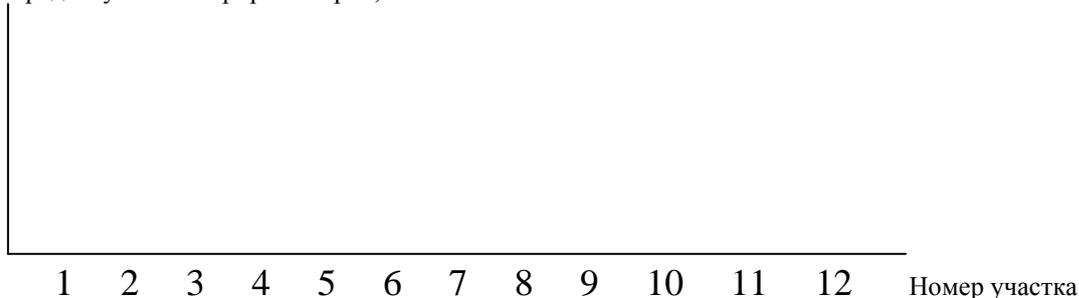


Рисунок 2. Средний суточный прирост корня \_\_\_\_\_  
(название растения)

Таблица 1. - Средний суточный прирост корня, мм

Растение	Корни	Прирост участков, мм											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1												
	2												
	3												
	Среднее												

**Определение зоны роста стебля**

**Последовательность выполнения работы.**

- Отобрать (не вынимая их из сосуда) 3 проросшие семени фасоли, бобов

или подсолнечника, с длиной проростков 3 - 4 см. Проростки изучаемых культур выращивают в сосудах с почвой в темноте.

2. На подсемядольном колене, подложив под него полоску миллиметровой бумаги, нанести заостренной спичкой метки на расстоянии 2 см, начиная от места прикрепления семядолей.
3. Проращивать проростки (в камере для изучения роста растений или в пробирке) в течение суток в темноте при температуре 20 – 25 °.
4. Через сутки измерить расстояния между метками. В случае растянувшихся во время роста меток (полоски вместо тонких линий) измерение проводить от их середины.
5. Вычислить суточный прирост различных участков стебля, вычитая из полученных величин исходные интервалы (2 см).

**Оформление работы.** Результаты проведенного эксперимента оформить в виде таблицы и рисунка. На рисунке на оси абсцисс откладывать номер участка, а на оси ординат - средние данные прироста стебля за сутки.

Среднесуточный прирост стебля, мм

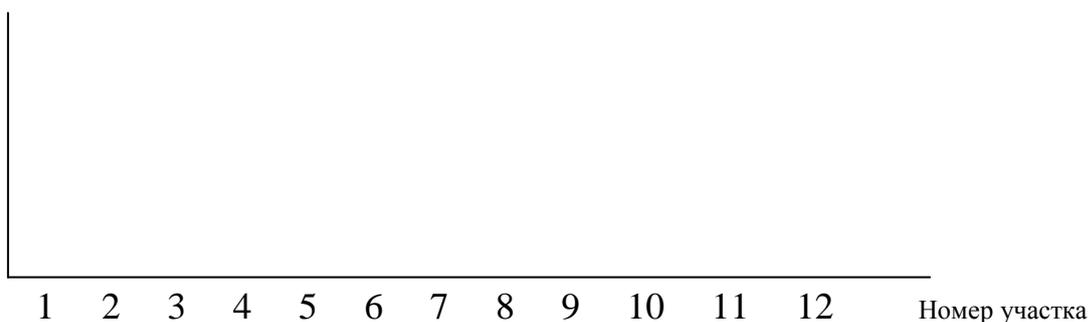


Рисунок 3. - Суточный прирост стебля \_\_\_\_\_  
(название растения)

Таблица 2 -. Суточный прирост стебля, мм

Растение	Стебли	Прирост участков, мм											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1												
	2												
	3												
	Среднее												

**Выводы.** На основании полученных данных сравнить средний суточный прирост различных участков у корня и стебля. Сделать вывод о характере роста корня и характере роста стебля.

**Контрольные вопросы.**

1. Какие фазы роста проходит каждая клетка?
2. Что называется большим периодом роста?

## Работа 29. Изучение действия различных концентраций гетероауксина на рост корней

Методические процедуры сводятся к проращиванию семян на различных концентрациях гетероауксина и учете длины корней.

**Объекты исследования.** Семена пшеницы или кукурузы.

**Реактивы.** Гетероауксин ( $C_{10}H_9O_2N$ ) – [3-индолилуксусная кислота (ИУК)].

**Оборудование.** Чашки Петри, пипетки (1 мл), мерные цилиндры (10 мл), фильтровальная бумага, маркер по стеклу.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Пронумеровать 5 чашек Петри (1, 2, 3, 4, 5).
2. Приготовить растворы гетероауксина следующих концентраций: 0,00001%; 0,0001 %; 0,001%; 0,01%. Удобно готовить разбавленные растворы из исходного раствора гетероауксина 0,01%-ной концентрации. Для получения исследуемых концентраций в мерный цилиндр на 10 мл налить 1мл раствора гетероауксина 0,01%-ной концентрации, и прилить (до мерной черты) 9 мл водопроводной воды. Затем раствор тщательно перемешивать и 9 мл его вылить в чашку Петри (5), а к оставшемуся 1 мл раствора гетероауксина (0,01%) прилить также, как и в первом случае, 9 мл водопроводной воды. Приготовленный раствор гетероауксина имеет 0,001% - концентрацию и 9 мл его перенести в чашку Петри (4). Аналогичным образом приготовить растворы более низких концентраций (0,0001% и 0,00001%), которые также последовательно по 9 мл прилить в чашки Петри (3 и 2).
3. На дно чашек Петри поместить фильтровальную бумагу, соответствующую по размеру ее диаметру.
4. В чашки Петри (1, 2, 3, 4, 5) налить по 9 мл: в первую – водопроводной воды, а во 2 – 5 чашки Петри налить последовательно гетероауксин следующих концентраций: во вторую – 0,00001%, в третью – 0,0001%, в четвертую – 0,001% и, наконец, в пятую - гетероауксин 0,01%-ной концентрации.
5. В каждую чашку Петри положить по 5 зерновок (желательно их визуально откалибровать по размеру) пшеницы или кукурузы. Чашки закрыть крышками и семена проращивать в темноте при температуре  $20 - 25^{\circ}$ .
6. Через неделю в каждом варианте опыта измерить длину всех корешков.

**Оформление работы.** Результаты эксперимента оформить в виде таблицы.

Таблица 1. - Влияние различных концентраций гетероауксина на рост корней \_\_\_\_\_, см  
(название объекта)

Вариант	Суммарная длина корешков, см	Средняя длина корешков на одно растение, см	Длина корешка, % к контролю
Водопроводная вода (контроль)			100
Раствор гетероауксина, %: 0,00001			
0,0001			
0,001			
0,01			

**Выводы.** По результатам эксперимента сделать выводы о том, какая, из изученных концентраций гетероауксина оказывает стимулирующее действие на рост корней растений, какая - ингибирующее, и, наконец, какая, концентрация гетероауксина является физиологически нейтральной.

**Контрольные вопросы.**

1. Какие фитогормоны стимулируют рост и развитие растений?
2. Какие фитогормоны ингибируют рост и развитие растений?
3. В какой концентрации гетероауксин стимулирует образование корешков у корней?

## **ТЕМА 8. Устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды**

Устойчивость растений к неблагоприятным условиям среды в агрономическом аспекте характеризуется тем, насколько изменяется продуктивность растений под влиянием этих условий по сравнению с продуктивностью их на оптимальном фоне (П.А. Генкель). Оценка устойчивости растений к экстремальным факторам (холоду, морозу, засухе, жаре, засоленности) важна для селекционной и агрономической практики.

Наиболее надежными методами оценки устойчивости растений к экстремальным факторам являются прямые полевые и вегетационные методы. Однако большая трудоемкость и продолжительность этих методов вынуждает исследователей применять разнообразные способы ускоренной лабораторной или лабораторно-полевой диагностики устойчивости растений.

В предлагаемом разделе практикума представлены работы, демонстрирующие физиологические и биохимические свойства, определяющие устойчивость растений и наиболее часто применяемые методы диагностики.

Для полготовки растений, контрастных по устойчивости, используют агротехнические опыты агрономических кафедр института. Растения, выращенные на полевых микроделянках и в условиях вегетационных опытов кафедры физиологии растений в опытах с удобрениями, сроками сева, сортами и др.

### **Работа 30. Защитное действие сахаров на цитоплазму растительных клеток. Устойчивость к заморозкам**

**Вводные пояснения.** При низких отрицательных температурах в межклетниках растительных тканей образуются кристаллы льда, которые, оттягивают воду из клеток, и тем самым способствуют обезвоживанию ее цитоплазмы. Степень устойчивости клеток к обезвоживанию у различных растительных организмов специфична. До определенной степени устойчивость клеток растений к обезвоживанию сохраняется благодаря ее водоудерживающей способности. При длительном же воздействии отрицательной температуры происходит не только коагуляция цитоплазмы, но нарушается и ее внутренняя структура. Все эти негативные процессы приводят, в конце концов, к отмиранию клеток. Между тем водоудерживающая способность цитоплазмы клеток в значительной степени зависит от концентрации находящихся в ней веществ. Эта концентрация у зимующих растений увеличивается за счет накопления к

началу зимнего периода растворимых сахаров. К тому же структура клеточной мембраны сохраняется благодаря тому, что она находится в водной среде. При дефиците воды мембранная структура сохраняется за счет углеводов, так как по химическому строению они очень близки к молекулам воды (радикалы  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$ ) имеются и у воды и у углеводов. Кстати, по этой причине семена, высушенные до влажности 14% и ниже, сохраняют годами жизнеспособность.

На свойстве растворимых сахаров обеспечивать сохранение структуры мембраны, и благодаря этому, повышать водоудерживающую способность цитоплазмы клеток растительных тканей, и основана предлагаемая работа.

**Объекты исследования.** Корнеплоды красной столовой свеклы.

**Реактивы.** Сахароза 0.5 М и 1 М растворы, поваренная соль, лед, снег.

**Оборудование.** Металлический сосуд для охлаждающей смеси, лопатка для охлаждающей смеси, термометр до  $30^\circ\text{C}$ , скальпель, пробочное сверло диаметром 6 мм, бритва, пробирки на 10 мл (3шт.), микроскоп, предметные стекла, фильтровальная бумага, карандаш по стеклу, стакан.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить охлаждающую смесь, температура которой приблизительно -  $20^\circ\text{C}$ . Для приготовления охлаждающей смеси заданной температуры необходимо 3 части колотого льда или снега тщательно смешать с 1 частью поваренной соли.
2. Приготовить пластинки свеклы, делая у корнеплода поперечные срезы, толщина которых колеблется в пределах 5 мм.
3. С помощью пробочного сверла приготовить 15 шт. высечек.
4. Высечки свеклы промыть под струей водопроводной воды для удаления клеточного сока из поврежденных (во время приготовления высечек) клеток.
5. Пронумеровать пробирки (1,2, 3), в которые прилить последовательно 5 мл дистиллированной воды (1), 5 мл 0.5 М раствора сахарозы (2) и 5 мл 1 М сахарозы (3).
6. В каждую из пробирок поместить по 5 шт. дисков свеклы одинаковых по толщине.
7. Поместить пробирки на 20 мин в охлаждающую смесь.
8. По окончании экспозиции пробирки разморозить, поместив их в стакан с водопроводной водой, температура которой  $20 - 22^\circ\text{C}$ .
9. Знаком «+» отметить интенсивность окрашенной жидкости в пробирках 1, 2, 3 и интенсивность обесцвечивания дисков и объяснить чем это различие (если таковое наблюдается) обусловлено.
10. Из дисков свеклы приготовить тонкие срезы и рассмотреть состояние их клеток под микроскопом при малом увеличении в капле того же раствора, в котором они находились.

11. В одном поле зрения подсчитать количество окрашенных клеток и количество обесцвеченных клеток, т.е. то количество клеток, из которых проэкстрагировался антоциан (основной пигмент корнеплода красной столовой свеклы).

**Оформление работы.**

Результаты эксперимента представить в виде таблиц.

Таблица 1. - Влияние сахарозы на интенсивность экстракции антоциана из дисков корнеплода красной столовой свеклы.

Вариант	Интенсивность окрашивания растворов, «+»	Интенсивность обесцвечивания дисков, «+»
Вода		
Сахароза: 0.5 М		
1 М		

Таблица 2. - Защитное действие сахаров на цитоплазму клеток корнеплодов красной столовой свеклы.

Вариант	Количество клеток в поле зрения микроскопа, шт.			Отношение количества окрашенных клеток к общему количеству, %
	обесцвеченных	окрашенных	всего	
Вода				
Сахароза: 0.5 М				
1 М				

**Выводы.** На основании полученных результатов эксперимента сделать выводы о защитном действии растворимых сахаров (в частности сахарозы) на цитоплазму клеток растений и о зависимости этого эффекта от их концентрации.

**Контрольные вопросы.**

1. Причины гибели клеток при морозе?
2. Какое значение имеют сахара на разных этапах развития растений?

## **Работа 31. Определение устойчивости растений к высокотемпературному воздействию по степени повреждения хлорофилл содержащих тканей**

**Вводные пояснения.** Состояние растений после оказания на них повреждающих факторов оценивают, используя разнообразные методы. Для оценки различных повреждающих воздействий, включая и воздействие высоких температур, на хлорофилл содержащие растительные ткани используют в достаточной степени простой, но вместе с тем, эффективный метод образования феофитина. Сущность метода заключается в том, что при высокотемпературном воздействии нарушается структура мембран цитоплазмы, и они теряют присущее только им уникальное свойство полупроницаемости. В связи с этим обстоятельством помещению хлорофилл содержащие ткани растений, подвергшиеся высокотемпературному воздействию в 0.2 н. раствор соляной кислоты (что предусматривает метод), приводит к подкислению клеточного сока. Подкисленный клеточный сок проникает в хлоропласты, а это, в свою очередь, приводит к замене в молекуле хлорофилла иона магния на ион водорода. Новое образовавшееся в результате такой замены вещество бурого цвета – это феофитин. Количество образующегося феофитина прямо пропорционально дозе повреждающего воздействия (температуре и продолжительности ее воздействия).

**Объекты исследования.** Листья растений с различной степенью устойчивости к высоким температурам.

**Реактивы.** Соляная кислота (HCl).

**Оборудование.** Электрическая плитка, водяная баня, термометр, кристаллизаторы, пинцеты, бюксы или стаканы.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить 0,2 н раствор соляной кислоты.
2. Приготовить водяную баню, температуру воды в которой необходимо поддерживать на уровне 40°C.
3. В баню поместить листья испытуемых растений.
4. По истечению 30 мин из бани отобрать первую пробу листьев и поместить их в кристаллизатор с холодной водой.
5. Температуру в бане (не извлекая оставшиеся в ней листья) поднять до 45°C.
6. Через 10 мин по достижению указанной в п.5 температуры отобрать вторую пробу и перенести в кристаллизатор с холодной водой.
7. Затем температуру воды постепенно довести до 60°C, последовательно отбирая пробы через каждые 5°C и каждую из отобранных проб помещать в кристаллизатор с холодной водой.
8. По окончанию экспозиции все отобранные в процессе опыта пробы поместить в стаканы с 0.2 н раствором соляной кислоты.

9. Через 20 мин просмотреть листья всех проб, отмечая степень их побурения (степень образования феофитина) в зависимости от температурного воздействия.

**Примечание.** При просматривании листьев следует помнить о том, что живые листья остаются зелеными, а погибшие от высокотемпературного воздействия буреют. Следует помнить также и том, что при воздействии высокой температуры у растений с кислым клеточным соком образование феофитина в листьях может произойти и без обработки их кислотой. Последнюю процедуру, следующую за прогреванием, предусматривает метод обнаружения феофитина.

**Оформление работы.** Результаты опыта оформить в виде таблицы. Знаком «+» отметить повреждающее воздействие высокой температуры. Первые признаки побурения (первые признаки образования феофитина) листьев отметить знаком «+», а для листьев, площадь образования феофитина у которых увеличивается относительно предыдущего варианта, количество знаков также следует последовательно увеличивать и, наконец, для листьев полностью побуревших количество знаков «+» следует увеличить до максимального значения. По температуре негативного начального воздействия листья различных растений могут значительно отличаться.

Таблица 1. - Влияние высокой температуры на хлорофилл содержащие листья растений.

Вариант	Температура, °С				
	40	45	50	55	60

**Выводы.** На основании полученных в эксперименте данных сделать выводы о пороговой температуре, за пределами которой устойчивость изученного растения к воздействию высокой температуры утрачивается. Сделать выводы также и о специфической устойчивости различных видов растений к воздействию высокой температуры.

**Контрольные вопросы.**

1. Что называется жаростойкостью?
2. Каковы биохимические механизмы гибели растений от высоких температур?
3. Какие растения оказались более жаростойкими?

## Работа 32. Определение засухоустойчивости растений проращиванием семян на растворах сахарозы

Метод определения устойчивости растений к засухе основан на определении количества проросших семян на растворах солей или сахаров с высоким осмотическим давлением, имитирующем условия физиологической сухости. Этот метод востребован физиологами растений, так как позволяет еще на ранних этапах онтогенеза определить относительную засухоустойчивость различных растений. Простота исполнения предлагаемого метода позволяет использовать его для массовых анализов определения засухоустойчивости, необходимость в которых возникает при оценке по этому признаку селекционного материала.

**Объекты исследования.** Семена пшеницы, ячменя, гороха, кукурузы.

**Реактивы.** Сахароза ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ).

**Оборудование.** Чашки Петри (4 шт.), фильтровальная бумага, термостат.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Приготовить растворы сахарозы с осмотическим давлением 5, 10, 14 и 18 атм., что соответствует 5,93 %, 11,86 %, 15,80 % и 19,86 %-ной концентрации ее.
2. На дно чашек Петри положить фильтровальную бумагу, соответствующую диаметру ее дна.
3. В чашках Петри (1, 2, 3, 4 и 5) увлажнить фильтровальную бумагу последовательно водопроводной водой и растворами сахарозы с осмотическим давлением 5, 10, 14 и 18 атм. Для этого в чашку Петри (1) прилить 7 мл водопроводной воды, а в чашки Петри 2, 3, 4 и 5 прилить последовательно растворы сахарозы, начиная от минимальной (5 атм).
4. В каждую чашку Петри поместить для проращивания семена изучаемых растений (не менее 20 шт.). Семена, (до момента раскладывания в чашки Петри) во избежание зарастания их микроорганизмами в процессе проращивания, необходимо тщательно промыть мыльной водой.
5. Семена проращивать в термостате при температуре  $20 - 25^{\circ}$ .
6. На третий и седьмой день подсчитать количество проросших семян.

**Оформление работы.** Результаты проведенных экспериментов оформить в виде таблицы.

Таблица 1. - Влияние сахарозы с различным осмотическим давлением на прорастание семян (название растения)

Вариант	Количество проросших семян, %	
	на третий день (энергия прорастания)	на седьмой день (всхожесть)
Водопроводная вода		
Сахароза: 5 атм.		
10 атм.		
14 атм.		
18 атм.		

**Выводы.** На основании результатов проведенного эксперимента сделать вывод о степени влияния засухи различной интенсивности на прорастание семян культурных растений.

**Контрольные вопросы**

1. Дайте определение понятию «засухоустойчивость растений».
2. Как определить засухоустойчивость семян?

## **ТЕМА 9. Математическая обработка экспериментальных данных**

Все биологические объекты, в том числе и растения, гетерогенны по природе. Это один из ключевых механизмов устойчивости их к среде обитания. Для того чтобы усреднить эту гетерогенность в экспериментах и доказать достоверность полученных данных необходима математическая обработка экспериментальных данных.

### **Работа 33. Статистическая обработка экспериментальных данных**

Полученные экспериментальные данные подвергаются первичной статистической обработке, которая позволяет определить степень их достоверности и наряду с этим объективно оценить ошибки, допущенные при проведении наблюдений.

**Объекты исследования.** Экспериментальные данные.

**Оборудование.** Калькулятор, компьютер.

**Последовательность выполнения работы.**

1. Рассчитать среднюю арифметическую ( $M = \Sigma V/n$ ), сумму отклонений от среднего ( $\epsilon$ ) - квадрат отклонений ( $\epsilon^2$ ), введя данные абсолютных значений наблюдений в таблицу.

Таблица 1. - Средний показатель результатов наблюдений и его возможные погрешности при математической обработке данных повторностей

Повторность	Абсолютная величина наблюдения	Отклонение от средней величины, $\pm$	Квадрат отклонения
1			
2			
3			
и т. д.			
Среднее	$M =$	$\Sigma [\epsilon] =$	$\Sigma [\epsilon^2] =$

$M$  – средняя арифметическая нескольких наблюдений (повторностей);

$V$  – значения отдельного измерения;

$n$  - число наблюдений;

$\Sigma$  – знак суммирования;

$\epsilon$  - абсолютная ошибка (погрешность) результатов повторностей.

2. Определить среднюю квадратическую погрешность результатов повторностей – «сигму»:

$$\sigma = \pm \sqrt{\epsilon^2 / (n - 1)};$$

3. Вычислить среднюю квадратическую ошибку среднего результатов повторностей (m):

$$m = \sigma / \sqrt{n} ;$$

4. Вычислить относительную погрешность среднего результатов повторностей ( $\delta$ ):

$$\delta = (m / M) * 100 \%;$$

5. Окончательный вариант выразить как  $M \pm m$  или  $M \pm \delta$ ;

**Оформление работы.** Результаты опыта представить в виде таблицы.

Таблица 1. - Степень достоверности и изменчивости физиологического показателя при математической обработке данных вариантов опыта

Вариант опыта	Средняя арифметическая: M	Средняя арифметическая $\pm$ средняя квадратическая ошибка: $M \pm m$	Средняя арифметическая $\pm$ средняя относительная погрешность: $M \pm \delta$
1			
2			
3			
и т.д.			

**Выводы.** По результатам, полученным при проведении эксперимента оценить степень достоверности и изменчивости изучаемого физиологического показателя.

### **Контрольные вопросы**

1. Что характеризует в биологических исследованиях средняя величина (M) ?
2. Что показывает средняя квадратическая ошибка среднего ( m) ?
3. Что показывает средняя относительная погрешность ( $\delta$ ) ?
4. Какая из рассчитанных ошибок (m или  $\delta$ ) данных биологического эксперимента допускает меньшую неточность?
5. Почему для более достоверной оценки средних величин (например, урожая) необходимо вычислять (m) и ( $\delta$ ) ?

## Глоссарий

**Адаптация** – генетический процесс выработки приспособлений у организмов к условиям их существования.

**Алкалоиды** – обширная группа азотсодержащих соединений растительного происхождения.

**Антагонизм** – взаимное ослабление ионами оказываемого ими физиологического действия на цитоплазму

**Водный потенциал клетки** – разность между свободной энергией воды внутри клетки и вне клетки при той же температуре и атмосферном давлении.

**Гербициды** – химические препараты из группы пестицидов для уничтожения сорной растительности.

**Гипертонический раствор** – раствор, имеющий большое осмотическое давление.

**Гипотонический раствор** – раствор, имеющий меньшее осмотическое давление.

**Гликолиз** - бескислородное разложение углеводов. Начинается этот анаэробный процесс с активации Сахаров присоединением фосфора, источником которого могут быть минеральные фосфаты и аденозинтрифосфорная кислота (АТФ). Образующиеся при этом фосфорные эфиры Сахаров в последующих ступенчатых реакциях окисляются до пировиноградной кислоты.

**Дедифференцировка** – переход специализированных неделящихся клеток к делению, т.е. восстановление меристематической активности.

**Денатурация белков** – (лат.denaturatus – лишенный природных свойств; от de- - приставка означающая отделение, удаление + natura – природа, естество) – термин биологической химии, означающий потерю белками их естественных свойств (растворимости, гидрофильности и др.) вследствие нарушения пространственной структуры их молекул.

**Диффузия** – процесс, ведущий к равномерному распределению молекул растворенного вещества и растворителя. Происходит по градиенту электрохимического потенциала без траты энергии.

**Дубильные вещества** – это полимеры фенольных соединений, близких по составу.

**Дыхание** – совокупность координированных последовательно протекающих экзергонических окислительно-восстановительных реакций, ведущих к освобождению энергии сложных органических веществ и

фиксированию ее в богатых энергией связях АТФ, используемых клеткой для выполнения работы.

**Дыхательный коэффициент** – отношение количества выделенного углекислого газа к количеству поглощенного кислорода.

**Засухоустойчивость** – способность растений в течение онтогенеза переносить засуху и осуществлять в этих условиях рост и развитие благодаря наличию ряда адаптивных механизмов.

**Зимостойкость** – устойчивость растений не только к холоду, но и к целому комплексу неблагоприятных условий, связанных с перезимовкой.

**Изотонический раствор** – раствор с одинаковым осмотическим давлением.

**Иммунитет** - способность растений противостоять действию повреждающих агентов; защитная реакция.

**Интенсивность дыхания** – количество кислорода, поглощенного за один час одним граммом сухого (или сырого) растительного материала, а так же количеством углекислого газа, выделенным за час одним граммом растительной массы.

**Каротиноиды** – полиеновые углеводороды красного, желтого и оранжевого цветов, производные изопрена, содержащие 40 атомов углерода.

**Конвергенция** – независимое развитие сходных признаков у разных групп организмов к сходным условиям внешней среды.

**Макроэлементы** - химические элементы, требующиеся в больших количествах для клетки (азот, фосфор, сера, калий, кальций и магний); поглощаются корнями растений из почвы в виде соответствующих солей.

**Микроэлементы** - химические элементы, требующиеся в малых количествах для клетки (железо, марганец, медь, цинк, бор, молибден, кобальт); поглощаются корнями растений из почвы в виде соответствующих солей.

**Митохондрии** - органеллы клеток; в них протекают окислительно-восстановительные реакции, обеспечивающие клетки энергией.

**Настии** - движения растений под влиянием изменения интенсивности действия, какого-либо фактора среды;

**Нижний концевой двигатель** - активное поглощение воды корневой системой; проявляется в плаче и гуттации растений.

**Нутации** — колебательные движения верхушек органов растения.

**Осмотическое давление** – давление, которое необходимо приложить к раствору, чтобы помешать одностороннему току растворителя (воды) в раствор через полупроницаемую мембрану.

**Пигменты** – вещества, избирательно поглощающие свет в видимой части спектра.

**Плазмалемма** – мембрана, окружающая цитоплазму клетки.

**Плазмолиз** – отслоение цитоплазмы от клеточной оболочки к центру клетки.

**Ренатурация** – процесс, обратный денатурации, при котором белки возвращают свою природную структуру.

**Рост** – процесс новообразования элементов структуры организма.

**Солеустойчивость (галотолерантность)** – устойчивость растений к повышенной концентрации солей в почве или в воде.

**Сосущая сила** – сила, с которой клетка способна поглотить воду.

**Тонопласт** – мембрана, окружающая вакуоль клетки.

**Транспирационный коэффициент** - количество воды, расходуемое растением на создание единицы веса сухого вещества.

**Ферменты** – биологические катализаторы белковой природы; осуществляют превращение веществ в клетке.

**Физиологически щелочная соль** - соль, из водных растворов которой растение быстрее поглощает анион.

**Фитогормоны** – вещества, образующиеся в очень малых количествах в одной части растения, транспортирующиеся в другую его часть, вызывающие там специфическую ростовую или формообразовательную реакцию.

**Флуоресценция** – явление свечения некоторых веществ при их освещении.

**Фотосинтез у растений** - процесс поглощения энергии солнца и образование на основе этой энергии органических веществ из неорганических элементов: диоксида углерода и воды.

## Приложение

### Список основной литературы для изучения курса по физиологии и биохимии растений

1. Алехина, Н.Д. Физиология растений: учеб. для вузов/ Н.Д. Алехина и др.; под ред. И.П.Ермакова. - М.: Академии, 2005,- 635 с.
2. Гиль, Т.А. Практикум по физиологии и биохимии растений. Метод. Руководство для студентов агр. Фак. / сост. Т. А. Гиль, В. Ю. Гребенщиков; Иркут. С-х. акад. – Иркутск: ИрГСХА, 2002 – 64 с.
3. Кузнецов, В.В. Физиология растений: учеб. для вузов/ В. В. Кузнецов, Г. А. Дмитриева. - 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 2006, - 742 с.
4. Назарова, Г.Д. Физиология и биохимия растений: метод, пос./ Г.Д. Назарова, И.Э. Илли, С.В. Половинкина и др.- Иркутск: ИГСХА, 2005,- 101 с.
5. Третьяков, Н.Н. Практикум по физиологии растений / Н.Н. Третьяков; под ред. Н.Н. Третьякова. М.: Агропромиздат, 1990.-270 с.
6. Третьяков, Н.Н. Практикум по физиологии растений: Учеб. Пособие для ВУЗов / Третьяков Н.Н., Паничкин Л.А., Кондратьев М.Н. и др., Под ред. Третьякова Н.Н. – 4 – е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 2003.

### Список дополнительной литературы для изучения курса по физиологии и биохимии растений

1. Боннер, Дж. Молекулярная биология развития / Дж. Боннер – М.: Мир, 1967.
2. Брей, С.М. Азотный обмен в растениях / С.М. Брей. – М.: Агропромиздат, 1986.
3. Гавриленко, В.Ф. Главы физиологии растений / В.Ф. Гавриленко, М.В. Гусев, К.А. Никитина, П. Хоффман. – М.: Изд-во МГУ, 1986.
4. Генкель, П.А. Физиология жаро- и засухоустойчивости растений / П.А. Генкель– М.: Наука, 1982.
5. Гудвин, Т. Введение в биохимию растений / Т. Гудвин, Э. Мерсер. – М.: Мир, 1986. – Т. I-II.
6. Гэлстон, А. Жизнь зеленого растения / А. Гэлстон, П. Девис, Р. Сэттер – М.: Мир, 1983. – С. 169-204.
7. Данилова, М.Ф. Структурные основы поглощения веществ корнем / М.Ф. Данилова. – Л.: Наука, 1974.
8. Дерфлинг, К. Гормоны растений. Системный подход / К. Дерфлинг. – М.: Мир, 1985.

9. Илли, И.Э. Полевая учебная практика по физиологии растений: метод, рук-во / И.Э. Илли - Иркутск, ИГСХА, 2000,- 24 с.
10. Кефели, В.И. Природные ингибиторы роста и фитогормоны / В.И. Кефели. – М.: Наука, 1974.
11. Кларксон, Д. Транспорт ионов и структура растительной клетки / Д. Кларксон. – М.: Мир, 1978.
12. Кошкин, Е.И. Физиология растений: учеб.практ. пос. (интерактивная форма) / Е.И. Кошкин и др.- М., 2001,- (ТАСИС)
13. Курсанов, А.А. О принципах саморегуляции физиологических процессов у растений / А.А. Курсанов // Ученый и аудитория. – М.: Наука, 1982.
14. Курсанов, А.Л. Транспорт ассимилятов в растении в растении / А.Л. Курсанов. – М.: Наука, 1976.
15. Люттге, У. Передвижение веществ в растении / У.Люттге, Н. Хигинботам. – М.: Колос, 1984. – С. 274-310.
16. Люттге, У. Передвижение веществ в растениях / У. Люттге, Н. Хигинботам. – М.: Колос. 1984. – С. 46-58.
17. Мокроносов, А.Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза / А.Т. Мокроносов. – М.: Наука, 1983.
18. Муромцев, Г.С. Гормоны растений гиббереллины / Г.С. Муромцев, В.Н. Агнестикова. – М.: Наука, 1984.
19. Николс, Д.Дж. Биоэнергетика. Введение в хемоосмотическую теорию / Д.Дж. Николс. – М.: Мир, 1985.
20. Нобель, Н.С. Физиология растительной клетки / Н.С. Нобель. М.: Мир, 1989.-134 с.
21. Петровская-Баранова, Т.П. Физиология адаптации и интродукции растений / Т.П. Петровская-Баранова. – М.: Наука, 1983.
22. Плешков, Б.И. Биохимия сельскохозяйственных растений / Б.И. Плешков. М.: Колос, 1980,- 495.с.
23. Полевой, В.В. Физиология растений / В.В. Полевой – М.: Высшая школа, 1989.
24. Полевой, В.В. Фитогормоны / В.В. Полевой. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1982.
25. Рубин, Б.А. Биохимия и физиология фотосинтеза / Б.А. Рубин, В.Ф. Гавриленко. – Л.: Изд-во МГУ, 1977.
26. Рубин, Б.А. Физиология и биохимия дыхания растений / Б.А. Рубин, М.Е. Ладыгина. – М.: Изд-во МГУ, 1974.
27. Саламатова, Т. С. Физиология растительной клетки / Т. С. Саламатова – Л.: Изд-во ЛГУ, 1983.
28. Семихатова, О.А. Смена дыхательных систем / О.А.. Семихатова. – Л.: Наука, 1969.
29. Скулачев, В.П. Рассказы о биоэнергетике / В.П. Скулачев. – М.: Молодая гвардия, 1985.
30. Скулачев, В.П. Трансформация энергии в биомембранах / В.П. Скулачев. – М.: Наука, 1972.

31. Слейчер, Р. Водный режим растений / Р. Слейчер. – М.: Мир, 1970.
32. Строганов, Б.П. Физиологические аспекты солеустойчивости растений / Б.П. Строганов. – М.: 1962.
33. Тарчевский, И.А. Основы фотосинтеза / И.А. Тарчевский. – М.: Высшая школа, 1977.
34. Тарчевский, И.А. Физиология фотосинтеза / И.А. Тарчевский – М.: Мир, 1982.
35. Третьяков, Н.Н. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений: Учебник для ВУЗов / Под ред. Н.Н. Третьякова – М.: Колос, 2000. – 639 с.
36. Третьяков, Н.Н. Физиология растений (Тест): учеб. пос. для вузов/ Н.Н. Третьяков, Л.А. Паничкин, М.Н. Кондратьев.- М.; Колос, 2003,-288 с.
37. Уоринг, Э. Рост растений и дифференцировка / Э. Уоринг, И. Филлипс. – М.: Мир, 1984.
38. Финсан, Дт. Мембраны и их функции в клетке / Дт. Финсан, Р. Колмэн, Р. Митчелл– М.: Мир, 1977.
39. Хинкл, П. Как клетки делают АТФ / П. Хинкл, Р. Мак-Карти // Молекулы и клетки. – М.: Мир, 1982. – Вып. 7.
40. Хит, О. Фотосинтез / О. Хит. – М.: Мир, 1977.
41. Холл, Д. Фотосинтез / Д. Холл, К. Рао. – М.: Мир, 1983.
42. Чайлахян, М.Х. Регуляция цветения высших растений / М.Х. Чайлахян. – М.: Наука, 1988.
43. Ченцов, Г.С. Общая цитология / Г.С. Ченцов – М.: Изд-во МГУ, 1984.
44. Шевченко, В.А. Биология растений с основами экологии: учеб. пос. для вузов/ В.А. Шевченко, А.М. Соловьев.- М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006.- 341 с.
45. Школьник, М.Я. Микроэлементы в жизни растений / М.Я. Школьник. – Л.: Изд-во АН СССР, 1974.
46. Щербаков, В.Г. Биохимия: учеб. пос. для вузов/ В.Г. Щербаков и др.; под ред В.Г. Щербакова.-СПб.: ГИОРД, 2005.- 467 с.

## СОДЕРЖАНИЕ

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ.....	3
<b>Тема 1. Физиология растительной клетки .....</b>	<b>6</b>
<i>Работа 1.</i> Действие гипертонических растворов на цитоплазму клетки.....	7
<i>Работа 2.</i> Определение потенциального осмотического давления клеточного сока методом плазмолиза .....	9
<i>Работа 3.</i> Определение водного потенциала клеток растений по изменению концентрации растворов (метод Шардакова).....	12
<i>Работа 4.</i> Диагностика повреждения растительной ткани по увеличению ее проницаемости.....	15
<i>Работа 5.</i> Определение жизнеспособности семян по окрашиванию цитоплазмы .....	17
<b>Тема 2. Обмен веществ.....</b>	<b>20</b>
<i>Работа 6.</i> Изучение свойств моно-, - ди – и полисахаридов.....	22
<i>Работа 7.</i> Получение шкалы гидролиза крахмала амилазой при разных температурах.....	25
<i>Работа 8.</i> Определение жира .....	28
<i>Работа 9.</i> Обнаружение белков.....	30
<i>Работа 10.</i> Микрохимическое определение алкалоидов.....	32
<i>Работа 11.</i> Определение дубильных веществ.....	34
<b>Тема 3. Фотосинтез.....</b>	<b>36</b>
<i>Работа 12.</i> Химические свойства пигментов.....	37
<i>Работа 13.</i> Определение спектров поглощения пигментов.....	43
<i>Работа 14.</i> Флуоресценция хлорофилла.....	46
<i>Работа 15.</i> Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла.....	47
<i>Работа 16.</i> Определение интенсивности фотосинтеза методом ассимиляционной колбы (по Л. А. Иванову и Н.Л. Коссович).....	50
<i>Работа 17.</i> Образование первичного крахмала на свету(проба Сакса).....	53
<b>Тема 4. Дыхание растений.....</b>	<b>55</b>
<i>Работа 18.</i> Определение интенсивности дыхания семян в закрытом сосуде.....	56
<i>Работа 19.</i> Определение дыхательного коэффициента у прорастающих семян.....	58
<i>Работа 20.</i> Ферменты дыхания растений.....	60
<b>Тема 5. Водный обмен растений.....</b>	<b>65</b>
<i>Работа 21.</i> Определение интенсивности транспирации весовым методом.....	65
<i>Работа 22.</i> Изучение состояния и количества устьиц методом отпечатков (по Полаччи).....	68
<i>Работа 23.</i> Определение степени открытости устьиц методом инфильтрации (по Молишу).....	70
<b>Тема 6. Физиология минерального питания .....</b>	<b>71</b>
<i>Работа 24.</i> Качественный микрохимический анализ золы растений .....	71
<i>Работа 25.</i> Антагонизм ионов водорода и кальция.....	75

<i>Работа 26.</i> Антагонизм ионов калия и кальция.....	76
<i>Работа 27.</i> Физиологически кислые и щелочные соли.....	78
<b>Тема 7. Рост и развитие растений</b> .....	80
<i>Работа 28.</i> Определение зоны роста корня и стебля.....	81
<i>Работа 29.</i> Изучение действия различных концентраций гетероауксина на рост корней .....	84
<b>Тема 8. Устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды</b> .....	86
<i>Работа 30.</i> Защитное действие сахаров на цитоплазму. Устойчивость к заморозкам.....	86
<i>Работа 31.</i> Определение устойчивости растений к высоко температурному воздействию по степени повреждения хлорофилл содержащих тканей.....	89
<i>Работа 32.</i> Определение засухоустойчивости растений проращиванием семян на растворах сахарозы.....	91
<b>Тема 9. Математическая обработка экспериментальных данных</b> .....	93
<i>Работа 33.</i> Статистическая обработка экспериментальных данных.....	93
ГЛОССАРИЙ.....	95
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	98
СОДЕРЖАНИЕ.....	101