МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

М.В. Ефимова

ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие

Томск
Издательский Дом Томского государственного университета
2018

РАССМОТРЕНО И УТВЕРЖДЕНО методической комиссией
Биологического института
Протокол № 197 от 29 марта 2018 г.

Председатель МК БИ А.Л. Борисенко

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

Для студентов агрономических специальностей – агрономов, почвоведов, агрохимиков, защитников растений биологических, сельскохозяйственных и педагогических вузов.

АВТОР – канд. биол. наук, доцент *М.В. Ефимова*

© Томский государственный университет, 2018
© Ефимова М.В., 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Техника безопасности лабораторных работ 4

Занятие 1. Физиология растительной клетки, осмотические свойства клетки 5

Занятие 2. Водный обмен растений. Транспирация 11

Занятие 3. Фотосинтетические пигменты 15

Занятие 4. Дыхание 20

Занятие 5. Рост 24

Занятие 6. Минеральное питание растений 27

Занятие 7. Устойчивость растений к действию абиотических факторов 33

Литература 36

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

1. На первом занятии студент должен внимательно ознакомиться с правилами работы в лаборатории, инструкцией по технике безопасности, расписаться в журнале инструктажа и неукоснительно выполнять требования преподавателя, лаборанта и дежурного по работе.

2. Запрещается находиться в лаборатории в верхней одежде, загромождать рабочее пространство посторонними предметами, сорить, шуметь, разговаривать по телефону; трогать и перемещать оборудование, реактивы и другие предметы, не имеющие отношения к выполняемым работам практикума.

3. При работе обязательно надевать защитные халаты, при необходимости – перчатки.

4. Перед началом работы необходимо тщательно ознакомиться с её описанием; усвоить принципы действия приборов и основные правила работы с ними.

5. Без указания преподавателя не производить дополнительных экспериментов.

6. Приём пищи и употребление напитков на рабочем месте запрещены.

7. Категорически запрещается пользоваться лабораторной посудой для еды или питья; пробовать на вкус, на ощупь и нюхать химические реактивы, употреблять в пищу объекты исследования.

8. При определении запаха следует лёгкими движениями руки направить воздух от горлышка сосуда к носу.

9. Пользоваться можно только маркированными реактивами.

10. Излишки реактивов необходимо сливать в отдельную ёмкость (если представляют опасность) или в раковину, но не возвращать в ту посуду, из которых они были взяты.

11. Отработанные органические растворители, концентрированные кислоты и щёлочи следует сливать в специальную посуду, установленную под тягой.

12. Работы с опасными веществами следует производить под тягой.

13. При попадании кислот и щелочей на кожу, пораженные места следует немедленно тщательно промыть водой, а затем обработать нейтрализующими растворами низкой концентрации (бикарбоната натрия и уксусной кислоты соответственно).

14. При нагревании жидкости в пробирках использовать только водяную баню. В случае использования спиртовки пробирки с жидкостью следует держать наклонно в сторону от себя и других работающих.

15. Запрещается оставлять без присмотра включенные электроприборы.

16. Горячие приборы или посуду ставить только на специальные подставки.

17. После окончания работы нужно вымыть использованную посуду, привести в порядок рабочее место, тщательно вымыть руки водой с мылом.

ЗАНЯТИЕ 1. Физиология растительной клетки, осмотические свойства клетки

Цель занятия: приготовление элементарных растительных препаратов для микроскопирования. Получение навыков работы с микроскопом. Разведение реактивов.

Материалы и оборудование: луковица синего лука, корнеплод моркови, элодея, традесканция, пеперомия; дистиллированная вода, растворы 1 М NaCl, 1 М сахарозы, 1 М KNO3, 0,7 М Ca(NO3)2, 0.5 % $CuSO_4$, кристаллы $K_4[Fe(CN)_6]$. Микроскоп, предметные и покровные стёкла, лезвия, препаровальные иглы, часовое стекло или чашка Петри, пенициллиновые флаконы или пробирки, пипетки Пастера минимального объема или наконечники, кусочки фильтровальной бумаги, маркер.

В начале занятия со студентами обсуждаются следующие вопросы:

✓ Чем растения отличаются от других живых организмов?

✓ Почему надо изучать растения?

✓ Что могут сделать физиологи растений для решения глобальных общечеловеческих проблем (борьба с голодом, борьба с болезнями, сохранение биоразнообразия, сохранение окружающей среды, поиск возобновляемых источников энергии).

✓ Особенности строения растительных клеток.

Работа 1. Явление плазмолиза и деплазмолиза

В зависимости от концентрации раствора его можно отнести к:

✓ **гипотоническому** (осмотическое давление ($P_{осм}$) раствора меньше давления клеточного сока; концентрация растворённого вещества в растворе меньше концентрации растворённых веществ в клеточном соке);

✓ **изотоническому** (давление раствора равно $P_{осм}$ клеточного сока);

✓ **гипертоническому** (давление раствора превышает осмотическое давление клеточного сока).

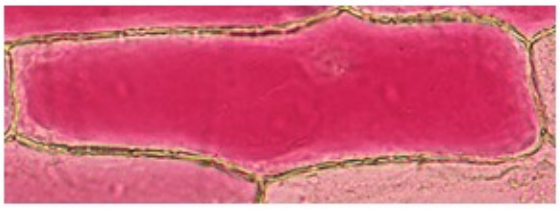
При помещении клетки в гипертонический раствор происходит отставание цитоплазмы от стенок клетки (**плазмолиз**), вследствие потери воды вакуолью и уменьшения ее объема. После замены наружного раствора на чистую воду, последняя начинает поступать внутрь клетки. Объем протопласта увеличивается и происходит **деплазмолиз**. После его завершения протопласт вновь заполняет весь объем клетки.

Плазмолиз хорошо заметен в клетках с окрашенным клеточным соком или при окраске препарата раствором нейтрального красного. Данный процесс может наступать только при условии разной проницаемости растворителя и растворенных веществ. К плазмолизу способна только живая клетка, в убитой клетке плазмолиз невозможен, так как цитоплазма теряет свойство полупрони-

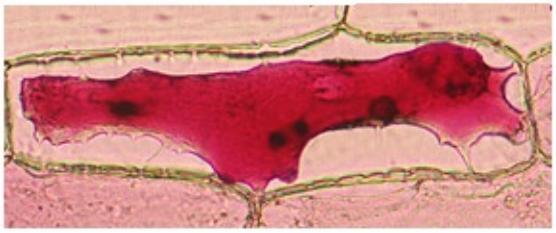
цаемости и становится полностью проницаемой (сквозная проницаемость) как для воды, так и для растворенных в ней веществ.

Метод плазмолиза широко используется для диагностики жизнеспособности клеток органов растения, перенесшего резкие воздействия неблагоприятных условий среды. Плазмолиз – обратимый процесс. У плазмолизированной клетки, погруженной в чистую воду, плазмолиз исчезает, наступает деплазмолиз. Деплазмолиз не имеет промежуточных форм.

типичная клетка эпидемиса чешуи лука



клетка в состоянии плазмолиза



Ход работы: на предметное стекло наносят каплю дистиллированной воды и помещают в нее срез эпидермиса чешуи луковицы. Препарат накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом сначала при малом, а потом при большом увеличении. Далее, не снимая предметного стекла со столика микроскопа, заменяют воду на раствор NaCl; каплю раствора наносят с одной стороны, с другой оттягивают раствор кусочком фильтровальной бумаги (повторить несколько раз). Таким образом, раствор NaCl проникает под стекло к исследуемой эпидерме. Рассматривают полученный препарат под микроскопом. Через некоторое время раствор заменяют водой. Наблюдают за изменениями, происходящими в клетках.

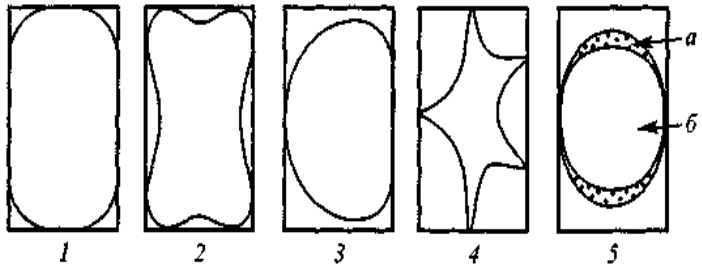
Задание: заполнить таблицу, объяснить причину наблюдаемых явлений в выводах.

№	Используемый реактив	Рисунок	Наблюдаемое явление
1			
2			
3			

Работа 2. Влияние ионов калия и кальция на форму плазмолиза

Плазмолиз наступает не сразу и имеет несколько этапов. Сначала цитоплазма отстает от оболочки по уголкам (уголковый плазмолиз). Затем протопласт продолжает отставать от клеточных стенок, сохраняя связь с ними в отдельных местах, поверхность протопласта между этими точками имеет вогнутую форму (**вогнутый**). Постепенно протопласт отрывается от клеточных стенок по всей поверхности и принимает округлую форму (**выпуклый**). Если у протопласта связь с клеточной стенкой в отдельных местах сохраняется, то при

дальнейшем уменьшении объема в ходе плазмолиза протопласт приобретает неправильную форму (**судорожный**). Время, в течение которого вогнутый плазмолиз переходит в выпуклый, позволяет оценить степень вязкость цитоплазмы. При более длительном нахождении в растворе (например, нитрата калия) цитоплазма набухает и там, где протопласт не касается клеточных стенок, образуются колпачки цитоплазмы (**колпачковый**).



Основные формы плазмолиза: 1 – уголковый (начальная стадия); 2 – вогнутый; 3 – выпуклый; 4 – судорожный (при быстром действии концентрированного плазмолитика и высокой степени вязкости цитоплазмы); 5 – колпачковый; а – цитоплазма, б – вакуоль.

Ионы калия повышают гидрофильность цитоплазмы, уменьшают вязкость и способствуют быстрому отрыву от клеточной стенки. Ионы кальция повышают вязкость цитоплазмы, увеличивают силы сцепления ее с клеточной стенкой.

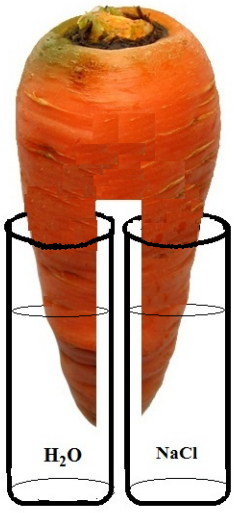
Ход работы: поместить на предметные стекла в капли 1 М KNO_3 и 0,7 М $Ca(NO_3)_2$ срез эпидермиса чешуи луковицы. Накрыть покровным стеклом и через 10 минут рассмотреть под микроскопом.

Задание: заполнить таблицу, определить степень плазмолиза в каждом случае, объяснить результат.

Используемый реактив	1 М KNO_3	0,7 М $Ca(NO_3)_2$
Рисунок		

Работа 3. Тургор растительной клетки. Поглощение воды и ее выход из клеток корнеплода моркови

Ход работы: из середины корнеплода моркови вырезают, начиная с кончика корня, продольную полосу ткани шириной около 1 см и удаляют ее. Две части корня остаются соединенными на протяжении примерно 1/3 всей его длины. Обе части корнеплода помещают в два стакана, стоящие рядом, в одном – насыщенный раствор хлорида натрия, в другом – вода.



Через 1,5–2 часа корень извлекают из стаканов, сравнивают размер и тургор тканей в его половинах и делают вывод о том, в каком из стаканов произошел выход воды из тканей корня, приведших к потере ими тургора.

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

Работа 4. Получение искусственной клеточки Траубе

Клеточку Траубе получают, помещая кристаллик гексацианоферрата калия в слабый водный раствор сульфата меди. Вокруг кристаллика в результате взаимодействия солей образуется осадочная мембрана гексацианоферрата меди. Эта мембрана проницаема только для молекул воды, но не для растворенных в ней веществ.

Ход работы: пенициллиновый флакон наполовину заполняют раствором сульфата меди и осторожно опускают один или несколько кристалликов гексацианоферрата (II) калия (ГЦФК). Полупроницаемая пленка $Cu_2[Fe(CN_6)]$ разделяет два раствора разной концентрации: внутри мешочка находится концентрированный раствор ГЦФК (образующийся при растворении кристаллика соли), а снаружи – раствор сульфата меди. Возникает ток воды внутрь мешочка, объем раствора ГЦФК увеличивается, в результате чего мембрана растягивается. Будучи очень тонкой, мембрана в отдельных местах разрывается под действием гидростатического давления. В этих местах соли снова взаимодействуют, возникают новые участки мембраны, что приводит к неравномерному увеличению размера мешочка. Мешочек будет расти, пока весь кристаллик не растворится. Дальнейшее поступление воды в мешочек приведет к разрыву пленки и она осядет в виде хлопьев на дно флакона.

Задание: описать опыт, сделать рисунок, сформулировать вывод о механизме перемещения воды через полупроницаемую мембрану.

Работа 5. Определение осмотического давления клеточного сока плазмолитическим методом

Давление, которое способен развить раствор, всасывая воду через полупроницаемую мембрану, называют **осмотическим**. Величина осмотического давления прямо пропорциональна его концентрации и абсолютной температуре. Концентрацию клеточного сока можно определить по величине его осмотического давления **плазмолитическим методом**. Для этого срезы тканей погружают в ряд растворов известной концентрации (сахароза, хлористый натрий). Находят такую концентрацию плазмолитика, которая вызывает уголковый плазмолиз не менее чем у 50% клеток. Изотонический раствор будет находиться между этим раствором и следующим (более слабым), который не вызывает плазмолиза. Т.е. концентрация изотонического раствора равна средне арифметическому значению между концентрациями указанных соседних растворов.

Установив концентрацию изотонического раствора, вычисляют осмотическое давление по уравнению Вант-Гоффа:

$$\mathbf{P = R \cdot T \cdot C \cdot i},$$

где **P** – осм. давление, атм.; R – универсальная газовая постоянная (0,0821); T – абсолютная температура (273+t°C); C – концентрация раствора в молях; i – изотонический коэффициент.

Концентрация NaCl, M	1,0	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,01
Изотонический коэффициент	1,62	1,64	1,66	1,68	1,70	1,73	1,75	1,78	1,83	1,93

Ход работы: приготовить растворы NaCl или сахарозы следующих концентраций: 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 и 0.1 М (например, для получения 10 мл 0.7 М раствора берут 7 мл **1 М** раствора и 3 мл воды; 0.6 М – 6 мл **1 М** раствора и 4 мл воды и т.д.) и разлить по пенициллиновым флаконам или пробиркам. Сделать 14 одинаковых срезов эпидермиса чешуи лука и поместить их на часовое стекло в воду так, чтобы они не плавали на поверхности. Через несколько минут срезы промокнуть фильтровальной бумагой и погрузить по два среза в каждый раствор. Через 25 минут посмотреть срезы под микроскопом.

Задание: заполнить таблицу. Рассчитать величину осмотического давления клеточного сока лука.

Концентрация раствора, М	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Степень плазмолиза							
Рисунок клетки							

Работа 6. Исследование вязкости цитоплазмы у различных объектов методом плазмолиза

Ход работы: поместить объекты (элодея, пеперомия, традесканция, роголистник) на предметное стекло в каплю 1 М сахарозы, закрыть покровным стеклом. Рассмотреть под микроскопом. Отметить время наступлении выпуклого плазмолиза у различных объектов.

Задание: сделать вывод о вязкости цитоплазмы. Результаты записать в таблицу.

Объект	**Экологическая группа**	**Время наступления выпуклого плазмолиза**
элодея	гидрофит	
традесканция	мезофит	
пеперомия	ксерофит	

Вопросы для самоконтроля

1. Дать определение понятиям «водный потенциал», «вязкость», «осмос», «осмотическое давление», «тургорное давление», «осмолиты», «плазмолиз / деплазмолиз», «циторриз», «протопласт», «симпласт/апопласт», «активный транспорт», «совместимые осмолиты» и т.д.

2. Провести сравнение клеток растений и животных.

3. Схематически изобразить строение клеточной стенки, мембраны, плазмодесмы, митохондрии, хлоропласта.

4. Перечислить функции клеточной стенки, мембраны, вакуолей, митохондрий, хлоропластов.

ЗАНЯТИЕ 2. Водный обмен растений. Транспирация

Цель занятия: научиться определять интенсивность транспирации; определять площадь листьев. Приготовление срезов верхней и нижней сторон листа для микроскопирования. Наблюдение за движениями устьиц.

Материалы и оборудование: листочки растений, дистиллированная вода, воск, 50% раствор глицерина. Микроскоп, окулярный микрометр, предметные и покровные стёкла, весы, чашка Петри, пипетки Пастера минимального объема или наконечники, фильтровальная бумага, ножницы, маркер.

Поступление, транспорт и выделение воды составляет **водный обмен растения**. Корень является специализированным органом поступления воды. Однако любая клетка растения, не насыщенная водой, может поглощать воду. Только сухая кутикула непроницаема для воды; при смачивании она набухает и становится проницаемой (смоченные дождём или росой листья могут поглощать до 25% падающей на них воды).

Поступление воды в клетки корня растений определяется градиентом водного потенциала (в сторону более отрицательного значения). Создаётся градиент с помощью двух механизмов – благодаря поглощению клетками веществ из почвы и за счёт испарения воды из листьев. Реализация этих механизмов приводит к повышении концентрации клеточного сока. Чем ниже насыщенность клеток водой, тем меньше их водный потенциал (более отрицателен).

Листья выделяют воду в результате **транспирации** и **гуттации**. Транспирация возможна только тогда, когда окружающий побеги воздух не насыщен водой. В обратном случае происходит гуттация, характерная для растений влажных субтропических лесов. В основном транспирируют листья, но могут и стебли (до 10 % от общей транспирации побегов). Транспирацию характеризуют по интенсивности, продуктивности и транспирационному коэффициенту.

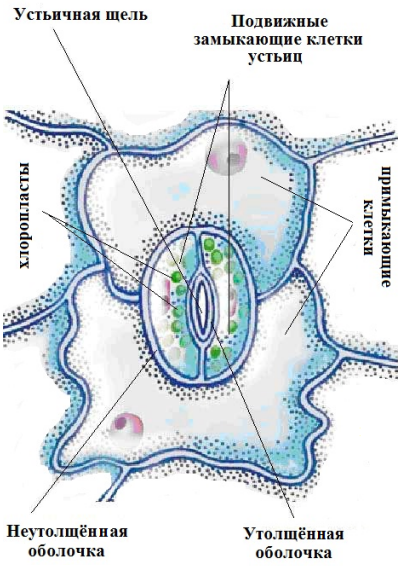
Интенсивность транспирации – количество воды, испаренной с единицы листовой поверхности в единицу времени (например., с 1 $м^2$ за 1 ч). **Транспирационный коэффициент** (эффективность использования воды) – количество граммов воды, израсходованной растением при накоплении 1 г сухого вещества. Средняя величина транспирационного коэффициента у C_3-растений – 600, у C_4-растений – 300, а у растений САМ-типа она колеблется от 33 до 240 г воды/г сухого вещества.

Продуктивность транспирации (обратная величина транспирационного коэффициента) – количество граммов сухого вещества, накопленного в растении при испарении 1000 г воды. Варьирует в диапазоне от 1 до 8.

Работа 7. Определение относительной транспирации весовым методом

Относительная транспирация – отношение интенсивности транспирации к интенсивности испарения со свободной поверхности при тех же условиях.

Данный показатель характеризует способность растений регулировать транспирацию и выражается в виде десятичной дроби или в процентах.



Испарение воды из ряда мелких отверстий, расположенных на небольшом расстоянии друг от друга, идет интенсивнее, чем с большего отверстия той же площади. Здесь действует закон И. Стефана о том, что испарение зависит не от площади отверстия, а от его диаметра. Несколько отверстий с малым диаметром имеют значительно большее диффузионное поле, чем одно крупное, т.к. общая длина окружностей малых отверстий значительно больше, чем длина окружности одного крупного отверстия, здесь действует так называемый краевой эффект. С другой стороны транспирация может регулироваться изменением степени открытости устьиц, а значит и интенсивностью испарения влаги через них. Частичное закрывание устьиц наполовину почти не отражается на интенсивности транспирации (согласно закону Стефана); полное их закрывание сокращает транспирацию примерно на 92%.

Ход работы:

1) *Определить интенсивность транспирации листа:*

а) лист растений (черешок листа обмакнуть в расплавленный парафин) взвесить и через 5 минут повторить взвешивание;

б) определить площадь листа (наложить лист на бумагу, аккуратно обвести карандашом, вырезать и взвесить полученную бумажную фигуру; параллельно вырезать квадрат известной площади (1 $см^2$) из этой же бумаги и взвесить его. Рассчитать площадь листа по формуле:

$$\mathbf{S = (a \cdot b)/c,\ см^2},$$

где a – площадь квадрата, c – вес квадрата, b – вес бумажных фигур.

в) рассчитать интенсивность транспирации листа (I_1) по формуле:

$$\mathbf{I_1 = (n \cdot 60 \cdot 10000)/(s \cdot t),\ (г/м^2 \cdot ч)},$$

где n – количество испаренной воды в граммах, t – продолжительность опыта в минутах, 10000 – коэффициент перевода $см^2$ в $м^2$; s – площадь листьев в $см^2$, 60 – коэффициент перевода минут в часы.

2) *Определить интенсивность испарения со свободной поверхности:*

а) взвесить чашку Петри с водой (чашка должна быть наполнена так, чтобы вода полностью покрывала её дно; наружная поверхность чашки должна быть сухой) и через 30 минут повторить взвешивание;

б) по формуле $S = \pi R^2$ определить площадь чашки Петри;

в) рассчитать интенсивность транспирации (I_2).

3) *Найти относительную транспирацию.*

Значение интенсивности транспирации нужно разделить на значение интенсивности свободного испарения.

Задание: определить относительную транспирацию. Объяснить различие показателей интенсивности транспирации листа и интенсивность испарения со свободной поверхности.

Работа 8. Наблюдение за движением устьиц

Газообмен между межклетниками листа и наружной атмосферой регулируется устьицами. Каждое устьице состоит из двух замыкающих клеток, у которых стенки, примыкающие к устьичной щели, сильно утолщены, тогда как наружные части оболочки остаются тонкими. Неодинаковая толщина наружных и внутренних стенок замыкающих клеток приводит к тому, что при изменении тургора замыкающие клетки способны искривляться или распрямляться, открывая или закрывая при этом устьичную щель. В основе механизма устьичных движений лежат осмотические явления. При насыщении водой замыкающих клеток устьиц они растягиваются, утолщенная часть не растягивается, а еще больше искривляется вовнутрь, устьица открываются, при потере воды тургор падает, замыкающие клетки выпрямляются и устьичные щели закрываются.

Ход работы: срез нижней эпидермы листа помещают в каплю глицерина на предметное стекло, закрывают покровным стеклом и сразу начинают наблюдения под микроскопом. Наблюдают явление плазмолиза как в замыкающих клетках, так и в остальных клетках эпидермиса. Устьичные щели закрываются.

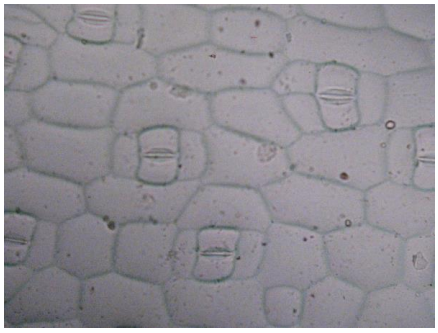
Через минут 15, вследствие того, что глицерин начинает проникать через цитоплазму в клеточный сок, наступает деплазмолиз и устьица открываются.

Заменить глицерин водой. При этом устьица откроются еще шире, так как из-за проникновения глицерина в клеточный сок осмотическое давление в замыкающих клетках повысится.

Задание: зарисовать устьица в открытом и закрытом состоянии. Сделать вывод.

Работа 9. Подсчет числа устьиц

Ход работы: с поверхности листа снимают эпидермис верхней или нижней стороны листа, надрезая его лезвием, помещают на предметное стекло в каплю дистиллированной воды и рассматривают под микроскопом при увеличении объектива ×20 (40). Необходимо в 5 повторностях подсчитать число устьиц, попадающих в поле зрения микроскопа при увеличении объектива на нижнем и верхнем эпидермисе листьев растений разных видов. Затем определяют площадь поля зрения микроскопа с учётом увеличения окуляра и объектива. При помощи объективного микромет-



ра измеряют в миллиметрах диаметр поля зрения при большом увеличении и рассчитывают его площадь ($S = \pi R^2$).

Цену деления окулярного микрометра определяют следующим образом. Совмещают окулярную шкалу со шкалой объективного микрометра. Находят какой-либо интервал, на котором совпадают риски шкал. Подсчитывают, сколько делений окулярной шкалы и сколько делений объективного микрометра укладывается на этом отрезке. Учитывая, что цена деления объективного микрометра составляет 0,01 мм, рассчитывают цену деления окулярного микрометра.

Используя полученные данные, определяют количество устьиц на 1 $см^2$ поверхности верхнего и нижнего эпидермиса листа.

Задание: определить количество устьиц на единицу площади листа на верхней и нижней сторонах листа. Пояснить выявленные различия.

Вопросы для самоконтроля

1. Перечислите функции воды.
2. Что такое гомеостатическая вода.
3. Какие типы транспирации Вам известны?
4. Какие механизмы устьичных движений существуют?
5. Какой характер расположения устьиц у водных растений?
6. Какую роль в жизни растений играет транспирация?
7. Перечислите способы снижения транспирации.
8. Что такое «гуттация»?
9. Что такое «физиологическая засуха»?
10. Что такое корневое давление?
11. В каких условиях у растений формируется ксероморфная структура?

ЗАНЯТИЕ 3. Фотосинтетические пигменты

Цель занятия: ознакомится с методами экстракции и разделения фотосинтетических пигментов растений; изучить свойства пигментов.

Материалы и оборудование: зелёные листья растений, дистиллированная вода, этиловый 96% спирт, бензин, 10% HCl; кристаллы уксуснокислого цинка и NaOH. Центрифуга, спектроскоп, пробирки, пробирки Эппендорфа, ступки, пестики, пипетки, пипетки Пастера минимального объема или наконечники, фильтровальная бумага, маркер.

Фотосинтетические (массовые пигменты) растений избирательно поглощают свет, накапливаются в большом количестве и выполняют ряд функций. **Хлорофиллы** (1) поглощают свет, (2) передают его энергию реакционному центру и (3) входят в состав реакционного центра и совершают химическую работу. **Фикобилины** – поглощают свет и передают его энергию молекулам хлорофилла *a* (но не реакционному центру). **Каротиноиды** – (1) поглощают свет и передают его энергию хлорофиллам; (2) защищают хлорофилл от окисления, (3) участвуют в кислородном обмене клетки, (4) придают окраску отдельным частям растений. **Антоцианы** – (1) придают окраску цветкам, (2) увеличивают осмотическое давление клеток (стрессоустойчивость растений), (3) преобразуют видимый свет в тепловое излучение (устойчивость к холоду), (4) способствуют повышению фотохимической активности хлоропластов.

Работа 10. Получение вытяжки пигментов

Ход работы: навеску зелёных листьев (~1 грамм) измельчают и тщательно растирают в ступке с небольшим количеством песка и спирта (~1 мл). После того, как образец будет полностью гомогенизирован, к нему добавляют около 10–15 мл спирта. Полученный гомогенат центрифугируют (10 минут, 12–14 тыс. об./мин.) или отфильтровывают через стеклянный фильтр с помощью насоса и колбы Бунзена.

Задание: часть полученной вытяжки (~0,5 мл) отлить в пробирку Эппендорфа (**для выполнения работы 11**), оставшийся раствор разлить по трём пробиркам (**1**, **3** и **4**) примерно в равных частях (для выполнения 12 и 13 работ).

Работа 11. Хроматографическое разделение пигментов на бумаге

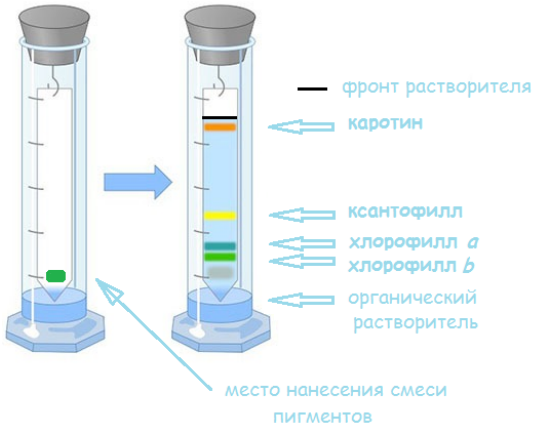
Метод основан на разделении пигментов между волокнами целлюлозы хроматографической бумаги и подвижной фазой – растворителем. При перемещении раствора по бумаге под действием капиллярных сил, молекулы пигментов распределяются между этими двумя фазами, в зависимости от адсорбционной способности и растворимости пигментов.

Расстояние, пройденное нанесённым на бумагу пигментом в направлении движения растворителя, характеризуется **величиной *Rf***, которая представляет собой отношение расстояния, пройденного растворённым пигментов, к расстоянию пройденному фронтом растворителя. В стандартных условиях это величина для данного пигмента постоянна и соответствует коэффициенту распределения.

Хроматографирование на бумаге проводят **восходящим** и **нисходящим** способами. При **восходящей** хроматографии бумажную полоску подвешивают вертикально; её нижний конец (на который нанесена смесь пигментов) погружают в растворитель. При этом место нанесения **должно** находится **выше** уровня растворителя. По мере движения растворителя под действием капиллярных сил вертикально вверх происходит разделение растворённых веществ. При **нисходящей** хроматографии верхний конец бумажной полосы со смесью пигментов, нанесённых недалеко от кромки бумаги, закрепляют в сосуде и размещают в верхней части камеры. Нижний конец бумаги спускаю вниз, но так, чтобы он не касался налитого на дне камеры растворителя. В результате действия капиллярных сил и силы тяжести растворитель начинает передвигаться вниз по бумажной полосе, в результате чего происходит разделение смеси.

Хроматографирование проводят в герметически закрытых камерах, где поддерживается атмосфера, насыщенная парами растворителей, что предотвращает их испарение с бумаги. Для эффективного распределения пигментов бумага должна быть равномерной по толщине и обладать достаточной плотностью.

Ход работы: проводим бумажную восходящую хроматографию. Полоску хроматографической бумаги шириной 2,5 см и длиной, соответствующей высоте сосуда, помещают на чистую поверхность. На расстоянии 2 см от нижнего края полоски в середину осторожно (**не** допуская образования большого пятна) наносят 10–15 небольших капель (микрокапилляром или наконечником) спиртового раствора пигментов, дожидаясь **полного высыхания** предыдущей капли. Полоску подвешивают на крючок в хроматографической камере (так, чтобы нижний конец был погружён в бензин; место нанесения смеси пигментов должно находиться выше растворителя) и плотно её закрывают. По окончании разделения пигментов (после того, как растворитель пройдёт ~ 10 см) хроматограмму вынимают, сразу отмечают карандашом границу подъема растворителя (**фронт растворителя**), высушивают в вытяжном шкафу и рассчитывают значение *Rf* для каждого пигмента.



Задание: зарисовать полученную хроматограмму в тетрадь, сделать выводы, учитывая разную растворимость пигментов в бензине и их молекулярные массы.

Работа 12. Разделение пигментов по Краусу и омыление хлорофилла щёлочью

Молекула хлорофилла состоит из двух частей – порфиринового ядра и фитольного хвоста (в два раза длиннее ядра). Благодаря атомам кислорода, азота и магния порфириновое кольцо гидрофильно. Фитольный хвост – углеводородная часть, следовательно, он гидрофобен. Полярность молекулы обуславливает её расположение в мембранах хлоропласта: фитольный хвост располагается в гидрофобной части мембраны тилакоида, а порфириновое ядро – в гидрофильной. Имея разные свойства, обе части молекулы хлорофилла выполняют разные функции: порфириновое ядро поглощает свет, а фитольный хвост «заякоривает» молекулу хлорофилла в определённой части мембраны тилакоида.

Полученный из листа хлорофилл легко реагирует с кислотами и щелочами. При взаимодействии со щелочью образуется два спирта – метанол и фитол – щелочная соль хлорофиллина.

При действии слабой кислоты хлорофилл теряет зелёный цвет, образуется красно-бурое вещество феофетин. У которого атом магния замещён на два атома водорода. В естественных условиях образование феофитина происходит при старении листьев, осенью, под влиянием неблагоприятных факторов. В природе появление феофитина вызвано увеличением проницаемости мембран и проникновением в хлоропласт кислого клеточного сока.

Щёлочь отделяет от молекулы хлорофилла фитольный хвост, в результате образующаяся соль теряет способность растворяться в бензине, но сохраняет зелёный цвет. В живом листе фитол может отщепляться от хлорофилла под действием фермента хлорофиллазы.

Кроме пиррольных колец, в состав молекулы хлорофилла входит ещё карбоциклическое кольцо с высокоактивной кетогруппой. Предполагают, что эта группа участвует в окислении воды.

Ход работы: добавить к спиртовой вытяжке пигментов (**пробирка 1**) 2–3 капли дистиллированной воды и равный (спиртовому) объём бензина. Закрыть пробирку, несколько раз сильно встряхнуть и дать отстояться. Отметить окраску свлоёв жидкости. Верхнюю бензиновую фракцию необходимо перенести **во вторую пробирку**. Экстракцию повторить дважды. В первой пробирке остаётся раствор ксантофилла.

К бензиновой фракции (**пробирка 2**) добавить несколько кристаллов NaOH и несколько капель воды, сильно встряхнуть. Прилить в пробирку спирт (объём равен объему бензина), сильно встряхнуть и дать отстояться. Верхняя фракция – раствор каротина в бензине; нижняя – раствор соли хлорофиллина в спирте.

Задание: получить растворы и оставить их для выполнения работы 14.

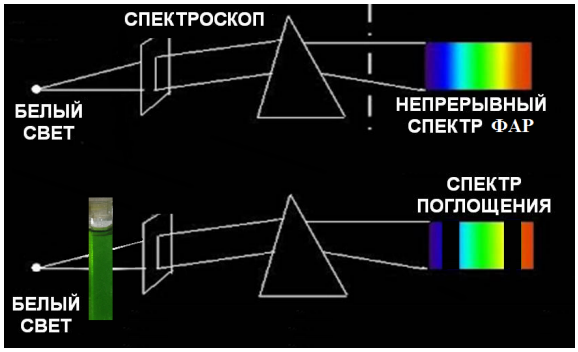
Работа 13. Получение раствора феофитина и металлозамещённого хлорофилла

Ход работы: в пробирки **три** и **четыре** со спиртовыми растворами пигментов добавляют по две капли 10% раствора HCl. При разрушении металлоорганической связи (потеря иона магния) образуется феофитин и цвет раствора изменяется. В **четвёртую** пробирку нужно добавить кристаллы уксуснокислого цинка и прокипятить (пробирку прикрыть фольгой). Образуется аналог хлорофилла (ион цинка встраивается вместо иона магния).

Задание: получить растворы и оставить их для выполнения работы 14.

Работа 14. Оптические свойства фотосинтетических пигментов

Пигменты характеризуются избирательным поглощением лучей света. Для определения, какие именно лучи поглощает пигмент, нужно кювету (пробирку) с раствором пигмента поместить перед щелью **спектроскопа**. На месте лучей, поглощаемых молекулами пигмента, в спектре излучения источника света появляются тёмные полосы. Чем полнее поглощаются лучи, тем темнее полоса. Спектр с темными полосами на месте поглощённых лучей и называется **спектром поглощения пигмента**. Наиболее затемнённые полосы в зонах поглощения соответствуют **максимумам поглощения**. Ширина полос поглощения зависит от количества молекул пигмента в слое раствора, через который проходит луч света, попадающий в щель спектроскопа. Положение максимумов поглощения может **смещаться** из-за взаимодействия отдельных молекул пигмента между собой или с белками.



Ход работы: оценивают спектр поглощения растворов пигментов, полученных при выполнении работ 10–14. Раствор хлорофилла находится в нижней части пробирки 2; феофетина – пробирке 3; металлозамещённого хлорофилла – пробирке 4; каротина – верхней части пробирки 2; ксантофилла – пробирке 1.

Задание: заполнить таблицу, сделать вывод.

Фотосинтетические пигменты	Спектр поглощения
Хлорофилл	
Феофетин	
Металлозамещённый хлорофилл	
Каротин	
Ксантофилл	

Вопросы для самоконтроля

1. Космическая роль фотосинтеза.
2. Перечислите массовые пигменты растений.
3. Чем отличается хлорофилл a от хлорофилла b?
4. На какие части делят молекулу хлорофилла по свойствам? Какую функцию выполняет каждая часть молекулы?
5. В какой части хлоропласта происходит темновая фаза фотосинтеза?
6. Какой тип транспорта характерен для агранальных хлоропластов?
7. Что такое ФАР?

ЗАНЯТИЕ 4. Дыхание

Цель занятия: научиться определять и рассчитывать дыхательный коэффициент; определять активность ряда дыхательных ферментов.

Материалы и оборудование: проросшие семена льна, овса, чечевицы, пшеницы, дистиллированная вода, метиленовый синий, 20%-ный раствор NaOH или KOH, 1 н растворы уксусной кислоты и ацетата натрия, 10% раствор фосфорной кислоты, 1 % раствор крахмала, раствор аскорбиновой кислоты (1 мг/мл), 0.02 М раствор пирокатехина, 0.01 н раствор йода.

Большая пробирка с хорошо пригнанной резиновой пробкой, в которую вставлена изогнутая под прямым углом тонкая стеклянная трубка с нанесёнными делениями, секундомер, водяная баня, пинцет, ступка с пестиком, штатив с пробирками, фильтровальная бумага, пипетки Пастера разного объема, стеклянные цилиндры объёмом 10 мл, маркер.

Работа 15. Определение дыхательного коэффициента

Дыхание – физиологический процесс постепенного окисления органических веществ с выделением энергии, которая запасается в молекулах АТФ (доноры энергии для выполнения любой работы в клетке). Органические вещества, разрушающиеся во время дыхания, называются **дыхательным субстратом**. Показателем химической природы субстрата служит дыхательный коэффициент (ДК) – отношение объема выделенной при дыхании углекислоты к объему поглощенного кислорода. ДК, определённые для целых семян и зародышей, обычно ниже, чем коэффициенты, измеренные при использовании клеток и чистых растворов дыхательных субстратов

Для ориентировочного определения величины ДК помещают исследуемый материал в пробирку, соединенную с градуированной трубкой, в которую введена капля красителя. В случае если объемы обмениваемых при дыхании газов равны, то капля в трубке передвигаться не будет.

При окислении углеводов ДК = 1:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = 6CO_2 + 6H_2O \ (ДК = 6CO_2/6O_2)$$

При величине ДК не равной 1, объёмы поглощённого O_2 и выделенного CO_2 не соответствуют друг другу, капля смещается.

При окислении белков или жиров ДК < 1:

$$C_{17}H_{35}COOH + 26O_2 = 18CO_2 + 18H_2O \ (ДК = 18CO_2/26O_2)$$

При окислении органических кислот ДК > 1:

$$2C_2O_4H_2 + O_2 = 4CO_2 + 2H_2O \ (ДК = 4CO_2/O_2)$$

Субстрат дыхания	Жир тристеарин	Жир трилинолеин	Лейцин	Лизин	Фенилаланин	Белки	Гексозы и их производные	Глу	Асп	Малат	Лимонная кислота	Щавелевая кислота
ДК	0,70	0,74	0,80	0,86	0,90	0,70÷0,99	1,00	1,11	1,33	1,33	1,33	4,00



Ход работы: в пробирку осторожно, стараясь не травмировать, помещают проросшие семена масличных (злаковых или бобовых) культур. Заполняют пробирку на 1/3 по объёму и плотно закрывают пробкой со стеклянной градуированной трубкой. Пробирку ставят в штатив (**чтобы избежать нагревания прибора от прикосновения рук**) и вводят в трубку каплю красителя. За каплей в трубке наблюдают в течение 5 минут, если капля не сдвигается, то ДК = 1 и дальнейшие наблюдения за данными семенами можно прекращать. Если капля поменяла своё расположение, то отмечают положение внутреннего мениска капли через 5 минут (3 минуты, если трубка короткая; время отчёта должно быть одним и тем же). Измерение повторяют ещё два раза, каждый раз проветривая пробирку. Вычисляют среднее расстояние, пройденное каплей (**А**), которое соответствует разности между объемами поглощенного кислорода и выделенной углекислоты.

Потом в пробирку вставляют кольцо из фильтровальной бумаги, аккуратно смачивают раствором щелочи (для поглощения CO_2), чтобы не допустить попадания её на семена. Закрывают пробирку пробкой и вновь вводят в трубку каплю красителя. Примерно через 5 минут начинают первые измерения, перемещение окрашенной капли измеряют три раза и вычисляют среднее значение (**В** – объём поглощённого O_2).

Определяют величины **А** и **В**:

$$\mathbf{A} = O_2 - CO_2;\ CO_2 = O_2 - \mathbf{A};$$

$$\mathbf{B} = O_2, \text{ следовательно, } CO_2 = \mathbf{B} - \mathbf{A}.$$

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

Задание: заполнить таблицу, сделать вывод о химической природе веществ, используемых для дыхания прорастающими семенами растений.

Растение	Расстояние, пройденное каплей за 3–5 минут, мм								Кол-во СО	Величина ДК	Дыхательный субстрат
	без щелочи (А)				со щелочью (В)						
	1	2	3	Хср	1	2	3	Хср			
Пшеница											
Лён											
Чечевица											

Работа 16. Количественное определение активности полифенолоксидазы

Процессы дыхания в клетках обеспечиваются активностью **оксидоредуктаз**, которые катализируют реакции переноса электронов (e^-) от окисляемого субстрата – донора e^- к акцептору e^-. Во многих реакциях e^- переносится вместе с протоном. Оксидоредуктазы, катализирующие перенос H^+, называются **дегидрогеназами**. Акцептором может служит кислород или другие соединения (промежуточные акцепторы). Оксидоредуктазы, катализирующие перенос электронов на молекулярный кислород или кислород H_2O_2 и органических перекисей, называют **оксидазами**. В дыхательной цепи митохондрий терминальной оксидазой является **цитохромоксидаза**. Многие оксидазы ускоряют реакции окисления, не связанные с дыхательной цепью митохондрий. Они завершают окислительные процессы вне митохондрий. Такие оксидазы, как **каталаза** и **пероксидаза**, защищают клетки от сильных окислителей.

Полифенолоксидаза (аэробная дегидрогеназа) повышает окислительно-восстановительный потенциал молекулярного кислорода и присоединяет к нему водород, отщеплённый от полифенола или близкого соединения. Непрореагировавший субстрат может быть окислен йодом, что позволяет количественно оценить активность фермента с помощью титрования в присутствии крахмала.

Ход работы: навеску растений (400 мг) гомогенизировать в ацетатном буфере (10 мл; буфер получают при смешивании равных объёмов однонормальных растворов уксусной кислоты и ацетата натрия (pH = 4.7)). Ступку оставить на 30 минут, накрыв листом бумаги. Вытяжку отфильтровать или процентрифугировать, разделить на две половины и одну из них прокипятить (накрыть фольгой) для получения контрольного раствора (учёт неферментативного окисления). Половину сырой и кипячёной вытяжки оставить для выполнения **работы 17**.

В две колбы (**ПФН** и **ПФК**) налить по 3 мл воды, 2 мл аскорбиновой кислоты и 1 мл пирокатехина. Добавить в одну колбу (**ПФН**) 1 мл некипяченого фильтрата, в другую (**ПФК**) – кипячёного, перемешивать две минуты и остановить реакцию ортофосфорной кислотой (1 мл). Добавить в каждую колбу по три капли раствора крахмала и титровать раствором йода до появления синей окраски. Определение концентрации повторить 2–3 раза.

Расчёт активности фермента выполнить по формуле:

$$\mathbf{A = (10 \cdot \Delta V \cdot 5)/(m \cdot 2),}$$

где **10** – коэффициент для учёта всего объёма вытяжки; **ΔV** – средняя разность между результатами титрования контрольной (с кипячёным фильтратом) и опытной вытяжек, мл; **5** – коэффициент для расчёта количества молекул субстрата, превращаемых ферментом, мкмоль/мл; **m** – навеска, г; **2** – время реакции, мин.

Ферментативная активность (**А**) показывает, сколько субстрата способен за минуту преобразовать фермент, содержащийся в 1 грамме растительного материала (**мкмоль субстрата/г·мин**).

Задание: рассчитать активность полифенолоксидазы.

Работа 17. Количественное определение активности пероксидазы в присутствии полифенолоксидазы

Пероксидазы окисляют полифенолы и ароматические амины, взаимодействуя не с молекулярным кислородом, а с H_2O_2 или органическими перекисями. Последние образуются в клетке под действием флавиновых оксидаз из каротиноидов, терпенов, жирных кислот в присутствии молекулярного кислорода.

Ход работы: смотрите «схема опыта для работ 16 и 17» – ПН и ПК. Расчет активности пероксидазы проводится по формуле, приведенной в **работе 16**. Для получения «реальной» активности пероксидазы необходимо от значения, полученного вычислением по формуле, отнять значение активности полифенолоксидазы (полученной в **работе 16)**

Задание: рассчитать активность пероксидазы.

Схема опыта для работ 16 и 17:

ПФН	**ПФК**	**ПН**	**ПК**
3 мл дистиллированной воды 2 мл (1 мг/1 мл) аскорбиновой кислоты 1 мл 0,02 М пирокатехина		3 мл дистиллированной воды 2 мл (1 мг/1 мл) аскорбиновой кислоты 1 мл 0,02 М пирокатехина 1 мл 0,01 % раствора H_2O_2	
1 мл соответствующего фильтрата			
Перемешивать две минуты			
Остановить реакцию добавлением 1 мл 10 % раствора ортофосфорной кислоты			
Добавить три капли 1 % раствора крахмала			
Титровать 0,01 н раствором йода до появления синей окраски.			

***Примечание*:** ПФН, ПФК, ПН, ПК – подписи на колбах, **ПФ** – полифенолоксидаза, **П** – пероксидаза, **Н** и **К** – некипячёный и кипячёный соответственно.

Вопросы для самоконтроля

1. Какое значение имеет дыхание для растений?
2. Где расположена дыхательная цепь?
3. Почему электроны перемещаются к кислороду воздуха?
4. Как происходит синтез АТФ.
5. Что такое «окислительное фосфорилирование»?
6. Какова роль кислорода в дыхании?
7. Какое значение имеет цикл Кребса для растений?
8. Каковы причины гибели растений от гипоксии? Как растения приспосабливаются к этим условиям?
9. Что такое эффект Пастера?

ЗАНЯТИЕ 5. Рост

Цель занятия: научиться определять и рассчитывать дыхательный коэффициент; определять активность ряда дыхательных ферментов.

Материалы и оборудование: проросшие и непроросшие семена растений, растение фикуса, булавки, пенопластовые брусочки, дистиллированная вода, чашки Петри, фильтровальная бумага, гелиевая ручка, маркер, 0.01 % гетероауксина, гетероауксиновая паста, песок, маркер.

Работа 18. Определение зоны роста стебля

Ход работы: на побег проросших семян растения гелиевой ручкой наносят метки через каждый 1 мм на протяжении 1 см от конуса нарастания. Растения прикрепляют булавкой к пенопластовому брусочку, покрытому фильтровальной бумагой. Затем помещают брусочки с растениями во влажную камеру, на дно которой наливают воду. Чтобы растения не подсыхали, под них подкладывают полоску фильтровальной бумаги, который опускают в воду, а камеру накрывают крышкой. Опыт проводят в темноте. Через 24 часа оценивают расхождение меток.

Задание: Нарисовать кривую роста, сделать вывод.

Работа 19. Определения зоны роста корня

Ход работы: на корень проросших семян растения гелиевой ручкой наносят метки через каждый 1 мм на протяжении 1 см от конуса нарастания. Растения прикрепляют булавкой к пенопластовому брусочку, покрытому фильтровальной бумагой. Затем помещают брусочки с растениями во влажную камеру, на дно которой наливают воду. Чтобы растения не подсыхали, под них подкладывают полоску фильтровальной бумаги, который опускают в воду, а камеру накрывают крышкой. Опыт проводят в темноте. Через 24 часа оценивают расхождение меток.

Задание: Нарисовать кривую роста, сделать вывод.

Работа 20. Наблюдение за геотропическими изгибами корня и стебля

Ход работы: проросшие семена помещают в сосуд корнем вверх. Через 24 часа отмечают изменения.

Задание: Сделать ввод относительно геотропизма побега и корня.

Работа 21. Эпинастические и гипонастические изгибы листьев под действием гетероауксина

Ход работы: ланолиновую пасту, содержащую гетероауксин (β-индолилуксусная кислота), наносят на нижнюю сторону черешка одних листьев, на верхнюю – других. Предварительно измеряют углы отхождения черешков листьев от стебля. Чрез 24 часов измеряю угол отхождения черешка.

Задание: изобразить схематически первоначальное и конечное положение черешка и сделать вывод.

Работа 22. Действие гетероауксина на рост растений

Ход работы: на проросток наносят ланолиновую пасту, содержащую гетероауксин. Переносят проростки в темноту и через 24 оценивают, произошёл ли изгиб.

Задание: сделать вывод.

Работа 23. Влияние разных концентраций гетероауксина на прорастание семян и рост проростков

Ход работы: в пять чашек Петри помещают фильтровальную бумагу и смачивают её водой (контрольный вариант) или раствором гетероауксина (0.01, 0.001, 0.0001 и 0.00001%). На увлажнённую бумагу раскладывают по пять семян. Через семь суток оценивают процент проросших семян, интенсивность роста стебля, корня, количество боковых корней.

Задание: выявить, какие концентрации гетероауксина стимулируют, а какие подавляют рост; показать видоспецифичность ответа.

Работа 24. Зависимость величины растения от количества запасных веществ в семени

Ход работы: отбирают 12 совершенно одинаковых семян. Из них 3 оставляют целыми. У трех других удаляют половину семени. У третьей порции семян оставляют 1/4 семени и у остальных – 1/8 часть семени. Причем оставшиеся для опыта части должны иметь зародыш. Все семена высевают в небольшие сосуды с песком и проращивают в темноте. Через 7 суток оценивают ростовые параметры растений, развившихся из семян с разным количеством запасных веществ.

Задание: сделать вывод.

Работа 25. Влияние аэрации на рост растений

Ход работы: три сосуда наполняют песком на ¼, ½ и ¾ объёма, увлажняют и помещают на поверхность по 5 семян. Плотно закрывают ёмкости. Объём воздуха в банках в зависимости от количества песка будет различным. Оценивают прорастание семян и ростовые показатели проростков.

Задание: сделать вывод.

Вопросы для самоконтроля

1. Перечислите свойства гормонов.
2. Как гормоны взаимодействуют друг с другом? Приведите примеры.
3. Перечислите функции фоторецепторов синего света;
4. Фотоконверсия фитохромов.
5. С помощью каких фитогормонов можно получить бессемянные плоды?
6. Что такое «тройной эффект этилена».
7. S-образная кривая роста.
8. Что такое «кислый рост»?
9. Какие вещества негормональной природы регулируют рост растений?
10. От каких внешних и внутренних факторов зависит реакция растений на действие гормонов?
11. Перечислите гормоны изопреноидной природы.
12. Какой гормон можно использовать при пересадке деревьев в качестве антитранспиранта?
13. Как можно ускорить или затормозить созревание плодов.
14. Чем отличаются экзогенные гормоны от эндогенных?

ЗАНЯТИЕ 6. Минеральное питание растений

Цель занятия: обнаружить ионы кальция, магния, железа, фосфора и серы в золе растений, выявить признаки голодания растений по отдельным элементам минерального питания, ознакомится с явлением антагонизма ионов, определить концентрацию нитратов в растениях.

Материалы и оборудование: зола растений, проросшие семена растений; растения, выросшие в условиях дефицита азота, фосфора и калия; 10% HCl, дистиллированная и бидистиллированная вода, раствор хлорида калия (9 г/л) и хлорида кальция (6,7 г/л), раствор дифениламина, калибровочные растворы $NaNO_3$ или KNO_3 (10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 мг/л). Микроскоп, стеклянные палочки, предметные стекла, фильтровальная бумага, пипетки Пастера разного объема, линейка, стеклянные цилиндры объёмом 50 мл, лезвие, маркер.

Работа 26. Микрохимический анализ золы

Зола, получаемая при сжигании растений, содержит большое количество элементов макро- и микроэлементов. Для изучения химического состава золы можно использовать микрохимический метод, в основе которого лежит свойство некоторых солей образовывать кристаллы характерной формы. Для выявления ионов хлора и калия готовят водный раствор, для ионов кальция, магния, железа, фосфора и серы – солянокислый.

Ход работы: насыпать в пробирку небольшое количество золы и аккуратно залить ее примерно четырехкратным объемом 10%-ной HCl. Отфильтровать полученный раствор в чистую пробирку через бумажный фильтр. Взять пять предметных стёкол и подписать их (в соответствии с обнаруживаемым ионом). С помощью пипетки Пастера нанести по капле вытяжки на каждое предметное стекло и на расстоянии 5 мм от нее – каплю обнаруживающего реактива. **Чистой** стеклянной палочкой с заостренным концом соединяют эти капли дугообразным каналом, в месте соединения, через некоторое время, произойдет реакция. Палочку необходимо промывать дистиллированной водой после соединения капель на каждом предметном стекле и вытирать фильтровальной бумагой.

Задание: рассмотреть образующиеся кристаллы в микроскоп и зарисовать их в таблице.

Обнаруживаемый ион	Обнаруживающий реактив	Кристаллы	Рисунок
Ca^{2+}	**Серная кислота** $CaCl_2+H_2SO_4 \rightarrow CaSO_4+2HCl$	Игольчатые кристаллы гипса, иногда располагающиеся группами (снежинки)	
Mg^{2+}	$MgCl_2+\mathbf{Na_2HPO_4}+\mathbf{NH_4OH} = NH_4MgPO_4+2NaCl$	При медленной кристаллизации выпадают кристаллы в виде трапеций, призм и октаэдров; при быстрой – звезд, крестов и ветвящихся образований	
Fe^{3+}	**Гексоцианоферрат (II) калия** $4FeCl_3+3K_4[Fe(CN)_6] \rightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3 + 12KCl$	Синее окрашивание осадка гексоцианоферрат (II) железа	
PO_4^{3-}	**Молибдат аммония** (+азотная кислота)	Зеленовато-желтые мелкие кристаллы	
SO_4^{2-}	**Ацетат свинца**	Мелкие кристаллы в виде длинных игл, звезд и ромбов	

Работа 27. Влияние элементов минерального питания на рост растений

Задание: заполнить таблицу и сделать вывод.

Состав среды	Длина стебля, см	Количество листьев, шт.	Суммарная площадь листьев, $см^2$	Объём корневой системы, $см^3$	Масса, г				Внешний вид растений
					Надземная часть, г		Подземная часть, г		
					Сырая	Сухая	Сырая	Сухая	
Полная среда									
Половинная среда									
Водопроводная вода									
Среда без добавления азота									
Среда без добавления фосфора									
Среда без добавления калия									

Работа 28. Антагонизм ионов

Питательный раствор для растений, как в почве, так и питательный раствор гидропоники или вегетационных сосудах, должен содержать все необходимые элементы питания в усваиваемой форме и быть физиологически уравновешенными. Растворы чистых солей или несбалансированное их содержание даже в количествах оптимально необходимых для роста растений оказывают токсическое действие на рост корней и жизнедеятельность клеток тканей.

Антагонизмом ионов называют такое явление, когда один ион уменьшает или устраняет действие другого. Например, отдельные соли могут проявлять токсичное действие на живые клетки, тогда как их смесь оказывается нейтральной. Раствор с оптимальным соотношением ионов называется **уравновешенным**.

Антагонизм ионов проявляется и в конкуренции за переносчиков на поверхности плазмалеммы, за активные центры ферментов, а также в противоположном воздействии на гидратацию белков, на вязкость и проницаемость цитоплазмы.

Опыты по антагонизму ионов необходимо проводить с очень чистыми реактивами и посудой, так как даже небольшое загрязнение посторонними ионами может быть причиной получения неправильных результатов.

Ход работы: В четыре затемнённые баночки налить 100 мл: (1) воды (контроль), (2) раствора хлорида калия, (3) раствора хлорида кальция и (4) смесь хлорида калия и кальция (86 мл раствора KCl и 14 мл раствора $CaCl_2$). В каждую баночку поместить воронку с фильтровальной бумагой и пятью проросшими семенами.

Задание: через неделю, после постановки эксперимента, подсчитать число боковых корней, измерить длину колеоптиля и главного корня, вычислить средние величины, данные занести в таблицу. Написать выводы.

Вариант опыта	**Длина колеоптиля**		**Длина главного корня после опыта**		**Число боковых корней**	
	см	% к контролю	см	% к контролю	шт.	% к контролю
Контроль (бидистиллят)						
KCl						
$CaCl_2$						
KCl + $CaCl_2$						

Работа 29. Обнаружение нитратов в растениях

По данным Министерства здравоохранения РФ, предельно допустимая доза нитратов для взрослого человека в сутки – 500 мг, токсичная – 600 мг, для грудного ребенка доза в 10 мг может быть смертельной.

Соли азотной и азотистой кислот, поглощаемые корнями из почвы, восстанавливаются в растении до аммиака (используется для синтеза аминокислот и других соединений). Сопоставление содержания нитратов в клеточном соке тканей различных органов растений позволяет судить об их нитратовосстанавливающей активности. Реактивом для обнаружения нитратов является дифениламин, дающий с этим ионом соединение синего цвета. По интенсивности окрашивания можно приблизительно судить о количестве нитратов в исследуемом объекте.

Данные **таблицы** позволяют с помощью этого реактива оценить количество нитратов в растении на разных стадиях развития и сделать вывод о необходимости азотной подкормки. Малое количество нитратов в начале вегетации растений означает недостаток азотного питания. Такое же малое количество их в фазе цветения является нормой и не требует подкормки растений.

Шкала для определения нитратов в срезах и соке растений (по Церлинг)

Балл	Окраска среза или сока	Необходимость в азотных удобрениях	
		в начале вегетации	в фазу цветения
0	Нет окраски	Очень сильная (60 кг/га)	Средняя (30 кг/га)
1	Бледно-голубая, быстро исчезает	Сильная (60 кг/га)	Слабая (30 кг/га)
2	Голубая у проводящих сосудов	Средняя (30 кг/га)	Не нуждаются
3	Голубая, исчезает через 2–3 мин	Слабая (30 кг/га)	-//-
4	Синяя, сохраняется несколько минут	-//-	-//-
5	Темно-синяя, сохраняется некоторое время	Не нуждаются	-//-
6	Темно-синяя, устойчивая	Избыток нитратов	

Нормы содержания нитратов в продуктах

Министерством здравоохранения РФ установлены следующие нормативы по содержанию нитратов в сельскохозяйственной продукции (в мг/кг по нитрат-иону). В числителе приводятся нормы для ранних и тепличных овощей, в знаменателе – для поздней продукции открытого грунта:

лук репчатый – 80
картофель – 250
огурцы – 400/150
морковь – 400/250
лук-перо – 800/600
арбузы – 60
дыни – 90
перец сладкий – 200

капуста – 900/500 кабачки – 400
томаты – 300/150

Ход работы: на белую бумагу раскладывают 12 подписанных предметных стёкол, наносят по капле указанного раствора, рядом наносят каплю дифениламина. Параллельно готовят срезы растений и капли сока. Затем к ним добавляют дифениламин. Раствор дифениламина соединяют с исследуемым раствором или образцом растений. Время учета окрашивания **не должно превышать 1-1.5 минут**, так как цвет быстро меняется и исчезает.

Количество нитратов оценивают согласно данным концентрационной шкалы.

Задание: заполнить таблицу, оценить концентрацию нитратов в растительных образцах, написать вывод.

Концентрационная шкала окраски на нитраты

Концентрация $NaNO_3$, мг/л	Цвет
10	
50	
100	
200	
300	
400	
500	
600	
700	
800	
900	
1000	

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите основные этапы в изучении корневого питания растений. Охарактеризуйте их.
2. Перечислите функции микроэлементов.
3. Какие элементы минерального питания способны к реутилизации?
4. Что такое биогеохимические провинции?
5. Что такое зола растений? Из чего она состоит?
6. Что такое вегетационный метод, водная культура, аэропоника, стерильная культура?
7. Какую роль играет фосфор в жизни растений? Что происходит при его недостатке?
8. Какую роль играет кальций в жизни растений? Что происходит при его недостатке?

9. Какую роль играет калий в жизни растений? Что происходит при его недостатке?

10. Какую роль играет сера в жизни растений? Что происходит при ее недостатке?

11. Какую роль играет магний в жизни растений? Что происходит при его недостатке?

12. Какую роль играют микроэлементы в жизни растений? Что происходит при их дефиците?

13. Как величина pH наружного раствора влияет на поглощение ионов?

ЗАНЯТИЕ 7. Устойчивость растений к действию абиотических факторов

Цель занятия: научиться сравнивать устойчивость разных растений к действию высоких температур, оценивать криопротекторные свойства сахарозы, влияние факторов на активность сахаразы.

Материалы и оборудование: столовая свекла, 0.5 и 1 М р-р сахарозы, 10% раствор сахарозы, 0.1 н раствор HCl, 0.2 М раствор HCl, 0.1 н раствор NAOH, 8 % р-р NaCI, дистиллированная вода, сухие дрожжи, снег или лед; сосуд для охлаждающей смесь примерным объёмом 3–5 литров; соль поваренная, лопаточка для перемешивания охлаждающей смеси, термометр, скальпель, пробочное сверло D 0. 5 см, центрифуга, микроскоп, предметные и покровные стекла, маркер, фильтровальная бумага, пробирки, водяная баня, пипетки Пастера разного объёма, химический стакан с холодной водой.

Работа 30. Определение устойчивости тканей листьев растений к действию высоких температур

При экстремальных воздействиях на ткани, например, вследствие повышения температуры, клеточные мембраны, в том числе и мембраны хлоропластов, теряют свойства полупроницаемости. Вследствие этого ионы водорода, присутствующие в клетке, замещают ион магния в молекуле хлорофилла, который превращается в феофитин, имеющий бурый цвет. Чем больше хлоропластов повреждено, тем большая площадь листа буреет.

Ход работы: 5 листьев каждого вида растений промаркировать и выдержать 30 минут в водяной бане при 40°С. Извлечь по одному листу каждого растения и перенести его в сосуд с холодной водой. Температуру в водяной бане увеличить на 5 (или 10 градусов), через 10 минут вытащить следующий лист. Постепенно температуру доводят до 60 (80) градусов и вытаскивают последний лист.

Все листья поместить в 0.2 М раствор HCl на 15 минут, промыть в воде и разместить на белой поверхности в порядке увеличения площади бурой окраски.

Задание: сравнить степень повреждения листьев при разной температуре у разных растений. Сделать рисунки и выводы.

Работа 31. Защитное действие сахара на цитоплазму при замораживании

Повреждение тканей при замораживании растений связано с образованием льда как внутри клеток, так и в межклетниках. Внеклеточный лёд вызывает дегидратацию клеток, оттягивая из них воду. Кристаллы льда внутри клетки вызывают механическое повреждение структуры цитоплазмы, нарушая их полупроницаемость.

Устойчивость растений к действию отрицательных температур, в основном, определяется различным содержанием углеводов, жирных кислот и белков, способных связывать свободную воду внутри клетки и снижать температуру замерзания. Повышенная морозостойкость характерна для растений с высоким накоплением сахаров (плодовые деревья, луковичные и т.д.). Вещества, повышающие морозостойкость растений, называют **криопротекторами**.

Ход работы: из корнеплода красной свёклы пробирочным сверлом и лезвием сделать 15 одинаковых срезов толщиной 1 мм. Тщательно промыть водой для удаления сока. Поместить по 5 срезов в три пробирки, на одну третью часть заполненные (1) водой, (2) 0.5 М и (3) 1 М раствором сахарозы. Поместить пробирки в охладительную смесь (к 3 частям снега или льда добавить 1 часть поваренной соли и тщательно перемешать лопаточкой). Через 15 минут переместить пробирки в стакан с водой комнатной температуры. После оттаивания оценить окраску воды (раствора сахарозы) и окраску срезов. После оттаивания отметить окраску в жидкости и окраску срезов. Проверить жизнеспособность клеток получением плазмолиза в 8%-ном растворе NaCl.

Задание: Установить связь между интенсивностью окрашивания растворов и составом смесей, находящихся в этих пробирках. Сделать вывод.

Работа 32. Влияние температуры и PH среды на активность сахаразы

Сахараза осуществляет ферментативный гидролиз сахарозы до глюкозы и фруктозы. Данный фермент есть у большинства организмов, самая высокая его активность у некоторых грибов, например дрожжей.

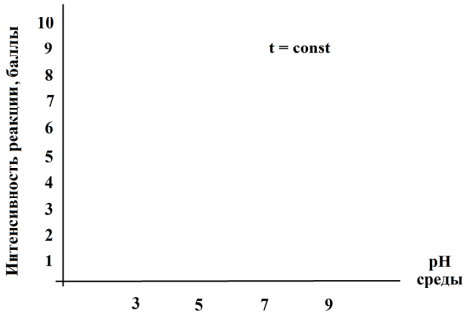
Ход работы: 0.4 г сухих дрожжей растереть в ступке и залить 15 мл воды, перемешать и оставить на 30 минут. Вытяжку фильтруют или центрифугируют.

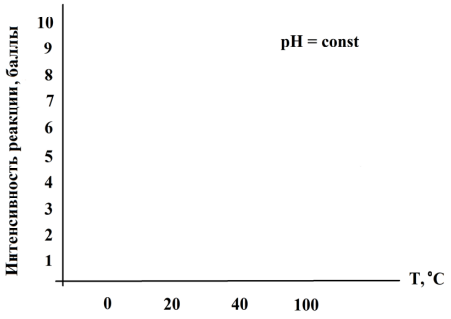
Пронумеровать 7 пробирок, налить в них по 1 мл вытяжки, добавить в первые четыре по 2 мл воды, в пятую – 2 мл 0.1 н HCl, в шестую – 2 мл 0.01 н HCl, в седьмую – 2 мл 0.1 н NaOH. Последующие 10 минут пробирки выдержать при той температуре, которая указана в таблице. После этого температуру во всех пробирках довести до комнатной и добавить по 2 мл 10 % сахарозы, перемешать, поместить пробирки на 15 минут в соответствующие температурные условия. Температуру во всех пробирках довести до комнатной, налить по 2 мл жидкости Фелинга (смешать в равных пропорциях раствор А и Б) и одновременно поместить в кипящую водяную баню, после того, как не менее в трёх пробирках изменится окраска, все пробирки вынуть из водяной бани.

Расставить пробирки в ряд по степени изменения окраски (синяя, жёлтая, оранжевая, коричнево-бурая). Заполнить таблицу, интенсивность реакции оценивать по 10 бальной шкале, при этом ноль баллов получает синяя пробирка, а десять баллов – коричневая.

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7
Температура	0°С	20°С	40°С	100°С	20°С	20°С	20°С
pH среды	7	7	7	7	3	5	9
Интенсивность реакции							

Задание: построить графики, выявить оптимальные условия для функционирования сахараза.





Вопросы для самоконтроля

1. Что такое «кросс-адаптация», «агрономическая устойчивость», «индуцируемая» и «конститутивная» устойчивость?
2. Перечислите функции белков теплового шока, пролина.
3. Чем обусловлена высокая скорость синтеза белков теплового шока?
4. Какие типы стрессоров вызывают водный дефицит у растений?
5. Перечислите негативные эффекты, вызываемые активными формами кислорода.
6. Что является причиной гибели растений под действием отрицательных температур?
7. Какие механизмы клеточной и молекулярной адаптации к избытку солей существуют?
8. Какие почвенно-климатические факторы в зимних условиях вызывают гибель растений?
9. Что такое фитоалексины?
10. Какие механизмы защиты существуют у растений от травоядных животных?
11. Чем отличаются растения-аккумуляторы ионов от растений-индикаторов?
12. Какие механизмы помогают клеткам растений снижать концентрацию тяжёлых металлов?

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецов Вл.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений : в 2 т. 4-е изд., перераб. и доп. М. : Юрайт, 2018. Т. 1. 437 с. (Бакалавр. Академический курс)
2. Кузнецов Вл.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений : в 2 т. 4-е изд., перераб. и доп. М. : Юрайт, 2016. Т. 2. 459 с. (Бакалавр. Академический курс)
3. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. М. : Абрис, 2011. 783 с.
4. Ботаника : учебник для вузов. Т. 2: Физиология растений / П. Зитте, Э.В. Вайлер, Й.В. Кадерайт, А. Брезински, К. Кернер; на основе учебника Э. Страсбургера и др. М. : Академия, 2008. 496 с.
5. Викторов Л.П. Малый практикум по физиологии растений : учеб. пос. для биол. спец. вузов. 3-е изд, перераб. и доп. М. : Высшая школа, 1983. 135 с.
6. Практикум по физиологии растений : учеб. пособие для студ. высш. пед. учеб. заведений / В.Б. Иванов, И.В. Плотникова, Е.А Живухина и др. ; под ред. В.Б. Иванова. 2-е изд., испр. М. : Академия, 2004. 144 с.

Издание подготовлено в авторской редакции

Отпечатано на участке цифровой печати
Издательского Дома Томского государственного университета

Заказ № 3138 от «17» апреля 2018 г. Тираж 50 экз.