

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени академика С.П. КОРОЛЕВА»
(Самарский университет)

Ю.В. МАКАРОВА

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Рекомендовано редакционно-издательским советом федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королёва» в качестве лабораторного практикума для студентов, обучающихся по основной образовательной программе высшего образования по направлению подготовки 06.03.01 Биология

С А М А Р А

Издательство Самарского университета
2017

УДК 581.1
ББК 28.573
М 15

Рецензенты: д-р биол. наук, проф. О. Н. Макурина,
канд. биол. наук, доц. А. Е. Митрошенкова

Макарова, Юлия Владимировна
М 15 **Физиология растений:** лабораторный практикум / *Ю.В. Макарова.* –
Самара: Изд-во Самарского университета, 2017. – 112 с.: ил.

ISBN 978-5-7883-1144-9

В лабораторном практикуме представлены теоретические основы и практические методы изучения физиологии растительной клетки, водного обмена, фотосинтеза, дыхания, минерального питания, роста и развития, а также устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды.

Практикум предназначен для студентов, обучающихся по направлению подготовки 06.03.01 Биология.

Подготовлен на кафедре экологии, ботаники и охраны природы биологического факультета естественнонаучного института Самарского университета.

УДК 581.1
ББК 28.573

ISBN 978-5-7883-1144-9

© Самарский университет, 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Раздел 1. ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ	6
Работа 1. Растительная клетка как осмотическая система. Плазмолиз и деплазмолиз	7
Работа 2. Влияние ионов калия и кальция на вязкость цитоплазмы. Колпачковый и судорожный плазмолиз	14
Работа 3. Определение осмотического давления клеточного сока плазмолитическим методом (по Г. де Фризу)	16
Работа 4. Определение сосущей силы клеток по изменению концентрации растворов	22
Работа 5. Влияние факторов внешней и внутренней среды на скорость движения цитоплазмы	27
Раздел 2. ВОДНЫЙ ОБМЕН	35
Работа 6. Наблюдение за движением устьиц под микроскопом	36
Работа 7. Определение степени открытия устьиц методом инфльтрации (по Г. Молишу)	41
Работа 8. Определение интенсивности транспирации методом быстрого взвешивания (по Л.А. Иванову)	44
Работа 9. Сравнение транспирации верхней и нижней сторон листа хлоркобальтовым методом (по Шталю)	49
Раздел 3. ФОТОСИНТЕЗ	52
Работа 10. Химические свойства пигментов зеленого листа	53
Работа 11. Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла в окислительно-восстановительных реакциях (по А.А. Гуревичу)	63
Работа 12. Разделение фотосинтетических пигментов методом бумажной хроматографии	66
Раздел 4. ДЫХАНИЕ	69
Работа 13. Определение интенсивности дыхания по количеству выделенного углекислого газа (по П. Бойсен-Йенсену)	70

Раздел 5. МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ	76
Работа 14. Обнаружение нитратов в растениях	77
Работа 15. Обнаружение элементов в золе растений микрохимическим методом	85
Раздел 6. РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ	91
Работа 16. Превращение веществ при прорастании семян	91
Работа 17. Обнаружение действия амилаз в прорастающих семенах	96
Раздел 7. УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ	98
Работа 18. Защитное действие сахарозы на цитоплазму при отрицательных температурах	99
Работа 19. Защитное действие сахарозы на белки цитоплазмы при отрицательных температурах	102
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	104
ПРИЛОЖЕНИЕ	108

ВВЕДЕНИЕ

Настоящее издание представляет собой лабораторный практикум по курсу «Физиология растений». Он предназначен для закрепления знаний, полученных в ходе лекционных занятий по одноименной дисциплине, приобретения навыков практической работы и ознакомления с основными методами исследования физиологических процессов у растений. Его особенностью является подробное изложение теоретического материала, предваряющего лабораторные работы по темам «Физиология растительной клетки», «Водный режим», «Фотосинтез», «Дыхание», «Минеральное питание», «Рост и развитие растений», «Устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды».

Для проверки усвоения учебного материала в конце каждой работы даны контрольные вопросы. В приложении помещена техника безопасности в лаборатории и правила оказания первой помощи при несчастных случаях во время проведения занятий.

Практикум адресован студентам бакалавриата биологических, сельскохозяйственных и педагогических вузов. Его материалы могут быть полезны при организации научной работы с учащимися средних общеобразовательных и профессиональных учебных заведений – школ, лицеев, колледжей.

Раздел 1. ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Основной структурной и функциональной единицей растительного организма является клетка. Растительная клетка состоит из *клеточной стенки* и внутреннего содержимого – *протопласта* (рис. 1.1). В свою очередь, протопласт представляет собой *цитоплазму*, отделенную от клеточной стенки *цитоплазматической мембраной*, или *плазмалеммой*.

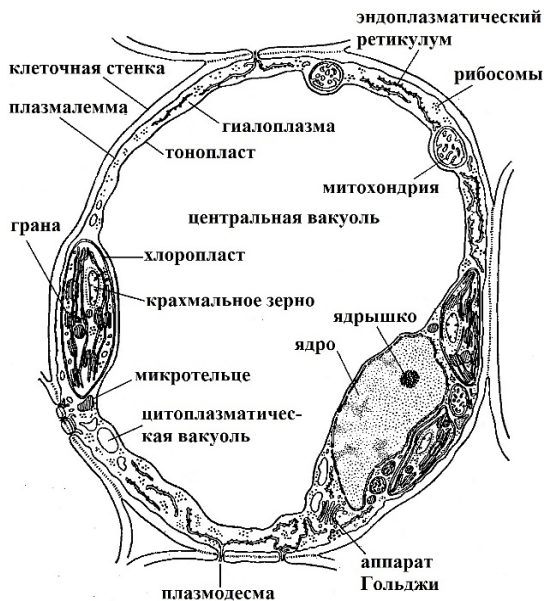


Рис. 1.1. Схема строения клетки мезофилла листа липы сердцевидной (*Tilia cordata* Mill.)

Цитоплазма растительной клетки имеет сложное строение (рис. 1.1). Ее основу составляет *гиалоплазма* – бесцветный, прозрачный, водный, коллоидный раствор, в который погружены все мембранные органоиды (*ядро*, *эндоплазматический ретикулум*, *аппарат Гольджи*, *митохондрии*, *лизосомы*, *микротельца*, а также присущие только растительной клетке *пластиды*, *крупная центральная вакуоль*) и немембранные органоиды (*рибосомы*, *микротрубочки*, *микрофила-*

менты). Каждый органоид выполняет свою оригинальную, незаменимую функцию.

Изучение происходящих в клетке процессов является основой для понимания жизнедеятельности целостного растительного организма.

Работа 1

Растительная клетка как осмотическая система. Плазмолиз и деплазмолиз

Вводные пояснения. *Осмоз* – это основной процесс, обеспечивающий поступление воды в зрелую растительную клетку с крупной центральной вакуолью.

Под осмосом (от греч. “*osmos*” – давление, толчок) понимают одностороннюю диффузию воды или другого растворителя через *полупроницаемую мембрану*, отделяющую чистый растворитель от раствора или раствор с меньшей концентрацией растворенного вещества от раствора с большей концентрацией растворенного вещества. При этом полупроницаемой мембраной называют тонкую перегородку, через которую могут проходить молекулы (ионы) растворителя и не проходят молекулы (ионы) растворенного вещества.

В качестве примера рассмотрим сосуд, разделенный полупроницаемой мембраной на два равных отсека. Пусть один отсек сосуда содержит 0,01 М раствор NaCl, а другой – такой же объем 1 М раствора NaCl (рис. 1.2).

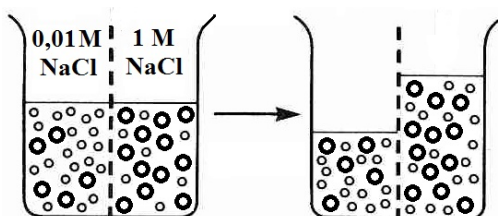


Рис. 1.2. Схема осмоса:
крупные кружки – ионы Na^+ и Cl^- ; мелкие кружки – молекулы воды

Хлорид натрия представляет собой вещество с ионной кристаллической решеткой. При попадании кристалла хлорида натрия в воду, расположенные на его поверхности ионы Na^+ и Cl^- , притягивают к себе полярные молекулы воды (рис. 1.3). В свою очередь, и молекулы воды притягивают к себе ионы Na^+ и Cl^- с равной силой. Притянутые молекулы воды испытывают толчки со стороны других молекул, находящихся в движении, и этих толчков вместе с тепловыми колебаниями ионов в кристалле оказывается достаточно для отделения ионов Na^+ и Cl^- от кристалла и перехода их в раствор. Отщепленные от кристалла ионы покрываются «шубой» из молекул воды и становятся гидратами. Поэтому, чем выше концентрация ионов Na^+ и Cl^- в анализируемом растворе, тем больше молекул воды потребуется для их гидратации.

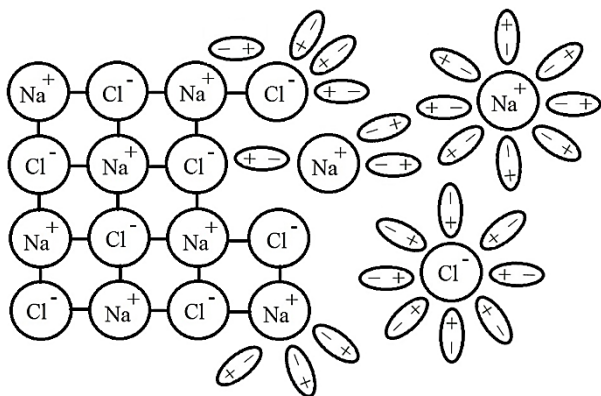


Рис. 1.3. Схема растворения хлорида натрия в воде

Так как концентрация ионов Na^+ и Cl^- выше в правом отсеке сосуда, а молекул воды больше в левом отсеке, то будет наблюдаться преимущественно правосторонняя диффузия молекул воды через полупроницаемую мембрану. Следствием этой диффузии будет постепенный подъем уровня раствора в правом отсеке сосуда за счет понижения уровня раствора в левом отсеке, а также постепенное выравнивание концентраций растворов соли в обоих отсеках сосуда (рис. 1.2). Подчеркнем, что изменение объемов и концентраций растворов в левом и правом отсеках обусловлено только перераспределением молекул

кул воды, а не соли, так как мембрана сосуда непроницаема для ионов Na^+ и Cl^- . В достигнутом равновесном состоянии полупроницаемая мембрана в единицу времени пропускает одинаковые количества воды как в направлении правого отсека, так и в направлении левого отсека сосуда, и движение растворов прекращается.

Таким образом, для того чтобы растительная клетка могла функционировать как *осмотическая система*, необходимо выполнение следующих условий. Во-первых, в клетке должны существовать структурные компоненты, сопоставимые по своим функциям с полупроницаемой мембраной. И, во-вторых, предполагаемые структурные компоненты должны разграничивать между собой растворы, концентрации которых отличаются.

В растительной клетке полупроницаемой мембраной, регулирующей осмотические процессы, принято считать систему, состоящую из плазмалеммы, тонопласта и расположенной между ними цитоплазмы (*мезоплазмы*). *Избирательная проницаемость (полупроницаемость)* плазмалеммы и тонопласта заключается в том, что они легко пропускают воду¹ и с трудом пропускают или не пропускают растворенные в ней вещества².

Осмотическое поступление воды в клетку связано с вакуолью. Содержащиеся в ней ионы (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} и др.) и первичные метаболиты типа сахаров, органических кислот и

¹ Молекулы воды преодолевают плазмалемму и тонопласт не только через липидный бислой, но и через *водные каналы*, образованные специфическими белками *аквапоринами* (от лат. “*aqua*” – вода и “*poros*” – отверстие), встраивающимися в липидный бислой этих мембран. Транспорт воды через водные каналы происходит быстрее и в большем объеме, чем через липидный бислой плазмалеммы и тонопласта.

² Избирательная проницаемость плазмалеммы и тонопласта, как и других мембран, зависит от уровня биологической активности клетки, возраста, воздействия внешних факторов. В клетках с высоким уровнем биологической активности (в молодых, зрелых тканях) мембраны обладают высоким уровнем избирательности по отношению к минеральным и органическим соединениям. При снижении активности растительной ткани (старение, воздействие неблагоприятных факторов) избирательная проницаемость мембран снижается. Благодаря избирательной проницаемости плазмалеммы и тонопласта поддерживается *гомеостаз* – относительное постоянство внутренней среды клетки.

аминокислот формируют раствор, концентрация которого выше, чем в свободном пространстве клеточной стенки³.

Убедиться в том, что растительная клетка функционирует как осмотическая система, можно, наблюдая *плазмолиз*. Плазмолиз – это процесс отделения протопласта от клеточной стенки. Он происходит при погружении клетки в раствор, концентрация которого выше, чем концентрация клеточного сока. В такой обстановке скорость передвижения молекул воды из клетки во внешний раствор будет значительно выше скорости их поступления в клетку, что приведет к снижению содержания воды в клетке (в первую очередь в вакуоли как основном резервуаре воды) и отделению протопласта от клеточной стенки. Выход воды из клетки будет продолжаться до тех пор, пока концентрации клеточного сока и внешнего раствора не сравняются.

По мере развития в клетке плазмолиза форма протопласта меняется: сначала протопласт отделяется от клеточной стенки лишь в уголках (плазмолиз такой формы называется *уголковым*), затем у него появляются многочисленные вогнутые поверхности (*вогнутый плазмолиз*) и, наконец, протопласт полностью отрывается от клеточной стенки и под действием сил поверхностного натяжения принимает округлую форму (*выпуклый плазмолиз*). Если вогнутый плазмолиз выражен чрезмерно, то говорят о *судорожном плазмолизе* (рис. 1.4).

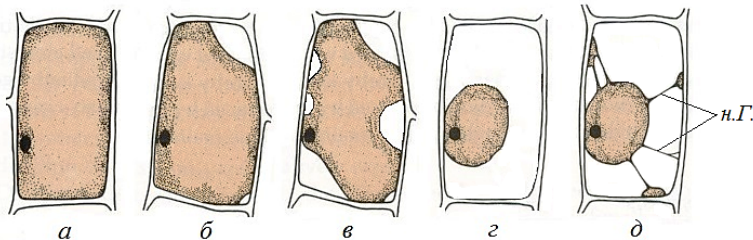


Рис. 1.4. Формы плазмолиза:

- а* – клетка в состоянии тургора; *б* – уголковый плазмолиз; *в* – вогнутый плазмолиз;
г – выпуклый плазмолиз; *д* – судорожный плазмолиз;
н.Г. – нити Гехта

³ Свободное пространство клеточной стенки представляет собой систему межфибрилярных полостей. В физиологически активных клетках такие полости заполнены водой с различными веществами, в стареющих клетках – пектиновыми веществами и лигнином.

Форма протопласта во время плазмолиза может свидетельствовать о разных степенях *вязкости цитоплазмы*. Если вязкость цитоплазмы низкая, то процесс развивается до стадии выпуклого плазмолиза. При более высокой вязкости поверхность протопласта приобретет вогнутую форму (выпуклый плазмолиз не наступает). При очень высокой вязкости происходит судорожный плазмолиз. О вязкости цитоплазмы свидетельствует и *время плазмолиза* – период с момента погружения клеток в раствор высокой концентрации до наступления выпуклого плазмолиза (примерно у половины клеток в поле зрения микроскопа). Чем больше время плазмолиза, тем выше вязкость цитоплазмы.

Пространство между клеточной стенкой и плазмалеммой (*периплазматическое пространство*), образующееся во время плазмолиза, заполняет раствор *плазмолитика* – вещества, вызывающего плазмолиз. В качестве плазмолитиков используют неядовитые вещества, которые плохо проникают или не проникают через мембраны в вакуоль, например, сахара (сахароза, глюкоза, ксилоза, сорбит, маннит и др.), некоторые соли (NaCl , KCl , KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , KCNS , Na_2HPO_4 и др.).

К плазмолизу способны только живые клетки, у которых плазмалемма и тонопласт обладают свойством избирательной проницаемости. После гибели клетки мембраны становятся полностью проницаемыми не только для воды, но и для растворенных в ней веществ, и осмотический выход воды из клетки не происходит.

Плазмолиз обратим. Процесс, обратный плазмолизу, называется *деплазмолизом*. Он развивается при погружении плазмолизированной клетки в чистую воду или раствор, концентрация которого ниже, чем концентрация клеточного сока. Деплазмолиз можно наблюдать и в том случае, если плазмалемма и тонопласт оказываются проницаемыми для плазмолитика (например, глицерина, мочевины): тогда, постепенно накапливаясь в вакуоли, плазмолитик способствует обратному току воды в клетку.

Деплазмолиз протекает быстрее, чем плазмолиз, и не имеет промежуточных стадий. По мере увеличения содержания воды в клетке объем вакуоли возрастает, клеточный сок давит на цитоплазму и прижимает ее к клеточной стенке. Под влиянием внутреннего давления клеточная стенка незначительно растягивается, а сама клетка переходит в напряженное состояние – *тургор*. Давление протопласта на кле-

точную стенку называется *тургорным (гидростатическим) давлением*. Оно препятствует дальнейшему поступлению воды в клетку. Благодаря тургорному давлению растительные ткани приобретают форму и упругость. Ограничивает поступление воды в клетку и клеточная стенка, имеющая прочную, сложно растяжимую структуру. Давление клеточной стенки на протопласт называется *тургорным натяжением*, или *противодавлением клеточной стенки*; оно равно по абсолютной величине тургорному давлению, но противоположно ему по знаку.

Цель работы: на примере плазмолиза и деплазмолиза убедиться в том, что живая растительная клетка функционирует как осмотическая система.

Объект исследования: луковица лука репчатого (*Allium cepa* L.) с пигментированными чешуями⁴.

Оборудование и реактивы: микроскоп, секундомер, спиртовка, лезвие безопасной бритвы, пинцет, препаровальная игла, предметные и покровные стекла, полоски фильтровальной бумаги, спички, простой карандаш, 1 М раствор сахарозы в капельнице, дистиллированная вода в капельнице.

Ход работы: приготавливают временный препарат эпидермиса сочной чешуи луковицы лука репчатого. Для этого на наиболее пигментированной стороне чешуи с помощью лезвия опасной бритвы вырезают квадрат со стороной около 1 см, и, захватив пинцетом за край надреза, медленно снимают эпидермис. Кусочек эпидермиса помещают в каплю дистиллированной воды на предметном стекле, аккуратно расправляют препаровальной иглой и накрывают покровным стеклом. Готовый препарат рассматривают под микроскопом. Зарисовывают в тетрадь небольшой участок эпидермиса.

На следующем этапе заменяют воду 1 М раствором сахарозы, для чего на предметное стекло рядом с покровным стеклом наносят каплю раствора плазмолитика, а с противоположной стороны покровного стекла прикладывают полоску фильтровальной бумаги. Повторяют это действие 2–3 раза, после чего незамедлительно начинают микроскопирование препарата. В процессе наблюдения зарисовывают в тетрадь последовательную смену форм плазмолиза, указывая временные

⁴ Окраска чешуй луковицы лука репчатого обусловлена наличием в клеточном соке водорастворимого пигмента *антоциана*.

отрезки их появления в клетках эпидермиса. Отмечают время плазмолиза. По форме плазмолиза характеризуют вязкость цитоплазмы клеток эпидермиса.

С наступлением выпуклого плазмолиза (примерно у половины клеток в поле зрения микроскопа) раствор плазмолитика заменяют водой. Наблюдают за деплазмолизом. Процесс зарисовывают в тетрадь, указывая время возвращения клеток в состояние тургора. Делают заключение о скорости протекания деплазмолиза по сравнению с плазмолизом.

После окончания деплазмолиза осторожно нагревают препарат над пламенем спиртовки, удерживая предметное стекло за край пинцетом. У термически обработанного препарата заменяют воду под покровным стеклом на 1 М раствор сахарозы, и, рассматривая в микроскоп, устанавливают, происходит ли плазмолиз.

По результатам проделанной работы делают выводы.

Контрольные вопросы

1. Что такое осмос и какова его физическая природа?
2. Почему растительную клетку можно сравнить с осмотической системой?
3. В чем заключается свойство избирательной проницаемости мембран? Перечислите некоторые факторы, влияющие на избирательную проницаемость плазмалеммы и тонопласта.
4. Какие компоненты клеточного сока определяют осмотическое поступление воды в клетку?
5. Что такое плазмолиз и какова причина его возникновения?
6. Как изменяется форма протопласта во время плазмолиза?
7. Может ли форма плазмолиза служить показателем вязкости цитоплазмы?
8. Что такое время плазмолиза? Можно ли использовать этот показатель для характеристики вязкости цитоплазмы?
9. Какие вещества называют плазмолитиками? Приведите примеры таких веществ.
10. Чем заполнено периплазматическое пространство растительной клетки во время плазмолиза?
11. Почему плазмолиз можно наблюдать только в живых клетках?
12. Что такое деплазмолиз, и чем он отличается от плазмолиза?

13. Объясните причины, вызывающие стойкий плазмолиз у клеток в растворе сахарозы и временный плазмолиз – в растворе глицерина.

14. Что означают понятия «тургор», «тургорное давление» и «тургорное натяжение»?

Работа 2

Влияние ионов калия и кальция на вязкость цитоплазмы. Колпачковый и судорожный плазмолиз

Вводные пояснения. Все вещества, поступающие в растительные клетки, условно делят на три группы.

1. *Вещества с хорошей проникающей способностью* легко и быстро проходят через плазмалемму и тонопласт. К ним относятся вода, газы и неполярные, растворимые в липидах вещества (органические и жирные кислоты, эфиры).

2. *Вещества с плохой проникающей способностью* медленно проходят через плазмалемму и тонопласт. Они имеют большой молекулярный вес и хорошую растворимость в воде. В эту группу входят аминокислоты, белки, сахара, многоатомные спирты и др. При этом чем больше гидроксильных (-ОН) групп имеет вещество, тем медленнее оно проникает через мембраны. Карбоксильные группы (-COOH) и аминогруппы (-NH₂) также задерживают проникновение веществ. Метильные (-CH₃) и этильные (-C₂H₅) группы, наоборот, способствуют их проникновению. В целом, чем больше полярных функциональных групп имеет вещество, тем хуже его проникающая способность.

3. *Вещества с ограниченной проникающей способностью* поступают через плазмалемму в мезоплазму, но очень слабо проникают или не проникают через тонопласт в вакуоль. К их числу относятся ионы солей.

Несмотря на ограниченную проникающую способность, ионы солей могут оказывать существенное влияние на свойства цитоплазмы, в частности, они могут изменять ее вязкость. Например, ионы K⁺ повышают оводненность цитоплазмы и понижают ее вязкость. Меньшая вязкость цитоплазмы благоприятствует протеканию синтетических процессов, внутриклеточному транспорту веществ, но снижает устойчивость растительной клетки к действию неблагоприятных внешних

факторов. Ионы Ca^{2+} оказывают на цитоплазму прямо противоположное действие.

Об изменении вязкости цитоплазмы можно судить по форме плазмолиза. При инкубации растительных клеток в концентрированных растворах солей, содержащих ионы K^+ , наблюдается *колпачковый плазмолиз*. Процесс развивается следующим образом. Под действием плазмолитика содержание воды в клетке (в вакуоле и гиалоплазме) уменьшается, и протопласт отделяется от клеточной стенки, постепенно приобретая округлую форму. В состоянии выпуклого плазмолиза мезоплазма окружает вакуоль тонким слоем. По мере проникновения ионов K^+ из внешнего раствора в мезоплазму концентрация внутриклеточного содержимого растёт, что вызывает обратный ток воды в клетку. Следствием увеличения осмотического давления мезоплазмы, а значит и уменьшения ее вязкости, является набухание мезоплазмы, которая приобретает вид колпачков на узких сторонах вакуоли. Объем вакуоли при этом не меняется, что свидетельствует о различной проницаемости плазмалеммы и тонопласта для ионов K^+ .

При действии концентрированных растворов солей, содержащих ионы Ca^{2+} , вязкость цитоплазмы возрастает. Доказательством этому служит судорожный плазмолиз, при котором протопласт остается связанным с клеточной стенкой тонкими плазматическими тяжами – *нитями Гёхта* (рис. 1.4).

Цель работы: изучить влияние ионов K^+ и Ca^{2+} на вязкость цитоплазмы, наблюдая колпачковый и судорожный плазмолиз в растительных клетках.

Объект исследования: луковица лука репчатого (*Allium cepa* L.) с пигментированными чешуями.

Оборудование и реактивы: микроскоп, секундомер (часы), лезвие безопасной бритвы, пинцет, препаровальная игла, предметные и покровные стекла, полоски фильтровальной бумаги, маркер для стекла, простой и цветные карандаши, 1 М раствор нитрата калия (KNO_3) в капельнице, 1 М раствор нитрата кальция [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$] в капельнице.

Ход работы: на одно предметное стекло наносят каплю 1 М раствора KNO_3 , на другое – каплю 1 М раствора $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Предметные стекла подписывают. В капли растворов помещают по одному кусочку эпидермиса сочной чешуи луковицы лука репчатого, которые аккуратно расправляют препаровальной иглой и накрывают покровным

стеклом. Чтобы исключить подсыхание препаратов, время от времени под покрывное стекло вводят свежие капли растворов KNO_3 и $Ca(NO_3)_2$.

Через 30 минут препараты рассматривают под микроскопом. В тетради зарисовывают фрагменты эпидермиса с хорошо выраженным колпачковым и судорожным плазмолизом, указывая видимые структурные элементы клеток. На основании проведенных наблюдений делают вывод о влиянии ионов K^+ и Ca^{2+} на вязкость цитоплазмы и о различной проницаемости плазмалеммы и тонопласта для ионов солей.

Контрольные вопросы

1. Чем отличаются друг от друга вещества с хорошей, плохой и ограниченной проникающей способностью?
2. Какое влияние оказывают ионы K^+ и Ca^{2+} на вязкость цитоплазмы?
3. Что представляет собой колпачковый и судорожный плазмолиз?

Работа 3

Определение осмотического давления клеточного сока плазмолитическим методом (по Г. де Фризу)

Вводные пояснения. По мере того, как молекулы воды диффундируют через полупроницаемую мембрану из раствора с меньшей концентрацией растворенного вещества в раствор с большей его концентрацией, *гидростатическое давление*⁵ в более концентрированном растворе растёт (рис. 1.5). Повышающееся гидростатическое давление будет противодействовать поступлению молекул воды в более концентрированный раствор, а значит, диффузия воды замедлится. При достижении гидростатическим давлением определенной величины поток воды через мембрану полностью остановится (осмос прекратится), наступит равновесие (состояние насыщения), при котором полупроницаемая мембрана в единицу времени будет пропускать одинако-

⁵ Гидростатическое давление – это давление покоящейся жидкости на дно и стенки сосуда.

вое количество воды в направлении обоих растворов. В таком состоянии системы гидростатическое давление раствора станет равным осмотическому давлению раствора. Следовательно, *осмотическое давление* (π) – это давление, которое необходимо приложить к раствору вещества, чтобы привести его в равновесие с раствором этого вещества иной концентрации или чистым растворителем, отделенным от него полупроницаемой мембраной. Оно численно равно гидростатическому давлению, при котором диффузия воды через полупроницаемую мембрану прекращается.

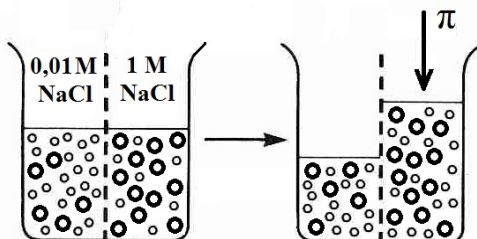


Рис. 1.5. Схема возникновения осмотического давления в растворе

Осмотическое давление служит количественной характеристикой осмоса. Оно выражается в атмосферах, барах или паскалях ($1 \text{ атм} = 1,013 \text{ бара} = 10^5 \text{ Па}$; $10^3 \text{ Па} = 1 \text{ кПа}$; $10^6 \text{ Па} = 1 \text{ МПа}$). Растворы с одинаковым осмотическим давлением (и одинаковыми концентрациями) называются *изотоническими* (*изоосмотическими*); осмос между такими растворами не происходит. Раствор, имеющий большее осмотическое давление (и большую концентрацию растворенного вещества), называется *гипертоническим*. Раствор с меньшим осмотическим давлением (и, соответственно, меньшей концентрацией) называется *гипотоническим*.

Осмотическое давление клеточного сока – важный физиологический показатель, демонстрирующий способность клетки поглощать воду из наружного раствора. Осмотическое давление клеточного сока можно определить с помощью плазмолитического метода. Задачей этого метода является выявление изотонического раствора плазмолитика. Для этого срезы исследуемой ткани помещают в ряд растворов плазмолитика известной концентрации, а затем рассматривают в микроскоп. В процессе микроскопирования находят такой срез, в котором

наблюдается самый начальный (уголковый) плазмолиз не менее чем у половины клеток в поле зрения микроскопа. Изотонический раствор будет находится между двумя растворами плазмолитика: раствором, вызывающим уголковый плазмолиз, и следующим раствором более низкой концентрации, при действии которого плазмолиз не происходит. На этом основании можно заключить, что концентрация изотонического раствора представляет собой среднее арифметическое между концентрациями указанных соседних растворов.

Зная концентрацию изотонического раствора, можно вычислить его осмотическое давление по формуле Я. Вант-Гоффа:

$$\pi = R \cdot T \cdot C \cdot i,$$

где π – осмотическое давление, атм.; R – газовая постоянная, равная 0,0821, л · атм / град · моль; T – абсолютная температура по Кельвину ($273 + t$ комнатная), град.; C – изотоническая концентрация, моль / л; i – изотонический коэффициент⁶.

Рассчитанное по предложенной формуле осмотическое давление раствора будет примерно равно осмотическому давлению клеточного сока.

Из формулы Я. Вант-Гоффа следует, что осмотическое давление клеточного сока зависит от концентрации растворенных в нем органических и минеральных веществ. Такие вещества называются *осмотически активными*, или *осмотиками*. К ним относятся соли, сахара, аминокислоты и органические кислоты. Суммарная концентрация этих веществ в клеточном соке в зависимости от систематической принадлежности растения колеблется в диапазоне 0,2–0,8 М.

Растение может регулировать концентрацию осмотиков и, соответственно, регулировать осмотическое давление. Увеличение концентрации клеточного сока и повышение осмотического давления достигаются с помощью ферментативного превращения сложных нерастворимых веществ в растворимые (крахмала в сахара, белков в аминокислоты), а также путем накопления растворимых солей в клеточном соке. Это позволяет растительным клеткам поглощать воду из

⁶ Изотонический коэффициент характеризует относительное количество частиц в растворе электролита. Он рассчитывается по формуле: $1 + \alpha \cdot (n - 1)$, где α – степень электролитической диссоциации, n – число ионов, на которые распадается молекула электролита. Изотонический коэффициент для неэлектролитов равен 1.

окружающей среды, даже если содержание воды в среде достаточно низкое.

У растительных организмов осмотическое давление изменяется от 0,1 МПа (у пресноводных растений) до 20,0 МПа (у лебеды скученной – *Atriplex confertifolia* (Torr. et Frem.) S.Wats., произрастающей на сухих засоленных почвах пустынь Мексики). Но у большинства растений средней полосы Европейской части России этот показатель колеблется от 0,5 до 3,0 МПа.

Осмотическое давление различно у разных жизненных форм: у древесных растений оно выше, чем у кустарников, а у кустарников выше, чем у травянистых растений. Отличаются по величине осмотического давления и растения, принадлежащие к разным экологическим группам: у растений пустынь осмотическое давление выше, чем у степных и, тем более, луговых растений; еще ниже этот показатель у растений болотных и водных местообитаний. Осмотическое давление у светолюбивых растений выше, чем у теневыносливых и тенелюбивых. На величину осмотического давления влияет размер клеток (осмотическое давление у мелких клеток обычно больше, чем у крупных), их расположение в пределах одной и той же ткани (в тканях корня показатель постепенно возрастает от верхушки к основанию, в стебле – от периферии к центру и от основания к верхушке). Сопоставление разных органов по величине осмотического давления показывает, что, например, листья обладают большим осмотическим давлением по сравнению с корневой системой. В целом же, следует отметить, что даже соседние клетки могут различаться по величине этого показателя.

Определение осмотического давления у растений имеет большое практическое значение. Зная величину этого показателя в клетках листьев, луковиц, клубней и корневищ растений, используемых человеком в пищу, можно оценить содержание в них воды и при необходимости скорректировать условия хранения. Например, осмотическое давление в клетках луковиц лука репчатого, клубнях картофеля в норме должно составлять порядка 1,5–2,0 МПа. Осмотическое давление свыше 2,0 МПа будет свидетельствовать о недостаточной влажности воздуха в овощехранилище, что может привести к увяданию луковиц и корнеплодов. Осмотическое давление ниже 1,5 МПа сигнализи-

рует об избытке влаги, которая может стать причиной загнивания растениеводческой продукции.

Цель работы: определить величину осмотического давления в клетках эпидермиса сочной чешуи луковицы лука репчатого плазмолитическим методом.

Объект исследования: луковица лука репчатого (*Allium cepa* L.) с пигментированными чешуями.

Оборудование и реактивы: микроскоп, секундомер (часы), комнатный термометр, бюретка с воронкой (2 шт.), штатив для крепления бюреток (2 шт.), стеклянные бюксы (5 шт.), стакан для воды, пинцет, препаровальная игла, стеклянная палочка, маркер для стекла, лезвие безопасной бритвы, кисточка, чашечка для срезов, предметные и покровные стекла, кусочки фильтровальной бумаги или салфетка, 1 М раствор NaCl, дистиллированная вода, кипяченая вода.

Ход работы: из 1 М раствора NaCl и дистиллированной воды в стеклянных бюксах готовят по 10 мл 0,5 М, 0,4 М, 0,3 М, 0,2 М и 0,1 М растворов NaCl⁷. Бюксы с растворами закрывают крышечками и ставят в ряд в порядке убывания концентраций.

Из сочной чешуи луковицы лезвием опасной бритвы изготавливают 15 срезов эпидермиса и помещают их в чашечку с кипяченой водой для удаления клеточного сока, вытекающего из поврежденных клеток. Через несколько минут пинцетом или кисточкой извлекают срезы из воды, слегка обсушивают их фильтровальной бумагой и по 3 штуки помещают в растворы, начиная с самой высокой концентрации (0,5 М). При этом срезы погружают не одновременно, а с интервалом в 5 минут, чтобы обеспечить одинаковую продолжительность их пребывания в растворах соли. Пинцет (кисточку) после каждой концентрации споласкивают дистиллированной водой и насухо вытирают фильтровальной бумагой или салфеткой.

Через 30 минут вынимают срезы из 0,5 М раствора NaCl, выкладывают на предметное стекло в каплю раствора этой же концентрации, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроско-

⁷ Для приготовления 0,5 М раствора NaCl смешивают 5 мл 1 М раствора NaCl с 5 мл дистиллированной воды. Для приготовления 0,4 М раствора смешивают 4 мл 1 М раствора NaCl с 6 мл дистиллированной воды. Для приготовления 0,3 М раствора смешивают 3 мл 1 М раствора NaCl с 7 мл дистиллированной воды и т. д. Для точного отмеривания жидкостей пользуются бюретками.

пом. Отмечают форму плазмолиза. Результаты эксперимента заносят в табл. 1.1. Через 5 минут рассматривают срезы из второго раствора (0,4 М) и т. д. Стекланную палочку, которой наносилась капля раствора, пинцет (кисточку), предметные и покровные стекла после каждого раствора споласкивают дистиллированной водой и вытирают.

Таблица 1.1. Изотоническая концентрация раствора хлорида натрия и осмотическое давление клеточного сока в клетках сочных чешуй лукович лука репчатого, установленные плазмолитическим методом

Концентрация раствора NaCl, моль/л	Изотонический коэффициент	Время погружения среза в раствор, час. мин.	Время извлечения среза, час. мин.	Форма плазмолиза	Изотоническая концентрация, моль/л	Осмотическое давление клеточного сока, МПа
0,5	1,70					
0,4	1,73					
0,3	1,75					
0,2	1,78					
0,1	1,83					

На основе полученных данных находят изотоническую концентрацию раствора и рассчитывают осмотическое давление раствора по уравнению Вант-Гоффа⁸. Делают вывод об осмотическом давлении клеточного сока.

Контрольные вопросы

1. Что такое осмотическое давление и от чего зависит его величина?
2. Какие растворы называются гипотоническими, изотоническими, гипертоническими?
3. Укажите некоторые внешние и внутренние факторы, оказывающие влияние на величину осмотического давления у растений?
4. С помощью каких процессов растение может регулировать величину осмотического давления?

⁸ Для перевода величины осмотического давления, выраженного в атмосферах, в мегапаскали, необходимо полученное значение осмотического давления в атмосферах умножить на 0,1013. Для перевода атмосфер в бары значение осмотического давления в атмосферах умножают на 1,0132.

5. На чем основан плазмолитический метод определения осмотического давления клеточного сока?

6. Какое практическое значение имеет определение величины осмотического давления клеток растений?

Работа 4 Определение сосущей силы клеток по изменению концентрации растворов

Вводные пояснения. Поступление воды в клетку определяется *сосущей силой клетки*. Под сосущей силой клетки ($S_{кл.}$) понимают силу, с которой клетка поглощает воду в каждый данный момент. Она равна разности между осмотическим давлением клеточного сока ($\pi_{кл. с.}$) и тургорным давлением (T): $S_{кл.} = \pi_{кл. с.} - T$.

Сосущая сила клетки равна по величине *водному потенциалу клетки* ($\Psi_{кл.}$), но противоположна ему по знаку: $S_{кл.} = -\Psi_{кл.}$

Сосущая сила клетки зависит от степени ее насыщенности водой: чем меньше клетка насыщена водой, тем больше ее сосущая сила. Изменение осмотических величин клетки в зависимости от ее насыщенности водой можно представить схематично (рис. 1.6).

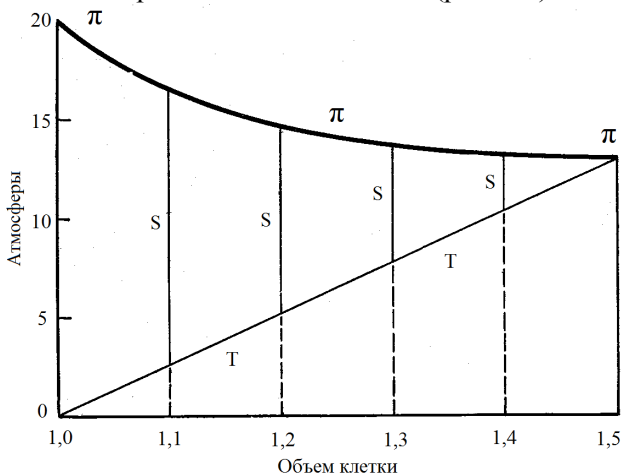


Рис. 1.6. Схема изменения осмотических величин в клетке в зависимости от ее насыщенности водой

На рис. 1.6. видно, что в состоянии выпуклого плазмолиза (левая часть схемы) клетка имеет наименьший объем, тургорное давление отсутствует, осмотическое давление клеточного сока максимальное, а сосущая сила клетки равна всей величине осмотического давления ($T = 0$, $S_{\text{кл.}} = \pi_{\text{кл. с.}}$). При погружении клеток в воду тургорное давление постепенно достигает максимальной величины (правая часть схемы), становясь равным несколько снизившемуся осмотическому давлению, сосущая сила падает до нуля ($T = \pi_{\text{кл. с.}}$, $S_{\text{кл.}} = 0$), клетка занимает наибольший объем; такое явление наблюдается в период ливневых дождей. Клетки наземных растений, как правило, не бывают насыщены водой, поэтому у таких клеток тургорное давление ниже осмотического, а сосущая сила определяется разностью их величин ($T < \pi_{\text{кл. с.}}$, $S_{\text{кл.}} = \pi_{\text{кл. с.}} - T$) (средняя часть схемы). В некоторых случаях (при *циторризе*⁹) сосущая сила может быть больше осмотического давления.

В отличие от клетки, *сосущая сила раствора* ($S_{\text{р-ра}}$) численно равна его осмотическому давлению ($\pi_{\text{р-ра}}$): $S_{\text{р-ра}} = \pi_{\text{р-ра}}$.

При погружении клетки в какой-либо раствор водообмен между ними определяется соотношением их сосущих сил: вода передвигается в ту сторону, где больше сосущая сила. Если погрузить растительную ткань в раствор, сосущая сила которого больше сосущей силы клеток ($S_{\text{р-ра}} > S_{\text{кл.}}$), то раствор будет отсасывать воду из клеток, вследствие чего его концентрация уменьшится. И, наоборот, если сосущая сила клеток больше сосущей силы раствора ($S_{\text{кл.}} > S_{\text{р-ра}}$), то клетки всасывают воду из раствора, который становится при этом более концентрированным. При равенстве сосущих сил клеток и раствора ($S_{\text{кл.}} = S_{\text{р-ра}}$) не происходит ни всасывания, ни отнятия воды, в результате чего концентрация внешнего раствора остается без изменения.

На практике показатель сосущей силы используют для диагностирования недостатка воды в растении и определения срока его полива. Так, у растений, испытывающих недостаток влаги, сосущая сила может достигать 1,5 МПа, у хорошо оводненных – это 0,3–0,6 МПа.

⁹ Циторриза – это деформирование растительной клетки вследствие ее обезвоживания. При циторризе протопласт, уменьшаясь в объеме, не отходит от клеточной стенки, а тянет ее за собой, вызывая волнообразное изгибание клеточной стенки. Циторриза наблюдается в молодых клетках с эластичными клеточными стенками, потеря воды которыми произошла не осмотическим путем, а вследствие испарения в воздушную среду, например, при суховее.

Определить сосущую силу клеток можно по изменению концентрации раствора, окружающего клетки. Изменение концентрации раствора устанавливают путем определения показателя преломления раствора (рефрактометрический метод) или его плотности (метод струек). Рефрактометрический метод и метод струек позволяют определить сосущую силу любых растительных объектов.

Цель работы: определить величину сосущей силы клеток листа с помощью рефрактометрического метода и метода струек.

Объект исследования: свежие листья растений.

Оборудование и реактивы: рефрактометр, секундомер (часы), бюретка с воронкой (2 шт.), штатив для крепления бюреток (2 шт.), пробирки (6 шт.), штатив для пробирок, пластиковая палетка, поделенная на ячейки, медицинская пипетка, пастеровская пипетка (6 шт.), стакан для воды, пробочное сверло, ножницы, пинцет, препаровальная игла, стеклянная палочка, маркер для стекла, фильтровальная бумага или салфетка, кусочек полиэтилена, 1 М раствор сахарозы, метиленовый синий, дистиллированная вода.

Ход работы: эксперимент проводят в 6 пробирках и пластиковой палетке, поделенной на ячейки.

Из 1 М раствора сахарозы и дистиллированной воды в подписанных пробирках готовят по 10 мл 0,6 М, 0,5 М, 0,4 М, 0,3 М, 0,2 М и 0,1 М растворов сахарозы¹⁰. Растворы тщательно перемешивают стеклянной палочкой (палочку после каждого раствора споласкивают дистиллированной водой и насухо вытирают фильтровальной бумагой) и переносят по 2 капли в соответствующие подписанные ячейки палетки. Все растворы берут одной и той же медицинской пипеткой, начиная с раствора самой низкой концентрации. После каждого раствора пипетку не промывают, удаляя остатки предыдущего раствора (снаружи и по возможности внутри) фильтровальной бумагой. Палетку накрывают кусочком полиэтилена для предотвращения испарения растворов.

¹⁰ Для приготовления 0,6 М раствора сахарозы смешивают 6 мл 1 М раствора сахарозы с 4 мл дистиллированной воды. Для приготовления 0,5 М раствора смешивают 5 мл 1 М раствора сахарозы с 5 мл дистиллированной воды. Для приготовления 0,4 М раствора смешивают 4 мл 1 М раствора сахарозы с 6 мл дистиллированной воды и т. д. Для точного отмеривания жидкостей пользуются бюретками.

Из листьев растений при помощи пробочного сверла вырезают 12 дисков и помещают по 2 диска в каждую ячейку палетки. Высечки рекомендуется делать с нижней стороны листа недалеко от средней жилки, избегая попадания в отверстие сверла крупных жилок. Палетку с дисками накрывают полиэтиленом и выдерживают в течение 30–40 минут, следя за тем, чтобы диски были полностью погружены в растворы.

По истечении указанного времени диски вынимают из растворов чистой препаровальной иглой и определяют изменение концентрации растворов после пребывания в них растительного материала по предложенным ниже методам.

Рефрактометрический метод (по Н.А. Максимова и Н.С. Петинору). Рефрактометр – оптический прибор, с помощью которого определяют показатель преломления луча при прохождении его через призму с нанесенным на нее исследуемым раствором. Показатель преломления раствора зависит от его концентрации и температуры. Основная часть рефрактометра – стеклянная призма, на которую стеклянной палочкой наносят 2 капли раствора. Палочку споласкивают дистиллированной водой и насухо вытирают фильтровальной бумагой. Глядя в окуляр, с помощью зеркала направляют свет в отверстие призмы, вращением винта совмещают границу светлой и темной частей поля зрения с пересечением линий креста и делают отсчет по шкале коэффициентов преломления. После каждого определения исследуемый раствор удаляют с поверхности призмы и контактирующих с ней поверхностей сухой фильтровальной бумагой, затем дважды протирают бумагой, смоченной дистиллированной водой, и снова вытирают сухой фильтровальной бумагой.

С помощью рефрактометра определяют показатель преломления у исходных растворов и растворов, в которых находились высечки из листьев. Полученные значения заносят в табл. 1.2. Находят такой раствор, показатель преломления которого, а значит и концентрация, не изменились после пребывания в нем растительного материала. Значение концентрации изотонического раствора используют для расчета осмотического давления раствора (см. лабораторную работу № 3)¹¹.

¹¹ Уравнение Вант-Гоффа для расчета осмотического давления ($\pi = R \cdot T \cdot C \cdot i$) вполне справедливо только для слабых растворов (до 0,1 М). Поэтому в табл. 1.2 и 1.3

Таблица 1.2. Изотоническая концентрация раствора сахарозы и сосущая сила клеток листа, установленные рефрактометрическим методом

Концентрация раствора сахарозы, моль/л	Осмотическое давление раствора сахарозы при 20 °С, МПа	Показатель преломления раствора сахарозы до погружения высечек	Показатель преломления раствора сахарозы после извлечения высечек	Изотоническая концентрация раствора сахарозы, моль/л	Сосущая сила клеток, МПа
0,6	0,263				
0,5	0,537				
0,4	0,821				
0,3	1,125				
0,2	1,449				
0,1	1,803				

Зная, что осмотическое давление раствора равно его сосущей силе, а концентрация раствора не изменилась после пребывания в нем высечек, делают заключение о сущей силе клеток листа.

Метод струек (по В.С. Шардакову). Растворы, в которых находились высечки из листьев, подкрашивают кристалликом метиленового синего, взятым на кончике препаровальной иглы (избыточное внесение красителя может увеличить концентрацию раствора и привести к искажению результатов эксперимента). Равномерно окрашенный раствор набирают в пастеровскую пипетку, конец которой опускают в пробирку с раствором исходной концентрации. Нижний конец пипетки должен быть погружен в раствор на 2–3 см. Очень медленно выпуская раствор из пипетки, наблюдают за направлением движения струйки окрашенной жидкости. Если плотность и концентрация раствора возросли после пребывания в нем высечек листа, подкрашенная струйка направляется вниз. В противоположном случае струйка поднимается вверх. При равенстве плотностей и концентраций обоих растворов вытекающий подкрашенный раствор остается на месте. Каждый раствор берут чистой сухой пипеткой. Результаты эксперимента заносят в табл. 1.3.

приводятся более точные, эмпирически полученные значения этого показателя для используемых в работе растворов сахарозы.

Завершив эксперимент, находят такой раствор, плотность и концентрация которого после экспонирования высечек листа не изменились (струйка осталась на месте). Сосущая сила этого раствора будет равна сосущей силе растительных клеток. А сосущая сила раствора равна его осмотическому давлению.

Таблица 1.3. Изотоническая концентрация раствора сахарозы и сосущая сила клеток листа, установленные методом струек

Концентрация раствора сахарозы, моль/л	Осмотическое давление раствора сахарозы при 20 °С, МПа	Направление движения струйки	Изотоническая концентрация раствора сахарозы, моль/л	Сосущая сила клеток, МПа
0,6	0,263			
0,5	0,537			
0,4	0,821			
0,3	1,125			
0,2	1,449			
0,1	1,803			

Контрольные вопросы

1. Что такое сосущая сила?
2. Какие значения приобретает сосущая сила в зависимости от степени насыщения клетки водой?
3. Чем определяется водообмен между клеткой и раствором?
4. Какой принцип лежит в основе определения сосущей силы рефрактометрическим методом и методом струек?
5. Какова практическая значимость определения показателя сосущей силы растений?

Работа 5

Влияние факторов внешней и внутренней среды на скорость движения цитоплазмы

Вводные пояснения. Одним из показателей жизнеспособности растительной клетки является *движение цитоплазмы*, или *циклоз*. При движении цитоплазмы происходит перенос веществ из одной части клетки в другую, их поглощение и выделение путем эндо- и экзоцито-

за, перемещение органоидов внутри клетки. У некоторых водорослей с движением цитоплазмы связан процесс размножения.

Выделяют несколько типов движения цитоплазмы. Самым простым, наименее упорядоченным и неустойчивым типом является *колебательное движение*. В процессе такого движения частицы перемещаются хаотично: одни находятся в покое, другие скользят по периферии, третьи – по направлению к центру клетки. Удобными объектами для наблюдения колебательного движения являются клетки зеленых нитчатых водорослей из класса конъюгаты (*Zygnematoophyceae*), например, кластериум (*Closterium*), пениум (*Penium*), спирогира (*Spirogyra*).

Струйчатое (циркуляционное) движение чаще всего отмечается в молодых клетках растений, в которых цитоплазма представлена постенным слоем и тяжами, пересекающими вакуоль (рис. 1.7 а). При такой структуре цитоплазма движется в виде тонких струек, идущих по различным время от времени меняющимся направлениям. Движение частиц в гиалоплазме осуществляется с различной скоростью часто навстречу друг другу. Струйчатое движение широко распространено у покрытосеменных растений. Его легко наблюдать в крупных клетках волосков молодых побегов тыквы (*Cucurbita pepo* L.), жгучих волосков крапивы (*Urtica dioica* L., *U. urens* L.), тычиночных нитей традесканции [*Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt, *T. zebrina* Bosse и др.], глоксинии [*Gloxinia perennis* (L.) Fritsch, *G. xanthophylla* (Поерр.) Roalson et Boggan и др.], в клетках многих ягод.

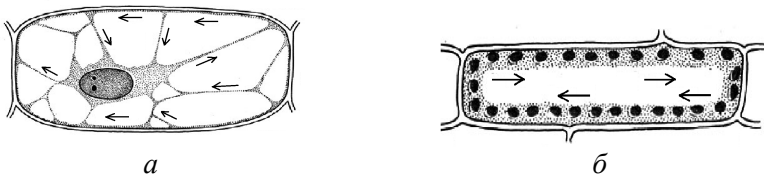


Рис. 1.7. Движение цитоплазмы:

а – струйчатое в клетке волоска тычиночной нити традесканции покрывальчатой (*Tradescantia spathacea* Sw.); *б* – ротационное в эпидермальной клетке элодеи зубчатой [*Elodea densa* (Planch.) Casp.] (стрелками показано направление движения) (Вайнар, 1987)

Ротационное (круговое, или вращательное) движение считается наиболее упорядоченным. Для него характерно одностороннее движение цитоплазмы только вдоль клеточной стенки, так как ее центральная часть занята крупной вакуолью (рис. 1.7 б). Такой тип движения часто встречается в клетках листьев водных растений – элодеи [*Elodea canadensis* Michx., *E. densa* (Planch.) Casp.], валлиснерии (*Vallisneria spiralis* L.), нителлы (*Nitella flexilis* L.), хары (*Chara fragilis* Desv. in Loisel.), а также в клетках корневых волосков, в пыльцевых трубках, камбиальных клетках и др.

Фонтанирующее движение является промежуточным типом между струйчатым и ротационным типами движения. Оно характеризуется тем, что в толстом центральном тяже цитоплазма перемещается в одном направлении (к вершине или к основанию клетки), а в пристенном слое – в прямо противоположном направлении (подобно движению струй в фонтане). Фонтанирующее движение свойственно клеткам, обладающим верхушечным ростом, поэтому его можно наблюдать в корневых волосках (например, у водокраса обыкновенного – *Hydrocharis morsus-ranae* L.) и в пыльцевых трубках многих растений.

Помимо перечисленных существуют и другие, менее распространенные типы и переходные формы движения цитоплазмы. При этом в одной и той же клетке они могут сменять друг друга.

Различают первичное и вторичное движение цитоплазмы. *Первичное движение* наблюдается в живых клетках в естественных условиях. *Вторичное (индуцированное) движение* вызывается изменением какого-либо фактора внешней среды (света, температуры, химическим и механическим воздействием и пр.). Движение цитоплазмы – один из наиболее чувствительных показателей жизнеспособности клетки, и многие даже незначительные воздействия способны остановить его или, наоборот, ускорить.

Явление ускорения движения цитоплазмы под влиянием света называется *фотодиназмом*. Реакция цитоплазмы на свет зависит от количества световой энергии и ее качественного состава. Движение цитоплазмы, вызываемое повышением температуры, называется *термодиназмом*. Установлено, что скорость движения цитоплазмы увеличивается при повышении температуры до 27–37 °С. При дальнейшем ее повышении движение цитоплазмы обычно замедляется, а затем полностью останавливается. Ускорение движения цитоплазмы под влиянием

ем химических веществ называется *хемодиназом*. Хемодиназ возникает при действии минимальных физиологических концентраций метаболитов растительных клеток, гормонов, некоторых аминокислот. Поэтому скорость движения цитоплазмы может регулироваться продуктами метаболизма клетки.

К числу веществ, тормозящих движение цитоплазмы, относится 2,4-динитрофенол (ДНФ). Он является разобщителем дыхания и фосфорилирования и способен влиять на циклоз в концентрациях 10^{-4} М– 10^{-3} М. Но действие ДНФ на цитоплазму обратимо, и при удалении реагента скорость движения цитоплазмы постепенно восстанавливается.

Движение цитоплазмы осуществляется благодаря структурным элементам *цитоскелета* – микротрубочкам и микрофиламентам. *Микротрубочки* – это полые цилиндрические органеллы диаметром 20–25 нм и длиной до нескольких микрометров. Стенки микротрубочек состоят из цепочек глобулярного белка *тубулина*, свернутых спирально. *Микрофиламенты* представляют собой тонкие (5–7 нм), спирально закрученные нити из глобулярного белка *актина*, сходного по молекулярной массе с актином мышц животных и близкого ему по аминокислотному составу. Под влиянием различных факторов микротрубочки и микрофиламенты могут быстро распадаться на отдельные компоненты (деполимеризоваться) и вновь собираются воедино (полимеризоваться), что вызывает переход цитоплазмы из состояния *геля* (вязкого коллоидного раствора) в *золь* (невязкий коллоидный раствор) и обратно. Предполагают, что такие фазовые переходы участков цитоплазмы, а также скольжение одного структурного элемента цитоскелета по другому, которое происходит за счет взаимодействия их белков, и лежат в основе движения цитоплазмы. Источником энергии для движения являются молекулы АТФ.

Самыми удобными объектами для изучения природы, механизма и интенсивности циклоза являются клетки водных растений с ротационной формой движения цитоплазмы. О движении цитоплазмы в этих клетках можно судить по перемещению отдельных крупных органоидов, например, хлоропластов, которые используют цитоплазматический поток для того, чтобы оптимально расположиться в клетке и получить максимальное количество световой энергии для осуществления фотосинтеза: при слабом освещении хлоропласты располагаются

у физически нижних и верхних клеточных стенок, где можно адсорбировать больше света, при сильном освещении они отходят к боковым стенкам. Скорость движения хлоропластов легко измерить с помощью секундомера и окуляр-микрометра. Зная скорость движения хлоропластов, можно судить и о скорости движения цитоплазмы в клетке.

Цель работы: по движению хлоропластов оценить влияние различных факторов (света, температуры, АТФ, ДНФ) на скорость движения цитоплазмы.

Объекты исследования: элодея канадская (*Eloдея canadensis* Michx.), валлиснерия спиральная (*Vallisneria spiralis* L.).

Оборудование и реактивы: микроскоп, окуляр-микрометр, объект-микрометр, секундомер, калькулятор, электроплитка, лампа для подсвечивания растений, водяная баня, термометр для воды, предметные и покровные стекла, стакан с аквариумной водой, медицинская пипетка, пинцет, препаровальная игла, лезвие безопасной бритвы, фильтровальная бумага, простой и цветные карандаши, $5 \cdot 10^{-3}$ М раствор АТФ в капельнице, $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор 2,4-динитрофенола (ДНФ)¹² в капельнице.

Ход работы: недалеко от верхушечной почки стебля отделяют лист у элодеи или отрезают лезвием безопасной бритвы кусочек листа у валлиснерии, кладут на предметное стекло в каплю воды, взятой из сосуда, в котором находились растения, и накрывают покровным стеклом. Клетки листа рассматривают под микроскопом сначала при малом, затем при большом увеличении. Выбирают наиболее хорошо просматриваемый участок листа рядом со средней жилкой. Обрывание (отрезание) листа вызывает движение цитоплазмы в клетках, которое можно наблюдать по перемещению всех хлоропластов в одном направлении вдоль клеточной стенки. Если спустя 10 минут движение цитоплазмы не появилось, то препарат, не снимая со столика микроскопа, выдерживают несколько минут при искусственном освещении. При этом лампа должна быть удалена от растения на расстояние 20–30 см для исключения перегрева клеток. В тетради зарисовывают

¹² Для приготовления $5 \cdot 10^{-4}$ М водного раствора 2,4-динитрофенола необходимо растворить 9 мг динитрофенола в 100 мл дистиллированной воды. При работе с ДНФ следует соблюдать осторожность, так как вещество ядовито и сильно раздражает кожу и слизистые оболочки.

клетки листа. Указывают клеточную стенку, гиалоплазму, хлоропласты и направление движения цитоплазмы. Отмечают, наблюдалось ли движение цитоплазмы сразу после приготовления препарата, или оно появилось под действием освещения.

Определяют скорость движения хлоропластов в клетках листа при комнатной температуре. Для этого совмещают шкалу окуляр-микрометра с направлением движения хлоропластов в одной из клеток. Включив секундомер, отмечают время (t) в секундах, необходимое для прохождения каким-то одним хлоропластом расстояния в десять делений окуляр-микрометра. Полученное значение заносят в табл. 1.4. Такие измерения проводят для десяти хлоропластов в десяти клетках, а затем рассчитывают среднее время (\bar{t}), значение которого также заносят в таблицу.

Таблица 1.4. Скорость движения хлоропластов в клетках листа элодеи и канадской (валлиснерии спиральной)

Вариант	Время прохождения хлоропластом десяти делений окуляр-микрометра (t), с										Среднее время (\bar{t}), с	Расстояние, пройденное хлоропластами (S), мкм	Скорость движения хлоропластов (V), мкм/с
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
H ₂ O комнатной температуры													
H ₂ O 37...40 °C													
5 · 10 ⁻³ М раствор АТФ													
5 · 10 ⁻⁴ М раствор ДНФ													

Для того чтобы установить расстояние в микрометрах (мкм), которое проходят хлоропласты в клетке, и затем рассчитать скорость движения хлоропластов, необходимо определить цену деления окуляр-микрометра. Препарат снимают с предметного столика микроскопа и,

не меняя объектива, на столик помещают объект-микрометр. Длина шкалы объект-микрометра составляет 1 мм, шкала имеет 100 делений, величина (цена) одного деления указана в виде маркировки на пластине объект-микрометра (обычно она составляет 0,01 мм, или 10 мкм). Вращением окуляра совмещают направление шкалы объект-микрометра с направлением шкалы окуляр-микрометра. Совмещают также нулевые точки обеих шкал. Определяют, сколько делений шкалы окуляр-микрометра приходится на какое-то определенное, возможно большее, число делений объект-микрометра. Цену деления окуляр-микрометра (L) рассчитывают по формуле:

$$L = (N \cdot k) / n ,$$

где N – число делений объект-микрометра; k – цена деления объект-микрометра (см. маркировку на объект-микрометре), мкм; n – число делений окуляр-микрометра, совпадающих с числом делений объект-микрометра¹³.

Зная цену деления окуляр-микрометра, вычисляют расстояние, которое проходят органоиды в клетке (S):

$$S = 10 \cdot L ,$$

где 10 – количество делений окуляр-микрометра, которое проходят хлоропласты в клетке; L – цена деления окуляр-микрометра, мкм.

Имеющиеся данные [путь (S), который проходят хлоропласты в клетке, и среднее время (t), требуемое хлоропластам для прохождения этого пути] позволяют рассчитать скорости движения хлоропластов и цитоплазмы в целом (V):

$$V = S / \bar{t} .$$

Результат заносят в табл. 1.4.

¹³ Например, 40 делений окуляр-микрометра точно совпадают с 9 делениями объект-микрометра. Цена деления объект-микрометра равна 0,01 мм, или 10 мкм. Тогда цена одного деления окуляр-микрометра составит: $L = (9 \cdot 10 \text{ мкм}) / 40 = 2,25 \text{ мкм} \approx 2,3 \text{ мкм}$.

Цена деления окуляр-микрометра зависит от комбинации окуляра и объектива, а также от длины тубуса микроскопа. Поэтому она определяется для каждого сочетания окуляра и объектива, применяемого для измерения. При работе на одном микроскопе можно один раз определить цену деления окуляр-микрометра при различных комбинациях окуляров и объективов и использовать полученные величины при последующих измерениях.

Если возможность воспользоваться окуляр-микрометром и объект-микрометром отсутствует, то измеряют время в секундах, которое затрачивают хлоропласты на движение вдоль длинной стороны клетки. Расстояние, которое проходят хлоропласты, оценивают приблизительно в долях от диаметра поля зрения. Диаметр поля зрения при объективе $\times 40$ с окуляром $\times 15$ составляет 200 мкм, с окуляром $\times K15$ – 270 мкм, с окуляром $\times K7$ – 900 мкм. На основании проведенных измерений рассчитывают среднее время и среднее расстояние, которое проходят хлоропласты в клетках листа, а затем определяют среднюю скорость их движения. Результаты заносят в табл. 1.5.

Таблица 1.5. Скорость движения хлоропластов в клетках листа элодеи канадской (валлиснерии спиральной)

Вариант	Среднее время, затрачиваемое хлоропластами на движение, с	Среднее расстояние, пройденное хлоропластами в клетках, мкм	Средняя скорость движения хлоропластов в клетках, мкм/с
H ₂ O комнатной температуры			
H ₂ O 37...40°C			
$5 \cdot 10^{-3}$ М раствор АТФ			
$5 \cdot 10^{-4}$ М раствор ДНФ			

На следующем этапе веточку элодеи (растение валлиснерии) опускают в стакан с водой, температура которой составляет 37...40 °С, и оставляют там на 20 минут. Температуру в стакане поддерживают при помощи водяной бани и контролируют термометром. Затем отделяют лист и, положив его на предметное стекло в каплю воды, быстро определяют скорость движения цитоплазмы как описано выше. Результаты заносят в табл. 1.4 или 1.5.

Оценивают влияние АТФ на скорость движения цитоплазмы. Для этого каплю раствора АТФ наносят с одной стороны покровного стекла и одновременно оттягивают фильтровальной бумагой воду из-под стекла с другой стороны. Через 10 минут определяют скорость движения цитоплазмы. Подобный опыт проводят и с раствором ДНФ. Результаты заносят в табл. 1.4 или 1.5.

На основании проведенных исследований делают вывод о влиянии различных факторов (света, температуры, АТФ, ДНФ) на скорость движения цитоплазмы.

Контрольные вопросы

1. Каково биологическое значение движения цитоплазмы?
2. Какие типы циклоза существуют в клетках растений?
3. Какое движение цитоплазмы называют первичным, а какое – вторичным?
4. Что такое фотодинез, термодинез и хемодинез?
5. Какие органоиды обеспечивают движение цитоплазмы?

Раздел 2. ВОДНЫЙ ОБМЕН

Вода является основным компонентом растений, составляя в среднем 80–90 % его массы. В этой связи наличие или отсутствие достаточного количества воды часто служит единственным фактором, определяющим распространение растений на поверхности нашей планеты, темпы их роста, внешнее и внутреннее строение.

Содержащаяся в растениях вода выполняет ряд важных функций: она объединяет все клетки и ткани растительного организма в единое целое, является основным растворителем и активным метаболитом многих биохимических процессов, обеспечивает транспорт веществ по растению. Вода участвует в построении и упорядочении мембранных структур, гидратирует белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды. Защищает растительные ткани от резких колебаний температуры. Благодаря явлению осмоса и тургорному давлению, она обеспечивает упругое состояние клеток и тканей, с чем связано поддержание формы растений и ориентация органов в пространстве.

Водный обмен растений складывается из нескольких процессов: поглощения воды, передвижения ее по растению, усвоения и выделения в окружающую среду. Изучение водного обмена важно для решения практических задач земледелия, в частности, для регуляции урожайности возделываемых сельскохозяйственных культур.

Работа 6

Наблюдение за движением устьиц под микроскопом

Вводные пояснения. Основная часть воды испаряется растением через устьица. *Устьица* – это отверстия в эпидерме, ограниченные двумя специализированными эпидермальными клетками, которые называются *замыкающими*. Вокруг замыкающих клеток расположены *побочные (сопровождающие, или примыкающие) клетки*, которые наряду с замыкающими клетками принимают непосредственное участие в открывании и закрывании устьиц.

Устьица расположены в эпидерме всех надземных и надводных органов растений, но больше всего их на листьях. На листьях устьица могут располагаться или только на нижней стороне (у древесных растений), или на обеих сторонах (у травянистых растений), причем у большинства видов на верхней стороне устьиц меньше, чем на нижней. У растений с плавающими на поверхности воды листьями устьица формируются только на верхней стороне листа. У подводных листьев устьица отсутствуют.

Количество устьиц на листе определяется видовыми особенностями растений и изменяется в зависимости от возраста и условий окружающей среды, составляя 10–600 штук на 1 мм². Длина устьиц 20–30 мкм, ширина – 4–6 мкм. Но даже при таких малых размерах (суммарно устьица занимают 1–2 % от площади листа) испарение воды через устьица может достигать 50–70 % от испарения с равной по величине водной поверхности.

Движение устьиц обусловлено особенностями строения замыкающих клеток (рис. 2.1).

У двудольных растений замыкающие клетки имеют бобовидную форму (рис. 2.1 а). Отличительной особенностью их строения является значительное утолщение клеточных стенок, граничащих с устьищем. Если воды в замыкающих клетках много, то протопласт давит на клеточные стенки, и более тонкие стенки, растягиваясь сильнее, увлекают за собой утолщенные стенки. В результате между замыкающими клетками появляется щель. В случае потери воды стенки замыкающих клеток выпрямляются, и устьице закрывается.

У однодольных растений замыкающие клетки имеют гантелевидную форму: они сужены в средней части и расширены на концах, при-

чем расширенные участки клеток имеют более тонкие клеточные стенки, чем средние части (рис. 2.1 б). При насыщении влагой тонкие стенки растягиваются, раздвигая замыкающие клетки, устьице открывается.

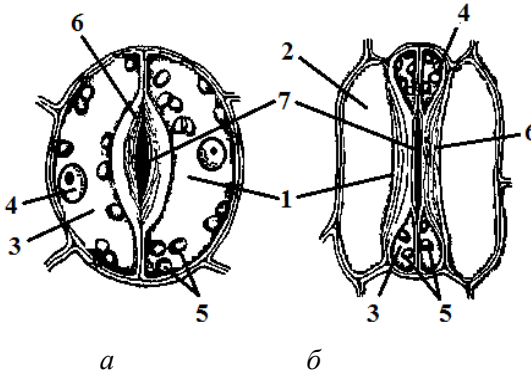


Рис. 2.1. Строение замыкающих клеток у двудольных (а) и однодольных (б) растений: 1 – замыкающая клетка; 2 – побочная клетка; 3 – гиалоплазма; 4 – ядро с ядрышком; 5 – хлоропласты; 6 – утолщение клеточной стенки; 7 – устьице

Таким образом, состояние устьица зависит от количества воды в замыкающих клетках. Устьице открывается, если в замыкающие клетки поступает вода и растет тургорное давление. Если из замыкающих клеток вода уходит, то тургорное давление в них уменьшается, и устьице закрывается.

Существует несколько механизмов, влияющих на изменение тургора замыкающих клеток. Первый из них связан с работой *калиевых насосов*, обеспечивающих перераспределение ионов K^+ между замыкающими и побочными клеткам. Это происходит следующим образом. При изменении внешних или внутренних условий на плазмалемме замыкающих клеток начинает работать H^+ -АТФаза¹⁴, которая вы-

¹⁴ H^+ -АТФаза – это фермент, гидролизующий молекулы АТФ и использующий высвобождающуюся при этом энергию для переноса ионов водорода. На 1 мкм^2 плазмалеммы приходится 10^4 молекул H^+ -АТФазы, каждая из которых за 1 секунду переносит от 10^5 до 10^6 протонов. Как правило, отношение количества перенесенных протонов к количеству гидролизующихся молекул АТФ равно единице. Выкачивая протоны, H^+ -АТФаза поддерживает рН цитоплазмы близкий к нейтральному. Помимо этого, H^+ -АТФаза обеспечивает энергией работу разнообразных белковых систем, находя-

качивает протоны H^+ из замыкающих клеток в побочные (источником протонов могут служить органические кислоты клеточного сока). Вместо протонов в цитоплазму, а затем и в вакуоль замыкающих клеток поступают ионы K^{+15} . Растущая в замыкающих клетках сосущая сила вызывает поступление в них воды, и устьица постепенно открываются. Основным поставщиком молекул АТФ для этого процесса является *дыхание*.

При выделении ионов K^+ из замыкающих клеток в побочные, сосущая сила в побочных клетках возрастает и, наконец, становится больше, чем в замыкающих клетках. Тогда вода из замыкающих клеток выходит в побочные клетки, и устьица закрываются.

Второй механизм (*осмотический*), влияющий на изменение тургора замыкающих клеток, обусловлен превращением крахмала в сахар на свету:

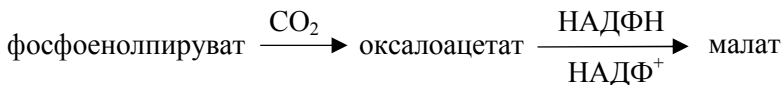


где Φ_n – фосфор неорганический. Реакция катализируется *крахмал-фосфорилазой* – ферментом, который в достаточном количестве присутствует в листьях. При увеличении концентрации глюкозо-1-фосфата в клеточном соке осмотическое давление и сосущая сила в замыкающих клетках растут, вызывая поступление в них воды и открывание устьиц. В случае обратного процесса, который происходит в темноте, вода из замыкающих клеток выходит, устьица закрываются. Следует отметить, что крахмал-фосфорилаза активируется при увеличении рН в замыкающих клетках, что возможно при откачивании из них протонов. А значит, первый и второй механизмы связаны между собой и могут быть задействованы одновременно.

Увеличение рН может активировать еще один фермент – *фосфоенолпируват-карбоксилазу* (*ФЕП-карбоксилазу*). Он катализирует карбоксилирование фосфоенолпирувата (ФЕП, является продуктом *гликолиза*) и запускает механизм образования малата (соли яблочной кислоты) в процессе *фотосинтеза*:

щихся на мембране, с помощью которых клетка поглощает или удаляет различные вещества (ионы, углеводы, аминокислоты и др.).

¹⁵ Иногда протоны не выходят из замыкающих клеток, тогда вслед за калием в эти клетки поступают ионы хлора.



Накопление малата в вакуолях также повышает осмотическое давление замыкающих клеток и ведет к поступлению в них воды. Такой механизм встречается, например, у *суккулентов* – многолетних сочных растений с сильно развитой водозапасающей паренхимой, обитающих в условиях сухого климата.

Закрывание устьиц происходит в результате обратного хода процессов превращения малата в ФЭП. В дальнейшем ФЭП может быть использован растением для синтеза крахмала.

Помимо ранее указанных, выделяют *фотосинтетический механизм устьичных движений*. Благодаря этому механизму устьица открываются на свету и закрываются в темноте. В замыкающих клетках устьиц содержатся хлоропласты, которые отсутствуют в остальных эпидермальных клетках. Поэтому на свету в замыкающих клетках начинается фотосинтез. В результате фотосинтеза содержащийся в замыкающих клетках CO_2 постепенно ассимилируется, что приводит к повышению pH внутриклеточной среды. Зашелачивание активирует работу ферментов (крахмал-фосфорилазы, ФЭП-карбоксилазы), при участии которых в клетке повышается содержание осмотически активных веществ, и устьица открываются. И напротив, в темноте концентрация CO_2 повышается (вследствие того, что CO_2 выделяется при дыхании и не используется в процессе фотосинтеза), внутриклеточная среда закисляется, активность ферментных систем подавляется, и устьица закрываются. Молекулы АТФ, образовавшиеся в замыкающих клетках в процессе фотосинтеза, используются для работы H^+ -АТФазы, а значит, они усиливают поступление ионов K^+ в замыкающие клетки и способствуют тому, чтобы устьица открылась.

Движение устьица зависит не только от содержания воды в замыкающих клетках, но также от ее содержания в побочных клетках эпидермы и в сопредельных клетках мезофилла. Если в побочных клетках и в клетках мезофилла много воды (в дождливую погоду или после обильного полива растения), то они механически сдавливают замыкающие клетки и не дают устьицу открыться. В засушливый период эти клетки теряют воду, их давление на замыкающие клетки уменьша-

ется, в результате чего устьичная щель открывается. Такой механизм называется *гидродинамическим*. Но устьице остается открытым недолго, так как замыкающие клетки также теряют воду.

Цели работы: изучить строение устьиц. Пронаблюдать за движением устьиц в воде и в растворе глицерина.

Объекты исследования: свежие листья традесканции бледной [*Tradescancia pallida* (Rose) D.R. Hunt], пеларгонии (*Pelargonium* sp.), десятидневных проростков кукурузы обыкновенной (*Zea mays* L.), овса посевного (*Avena sativa* L.) или других растений.

Оборудование и реактивы: микроскоп, лезвие безопасной бритвы, пинцет, препаровальная игла, предметные и покровные стекла, полоски фильтровальной бумаги, простой карандаш, 5 % раствор глицерина в капельнице, дистиллированная вода в капельнице.

Ход работы: перед началом работы растения хорошо поливают и выдерживают на свету в течение 1,5–2 часов, чтобы вызвать открывание устьиц.

Лезвием безопасной бритвы с нижней стороны листа срезают эпидермис¹⁶, помещают его на предметное стекло в каплю воды и накрывают покровным стеклом. При малом и большом увеличении микроскопа рассматривают и зарисовывают в тетрадь *устьичный комплекс* (замыкающие и побочные клетки). В замыкающих клетках отмечают ядро с ядрышком, хлоропласты, гиалоплазму. Обращают внимание на неравномерное утолщение стенок замыкающих клеток.

Находящуюся на предметном стекле дистиллированную воду заменяют на 5 % раствор глицерина: с одной стороны покровного стекла наносят каплю глицерина, а с другой – оттягивают воду фильтровальной бумагой. Для наиболее полной замены жидкостей манипуляцию повторяют 2–3 раза, после чего незамедлительно переходят к микроскопированию препарата. Наблюдают плазмолиз как в замыкающих клетках устьиц, так и в остальных клетках эпидермиса. Небольшой

¹⁶ Можно воспользоваться еще одним способом изготовления препарата эпидермиса. Для этого лист растения оборачивают вокруг указательного пальца левой руки так, чтобы его нижняя сторона была обращена наружу. Правой рукой при помощи препаровальной иглы надрывают эпидермис над средней жилкой в средней части листа и очень медленно пинцетом снимают его кусочек. При этом невольно захватывают и часть мезофилла листа, но обычно можно найти тонкий участок на периферии, состоящий из одного ряда клеток эпидермиса.

участок препарата с закрывшимися устьицами зарисовывают в тетрадь, поясняя причину наблюдаемого явления.

Через некоторое время плазмолиз в эпидермальных клетках сменяется деплазмолизом, вследствие чего устьичная щель постепенно открывается. Увиденное зарисовывают в тетрадь, поясняя причину.

После раскрытия устьиц раствор глицерина заменяют на дистиллированную воду. В воде устьица раскрываются еще шире, чем до начала наблюдения. Препарат эпидермиса зарисовывают в тетрадь и также поясняют суть этого процесса. По результатам проведенной работы делают выводы о влиянии воды и раствора глицерина на устьичные движения.

Контрольные вопросы

1. Что такое «устьичный комплекс» и каковы отличия в расположении устьиц на листовой поверхности у травянистых и древесных растений?

2. Каковы особенности строения замыкающих клеток у однодольных и двудольных растений?

3. Перечислите механизмы, влияющие на изменение тургора замыкающих клеток? Объясните работу каждого из механизмов.

4. Каким образом движение устьиц зависит от содержания воды в побочных клетках эпидермы и в клетках мезофилла?

Работа 7

Определение степени открытия устьиц методом инфильтрации (по Г. Молишу)

Вводные пояснения. На движение устьиц влияют внешние факторы (вода, свет, температура, химический состав почв) и внутренние факторы (содержание воды в тканях растения, концентрация углекислого газа в межклетниках и в замыкающих клетках, фитогормоны).

Вода является главным фактором, регулирующим устьичные движения, так как ширина устьичной щели зависит от тургорного давления в замыкающих клетках: чем выше тургорное давление в замыкающих клетках, тем шире открыто устьице.

Свет влияет на движение устьиц опосредованно, через участие в процессе фотосинтеза. Благодаря хлоропластам на свету в замыкающих клетках протекает фотосинтез. Образующиеся в процессе фотосинтеза молекулы АТФ используются для закачки ионов калия через калиевые каналы в замыкающие клетки.

Свет косвенно влияет и на превращение крахмала в глюкозо-1-фосфат в замыкающих клетках устьиц: вследствие фотосинтеза концентрация CO_2 в замыкающих клетках понижается, рН внутриклеточной среды растет, вызывая повышение активности крахмалфосфорилазы, катализирующей процесс расщепления крахмала. Поэтому на свету в условиях хорошего водоснабжения устьица открываются тем шире, чем больше освещенность.

Движение замыкающих клеток зависит и от температуры окружающей среды. Показано, что при температуре ниже 0°C устьица не открываются. При температуре от 0 до $+5^\circ\text{C}$ они открываются медленно и не полностью. Закрывание устьиц вызывает температура выше $+30^\circ\text{C}$ (вследствие увеличения интенсивности дыхания и повышения концентрации CO_2). При температурах оптимальных для фотосинтеза ($20\text{--}25^\circ\text{C}$ для растений умеренных широт) замыкающие клетки содержат мало CO_2 , и устьица открыты.

Важное значение для работы устьичного аппарата растения имеет достаточное содержание калия в корнеобитаемом слое почвы. При внесении этого химического элемента в почву в замыкающих клетках наблюдается распад крахмала до сахара, и устьица открываются.

Следовательно, недостаток воды, слабая освещенность и высокая температура вызывают снижение интенсивности фотосинтеза, повышение интенсивности дыхания, накопление CO_2 в замыкающих клетках и закрывание устьиц. Напротив, высокая влажность воздуха и корнеобитаемого слоя почвы, хорошее освещение, оптимальные температуры, достаточное содержание в почве калия приводят к открыванию устьиц. В целом, благодаря тому, что на растение одновременно действует целый комплекс факторов, устьица у него, как правило, среднеоткрытые.

Из внутренних факторов следует отметить влияние на регуляцию устьичных движений фитогормонов – *абсцизовой кислоты*, *цитокининов*, *гибберелинов*. Абсцизовая кислота вызывает быстрое закрывание устьиц, цитокинины и гибберелины – их открывание.

Влияние концентрации CO_2 на степень открытия устьиц хорошо прослеживается у суккулентов. В ночное время в листьях этих растений происходит карбоксилирование фосфоенолпирувата и образование малата, вследствие чего концентрация CO_2 в замыкающих клетках понижается, и устьица открываются. Днем наблюдается обратный процесс – декарбоксилирования малата, следствием которого является закрывание устьиц.

Определить состояние устьиц растения можно не только при помощи микроскопа. Простым и легко применимым даже в полевых условиях является *метод инфильтрации*, предложенный австрийским физиологом растений Гансом Мблишем (1856–1937). Метод инфильтрации основан на способности органических жидкостей, обладающих различной вязкостью, смачивать клеточные стенки и по-разному проникать через устьица в ближайшие межклетники, вытесняя из них воздух. И если в обычном состоянии лист кажется матовым (благодаря тому, что межклетники заполнены воздухом), то при инфильтрации, то есть заполнении межклетников жидкостью, соответствующие участки листа выглядят более темными в отраженном свете и прозрачными в проходящем свете. Жидкость, не проникающая через устьица, испаряется и никаких следов на листе не оставляет.

Г. Молиш подобрал жидкости, которые по-разному проникают в устьичные щели: спирт проходит только через широко открытые устьица, бензол – в среднеоткрытые, ксилол – в слабооткрытые.

Цель работы: определить степень открытия устьиц листа на основании проникновения в его межклетники ксилола, бензола и спирта.

Объект исследования: свежие листья традесканции (*Tradescantia* sp.), пеларгонии (*Pelargonium* sp.) или других растений.

Оборудование и реактивы: стеклянная палочка, стакан с водой, фильтровальная бумага или салфетка, ксилол, бензол, этиловый спирт.

Ход работы: в работе используют хорошо увлажненные и подвядшие растения, а также растения, выдержанные на свету и в темноте в течение 1,5–2 часов.

На соседние участки нижней стороны листа наносят с помощью стеклянной палочки небольшие капельки ксилола, бензола и спирта (палочку споласкивают водой и вытирают фильтровальной бумагой или салфеткой после каждой жидкости). Лист выдерживают в горизонтальном положении до полного исчезновения капель, а затем рас-

смазывают в отраженном и проходящем свете. Если капля жидкости исчезла, но цвет листа не изменился, значит, жидкость испарилась. Изменение окраски листа на месте нанесения капли реактива свидетельствует об инфильтрации жидкости. Результаты исследования заносят в табл. 2.1, обозначая проникновение жидкости знаком «+», отсутствие проникновения – знаком «-».

Таблица 2.1. Определение степени открытия устьиц листа методом инфильтрации

Название растения	Состояние растения	Проникновение жидкостей			Степень открытия устьиц
		спирт	бензол	ксилол	

Делают вывод о влиянии внешних условий на степень открытия устьиц, исходя из того, что при инфильтрации только ксилота устьица открыты слабо, ксилота и бензола – средне, ксилота, бензола и спирта – открыты сильно. При закрытых устьицах инфильтрации жидкостей нет.

Контрольные вопросы

1. Какие внешние и внутренние факторы влияют на степень открытия устьиц?
2. На чем основано определение состояния устьиц методом инфильтрации?

Работа 8

Определение интенсивности транспирации методом быстрого взвешивания (по Л.А. Иванову)

Вводные пояснения. *Транспирация* (от лат. “*trans*” – сквозь и “*spiro*” – дышу) – это процесс испарения воды надземной частью растения. Он происходит лишь тогда, когда воздух, окружающий побеги, не насыщен водой. Транспирация играет важную роль в жизни растения: она регулирует температуру надземных органов, помогает подниматься воде с растворенными в ней минеральными и органическими веществами вверх по растению, поддерживает нормальный газообмен. Главным органом транспирации является лист.

Транспирация может быть охарактеризована с помощью ряда показателей, одним из которых является интенсивность транспирации. Под *интенсивностью*, или *скоростью транспирации* понимают количество воды в граммах, испаренное растением за 1 час с 1 м² его поверхности. Интенсивность транспирации зависит от освещенности, влажности воздуха и почвы, температуры, условий минерального питания, а также ряда других факторов. Интенсивность транспирации изменяется в пределах 15–250 г воды / м² · час днем и 1–20 г воды / м² · час ночью.

Несмотря на то, что транспирация – это испарение воды, она идет медленнее, чем испарение со свободной водной поверхности такой же площади. Это доказывает величина относительной транспирации. *Относительная транспирация* – это отношение интенсивности транспирации к *интенсивности эвапорации* (испарению со свободной водной поверхности) при одинаковых условиях. Величина относительной транспирации обычно составляет 0,1–0,5, но иногда поднимается до 1,0 и опускается у некоторых хорошо защищенных от потери воды листьев до 0,01. Следовательно, транспирация представляет собой процесс, который регулируется самим растением.

Определить интенсивность транспирации позволяет простой и достаточно точный *метод быстрого взвешивания*, предложенный Л.А. Ивановым. Данный метод основан на учете изменений массы транспирирующего органа за короткие промежутки времени (до 5 минут). Это дает возможность наблюдать транспирацию при том состоянии насыщения органа водой, при котором он находился на растении.

Цель работы: определить интенсивность транспирации листьев растений и относительную транспирацию методом быстрого взвешивания.

Объекты исследования: комнатные растения (традесканция – *Tradescantia* sp., пеларгония – *Pelargonium* sp. и др.).

Оборудование и реактивы: весы торсионные (или весы электронные с точностью до третьего знака после запятой), весы технические, секундомер (часы), калькулятор, ножницы, пинцет, спиртовка, спички, чашка Петри, линейка, писчая бумага, карандаш простой остро отточенный, парафин в фарфоровой чашечке, стакан с водой комнатной температуры.

Ход работы: перед началом работы проверяют горизонтальность установки торсионных весов и проводят их калибровку. Торсионные весы представляют собой круглый металлический корпус на штативе с циферблатом под стеклом (рис. 2.2). Они предназначены для быстрого и точного взвешивания малых масс (от 1 до 500 мг).

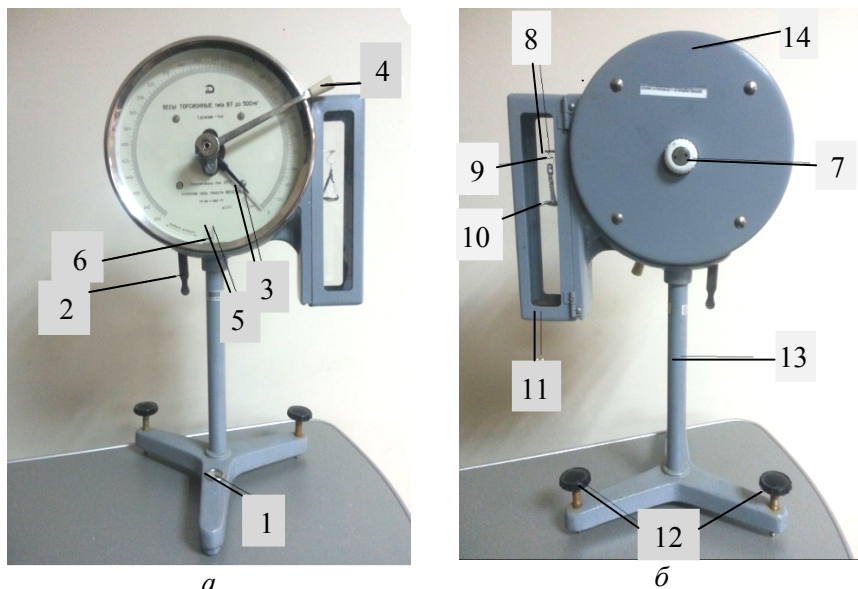


Рис. 2.2. Торсионные весы:

а – вид спереди; *б* – вид сзади;

- 1 – уровень; 2 – арретир; 3 – указатель; 4 – рычаг; 5 – контрольная стрелка;
 6 – линия равновесия; 7 – винт; 8 – грузовой рычаг; 9 – крючок; 10 – чашечка;
 11 – футлярчик; 12 – регулировочный винт; 13 – штатив; 14 – корпус

Горизонтальность установки торсионных весов на поверхности проверяют с помощью пузырькового уровня (1). При необходимости весы регулируют с помощью винтов (12). Затем весы калибруют. Для этого к весам вместо чашечки (6) осторожно с помощью пинцета подвешивают на крючок (9) калибровочную гирию на 500 мг. Дверцу футлярчика (11) закрывают, чтобы исключить воздействие факторов окружающей среды на взвешивание. Перемещают в крайнее правое положение арретир (2), освобождая коромысло весов, и с помощью рычага (4) сдвигают указатель (3) до установления состояния равнове-

сия. Весы находятся в состоянии равновесия тогда, когда контрольная стрелка (5) совпадает с линией равновесия (6) на шкале прибора. Если контрольная стрелка не совпадает с линией равновесия, то ее приводят к этому положению с помощью винта (7). После этого весы арретируют (выключают), перемещая рычаг (2) влево. Для установления массы груза используют подвешенную на крючок (9) чашечку (10).

После установки и калибровки торсионных весов приступают к изучению интенсивности транспирации. В работе используют растения одного или разных видов (хорошо увлажненные и подвядающие, выдержанные на свету и в темноте в течение 1,5–2 часов).

Небольшой лист срезают ножницами с небольшим отрезком черешка, и без промедления обмакивают место среза в расплавленный парафин. Это необходимо для того, чтобы смягчить или полностью ликвидировать резкое повышение интенсивности транспирации: расплавленный парафин быстро проникает в сосуды листа и, застывая, обеспечивает сопротивление движению водного тока.

После запаивания парафином лист сразу же взвешивают на торсионных весах. Приступая к взвешиванию, открывают футлярчик (11), помещают на чашечку (10) лист и закрывают футлярчик. Следует обратить внимание на то, чтобы лист не касался внутренних стенок футлярчика. Перемещают в крайнее правое положение арретир (2) и медленно передвигают рычаг (4), пока контрольная стрелка (5) не совпадет с линией равновесия (6). В этом положении стрелка (3) укажет исходную массу листа в мг. Полученное значение выражают в граммах и заносят в табл. 2.2.

Таблица 2.2. Интенсивность транспирации листьев растений и относительная транспирация, установленные методом быстрого взвешивания

Объект исследования	Экспозиция, мин.	Масса, г			Площадь, см ²	$I_T (I_E)$, г / м ² · час	R_T
		исходная	конечная	потеря массы			
<i>Tradescantia</i> sp.							
<i>Pelargonium</i> sp.							
Чашка Петри с водой							

После взвешивания весы выключают, передвигая арретир влево до щелчка, футлярчик полностью открывают, оставляя лист лежать на чашечке весов.

Через 5 минут (не позднее, так как может начаться завядание, снижающее транспирацию) лист повторно взвешивают. Полученное значение конечной массы заносят в таблицу. Зная исходную и конечную массу, рассчитывают потерю массы листом, которая возникает вследствие испарения воды с его поверхности за 5 минут.

Интенсивность транспирации листа (I_T) рассчитывают по формуле:

$$I_T = (n \cdot 60 \cdot 10000) / (S \cdot t) \quad (2.1),$$

где n – количество воды, испарившейся с поверхности листа, г; S – площадь листа, см^2 ; t – экспозиция, мин. (в данном случае она составляет 5 минут); 60 – коэффициент перевода минут в часы; 10000 – коэффициент перевода см^2 в м^2 .

Площадь листа (S) в формуле (1) определяют весовым методом. Лист накладывают на бумагу (можно взять тетрадный лист в клетку), обводят карандашом по контуру, вырезают ножницами бумажную проекцию листа и взвешивают ее. Затем из той же бумаги вырезают квадрат известной площади (например, 100 см^2 , то есть $10 \cdot 10 \text{ см}$) и также взвешивают. Площадь листа вычисляют по формуле:

$$S = (a \cdot b) / c \quad (2.2),$$

где S – площадь листа, см^2 ; a – масса проекции листа, г; b – площадь квадрата из бумаги, см^2 ; c – масса квадрата из бумаги, г.

Чтобы убедиться в том, что транспирация не является процессом простого физического испарения воды, определяют интенсивность эвапорации (I_E) в тех же условиях, что и интенсивность транспирации. Для этого в чашку Петри наливают почти до краев воду комнатной температуры, взвешивают чашку на технических весах с точностью до 0,01 г (наружная поверхность чашки должна быть совершенно сухой) и через определенное время, например, через час, проводят повторное взвешивание. Полученные данные исходной и конечной массы чашки Петри с водой заносят в таблицу. Интенсивность эвапорации определяют по формуле (2.1), где n – количество воды, испарившейся из

чашки Петри, г; S – площадь чашки Петри, см²; t – экспозиция, мин. (в данном случае она составляет 60 минут). Площадь чашки Петри рассчитывают по формуле:

$$S = \pi \cdot r^2 \quad (2.3).$$

Далее находят относительную транспирацию (R_T) по формуле:

$$R_T = I_T / I_E \quad (2.4).$$

На основании полученных данных делают вывод о зависимости интенсивности транспирации и относительной транспирации от изучаемых факторов внешней среды (освещенности, влажности почвы и др.) и о способности растений регулировать транспирацию.

Контрольные вопросы

1. Что такое транспирация и какова ее роль в жизни растений?
2. Что понимают под интенсивностью транспирации?
3. Что такое относительная транспирация?

Работа 9

Сравнение транспирации верхней и нижней сторон листа хлоркобальтовым методом (по Шталю)

Вводные пояснения. Лист испаряет от 80 до 90 % воды через устьица. Поэтому интенсивность транспирации в значительной степени зависит от их открытия. В процессе *устьичной транспирации* вода сначала передвигается из сосудов листа в стенки клеток мезофилла, затем испаряется с поверхности стенок клеток мезофилла в межклетники, далее диффундирует по межклетникам в виде водяных паров к устьицам и, наконец, выходит через устьица в атмосферу.

Испарение воды в атмосферу из клеточных стенок эпидермы называют *кутикулярной транспирацией*. Свое название этот тип транспирации получил благодаря тому, что снаружи эпидерма покрыта кутикулой. Основными компонентами кутикулы являются кутин и воска, обладающие гидрофобными свойствами и, потому, защищающие

лист от потери воды. Очевидно, что интенсивность кутикулярной транспирации будет зависеть от возраста листа и толщины покрывающей его кутикулы. Именно поэтому у молодых листьев с тонкой кутикулой этот тип транспирации будет составлять 30–50 %, а у зрелых листьев с мощной кутикулой – не будет превышать 10 % от всей транспирации. В стареющих листьях кутикулярное испарение воды вновь возрастает из-за разрушения и растрескивания кутикулы. Следует уточнить, что при открытых устьицах перемещение водяного пара через кутикулу листа обычно незначительно. Однако, если устьица закрыты (например, во время засухи), то кутикулярная транспирация приобретает важное значение в водном обмене растения.

Хлоркобальтовый метод, предлагаемый для оценки интенсивности транспирации, основан на способности хлорида кобальта (CoCl_2) поглощать воду и превращаться в кристаллогидрат ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). При этом фильтровальная бумага, пропитанная раствором хлорида кобальта и высушенная в сушильном шкафу, на поверхности транспирирующего органа изменяет свой цвет с ярко-голубого (цвет сухого CoCl_2) на розовый (цвет $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). По скорости порозовения хлоркобальтовой бумаги, а также по изменению ее веса можно примерно судить об интенсивности транспирации надземных органов растения.

Цель работы: изучить интенсивность транспирации верхней и нижней сторон листа.

Объекты исследования: комнатные растения (традесканция – *Tradescantia* sp., пеларгония – *Pelargonium* sp. и др.).

Оборудование и реактивы: для приготовления хлоркобальтовой бумаги: сушильный шкаф, технические весы, эксикатор, стеклянный химический стакан, мерный цилиндр, стеклянная палочка, белая фильтровальная бумага или обеззоленные тонкие фильтры, шпатель, пинцет, ножницы, линейка, простой карандаш, нитрат кобальта [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2$], хлорид натрия (NaCl), хлорид кальция (CaCl_2), дистиллированная вода¹⁷. Для изучения интенсивности транспирации верхней и

¹⁷ Хлоркобальтовую бумагу готовят следующим образом. Белую фильтровальную бумагу или обеззоленные тонкие фильтры нарезают на прямоугольники размером 2 · 3 см, в течение нескольких минут выдерживают их в растворе хлорида кобальта (CoCl_2), а затем высушивают в сушильном шкафу до появления ярко-голубого цвета.

нижней сторон листа: торсионные весы (или весы электронные с точностью до третьего знака после запятой), микроскоп, секундомер (часы), калькулятор, хлоркобальтовая бумага, предметные и покровные стекла, препаровальная игла, лезвие безопасной бритвы, ножницы, пинцет, кусочки полиэтиленовой пленки, простой карандаш, скрепки, капельница с водой.

Ход работы: кусочки хлоркобальтовой бумаги берут пинцетом (категорически запрещается дотрагиваться пальцами до хлоркобальтовой бумаги, так как влага на пальцах может вызвать ее порозовение), помечают простым карандашом, взвешивают на торсионных весах и прикладывают к верхней и нижней стороне одного и того же листа (свежесрезанного или находящегося на растении). Снаружи хлоркобальтовую бумагу накрывают кусочком полиэтиленовой пленки, который закрепляют на поверхности листа скрепками за пределами бумаги. Величину исходной массы кусочка хлоркобальтовой бумаги заносят в табл. 2.3.

Таблица 2.3. Транспирация верхней и нижней сторон листа

Объект исследования	Сторона листа	Масса хлоркобальтовой бумаги, мг		Изменение массы хлоркобальтовой бумаги, мг / см ²	Среднее количество устьиц в поле зрения микроскопа, шт. (увеличение – __)
		исходная	конечная		
<i>Tradescantia</i> sp.	верхняя				
	нижняя				
<i>Pelargonium</i> sp.	верхняя				
	нижняя				

Через 30–45 минут хлоркобальтовую бумагу снимают пинцетом и повторно взвешивают на торсионных весах. Результат взвешивания заносят в табл. 2.3. Вычисляют изменение веса аппликаций в пересчете на 1 см².

Хлоркобальтовую бумагу хранят в эксикаторе над прокаленным хлоридом кальция (CaCl₂) или, в крайнем случае, в плотно закрытой банке. Для приготовления раствора хлорида кобальта в 100 мл воды растворяют 6,7 г нитрата кобальта [Co(NO₃)₂] и 2,6 г поваренной соли (NaCl).

С помощью лезвия безопасной бритвы готовят по 3 препарата верхнего и нижнего эпидермиса анализируемого листа. Кусочки эпидермиса (отдельно верхнего, отдельно нижнего) помещают в воду на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом, подсчитывая количество устьиц, попадающих в поле зрения микроскопа. При этом микровинтом слегка меняют фокусировку, чтобы обнаружить все устьица на просматриваемом участке. Для объективной оценки на каждом препарате эпидермиса просматривают по 3–5 полей зрения, а затем вычисляют среднее арифметическое, которое записывают в табл. 2.3.

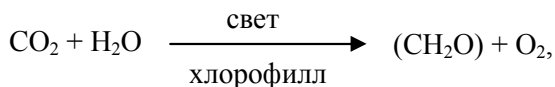
На основании проведенных исследований делают вывод об интенсивности транспирации верхней и нижней сторон листа.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается особенность хлоркобальтового метода, используемого для определения интенсивности транспирации?
2. Что понимают под устьичной и кутикулярной транспирацией? Каково соотношение между ними?

Раздел 3. ФОТОСИНТЕЗ

Фотосинтез – это процесс усвоения растениями световой энергии и использования ее для образования органических веществ из диоксида углерода и воды. Суммарное уравнение фотосинтеза для высших растений выглядит следующим образом:



где CH_2O – фрагмент молекулы углевода.

Процесс фотосинтеза условно делится на две стадии: *световую (фотохимическую)* и *темновую (химическую)*. Первая стадия включает реакции поглощения хлорофиллом и другими пигментами квантов света и последующую трансформацию световой энергии в химиче-

скую энергию связей АТФ и НАДФ · Н. В темновой стадии запасенная в форме АТФ и НАДФ · Н химическая энергия используется для восстановления захваченного диоксида углерода до углеводов и других веществ.

У высших растений фотосинтез протекает в специализированных органоидах – хлоропластах. В *тилакоидных мембранах* хлоропластов сосредоточены все фотосинтетические пигменты и ферменты, необходимые для осуществления световых реакций фотосинтеза. В *строме* содержатся ферменты, участвующие в темновых превращениях диоксида углерода. Образующиеся в хлоропластах продукты ассимиляции транспортируются в другие органы и ткани растения, где они используются или запасаются.

Фотосинтез – один из важнейших движущих факторов круговорота веществ и энергии на планете. Он способствовал формированию высокого содержания кислорода в атмосфере и озонового слоя в ее верхних слоях. Благодаря фотосинтезу обеспечивается постоянство содержания углекислого газа в атмосфере. Синтезируемые зелеными растениями органические вещества служат пищей для всех остальных гетеротрофных живых организмов – от бактерий до человека. Запасы древесины, а также органические вещества (торф, сапрпель, уголь, нефть, горючие сланцы), накопленные и модифицированные на протяжении длительного исторического периода развития нашей планеты, используются человеком для получения энергии, необходимой в быту, промышленности и сельском хозяйстве.

Работа 10

Химические свойства пигментов зеленого листа

Вводные пояснения. В хлоропластах высших растений содержатся два типа пигментов – хлорофиллы и каротиноиды.

Хлорофиллы представлены *хлорофиллом а* ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) и *хлорофиллом б* ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$), при этом содержание хлорофилла *а* в листе примерно в три раза выше, чем хлорофилла *б*. Хлорофилл *а* имеет сине-зеленый цвет, хлорофилл *б* – желто-зеленый. Основным функциональным пигментом является хлорофилл *а*: он служит донором энергии для фотосинтетических реакций, тогда как остальные

пигменты лишь передают поглощенную ими энергию хлорофиллу *a*. Таким образом, без хлорофилла *a* фотосинтез не идет.

Хлорофиллы – это сложные эфиры дикарбоновой кислоты хлорофиллина ($C_{34}H_{32}O_5N_4Mg$), у которой одна карбоксильная группа (–COOH) этерифицирована остатком спирта метанола (CH_3OH), а вторая – остатком спирта фитола ($C_{20}H_{39}OH$) (рис. 3.1).

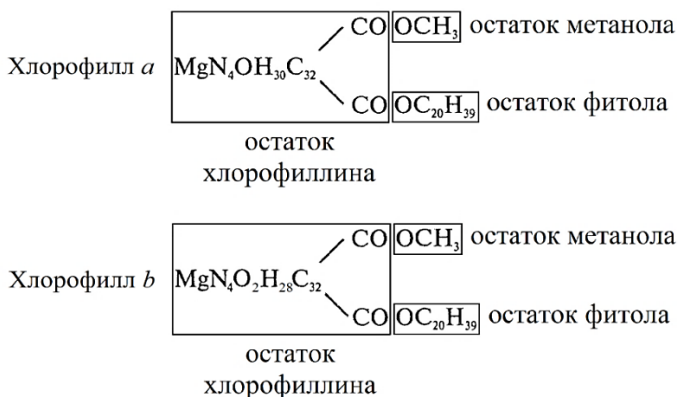


Рис. 3.1. Строение молекул хлорофиллов *a* и *b*

Молекула хлорофилла состоит из двух частей: порфиринового ядра и фитольного хвоста (рис. 3.2). Порфириновое ядро образовано четырьмя пиррольными кольцами (I, II, III, IV), связанными между собой метиновыми мостиками (–CH=). Поэтому хлорофилл относят к классу циклических тетрапирролов. В центре ядра расположен атом магния, который соединен с атомами азота пиррольных колец двумя координационными связями. Атом магния определяет уникальные функции молекулы хлорофилла в фотосинтезе, связанные с поглощением, запасанием и преобразованием энергии¹⁸. Помимо четырех пир-

¹⁸ Обладая координационным числом 6, магний способен дополнительно образовывать две координационные связи с атомами кислорода и азота. Благодаря этому свойству молекулы хлорофилла могут создавать комплексы с молекулами других пигментов, с белками, липидами и иными компонентами хлоропласта. В результате образуется целая серия спектральных форм хлорофилла, выполняющих различные функции: более коротковолновые формы (661, 670, 678 нм) участвуют главным образом в процессах поглощения энергии, более длинноволновые формы (683 нм) – в про-

рольных колец, в порфириновое ядро входит цикlopentanовое кольцо (V) с высокоактивной кетогруппой ($>C=O$). Предполагают, что кетогруппа участвует в окислении воды, происходящем в световую фазу фотосинтеза.

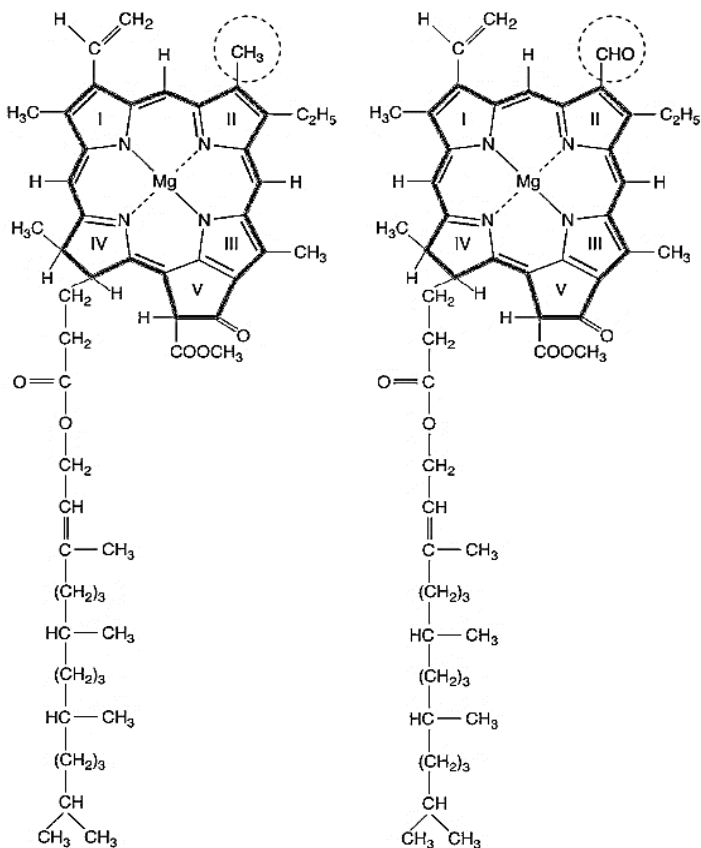


Рис. 3.2. Структурные формулы молекул хлорофилла *a* и хлорофилла *b*

Молекула хлорофилла *a* отличается от молекулы хлорофилла *b* только тем, что у нее к третьему атому углерода во втором пирроль-

цессах ее миграции, а пигменты реакционных центров (P_{680} , P_{700}) – в процессах преобразования энергии.

ном кольце присоединена метильная группа ($-\text{CH}_3$), тогда как у молекулы хлорофилла *b* в этом положении находится альдегидная группа ($-\text{CHO}$) (рис. 3.2). По этой причине хлорофилл *a* содержит кислорода на один атом меньше, а водорода – на два атома больше.

Молекула хлорофилла полярная. Атомы кислорода, азота и магния придают порфириновому ядру гидрофильные свойства. Фитольный хвост – это углеводородная часть, поэтому он гидрофобен. Полярность обуславливает определенное расположение молекулы хлорофилла в мембране хлоропласта: фитольный хвост располагается в гидрофобной части мембраны тилакоида (он погружен в липидный бислой), а порфириновое ядро – в гидрофильной части (оно связано с белком на поверхности мембраны тилакоида). Имея разные свойства, две части молекулы выполняют разные функции: порфириновое ядро поглощает свет, а фитольный хвост, играя роль якоря, удерживает молекулу хлорофилла в мембране тилакоида, регулирует положение ядра по отношению к свету и, таким образом, изменяет активность поглощения света молекулой хлорофилла.

Хлорофиллы не растворяются в воде, но хорошо растворимы в органических растворителях. Они легко взаимодействуют с солями, кислотами и щелочами. Хлорофилл в живой неповрежденной клетке обладает способностью к обратимому фотоокислению и фотовосстановлению.

Каротиноиды по своей химической природе относятся к изопреноидам – обширной группе веществ, молекулы которых состоят из различного числа звеньев изопрена (C_5H_8). Каротиноиды содержат 8 звеньев изопрена и являются тетратерпенами. Каротиноиды, как и хлорофиллы, содержат сопряженные двойные связи. Кроме того, на концах их молекул находятся одинаковые или разные насыщенные замещенные циклогексеновые (иононовые) кольца (рис. 3.3).

Каротиноиды присутствуют в хлоропластах всех высших растений. В зеленых листьях они обычно незаметны, так как маскируются хлорофиллами. Окраска каротиноидов открывается осенью перед листопадом, когда хлорофиллы разрушаются.

В процессе фотосинтеза каротиноиды выполняют ряд важных функций: антенную (поглощают определенные участки солнечного спектра, которые недоступны для поглощения хлорофиллу, а затем передают энергию этих лучей на молекулы хлорофилла), защитную

(предохраняют различные органические вещества, и в первую очередь молекулы хлорофилла, от разрушения на свету в процессе фотоокисления), участвуют в процессе разложения воды и выделения кислорода при фотосинтезе.

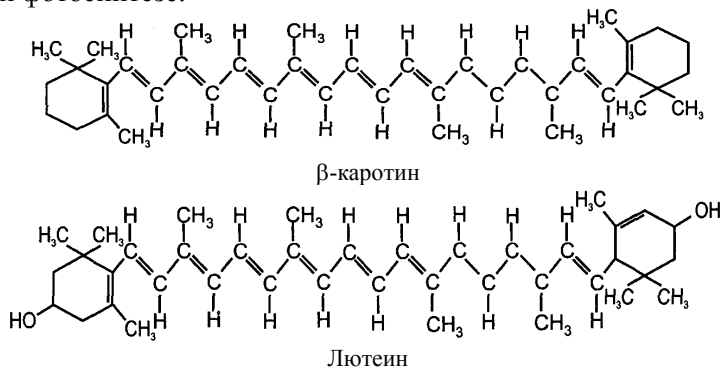


Рис. 3.3. Структурные формулы основных каротиноидов высших растений

Каротиноиды подразделяют на каротины и ксантофиллы. *Каротины* – это непредельные углеводороды с эмпирической формулой $C_{40}H_{56}$. Они имеют оранжевый и красный цвета. Основным каротином в зеленых листьях является *β-каротин* (рис. 3.3). *Ксантофиллы* – кислородсодержащие производные каротинов с эмпирическими формулами $C_{40}H_{56}O_2$ и $C_{40}H_{56}O_4$. Ксантофиллы имеют желтый цвет. Преобладающим ксантофиллом у высших растений являются *лютеин* ($C_{40}H_{56}O_2$) (рис. 3.3).

Каротиноиды, как и хлорофиллы, не растворяются в воде, но, благодаря присутствию гидроксильных ($-OH$) и других кислородсодержащих групп, они хорошо растворимы в органических растворителях. В частности, ксантофиллы легко растворяются в спирте и значительно хуже (в отличие от каротинов) в бензине.

Цель работы: получить из листьев вытяжку пигментов и изучить некоторые из их химических свойств.

Объекты исследования: свежесрезанные листья комнатных растений или сухие листья крапивы.

Оборудование и реактивы: для получения вытяжки пигментов из сырого растительного материала: насос Камовского, колба Бунзена, фильтр Шотта, фарфоровая ступка с пестиком, мерный цилиндр,

плоскодонная колба с пробкой, ножницы, шпатель, этанол (C_2H_5OH), карбонат кальция ($CaCO_3$) или карбонат магния ($MgCO_3$), кварцевый песок или промытый и прокаленный речной песок. Для получения вытяжки пигментов из сухого растительного материала: водяная баня, коническая плоскодонная термостойкая колба на 200 мл, корковая пробка с обратным холодильником, плоскодонная колба с пробкой, мерный цилиндр, термостойкий стакан, ножницы, этанол (C_2H_5OH), вода. Для изучения химических свойств пигментов: пробирки в штативе (5 шт.), пипетка лабораторная на 1 мл (2 шт.), пипетка лабораторная на 10 мл или мерный цилиндр с воронкой (1 шт.), воронка стеклянная малая (1 шт.), резиновые пробки малые (4 шт.), спиртовка, спички, держатель для пробирок, маркер для стекла, простой и цветные карандаши, бензин, 20 % раствор гидроксида натрия ($NaOH$) или гидроксида калия (KOH), ацетат меди $[Cu(CH_3COO)_2]$ или ацетат цинка $[Zn(CH_3COO)_2]$, этанол (C_2H_5OH) в капельнице, 10 % соляная кислота (HCl) в капельнице, дистиллированная вода в капельнице.

Ход работы: получение спиртового раствора (вытяжки) пигментов. Обычно пигменты извлекают из растительного материала при помощи полярных растворителей (этанол, ацетон и др.), которые разрушают связь пигментов с липопротеидами пластид и обеспечивают полное их экстрагирование. Помимо растворителей к растительному материалу добавляют небольшое количество карбоната кальция ($CaCO_3$), карбоната магния ($MgCO_3$) или 1 N раствор гидроксида аммония (NH_4OH): они нейтрализуют кислоты клеточного сока и предотвращают разрушение пигментов в процессе их извлечения. Для получения вытяжки пигментов используют сырой или сухой растительный материал.

Свежесрезанные листья (2–3 штуки) измельчают ножницами в фарфоровую ступку. Туда же вносят 10–15 мл этанола, небольшое количество песка и карбонат кальция (карбонат магния), взятый на кончике шпателя. Содержимое ступки растирают пестиком до однородного состояния. Полученную массу отфильтровывают через фильтр Шотта в колбу Бунзена при помощи насоса Камовского. Остатки массы смывают со стенок ступки 10 мл этанола в фильтр Шотта и также отфильтровывают. Готовый спиртовой раствор пигментов сливают из колбы Бунзена в герметичную посуду и хранят в темноте в холодильнике. Спиртовой раствор пигментов представляет собой прозрачную,

не имеющую осадка изумрудно-зеленую жидкость, в которой содержатся пигменты хлорофиллы и каротиноиды.

Для получения большого объема вытяжки пигментов используют сухие листья крапивы. Их помещают в коническую термостойкую плоскодонную колбу и ошпаривают кипятком, затем воду сливают. В колбу приливают 100 мл этанола, закрывают ее корковой пробкой с обратным холодильником и ставят в баню с кипящей водой для экстрагирования пигментов. После пятиминутного кипячения содержимое колбы охлаждают, и надосадочный раствор (вытяжку пигментов) осторожно сливают в герметичную посуду.

В тетради отмечают цвет получившейся вытяжки и делают вывод о растворимости пигментов в спирте.

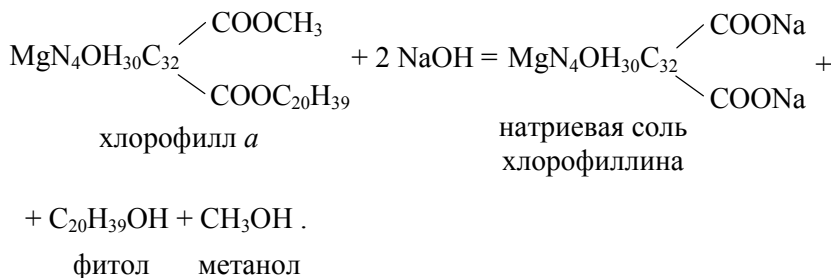
Разделение пигментов (по Г. Краусу). Полярный и неполярный органический растворитель в одном сосуде не смешиваются, а образуют два слоя – верхний и нижний. Метод Г. Крауса основан на неодинаковой способности пигментов растворяться в полярном (спирт) и неполярном (бензин) растворителе.

В пробирку наливают 2–3 мл спиртового раствора пигментов, добавляют 4–5 мл бензина и несколько капель воды для гидролиза хлорофилл-белкового комплекса. Пробирку закрывают пробкой, сильно встряхивают, а затем отстаивают. Происходит разделение эмульсии на 2 слоя. Верхний (бензиновый) слой из бесцветного становится зеленым. Это происходит благодаря тому, что в него переходят хлорофиллы *a* и *b*. В этом же слое находится оранжевый пигмент каротин, но он замаскирован преобладающими зелеными пигментами. В нижнем (спиртовом) слое остается желтый пигмент ксантофилл, который, будучи дуосновным спиртом, почти нерастворим в бензине.

Если пигменты разделяются недостаточно четко (и верхний, и нижний слой окрашены в зеленый цвет), то добавляют 3–4 капли воды, и содержимое пробирки снова встряхивают. Помутнение нижнего слоя связано с избытком воды. В этом случае в пробирку приливают немного этанола и вновь встряхивают.

В тетради зарисовывают пробирки, отмечают окраску бензинового и спиртового слоя до и после встряхивания. Делают вывод о различной растворимости пигментов в полярном и неполярном растворителе. Вывод в отношении каротина делают только после выполнения следующего опыта.

Действие щелочей на хлорофиллы и выделение каротина. Хлорофиллы, как и все сложные эфиры, реагируют со щелочами. Под действием щелочи происходит омыление хлорофилла, которое заключается в разрыве сложноэфирных связей и отщеплении остатков двух спиртов – фитола и метанола:



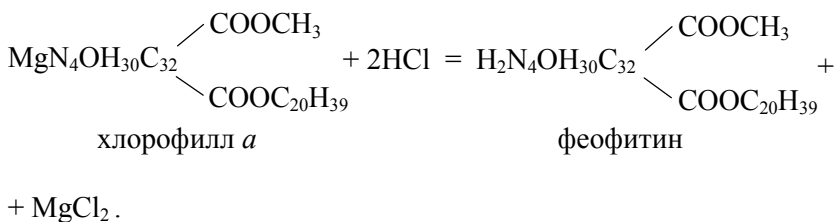
Образующаяся щелочная соль хлорофиллина сохраняет зеленую окраску и оптические свойства хлорофилла. Но, потеряв гидрофобный фитольный хвост, она утрачивает способность растворяться в бензине и переходит в спиртовой слой, окрашивая его в зеленый цвет. Таким образом, растворимость хлорофилла в бензине, его гидрофобность обусловлены присутствием в молекуле хлорофилла остатка спирта фитола. В живом листе фитол может отщепляться от хлорофилла под действием фермента *хлорофиллазы*.

В пробирку наливают 2–3 мл спиртовой вытяжки пигментов, добавляют 1 мл 20 % раствора гидроксида натрия (NaOH) или гидроксида калия (KOH) и встряхивают. После этого приливают 2–3 мл бензина и несколько капель воды. Содержимое пробирки опять сильно встряхивают, а затем отстаивают. После разделения эмульсии оранжево-желтый бензиновый слой содержит каротин, а зеленый спиртовой – натриевую (калиевую) соль хлорофиллина, спирты фитол и метанол, а также ксантофилл. Если бензиновый слой не приобрел оранжево-желтого цвета, то добавляют еще щелочи и встряхивают. Проведенный опыт показывает, что каротиноиды, в отличие от хлорофиллов, не вступают в реакцию со щелочами.

В тетради зарисовывают исходную и конечную окраску растворов в пробирке, указывая распределение пигментов и продуктов

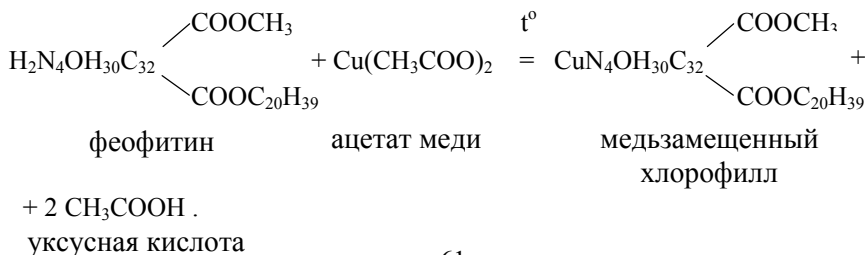
омыления в слоях. Записывают уравнение реакции омыления хлорофилла.

Получение феофитина и восстановление металлорганической связи. Зеленый цвет хлорофиллов связан с наличием в порфириновом ядре атома магния, соединенного через атомы азота с четырьмя пиррольными кольцами. Но атом магния слабо удерживается в порфириновом ядре и при действии слабых кислот легко замещается двумя атомами водорода. Получившееся соединение носит название *феофитина* и имеет оливково-бурый цвет. Реакция идет по уравнению:



В естественных условиях появление феофитина вызвано увеличением проницаемости мембран и проникновением в хлоропласт кислого клеточного сока. Поэтому при старении листьев, осенью, а также под влиянием неблагоприятных факторов (низкие и высокие температуры, дефицит и избыток влаги) проницаемость мембран увеличивается, и содержание феофитина резко возрастает; в результате листья желтеют. При прочих условиях феофитин присутствует в растениях в незначительном количестве и выполняет важную роль в цепи переноса электронов (является первичным акцептором электронов в фотосистеме II).

Если на феофитин подействовать солями меди, цинка или ртути, то атомы водорода в порфириновом ядре вновь замещаются на атом металла:



Зеленая окраска восстанавливается, но она отличается оттенком от зеленой окраски хлорофилла. Это является убедительным доказательством того, что цвет хлорофиллов зависит от металлоорганической связи в их молекуле.

В 3 пробирки наливают по 2–3 мл спиртовой вытяжки пигментов. Одну пробирку оставляют для контроля, а в двух других получают феофитин. Для этого в пробирки добавляют 1–2 капли 10 % соляной кислоты (HCl).

Для восстановления металлоорганической связи в третью пробирку прибавляют несколько кристалликов ацетата меди $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ или ацетата цинка $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ и осторожно нагревают над пламенем спиртовки. Наблюдают появление зеленой окраски. Если окраска не изменилась, добавляют еще соли и продолжают нагревание.

В тетради зарисовывают окраску феофитина и металлозамещенного хлорофилла. Записывают уравнения реакций феофитинизации и восстановления металлоорганической связи. Объясняют причины изменения окраски растворов в пробирках.

Особенностью металлозамещенного хлорофилла является его способность долго сохранять зеленую окраску и не окисляться на воздухе. Чтобы убедиться в этом, пробирки со спиртовой вытяжкой пигментов и с металлозамещенным хлорофиллом подписывают, закрывают пробками и оставляют в штативе на свету. Через неделю делают вывод о стойкости хлорофилла и металлозамещенного хлорофилла, отмечая изменение цвета растворов.

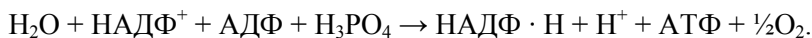
Контрольные вопросы

1. Каковы особенности химического строения молекул хлорофиллов и каротиноидов?
2. Какие функции выполняют хлорофиллы и каротиноиды в процессе фотосинтеза?
3. Какое производное хлорофилла образуется при замещении атома магния в порфириновом ядре на атомы водорода, и какую роль играет это вещество в процессе фотосинтеза?
4. Какие химические свойства хлорофиллов и каротиноидов были продемонстрированы в ходе проведенной работы?

Работа 11

Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла в окислительно-восстановительных реакциях (по А.А. Гуревичу)

Вводные пояснения. В световую фазу фотосинтеза происходит окисление (фотолиз) воды до молекулярного кислорода и образование богатых энергией соединений – НАДФ · Н и АТФ, которые необходимы для восстановления CO_2 в темновой фазе фотосинтеза. Схематично этот процесс можно представить следующим образом:



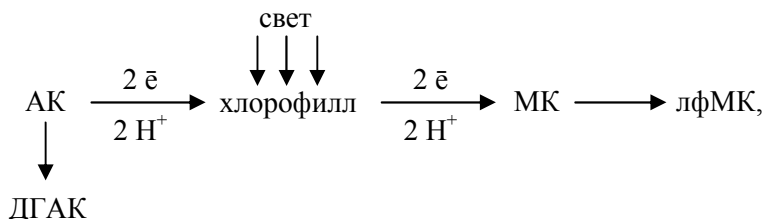
Фотолиз воды возможен только при участии хлорофилла. В этом процессе пигмент выполняет функцию *фотосенсибилизатора* (вещества, использующего энергию света и стимулирующего химическую реакцию, но не участвующего в ней) и способствует восстановлению НАДФ^+ до $\text{НАДФ} \cdot \text{H}$ при переносе к нему двух электронов и двух протонов, источником которых является вода.

Участие хлорофилла в окислительно-восстановительных реакциях под действием света обусловлено наличием в его структуре правильно чередующихся двойных и одинарных связей – *сопряженных двойных связей*. Между двумя атомами, связанными двойной связью, находится четыре электрона. И если система состоит из сопряженных двойных связей, то половина этих π -электронов может свободно перемещаться вдоль всей системы. Поэтому, поглотив квант света, такой электрон способен оторваться от молекулы пигмента, а сам пигмент становится донором электронов для восстановления других веществ.

Помимо сопряженных двойных связей с подвижными π -электронами, участие хлорофилла в окислительно-восстановительных реакциях возможно благодаря присутствию в его молекуле атомов азота с неподеленными электронами: азот пиррольных колец может отдавать электрон (окисляться) или присоединять электрон (восстанавливаться).

Убедиться в том, что хлорофилл является инициатором и участником окислительно-восстановительных реакций, можно в модельном опыте с использованием аскорбиновой кислоты и метилового красного.

Аскорбиновая кислота в клетках живых организмов выступает в качестве источника энергии: она отдает электроны и протоны в электрон-транспортную сеть, а значит, является восстановителем. Краситель метиловый красный является окислителем. Но в силу большой разницы окислительно-восстановительных потенциалов (E_0 аскорбиновой кислоты равен 0,1 эВ, E_0 метилового красного 0,8 эВ) метиловый красный не может напрямую окислить аскорбиновую кислоту. Восстановить метиловый красный помогает хлорофилл, активированный энергией света. Процесс протекает по схеме:



где АК – аскорбиновая кислота; ДГАК – дегидроаскорбиновая кислота; МК – метиловый красный; лфМК – лейкоформа метилового красного.

Из схемы следует, что аскорбиновая кислота, отдавая электроны и протоны, окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты, а метиловый красный, принимая электроны и протоны от аскорбиновой кислоты, восстанавливается до бесцветного соединения (*лейкосоединения*).

Цель работы: с помощью модельного опыта выявить фотосенсibiliзирующую активность хлорофилла в окислительно-восстановительных реакциях.

Объекты исследования: свежесрезанные листья комнатных растений или сухие листья крапивы.

Оборудование и реактивы: для получения вытяжки пигментов из сырого растительного материала: насос Камовского, колба Бунзена, фильтр Шотта, фарфоровая ступка с пестиком, мерный цилиндр, плоскодонная колба с пробкой, ножницы, шпатель, этанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), карбонат кальция (CaCO_3) или карбонат магния (MgCO_3), кварцевый песок или промытый и прокаленный речной песок. Для получения вы-

тяжжи пигментов из сухого растительного материала: водяная баня, коническая плоскодонная термостойкая колба на 200 мл, корковая пробка с обратным холодильником, плоскодонная колба с пробкой, мерный цилиндр, термостойкий стакан, ножницы, этанол (C_2H_5OH), вода. Для обнаружения фотосенсибилизирующей активности хлорофилла: пробирки в штативе (4 шт.), пипетка лабораторная градуированная на 10 мл или мерный цилиндр с воронкой (2 шт.), сосуд с прозрачными плоскопараллельными стенками (аквариум), шпатель, электрическая лампа на 300 Вт в штативе, маркер для стекла, кристаллическая аскорбиновая кислота, этанол, насыщенный спиртовой раствор метилового красного¹⁹ в капельнице.

Ход работы: лабораторную работу начинают с приготовления спиртового раствора пигментов (см. лабораторную работу № 10).

Берут четыре пробирки: в первые три пробирки наливают по 5 мл спиртового раствора пигментов, в четвертую – 5 мл этанола. В первую, вторую и четвертую пробирки добавляют по 40–50 мг (на кончике шпателя) аскорбиновой кислоты и встряхивают их. Во все пробирки приливают по каплям спиртовой раствор метилового красного (при добавлении метилового красного зеленая окраска в первых трех пробирках должна измениться на красно-бурую, в четвертой пробирке окраска раствора должна быть доведена до ярко-розовой). Вторую пробирку убирают в темноту, а первую, третью и четвертую пробирки ставят в штатив и освещают электролампой, расположив ее на расстоянии примерно 15 см от штатива. Для поглощения тепловых лучей между пробирками и лампой помещают сосуд с плоскопараллельными стенками, заполненный водой.

Через 30–40 минут в первой пробирке метиловый красный обесцвечивается, и раствор вновь приобретает зеленую окраску. В остальных пробирках окраска раствора не меняется, так как без света, аскорбиновой кислоты или хлорофилла метиловый красный не восстанавливается в лейкосоединение. Результаты опыта заносят в таблицу.

¹⁹ Для приготовления насыщенного спиртового раствора 0,2 г метилового красного растворяют в 60 мл 96 % этанола. Получившийся раствор доводят дистиллированной водой до 100 мл.

Вариант	Состав смеси веществ	Условия опыта	Результат
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	

Делают выводы о фотосенсибилизирующем действии хлорофилла, а также о роли аскорбиновой кислоты, метилового красного и света в наблюдаемом процессе.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается сущность световой стадии фотосинтеза?
2. Какие вещества называют фотосенсибилизаторами?
3. Чем обусловлено участие хлорофилла в окислительно-восстановительных реакциях под действием света?

Работа 12

Разделение фотосинтетических пигментов методом Бумажной хроматографии

Вводные пояснения. *Хроматография* (от греч. “*chromatos*” – цвет и “*grapho*” – пишу) – это физико-химический метод разделения смесей на отдельные составляющие их компоненты. Создателем хроматографического метода является русский физиолог и биохимик растений Михаил Семенович Цвет (1872–1919). При пропускании спиртовой вытяжки пигментов зеленого листа через стеклянную трубку, заполненную сорбентом, ему удалось обнаружить в вытяжке отдельные фотосинтетические пигменты – сине-зеленый хлорофилл *a*, желто-зеленый хлорофилл *b*, три фракции желтых каротиноидов и серо-стальной феофитин. В 1901 году хроматографический метод был впервые представлен М.С. Цветом на защите собственной магистерской диссертации «Физико-химическое строение хлорофильного зерна».

В основе хроматографического метода разделения фотосинтетических пигментов лежит явление *сорбции* (от лат. “*sorbeo*” – поглощаю), которое можно наблюдать при пропускании раствора, содержащего смесь пигментов, через слой твердых, поглощающих их веществ – *сорбентов*. Благодаря тому, что пигменты обладают неодинаковой растворимостью в растворителе (*элюенте*) и неодинаковой сорбционной способностью, они будут передвигаться в сорбенте (или по поверхности сорбента) с различной скоростью и располагаться в нем (на нем) в разных местах. Чем больше растворимость пигмента в элюенте, и чем хуже он сорбируется данным сорбентом, тем быстрее он будет передвигаться, и тем дальше будет располагаться зона этого пигмента от начала старта.

В настоящей работе предлагается разделить фотосинтетические пигменты зеленого листа *методом бумажной хроматографии*. В этом методе в качестве сорбента используется целлюлоза хроматографической бумаги, по поверхности которой за счет капиллярных сил перемещаются пигменты в потоке элюента.

Цель работы: используя метод бумажной хроматографии, провести разделение смеси фотосинтетических пигментов.

Объекты исследования: свежие листья комнатных растений или сухие листья крапивы.

Оборудование и реактивы: для получения вытяжки пигментов из сырого растительного материала: насос Камовского, колба Бунзена, фильтр Шотта, фарфоровая ступка с пестиком, мерный цилиндр, плоскодонная колба с пробкой, ножницы, шпатель, этанол (C_2H_5OH), карбонат кальция ($CaCO_3$) или карбонат магния ($MgCO_3$), кварцевый песок или промытый и прокаленный речной песок. Для получения вытяжки пигментов из сухого растительного материала: водяная баня, коническая плоскодонная термостойкая колба на 200 мл, корковая пробка с обратным холодильником, плоскодонная колба с пробкой, мерный цилиндр, термостойкий стакан, ножницы, этанол (C_2H_5OH), вода. Для разделения смеси фотосинтетических пигментов методом бумажной хроматографии: вентилятор или фен, секундомер (часы), стеклянный бюкс на 10 мл (2 шт.), хроматографическая камера или стеклянный цилиндр с пробкой (в пробку должен быть вставлен крючок), хроматографическая бумага, пинцет, карандаш, линейка, ножницы, канцелярский клей, ацетон, бензин или петролейный эфир.

Ход работы: лабораторную работу начинают с приготовления спиртового раствора пигментов (*см. лабораторную работу № 10*).

Готовый спиртовой раствор пигментов переносят в бюкс. Подготавливают второй бюкс с чистым ацетоном. Из хроматографической бумаги вырезают полоску шириной 1,5–2,0 см и длиной 20 см, на одном конце которой проводят карандашом линию старта, отступив от края 1 см. Строго вертикально конец полоски опускают до линии старта в спиртовую вытяжку пигментов, при этом уровень пигментов должен подняться не более, чем на 1,0–1,5 см от линии старта. Полоску высушивают в потоке воздуха от вентилятора или фена и опять погружают до линии старта в раствор пигментов. Эту операцию повторяют 5–7 раз до тех пор, пока у верхней границы распространения пигментов не образуется темно-зеленая полоса. После этого нижний конец полоски на несколько секунд погружают в чистый ацетон для того, чтобы поднять фотосинтетические пигменты к верхней границе их распространения (к темно-зеленой полосе).

Полоску бумаги высушивают до исчезновения запаха ацетона и помещают в вертикальном положении в хроматографическую камеру, на дно которой налит бензин или петролейный эфир. Вместо хроматографической камеры можно использовать стеклянный цилиндр, герметически закрывающийся пробкой. В пробку вставляют крючок и прикрепляют к нему полоску фильтровальной бумаги с вытяжкой пигментов. Полоску нужно подвесить на крючок так, чтобы в растворитель был погружен только неокрашенный участок, расположенный ниже темно-зеленой полосы. Кроме того, полоска не должна касаться стенок сосуда.

Через 10–15 минут пигменты зеленого листа разделяются на хроматографической бумаге в следующем порядке: снизу – хлорофилл *b*, над ним – хлорофилл *a*, затем ксантофиллы и феофитин. Каротин пройдет вместе с растворителем и расположится значительно выше других пигментов.

Полученную хроматограмму клеивают в тетрадь, отмечают карандашом пигментные зоны и подписывают их. По результатам работы делают вывод о причинах разделения пигментов на бумаге.

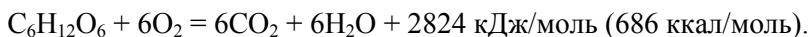
Контрольные вопросы

1. Какой принцип лежит в основе хроматографического метода разделения пигментов?
2. Какую окраску имеют полосы на хроматографической бумаге, соответствующие хлорофиллам *a* и *b*, каротиноидам, феофитину?
3. В каком соотношении хлорофиллы *a* и *b* находятся в зеленом листе? Каким образом это подтверждается на хроматограмме?

Раздел 4. ДЫХАНИЕ

Дыхание – это сложный комплекс окислительно-восстановительных процессов, в результате которых химическая энергия органических веществ (углеводов, белков, жиров, органических кислот) преобразуется в конвертируемые формы клеточной энергии – $\Delta\mu\text{H}^{+20}$ и АТФ, используемые для выполнения любой работы в клетке. В этом состоит основное значение дыхания для растения. Вторая, не менее важная функция, – это образование органических соединений (органических кислот, пентоз) на промежуточных стадиях дыхания, которые затем используются клеткой в различных метаболических реакциях. В-третьих, в ходе дыхания образуется вода, которая может использоваться растением в условиях его обезвоживания. И, в-четвертых, энергия дыхания может выделяться в виде тепла, что повышает устойчивость растения к действию низких температур.

Поскольку основным субстратом дыхания у растений является глюкоза и ее производные, то суммарное уравнение дыхания выглядит следующим образом:



Дыхание условно делят на три этапа: *гликолиз*, *цикл трикарбоновых кислот* и *окислительное фосфорилирование в дыхательной цепи*. Гликолиз и цикл трикарбоновых кислот – это биохимические пути

²⁰ $\Delta\mu\text{H}^+$ (*дельта мю аш*) – это протонный градиент или электрохимический градиент ионов H^+ . Энергия, не накопленная в $\Delta\mu\text{H}^+$ и АТФ, в основном рассеивается в виде тепла.

окисления глюкозы, протекающие соответственно в гиалоплазме и матриксе митохондрий. Главный результат первого и второго этапов – это образование соединений с высоким восстановительным потенциалом – *никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (НАДН)* и *флавинадениндинуклеотида восстановленного (ФАДН₂)*. На заключительном этапе указанные восстановительные эквиваленты окисляются в электрон-транспортной цепи, локализованной во внутренней мембране митохондрий. В процессе электронного транспорта на внутренней мембране митохондрий образуется протонный градиент $\Delta\mu\text{H}^+$, энергия которого используется для синтеза АТФ из АДФ и фосфора неорганического ($\text{P}_\text{н}$). Процесс, в котором работа дыхательной цепи сопряжена с синтезом АТФ, получил название окислительного фосфорилирования. Именно в этом процессе синтезируется основная масса АТФ, образуемого при дыхании. Таким образом, дыхание – это центральное звено обмена веществ растительного организма, тесно связанное с другими процессами метаболизма.

Работа 13

Определение интенсивности дыхания по количеству выделенного углекислого газа (по П. Бойсен-Йенсену)

Вводные пояснения. Для характеристики дыхания используют такой показатель, как интенсивность дыхания. Под *интенсивностью дыхания* понимают количество кислорода в миллиграммах, поглощенного 1 граммом сухого (или сырого) растительного материала за 1 час, а также количество углекислого газа в миллиграммах, выделенного 1 граммом растительной массы за 1 час.

На интенсивность дыхания влияет ряд факторов. Один из них – это *оводненность тканей растения*. Так, увеличение оводненности клеток листьев до 80 % приводит к росту интенсивности дыхания, так как вода повышает активность дыхательных ферментов, скорость химических реакций, интенсифицирует транспорт веществ и увеличивает ширину устьичных щелей, через которые поступает кислород. Однако дальнейшее увеличение содержания воды в межклетниках и в свободном пространстве клеточных стенок будет мешать газообмену, и интенсивность дыхания в клетках листьев начнет снижаться. В целом,

небольшой водный дефицит тканей растения будет увеличивать интенсивность дыхания: в этом состоянии усиливаются процессы распада сложных углеводов (например, крахмала) на более простые (сахара), которые, в свою очередь, являются основным субстратом дыхания. При длительном завядании растение расходует сахара, и интенсивность дыхания падает. Иная закономерность изменения этого показателя характерна для семян: в них интенсивность дыхания возрастает по мере увеличения содержания воды, благодаря которой повышается активность дыхательных ферментов.

Другим фактором, влияющим на интенсивность дыхания, является *газовый состав среды*. Процесс дыхания связан, прежде всего, с постоянным потреблением кислорода, который является конечным акцептором электронов, движущихся по дыхательной цепи. Так как системы клеточного дыхания эволюционно формировались в условиях низкого парциального давления кислорода, то понижение содержания кислорода в среде с 21 % до 5 % существенно не снижает интенсивность дыхания у большинства видов растений. Сильное уменьшение интенсивности дыхания наблюдается только при понижении содержания кислорода во внешней среде до 3 %. Дефицит кислорода для дыхания может отмечаться в корневых системах растений, развивающихся на очень плотных почвах и почвах с избыточным содержанием воды (вследствие быстрого снеготаяния, сильных ливней, затопления или неправильного орошения), в семенах и плодах с плотной оболочкой, в сочных плодах, клубнях, корнеплодах, толстых стволах. При недостатке кислорода в тканях идет *гликолиз*, а также *спиртовое* и *молочно-кислое брожение*, в результате чего в них накапливаются спирты и кислоты, увеличивающие проницаемость клеточных мембран. *Пентозофосфатный цикл* и *цикл Кребса* отсутствуют, что вызывает недостаток промежуточных метаболитов, необходимых для синтеза других веществ. Дыхательная цепь функционирует плохо, восстановленные коферменты слабо окисляются, и образуется мало молекул АТФ. Возникающий дефицит АТФ тормозит работу клеток. Для получения нужного количества энергии в клетках увеличивается скорость гликолиза, что связано с большим расходом сахара.

Помимо кислорода, на интенсивность дыхания влияет углекислый газ: при очень высоких его концентрациях (выше 40 %) дыхание подавляется. На фоне высокой концентрации CO_2 угнетение дыхания

может происходить вследствие торможения активности ряда дыхательных ферментов, а также в результате закрытия устьиц, что затрудняет доступ кислорода.

Температура – следующий фактор, оказывающий влияние на интенсивность дыхания. Дыхание представляет собой комплекс процессов, зависимых от ферментов. Поэтому при повышении температуры интенсивность дыхания возрастает, но лишь до определенного предела. Выше этого предела начинается инактивация ферментов (а также набухание митохондрий, разрушение крист и, следовательно, нарушение транспорта электронов), и интенсивность дыхания падает. Оптимальной для дыхания растений умеренной зоны считают температуру +37...+38 °С. Но если растения находятся при такой температуре более 6 часов, то оптимальная температура снижается до +25 °С. В целом, растения могут осуществлять дыхание от – 25 °С до +60 °С.

Интенсивность дыхания зависит от *минерального питания* растения. Для формирования различных *оксидаз* и *дегидрогеназ* необходимы макроэлементы (азот, фосфор, сера, железо) и микроэлементы (медь, марганец, молибден). В то же время избыточное поступление некоторых минеральных ионов (нитратов, калия) снижает интенсивность дыхания. Наконец, недостаточное минеральное питание может привести к изменению структуры митохондрий и вызвать нарушение окислительного фосфорилирования и разобщение его с дыханием.

Влияние *света* на дыхание изучено недостаточно, так как на свету одновременно идет фотосинтез, в газообмене которого используются те же газы (O₂ и CO₂). Установлено, что свет стимулирует *фотодыхание*²¹, повышает интенсивность *темнового (митохондриального) дыхания*. Предполагают, что свет активирует дыхательные ферменты оксидазы.

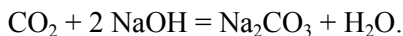
Поранение органов и тканей растения усиливает интенсивность дыхания, так как при разрушении клеток повышается соприкосновение дыхательных субстратов и ферментов.

²¹ Под фотодыханием понимают процесс поглощения кислорода и выделения углекислого газа на свету с использованием в качестве субстрата промежуточных продуктов цикла Кальвина. В его осуществлении принимают участие хлоропласты, митохондрии и пероксисомы. Фотодыхание характерно для растений с C₃-типом фотосинтеза.

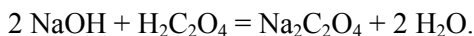
Интенсивность дыхания зависит от *возраста*. Более молодые, растущие органы и ткани дышат интенсивнее старых. Кратковременное усиление дыхания происходит и перед отмиранием органа. Низкой интенсивностью дыхания отличаются органы растения, закончившие рост или находящиеся в состоянии покоя. У целого растения интенсивность дыхания в течение онтогенеза сначала увеличивается, достигает максимума перед цветением, затем падает и вновь увеличивается незадолго до начала старения. Уменьшение дыхания после цветения связано с увеличением содержания целлюлозы, лигнина и запасных веществ в клетках, а также с ростом количества мертвых клеток на протяжении жизни растения. Увеличение интенсивности дыхания в конце онтогенеза связывают с накоплением этилена, который активизирует ферменты дыхательной цепи.

На интенсивность дыхания влияют и *экологические особенности растения*. Так, светолюбивые растения характеризуются более высокой интенсивностью дыхания по сравнению с теневыносливыми и тенелюбивыми. Растения, эволюционно сформировавшиеся и обитающие в холодном климате, дышат интенсивнее, чем южные, теплолюбивые.

Метод, предложенный датским физиологом растений Пётром Бойсен-Йёнсенем для оценки интенсивности дыхания, основан на измерении количества углекислого газа, выделенного растением при дыхании в закрытом сосуде. В этом методе содержание углекислого газа учитывают при поглощении его раствором гидроксида натрия:



Избыток гидроксида натрия, не прореагировавший с углекислым газом, оттитровывают раствором щавелевой кислоты:



Параллельно определяют исходное содержание атмосферного углекислого газа в аналогичной контрольной колбе. По разности титрования в контрольной и опытной колбе судят о количестве углекислого газа, выделенного растением при дыхании.

Метод П. Бойсена-Йенсена позволяет сравнить интенсивность дыхания разных растительных объектов, а также выявить изменения в интенсивности дыхания у растений в стрессовых условиях.

Цель работы: сравнить интенсивность дыхания различных растительных объектов в зависимости от их физиологического состояния.

Объекты исследования: проросшие и непроросшие семена, покоящиеся или набухшие почки, листья, стебли и цветки растений.

Оборудование и реактивы: весы технические, секундомер (часы), калькулятор, бюретка (2 шт.), стеклянная воронка для бюретки (2 шт.), стеклянный стаканчик (2 шт.), штатив для крепления бюретки (2 шт.), плоскодонная коническая колба на 250 мл (3 шт.), резиновая пробка для колбы (1 шт.), резиновая пробка с крючком для колбы (2 шт.), резиновая пробка со стеклянной трубкой (3 шт.), шпатель, ножницы, куски марли размером 10 · 10 см, шпунг с нитками, 0,1 Н раствор гидроксида натрия (NaOH), раствор щавелевой кислоты ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$)²², 1 % спиртовой раствор фенолфталеина ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$)²³ в капельнице.

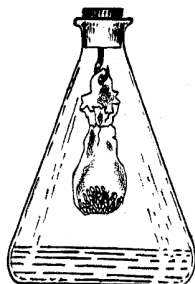
Ход работы: для опыта используют три одинаковые колбы. В двух колбах определяют интенсивность дыхания сравниваемых объектов (проросших и непроросших семян, покоящихся и набухших почек, молодых и старых листьев, листьев разного яруса, листьев и стеблей у одного и того же растения и пр.), а третья колба является контрольной и служит для определения исходного содержания CO_2 в воздухе. Перед началом опыта колбы выдерживают 15 минут в одинаковых условиях для равномерного заполнения атмосферным воздухом.

Навеску растительного материала (2–5 г) помещают в марлевый мешочек, который завязывают ниткой. Мешочек крепят к крючку пробки таким образом, чтобы он свободно проходил через горло колбы и находился на достаточном удалении от ее дна. С помощью бю-

²² Раствор щавелевой кислоты готовят из расчета 2,8636 г щавелевой кислоты на 1 л дистиллированной воды.

²³ Для приготовления 1 % спиртового раствора фенолфталеина отвешивают в фарфоровой чашке на технических весах 1 г фенолфталеина и смывают его небольшим количеством 96 % этилового спирта в мерную колбу на 100 мл. Объем раствора в колбе доводят спиртом до 100 мл, закрывают колбу пробкой и взбалтывают. После растворения фенолфталеина раствор фильтруют через бумажный фильтр. Индикатор изменяет окраску от бесцветной к красно-фиолетовой при увеличении pH от 8,2 до 10,0.

ретки в колбу наливают 10–25 мл 0,1 Н раствора NaOH, без промедления опускают мешочек с растительным материалом и плотно закрывают пробкой (рисунок).



В табл. отмечают время начала опыта.

Объект исследования	Навеска, г	Объем NaOH в колбе, мл	Время		Расход $H_2C_2O_4$, мл		Интенсивность дыхания, мг/г · ч
			начало, час. мин.	конец, час. мин.	контроль	опыт	

Аналогичные действия проводят со второй колбой, при этом навеска находящегося в ней растительного материала должна быть такой же, как и в первой колбе. Колбы с растительным материалом, содержащим хлорофилл, помещают в темноту для исключения фотосинтеза. В третью (контрольную) колбу наливают 10–25 мл 0,1 Н раствора NaOH и без внесения растительного материала плотно закрывают пробкой. В течение опыта раствор щелочи периодически осторожно взбалтывают во всех колбах, не допуская попадания щелочи на мешочки.

Через 1 час мешочек с растительным материалом вынимают из первой колбы, и пробку с крючком быстро заменяют на пробку со стеклянной трубкой. Через трубку в колбу добавляют 2–3 капли фенолфталеина, снова встряхивают колбу и проводят титрование щелочи щавелевой кислотой. Во время титрования розовая окраска раствора в

колбе постепенно бледнеет и в конце мгновенно исчезает от одной капли раствора щавелевой кислоты. Поэтому необходимо уловить этот момент и не перелить кислоту. Объем щавелевой кислоты, пошедший на титрование раствора, заносят в таблицу. То же проделывают в отношении второй и третьей колб, не забывая, что экспозиция должна быть строго одинаковой у всех колб.

В предлагаемой работе раствор щавелевой кислоты приготовлен таким образом, что 1 мл его соответствует 1 мг CO_2 . А значит, разность между объемом раствора щавелевой кислоты, пошедшей на титрование в контрольной и опытной колбах, дает количество мг CO_2 , выделенного за время опыта исследуемым растительным материалом. Полученное для первой и второй колб количество мг CO_2 пересчитывают на 1 г навески растительного материала. Величины интенсивности дыхания заносят в табл.

По результатам опыта делают вывод об интенсивности дыхания растительных объектов и о влиянии на этот процесс их физиологического состояния.

Контрольные вопросы

1. Что такое дыхание, и каково его значения для растения?
2. Что понимают под интенсивностью дыхания? Какие факторы влияют на этот показатель?
3. Какие принципы положены в основу метода определения интенсивности дыхания по П. Бойсен-Йенсену?

Раздел 5. МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ

Минеральное питание – это совокупность процессов поглощения, передвижения и усвоения из окружающей среды химических элементов, необходимых для жизнедеятельности растительного организма.

В растениях можно обнаружить почти все химические элементы периодической таблицы Д.И. Менделеева. При этом только 19 из них – Н, С, О, N, К, Са, Mg, P, S, Si, Cl, Fe, В, Mn, Na, Zn, Cu, Ni, Мо – необходимы для жизни. Элемент считается необходимым, если его отсутствие исключает нормальный жизненный цикл растения; его нельзя

заменить другим химическим элементом; для данного элемента четко определены его физиологические функции. Среди перечисленных элементов Н, С и О растения получают из воздуха и воды. Остальные – из почвы, вследствие чего они получили название *необходимых микреральных химических элементов*.

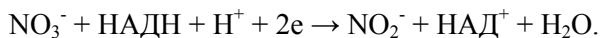
В зависимости от содержания необходимые минеральные химические элементы достаточно условно делят на *макроэлементы* и *микроэлементы*. Содержание макроэлементов (N, K, Ca, Mg, P, S, Si) в растительных тканях в расчете на сухую массу составляет 0,1–1,5 %. Концентрация микроэлементов (Cl, Fe, B, Mn, Na, Zn, Cu, Ni, Mo) – менее 0,01 %. Из почвы минеральные элементы поглощаются в виде катионов и анионов.

Работа 14 Обнаружение нитратов в растениях

Вводные пояснения. *Нитраты* – это соли азотной кислоты, содержащие однозарядный ион NO_3^- . Растения поглощают нитраты из почвенного раствора с помощью корневой системы и затем восстанавливают их до аммиака. Восстановление нитратов осуществляется в результате двух последовательных реакций, которые схематично можно представить следующим образом:



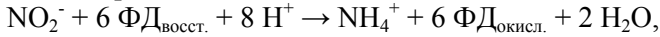
Первая реакция протекает в гиалоплазме. Она заключается в восстановлении нитрата до нитрита и катализируется ферментом *нитратредуктазой*:



НАДН образуется в результате дыхания корневой системы. Поэтому в условиях, затрудняющих дыхание, восстановление нитратов тормозится.

Образующийся нитрит является высокоактивным и токсичным ионом, поэтому он незамедлительно транспортируется из гиалоплазмы в

лейкопласты: в них содержится фермент *нитритредуктаза*, восстанавливающий нитрит до аммония:



где $\text{ФД}_{\text{восст.}}$ и $\text{ФД}_{\text{окисл.}}$ – восстановленная и окисленная форма ферредоксина. Ферредоксин восстанавливается за счет *никотинамидадениндинуклеотидфосфата восстановленного (НАДФН)*, образующегося в окислительном пентозофосфатном цикле дыхания.

Восстановление нитратов до аммиака происходит не только в клетках ризодермы и паренхимы корней. У некоторых растений нитраты в неизменном виде вместе с пасоккой транспортируются по ксилеме в листья, где восстанавливаются в хлоропластах за счет НАДФН и $\text{ФД}_{\text{восст.}}$, образующихся во время световой фазы фотосинтеза. В дальнейшем ионы аммония вовлекаются в азотный обмен и используются растением для синтеза аминокислот и белков. Уточним, что некоторое количество нитратов (до 1,5 %) остается неизменным и запасается растением в вакуолях для будущих нужд.

Содержание нитратов в растении зависит от ряда факторов. Во-первых, на него влияет *содержание нитратов в среде произрастания* – воде, песке и почве, на которых растут и развиваются растения. Нитраты могут поступать в природные среды естественным путем или целенаправленно вноситься человеком, например, в составе нитратных (натриевая и кальциевая селитры) и аммонийно-нитратных (аммиачная и известково-аммиачная селитры) удобрений.

На содержание нитратов в растении влияет *световой режим*. Растения, развивающиеся в условиях недостаточной освещенности и короткого дня (тепличные культуры), как правило, содержат нитратов больше. Это связано, во-первых, с низким уровнем выработки у таких растений в процессе фотосинтеза углеводов, которые необходимы для осуществления дыхания. В свою очередь, дыхание является поставщиком НАДН и НАДФН – доноров электронов и протонов для процесса восстановления нитратов до аммиака. Во-вторых, фотосинтез является поставщиком НАДФН и восстановленного ферредоксина, содержание которых будет снижаться при недостаточной освещенности. И, наконец, дефицит света увеличивает время активации флавина – одной из протетических групп нитратредуктазы. На восстановление нитратов влияет и качество света: процесс стимулирует синий свет.

Еще одним фактором является *степень увлажнения субстрата*: чем выше влажность субстрата и чем продолжительнее развивается на нем растение, тем больше нитратов оно накапливает. Именно поэтому культуры, выращенные в холодное дождливое лето в условиях открытого грунта, будут содержать нитратов больше, чем выращенные при более благоприятных погодных условиях.

Отмечена и *видовая специфика* в накоплении нитратов растениями. Так, представители семейств Амарантовые (*Amaranthaceae*), Маревые (*Chenopodiaceae*), Сельдерейные (*Apiaceae*), Астровые (*Asteraceae*), Капустные (*Brassicaceae*), Пасленовые (*Solanaceae*), Тыквенные (*Cucurbitaceae*) и некоторых других способны накапливать значительные количества нитратов в своих органах.

Содержание нитратов зависит от *возраста*: чем старше растение, тем меньше оно содержит нитратов. Такая взаимосвязь обусловлена возрастным увеличением в органах и тканях растения запасов ассимилятов, которые вовлекают нитраты в метаболизм.

Распределение нитратов в растении зависит от *локализации нитратредуктазы*. Если наиболее активна нитратредуктаза корневой системы, то восстановление нитратов и образование органических азотсодержащих веществ происходит главным образом в корнях. У таких растений корневая система содержит нитратов больше, чем зеленая фитомасса. К ним относятся горох (*Pisum sativum* L., *P. arvense* L.), люпин (*Lupinus polyphyllus* Lindl.), черника (*Vaccinium* sp.), многие виды древесных растений.

У некоторых растений (сахарная свекла – *Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* convar. *saccharifera* Alef., хлопчатник – *Gossypium hirsutum* L., дурнишник – *Xanthium* sp., бурачник – *Borago* sp. и др.) нитратредуктаза корневой системы обладает низкой активностью, и восстановление нитратов происходит в листьях. В итоге надземные органы этих растений содержат нитратов больше, чем корневая система.

У абсолютного большинства растений нитратредуктаза в корнях и листьях обладает примерно одинаковой активностью. Поэтому в составе пасоки обнаруживаются и нитраты, и органические соединения азота. Содержание нитратов в корневой системе у таких растений близко к их содержанию в надземной фитомассе. Эта группа растений объединяет хлебные злаки (пшеницу – *Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf., рожь – *Secale cereale* L., ячмень – *Hordeum vulgare* L.,

H. distichon L., овес – *Avena sativa* L., кукурузу – *Zea mays* L., просо – *Panicum miliaceum* L.), фасоль (*Phaseolus vulgaris* L.), многие овощные культуры и др.

Таким образом, для растений нитраты безвредны и могут накапливаться в их тканях в значительных количествах. Однако высокие содержания нитратов опасны для теплокровных, в том числе и для человека: попадая в желудок, они могут восстанавливаться до нитритов и далее при взаимодействии с вторичными аминами образовывать *нитрозамин* – вещество, обладающее сильным канцерогенным действием. Высокие дозы нитратов в растениеводческой продукции способны вызывать и такое заболевание, как *метгемоглобинемия*, при которой в крови вместо гемоглобина образуется метгемоглобин, нарушается снабжение тканей кислородом и развивается синюшность. В этой связи Министерством здравоохранения РФ установлено *предельно допустимое количество (ПДК)* нитратов, потребляемое взрослым человеком с пищей и водой, которое составляет 500 мг в сутки. Токсичной считается концентрация 600 мг в сутки.

Цель работы: оценить содержание нитратов в растительном материале по реакции с дифениламином и с помощью нитрат-тестера.

Объекты исследования: различные виды растений, а также растения одного вида, произраставшие в разных условиях (на солнце и в тени, при избыточном, оптимальном и недостаточном увлажнении, с подкормкой минеральными солями и без нее и т. д.).

Оборудование и реактивы: нитрат-тестер, белые керамические тарелки, стеклянная палочка, нож, ножницы, шпатель, терка, салфетки, ватные тампоны, 1 % раствор дифениламина (ДФА) в концентрированной серной кислоте²⁴ в капельнице, этанол, дистиллированная вода в стакане.

Ход работы: *обнаружение нитратов раствором дифениламина.* Содержание нитратов в различных частях растения можно определить по реакции с дифениламином, который в присутствии ионов NO_3^- дает синюю окраску. По интенсивности окрашивания можно приблизительно судить о количестве нитратов в исследуемом растительном материале.

²⁴ Для приготовления 1 % раствора дифениламина необходимо растворить 0,5 г дифениламина в 50 мл концентрированной серной кислоты при помешивании. Раствор хранят в сосуде из темного стекла.

Части исследуемых растений разминают стеклянной палочкой (после каждого растительного образца палочку споласкивают дистиллированной водой и насухо вытирают салфеткой) или натирают на мелкой терке. Образовавшийся растительный гомогенат выкладывают на тарелку и обливают раствором ДФА. Интенсивность окраски гомогената оценивают по 3-балльной шкале. Бледно-голубая, быстро исчезающая, и голубая, сохраняющаяся в течение 2–3 минут, окраска гомогената указывает на низкое содержание нитратов; синяя окраска, сохраняющаяся в течение нескольких минут, свидетельствует о среднем содержании нитратов; устойчивая темно-синяя или темно-фиолетовая окраска является признаком высокого уровня нитратов в тканях растения. Результаты заносят в табл. 5.1–5.4.

Таблица 5.1. Содержание нитратов в органах сельскохозяйственных культур

Анализируемый орган		Содержание нитратов, баллы		
		Горох	Подсолнечник	Фасоль
Корневая система				
Стебель	базальная часть			
	срединная часть			
	апикальная часть			
Листья	нижние			
	срединные			
	верхушечные			

Таблица 5.2. Содержание нитратов в органах зеленных культур

Анализируемый орган	Содержание нитратов, баллы		
	Укроп	Петрушка	Кориандр
Стебель			
Листья			

Таблица 5.3. Содержание нитратов во фруктах

Часть анализируемого органа	Содержание нитратов, баллы		
	Яблоня	Груша	Банан
Кожица			
Мякоть			

Таблица 5.4. Содержание нитратов в овощах

Часть анализируемого органа	Содержание нитратов, баллы		
	Морковь	Огурец	Кабачок
Основание корнеплода (плода)			
Срединная часть корнеплода (плода)			
Кончик корнеплода (плода)			
Покровные ткани			

Определение содержания нитратов в растительном материале с помощью нитрат-тестера. Для экспресс-оценки содержания ионов NO_3^- в свежих фруктах, овощах и зеленных культурах можно использовать нитрат-тестер, например, фирмы «СОЭКС» (Россия) (рис. 5.1).

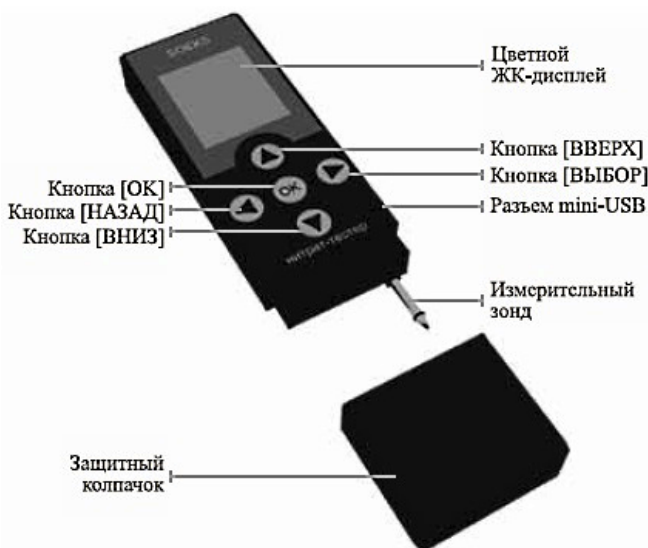


Рис. 5.1. Внешний вид нитрат-тестера «СОЭКС»

Работа нитрат-тестера «СОЭКС» основана на измерении проводимости переменного высокочастотного тока в анализируемом расти-

тельном материале. Нитрат-тестер откалиброван по содержанию нитрат-ионов, концентрация которых в плодоовощной продукции определена независимым методом анализа (потенциометрически по ГОСТ 29270-95 «Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения нитратов»). Результат анализа выдается прибором в виде концентрации нитрат-ионов и сравнения ее с ПДК для анализируемой культуры (табл. 5.5). Полученный результат является оценочным и не может заменить собой количественный химический анализ в специализированной химической лаборатории.

Нитрат-тестер «СОЭКС» включают нажатием и удерживанием кнопки [ОК] до появления подсветки дисплея, после чего кнопку [ОК] отпускают. С помощью кнопок [ВВЕРХ] и [ВНИЗ] выбирают пункт меню «Измерение» и нажимают кнопку [ОК]. В появившемся на дисплее меню из предлагаемого списка выбирают объект исследования и нажимают кнопку [ОК]. После выбора объекта на экране появится текст «Убедитесь, что зонд не воткнут в проверяемый продукт и нажмите кнопку ОК». Зонд протирают смоченным в этиловом спирте тампоном, а затем насухо чистой салфеткой. Нажимают кнопку [ОК], после чего начинается подготовка прибора к измерениям (самокалибровка), сопровождаемая сообщением «Подождите, идет подготовка к анализу». Дожидаются появления сообщения: «Воткните зонд в продукт. Нажмите ОК»; при этом на экране будет указана ПДК для выбранного объекта исследования. Зонд втыкают в продукт, удерживая прибор перпендикулярно плоскости продукта. Глубина погружения зонда может быть от 1 см до полного погружения. Заостренный конец зонда не должен выходить наружу, упираться в косточку плода или попадать во внутренние пустоты, а должен находиться в равномерной сочной массе продукта. Если зонд введен неудачно, то не следует использовать уже имеющееся в продукте отверстие для его повторного введения. Для определения содержания нитрат-ионов в зеленных культурах (салат, укроп, петрушка, кориандр, листья лука репчатого и др.) небольшое количество продукта измельчают до кашицеобразного состояния, и погружают зонд в полученную массу. Нажимают кнопку [ОК], после чего начинается процесс измерения, во время которого на экране высвечивается сообщение «Подождите, идет измерение». Во время измерения стараются держать прибор и анализируемый продукт неподвижно. Через несколько секунд на экране высвечивается резуль-

тат измерения, который показывает, какое количество нитратов (в мг) содержится в 1 кг исследуемого растительного материала. Если результат измерения ниже установленного ПДК, то появляется сообщение «Содержание нитратов в норме». Если результат измерения превышает ПДК не более, чем на 25 %, то появляется сообщение «Незначительное превышение нормы». При более высоких показателях (превышение на 25–50 % и более 50 %) появятся сообщения «Значительное превышение нормы» и «Опасная концентрация нитратов», соответственно. Зонд после анализа протирают сначала тампоном, смоченным в воде, затем тампоном, смоченным в спирте и далее сухой чистой салфеткой. Для выключения прибора нажимают и удерживают кнопку [OK] до появления анимированной заставки, после этого отпускают кнопку [OK].

Таблица 5.5. ПДК нитратов (мг/кг) в овощах и фруктах

Культура	ПДК	Культура	ПДК
Абрикос	60	Морковь ранняя	400
Арбуз	60	Морковь поздняя	250
Банан	200	Нектарин	60
Баклажан	300	Огурец грунтовой	150
Виноград	60	Огурец тепличный	400
Груша	60	Перец сладкий	200
Зелень	2000	Персик	60
Дыня	90	Помидор грунтовой	150
Капуста ранняя	900	Помидор тепличный	300
Капуста поздняя	500	Редис	1500
Кабачок	400	Редька	1000
Картофель	250	Салат	2000
Клубника	100	Свекла	1400
Лук репчатый	80	Хурма	60
Лук зеленый	600	Яблоко	60

По результатам проведенных исследований (с использованием раствора дифениламина, а также нитрат-тестера) для каждого растения составляют ряд интенсивности накопления нитратов в органах и их частях, проводят сравнительный анализ накопления нитратов у разных растений, дают рекомендации по использованию в пищу тех или иных культур.

Контрольные вопросы

1. Какие химические соединения называют нитратами?
2. В чем состоит основное значение нитратов для растений?
3. Каким образом происходит восстановление нитратов в клетках растительного организма?
4. Какие факторы влияют на накопление нитратов растениями?
5. Почему у одних растений нитраты накапливаются в корневой системе, у других – в надземной фитомассе, а у третьих нитраты более-менее равномерно распределяются между корневой системой и надземными органами?
6. Какова опасность для человека употребления в пищу растительной продукции с избыточным содержанием нитратов?

Работа 15

Обнаружение элементов в золе растений микрохимическим методом

Вводные пояснения. Все живые организмы состоят преимущественно из воды и органического вещества. В то же время в любом организме обязательно присутствует некоторое количество химических элементов, которые при полном его разрушении (испарении воды и сгорании органического вещества) никуда не исчезают, а образуют минеральный остаток – *золу*. Такие элементы принято называть *зольными*, или *минеральными элементами*. К ним относятся все химические элементы, за исключением углерода, кислорода, водорода и азота, которые окисляются и улетучиваются в процессе сжигания.

Основным источником минеральных элементов в организмах является земная кора. Из нее элементы поступают в почвы, а затем поглощаются корневыми системами растений главным образом в виде минеральных соединений.

Содержание золы в растениях (*зольность*) колеблется в широких пределах и определяется рядом факторов. Во-первых, зольность зависит от условий произрастания: чем богаче почва по содержанию минеральных элементов и чем суше климат, тем выше содержание золы в растениях. Повышению зольности способствует и высокая степень

насыщенности атмосферы газовыми примесями и пылевыми частицами, несущими разнообразные соединения минеральных элементов. Впоследствии такие вещества могут оседать на поверхность наземных органов растений, закрепляться на них или проникать внутрь органов через кутикулу и устьичные щели. Во-вторых, зольность зависит от физиологической потребности различных органов одного и того же растения в поступающих минеральных элементах. Так, в корнях и стеблях содержание золы составляет в среднем 4–5 %, в листьях – 3–15 %, в семенах – около 3–5 %. Меньше всего образуется золы при сжигании древесины (0,4–1,0 %). Эти цифры показывают, что зольные элементы сконцентрированы в тех органах, метаболические процессы в которых протекают наиболее интенсивно. В-третьих, содержание золы в растении в целом, а также в отдельно взятых его органах определяется его видовыми и сортовыми особенностями. Например, зольность листьев картофеля составляет 5–13 % (в зависимости от сорта), листьев свеклы – 11–15 %, репы – 8–15 %.

Разнообразен и состав золы. Анализы показывают, что почти нет химических элементов, которые не были бы найдены в золе того или иного растения. В ней удается обнаружить даже самые редкие элементы, такие, как золото, уран, лантан, селен, ртуть и др.

Многие элементы, рассеянные в земной коре, способны накапливаться в растениях в большом количестве. Эта особенность может служить основой для поиска полезных ископаемых. Например, бурачок обратнойцевидный [*Alyssum obovatum* (С.А. Мей.) Turcz.] из семейства Капустные (*Brassicaceae*) произрастает только в местах залегания кобальтовых и кобальтово-медных руд и является активным накопителем кобальта, никеля и меди. Астрагал склоненный (*Astragalus pinetorum* Voiss.) из семейства Бобовые (*Fabaceae*) массово произрастает в зонах медно-молибденового оруднения и является концентратом молибдена и меди. Индикатором повышенных содержаний меди в горных породах и, соответственно, накопителем этого же элемента является качим Патрэна (*Gypsophila patrinii* Ser.) из семейства Гвоздичные (*Caryophyllaceae*). Индикатором полиметаллических руд, а также руд цинка и меди выступает дрема широколистная [*Melandrium latifolium* (Poir.) Maire] из семейства *Caryophyllaceae*, которая в наибольшем количестве аккумулирует свинец и цинк. Универсальным индикатором оловосодержащих руд является седмичник ев-

ропейский (*Trientalis europaea* L.) из семейства Первоцветные (*Primulaceae*) и т. д. Растения, накапливающие в своих органах металлы, принято называть *металлофитами*. Кроме металлов растительные организмы способны аккумулировать и неметаллические химические элементы. Например, растения засоленных местообитаний – *галофиты* – характеризуются повышенным содержанием натрия, хлора и брома.

Помимо использования в поиске месторождений полезных ископаемых, растения-аккумуляторы могут быть применены при *фиторе-медиации* – очищении почв, вод и воздуха, загрязненных различными неорганическими примесями, а также в медицине, как *биологически активные добавки (БАД)* к основному пищевому рациону людей, страдающих от недостатка определенных химических элементов.

Детальное изучение минеральных элементов в растениях имеет большое значение. Оно позволяет сопоставить содержание элементов в живом организме и в среде его обитания, особенно в субстрате, на котором растения произрастают.

Присутствие некоторых минеральных химических элементов в исследуемом материале можно выявить *микрхимическим методом*, который предназначен для обнаружения различных веществ в малых по массе образцах. В основе микрхимического метода лежит свойство некоторых солей металлов и неметаллов выпадать в осадок и образовывать характерной формы кристаллы, по которым можно судить о наличии в составе золы того или иного химического элемента.

Цель работы: с помощью микрхимического метода обнаружить в золе растений ряд химических элементов: калий, хлор, кальций, магний, фосфор, железо, серу.

Объект исследования: зола различных видов растений.

Оборудование и реактивы: микроскоп, спиртовка, пробирки (4 шт. на один образец золы) в штативе, воронка стеклянная малая (1 шт. на один образец золы), предметные стекла, стеклянная палочка, шпатель малый, пинцет, препаровальная игла, бумажные фильтры, маркер для стекла, простой карандаш, 10 % раствор соляной кислоты (HCl), 1 % раствор серной кислоты (H₂SO₄), 10 % раствор аммиака, или нашатырный спирт (NH₄OH), 1 % раствор гидротартрата натрия (NaHC₄H₄O₆), 1 % раствор нитрата серебра [Ag(NO₃)₂], 1 % раствор фосфорнокислого натрия (Na₂HPO₄), 1 % раствор молибденовокислого аммония [(NH₄)₂MoO₄] в 1 % азотной кислоте, 1 % раствор калия

железосинеродистого, или желтой кровавой соли – $K_4[Fe(CN)_6]$ в капельницах, дистиллированная вода в стакане.

Ход работы: небольшое равное количество золы растений помещают в две пробирки. Содержимое первой пробирки заливают дистиллированной водой в пятикратном объеме, а второй – 10 % раствором соляной кислоты в пятикратном объеме. Зола настаивают 5 минут и затем отфильтровывают в сухие пробирки. Водный раствор золы исследуют на содержание ионов K^+ и Cl^- . Солянокислый раствор используют для выявления ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , P^{5+} , Fe^{3+} и S^{6+} .

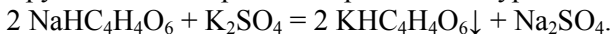
Для обнаружения ионов K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , P^{5+} и S^{6+} готовят препарат. На один конец предметного стекла помещают небольшую каплю фильтрата, на другой – каплю соответствующего реактива и препаративной иглой или стеклянной палочкой соединяют их. В месте соединения образуются продукты реакции²⁵. Для получения кристаллов солей препарат слегка подсушивают над пламенем спиртовки, придерживая предметное стекло за край с помощью пинцета. При подсушивании препарата предметное стекло поднимают высоко над пламенем горелки, слегка передвигая из стороны в сторону. Полученный препарат микроскопируют без использования покровного стекла.

Ионы Cl^- обнаруживают непосредственно в пробирке с водной вытяжкой из золы, оставшейся после определения ионов K^+ . Ионы Fe^{3+} выявляют в фарфоровой чашке, используя остаток солянокислой вытяжки после обнаружения ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , P^{5+} и S^{6+} .

В тетрадь записывают уравнения качественных реакций и зарисовывают форму наблюдаемых кристаллов. Делают вывод о содержащихся в золе химических элементах.

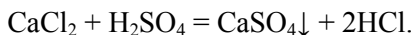
Обнаружение калия. Реактивом на ионы K^+ служит 1 % раствор гидротартрата натрия, который с нейтральным раствором солей калия дает осадок гидротартрата калия ($KHC_4H_4O_6$) в виде крупных призм и пластинок (рис. 5.2).

При обнаружении калия реакция протекает по уравнению:



²⁵ В процессе приготовления препарата необходимо тщательно следить за чистотой препаративной иглы (стеклянной палочки) и предметного стекла. Следует избегать полного перемешивания на предметном стекле каплей вытяжки золы и реактива, так как самые крупные и правильной формы кристаллы образуются именно в тонких межкапельных перемычках.

Обнаружение кальция. В качестве реактива на ионы Ca^{2+} используют 1 % серную кислоту. Реакция протекает с образованием гипса (CaSO_4):



Гипс осаждается на предметном стекле в виде игольчатых кристаллов (рис. 5.2).

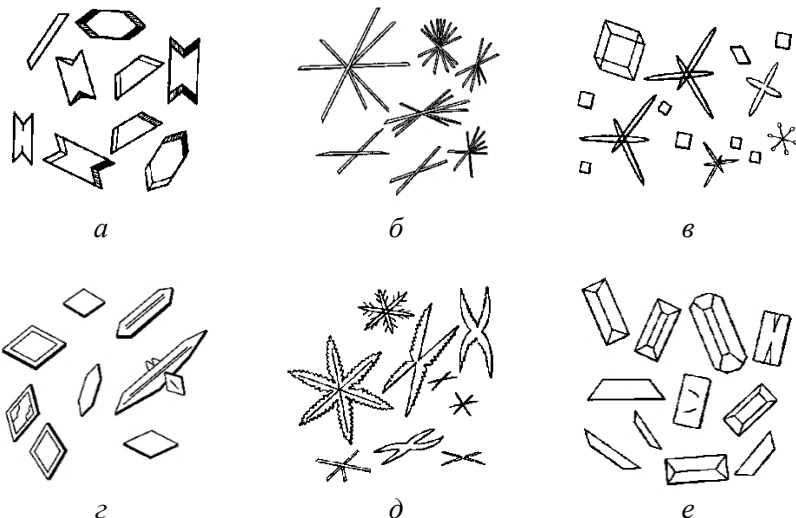
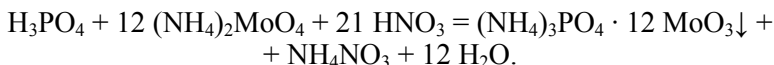


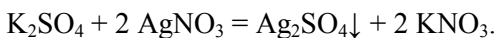
Рис. 5.2. Кристаллы гидротартрата калия (а), гипса (б), аммонийно-фосфорного молибдата (в), сульфата серебра (г), фосфорно-аммиачно-магнезиальной соли в случае быстрой (д) и медленной (е) кристаллизации

Обнаружение фосфора. Для обнаружения фосфора используют 1 % раствор молибденовокислого аммония в 1 % азотной кислоте. Реакция протекает по следующему уравнению:



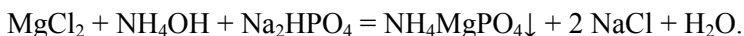
Одним из продуктов реакции является зеленовато-желтый осадок аммонийно-фосфорного молибдата – $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$, кристаллы которого имеют характерную форму (рис. 5.2).

Обнаружение серы. Ионы S^{6+} обнаруживают с помощью 1 % раствора нитрата серебра:

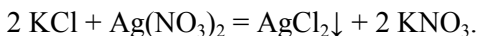


При этом выпадает осадок сульфата серебра (Ag_2SO_4) в форме вытянутых шестиугольников и ромбов (рис. 5.2). Трение стеклянной палочкой на холоде по стеклу в капле продуктов реакции ускоряет выпадение осадка.

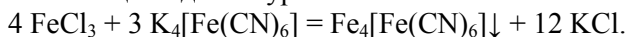
Обнаружение магния. Для обнаружения Mg^{2+} каплю фильтрата сначала нейтрализуют каплей 10 % раствора аммиака, а затем соединяют ее с реактивом, которым служит 1 % раствор фосфорнокислого натрия. В результате химической реакции образуются характерные кристаллы фосфорно-аммиачно-магнезиальной соли (NH_4MgPO_4), которые имеют форму трапеций, призм, октаэдров, а в случае быстрой кристаллизации – звезд, листьев папоротника и крестов (рис. 5.2). Реакция происходит по уравнению:



Обнаружение хлора. Ионы Cl^- обнаруживают нитратом серебра, приливая по каплям реагент в пробирку с 2 мл водной вытяжки из золы. В присутствии ионов Cl^- выпадает белый осадок хлорида серебра ($AgCl_2$):



Обнаружение железа. Для обнаружения Fe^{3+} используют 1 % раствор желтой кровяной соли. Реакцию проводят в фарфоровой чашке, доливая по каплям к остатку солянокислой вытяжки из золы раствор реактива до появления темно-синего осадка берлинской лазури – $Fe_4[Fe(CN)_6]$. Если железа в испытуемом растворе мало, то раствор предварительно упаривают и к охлажденному осадку прибавляют каплю реактива. Реакция идет по уравнению:



Контрольные вопросы

1. Какие химические элементы называют минеральными элементами?
2. Что является источником минеральных элементов в растительных организмах?
3. Какие факторы влияют на содержание золы в растениях? Обоснуйте роль каждого фактора.
4. Какова практическая значимость растений, накапливающих химические элементы?

Раздел 6. РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ

Рост – это необратимое увеличение растения по одному или нескольким параметрам: по числу клеток, линейным размерам, сырой и сухой биомассе. Если рост является количественным явлением, то *развитие* – это качественное явление. В процессе развития растение приобретает новые структуры.

На рост и развитие растения влияют внешние факторы: температура и влажность почвы и воздуха, интенсивность и спектральный состав света, продолжительность дня и ночи, содержание органических и минеральных веществ в питательном субстрате. Важными внутренними факторами регуляции роста и развития являются химические соединения, образующиеся в растении.

Работа 16

Превращение веществ при прорастании семян

Вводные пояснения. Важным компонентом семени является *запас питательных веществ*. Как правило, он сосредоточен в особых запасующих тканях – эндосперме или перисперме. Но если они развиты слабо, то запасные вещества накапливает зародыш, чаще всего – его семядольные листья. Главное назначение запасных веществ – это обеспечение питания проростка в гетеротрофный период его развития.

В семенах масличных культур основными запасными веществами являются *липиды* (*жиры*, или *триглицериды*), содержание которых в семенах льна, горчицы, конопли и подсолнечника достигает 30–50 %, в маке и клещевине – 50–60 %. Липиды локализуются в различных частях семени (эндосперме, осевой части зародыша, семядолях). В клетке запасные липиды откладываются в *сферосомах* (*олеосомах*, или *жировых каплях*), которые представляют собой одномембранные органоиды диаметром 0,5 мкм. В сферосомах содержатся также ферменты, участвующие в гидролизе липидов во время прорастания семени. Образование структурных компонентов липидов – трехатомного спирта глицерина, насыщенных и ненасыщенных с одной двойной связью жирных кислот – происходит в цитоплазме, а ненасыщенных жирных кислот с двумя и тремя двойными связями – в гладком эндоплазматическом ретикулуме. Исходными веществами для синтеза этих компонентов являются углеводы, поступающие в семена из листьев, стеблей и соцветий растения.

Основные запасные вещества злаков – это *углеводы*, в частности – крахмал, молекула которого состоит из двух полисахаридов – амилозы и амилопектина. Соотношение между амилозой и амилопектином изменяется в зависимости от условий внешней среды, в которых происходило формирование семени, но в среднем содержание амилозы составляет 15–25 %, а амилопектина – 75–85 % от общего количества крахмала в зерне. Запасной крахмал откладывается в мучнистой части эндосперма семени: сначала крахмал синтезируется и накапливается в непигментированных пластидах *амилопластах*, затем мембранная структура амилопластов разрушается, и они превращаются в *крахмальные зерна*. Размер крахмальных зерен может составлять 5–50 мкм. Образование крахмала в амилопластах происходит при утилизации простых сахаров, поступающих из окружающей цитоплазмы, и катализируется ферментами *α-глюканфосфорилазой*, *крахмалсинтазой* и *Q-энзимом*. Источником простых сахаров в цитоплазме являются углеводные продукты, транспортируемые из вегетативных органов растения (листьев, стеблей, колосковых чешуй). Кроме крахмала в зерновках злаков накапливаются и другие углеводы, но в меньших количествах: сахара (2–5 % от массы зерна), целлюлоза (2–15 %), гемицеллюлозы, пектиновые вещества, полифруктозиды, слизи (в сумме до 18 %). Сахара (сахароза, моносахариды, мальтоза, раффиноза) ло-

кализуются преимущественно в зародыше и периферийных частях мучнистого эндосперма. Целлюлоза, гемицеллюлоза и пектиновые вещества входят в состав клеточных стенок, семенных оболочек и пленок. Полифруктозиды образуются в зерне на ранних стадиях его созревания, но в дальнейшем распадаются, превращаясь в другие углеводы. Семенные оболочки содержат довольно много слизи особенно у зерновок ржи – *Secale cereale* L. (2–3 %).

Под действием внешних факторов (вода, температура, свет и др.) покой семян снимается, начинается их прорастание. При поглощении воды из субстрата и воздуха семена достигают критической влажности, выше которой жизнедеятельность клеток резко усиливается, ферментативные системы переходят в активное состояние, запускается гидролиз сложных органических веществ до более простых. Уже через двое-трое суток значительная часть крахмала под действием ферментов *амилаз* последовательно расщепляется до полисахаридов декстринов, олигосахарида мальтозы и конечного продукта – моносахарида глюкозы. Липиды под действием ферментов *липаз* и *фосфорилаз* гидролизуются до глицерина и жирных кислот, которые подвергаются дальнейшему окислению с образованием молекул *ацетил-коэнзима А*, вовлекаемого в ключевой этап дыхания клеток – цикл трикарбоновых кислот. Поэтому в прорастающих семенах липиды очень быстро превращаются в углеводы.

На этапе прорастания подвергаются гидролизу и другие основные запасные вещества семени – *белки*. Под действием ферментов *протеаз* они расщепляются до аминокислот, которые служат источником углерода и азота для синтеза белков и других азотистых соединений в клетках развивающегося проростка. Помимо этого в тканях проростка имеются все необходимые ферменты, при участии которых происходит взаимопревращение одних аминокислот в другие путем переаминирования и дезаминирования, что позволяет создать фонд аминокислот, необходимых для растения на данном этапе его развития.

В гетеротрофный период развития проросток получает из запасных веществ семени не только органические вещества, но и элементы минерального питания, например, калий, магний, азот и др.

Для того чтобы установить, что происходит с запасными питательными веществами семени при прорастании, необходимо сравнить химический состав покоящихся и проросших семян.

Цель работы: определить содержание крахмала, моносахаридов и липидов в покоящихся и проросших семенах.

Объекты исследования: покоящиеся и проросшие семена²⁶ пшеницы (*Triticum aestivum* L. или *T. durum* Desf.) и клещевины (*Ricinus communis* L.).

Оборудование и реактивы: микроскоп, секундомер (часы), электроплитка, водяная баня, штатив для пробирок металлический для водяной бани, ступка с пестиком (4 шт.), пробирки в штативе (8 шт.), пипетка лабораторная объемом 10 мл (2 шт.), шпатель малый, держатель для пробирок, скальпель или лезвие безопасной бритвы, предметные и покровные стекла, препаровальная игла, фильтровальная бумага, салфетка, маркер для стекла, фелингова жидкость²⁷, разбавленный раствор йода в йодистом калии (J_2 в KJ)²⁸ в капельнице, раствор красителя судан III²⁹ в капельнице, дистиллированная вода в капельнице и в стакане.

Ход работы: в четырех ступках растирают покоящиеся и проросшие семена пшеницы (по 10 штук) и клещевины (по 3–4 штуки), при этом семена клещевины предварительно очищают от кожуры. Растертую массу переносят в четыре подписанные пробирки, доливают по 5–7 мл воды и ставят в кипящую водяную баню на 10 минут для экстрагирования веществ. После кипячения надосадочную жидкость из каждой пробирки аккуратно сливают в чистые подписанные пробирки,

²⁶ Семена прорастивают в темноте для исключения новообразований органических веществ при фотосинтезе.

²⁷ Фелингова жидкость готовится непосредственно перед началом работы путем смешивания равных объемов раствора № 1 и раствора № 2. Раствор № 1: в колбе на 1 л растворяют 40 г медного купороса ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$) в дистиллированной воде, объем раствора доводят до метки дистиллированной водой, а затем фильтруют. Раствор № 2: растворяют 200 г сегнетовой соли ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4 H_2O$) в дистиллированной воде, добавляют 150 г КОН или NaOH; раствор переливают в мерную колбу на 1 л, объем доводят до метки дистиллированной водой и фильтруют.

²⁸ Растворяют 2 г йодистого калия (KJ) в 5 мл дистиллированной воды, добавляют 1 г йода кристаллического (J_2), после полного растворения которого доливают 295 мл воды. Полученный концентрированный раствор йода в йодистом калии (J_2 в KJ) хранят в темной склянке с притертой пробкой. Для получения разбавленного раствора данный концентрированный раствор разбавляют в 3 раза дистиллированной водой.

²⁹ В фарфоровой чашке растворяют 0,2 г красителя судан III в 20 мл 96 % спирта, добавляют 20 мл глицерина, тщательно перемешивают и фильтруют. Раствор хранят в холодильнике.

куда приливают равный объем фелинговой жидкости. Полученную в пробирках смесь доводят до кипения на водяной бане. При взаимодействии моносахариды восстанавливают фелингову жидкость до оксида меди (I) – Cu_2O , который выпадает на дно пробирки в виде кирпично-красного осадка. По количеству образовавшегося осадка Cu_2O судят о примерном содержании в семенах моносахаридов. Содержание моносахаридов оценивают по 3-балльной шкале: 1 – низкое содержание; 2 – среднее содержание; 3 – высокое содержание. Результаты заносят в табл.

Объект исследования	Содержание веществ, баллы		
	моносахариды	крахмал	липиды
Семена пшеницы покоящиеся			1
Семена пшеницы проросшие			0
Семена клещевины покоящиеся			
Семена клещевины проросшие			

К мезгѐ, оставшейся в исходных пробирках, приливают небольшое количество раствора йода. По интенсивности синего окрашивания мезги судят о примерном содержании крахмала в семенах, которое также оценивают по 3-балльной шкале. Полученные результаты заносят в табл.

Для определения содержания липидов в покоящихся и проросших семенах клещевины приготавливают тонкие срезы семян. Срезы помещают на предметное стекло, обрабатывают раствором краски судан III и накрывают покровным стеклом. Через 5 минут срезы промывают дистиллированной водой и микроскопируют. Содержание липидов оценивают по 3-балльной шкале по количеству и размерам сферосом, окрашенных в красный или оранжевый цвет. Результаты заносят в таблицу. Так как содержание липидов в крахмалистых семенах пшеницы очень низкое и в данной работе не определяется, то в таблице приведено их содержание в баллах.

В заключении делают вывод о характере превращения углеводов и липидов при прорастании крахмалистых (пшеница) и маслянистых (клещевина) семян.

Контрольные вопросы

1. Каково физиологическое значение запаса питательных веществ семени, и в каких морфологических частях семени он сосредоточен?
2. Какие вещества запасаются в семенах масличных культур? Где они локализованы и как синтезируются?
3. Какие углеводы запасаются в зерновках злаков? Из каких компонентов и при участии каких ферментов синтезируется крахмал в семенах?
4. Что происходит с запасными питательными веществами семени при его прорастании?

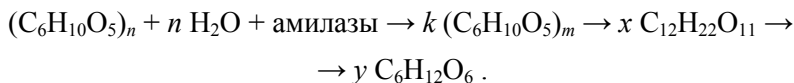
Работа 17

Обнаружение действия амилаз в прорастающих семенах

Вводные пояснения. Одним из запасных питательных веществ растений является полисахарид крахмал – $(C_6H_{10}O_5)_n$. Он накапливается в плодах, клубнях, луковицах и, особенно, в семенах. Больше всего крахмала содержат зерновки злаков, главным образом риса (до 82 %), пшеницы (до 75 %) и кукурузы (до 72 %).

Крахмал в покоящемся семени – это нерастворимое, мало подвижное и недоступное для питания зародыша органическое вещество. Свое физиологическое значение он приобретает только с началом прорастания семени, когда его молекулы начинают распадаться на молекулы более простых, растворимых и доступных для поглощения зародышу веществ. Для осуществления этого процесса требуются ферменты – в основном α - и β -амилазы. Они не только изначально содержатся в эндосперме и зародыше покоящегося семени, но и активно синтезируются *de novo* при его прорастании. Центром синтеза амилаз является щиток развивающегося зародыша.

Под действием α - и β -амилаз крахмал $[(C_6H_{10}O_5)_n]$ гидролизуется до полисахаридов декстринов $[(C_6H_{10}O_5)_m]$, олигосахарида мальтозы $(C_{12}H_{22}O_{11})$ и моносахарида глюкозы $(C_6H_{12}O_6)$, молекулы которых используются как субстрат для дыхания или транспортируются в зародыш для обеспечения процессов его роста и развития:



При нарушении целостности семени амилазы, крахмал и продукты гидролиза крахмала легко диффундируют во внешнюю среду, где могут быть обнаружены с помощью йодной реакции. Йод окрашивает крахмал и продукты его гидролиза в разные цвета: в типично синий (характерный для неизменного крахмала), в сине-фиолетовый и фиолетовый (цвета, присущие продуктам распада крахмала – амилодекстринам), красно-бурый (цвет, характерный для эритродекстринов), и, наконец, желтый (свидетельствующий о расщеплении крахмала до ахродекстринов). Менее сложные углеводы, имеющие степень полимеризации менее 20 единиц, окрашенных комплексов с йодом не образуют.

Обнаружить действие амилаз в прорастающем семени можно на агаре, приготовленном с добавлением крахмала.

Цель работы: с помощью йодной реакции на крахмальном агаре обнаружить действие амилаз в прорастающих семенах пшеницы.

Объект исследования: покоящиеся и прорастающие семена пшеницы (*Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf.).

Оборудование и реактивы: Для обнаружения действия амилаз: секундомер (часы), скальпель или лезвие безопасной бритвы, пинцет, простой и цветные карандаши, чашка Петри с крахмальным агаром, раствор йода в йодистом калии (J_2 в КJ) в капельнице, дистиллированная вода в стакане. Для приготовления крахмального агара³⁰: электроплитка, технические весы, шпатель, термостойкая плоскодонная колба, мерный цилиндр, стеклянный стаканчик, стеклянная палочка, агар-агар, крахмал, дистиллированная вода. Для приготовления раствора йода в йодистом калии³¹: стеклянный стаканчик, стеклянная палочка, капельница, концентрированный раствор йода в йодистом калии (J_2 в КJ), дистиллированная вода.

³⁰ Для приготовления крахмального агара в термостойкую плоскодонную колбу с 2 г измельченного агар-агара приливают 100 мл воды и осторожно кипятят до полного растворения агара. В стеклянном стаканчике разводят 2 г крахмала в 10 мл холодной воды и при помешивании стеклянной палочкой вливают в кипящий раствор агара. Полученную смесь вновь доводят до кипения и сразу разливают по чашкам Петри. Чашки с крахмальным агаром хранят в холодильнике.

³¹ Для приготовления раствора йода в йодистом калии небольшое количество концентрированного раствора йода в йодистом калии (см. лабораторную работу № 16) разбавляют дистиллированной водой в 3 раза.

Ход работы: прорастающие семена пшеницы разрезают пополам скальпелем или лезвием безопасной бритвы и, удерживая пинцетом, слегка смачивают водой и раскладывают срезами вниз на одну половину чашки Петри с крахмальным агаром. Аналогичные действия проводят с покоящимися семенами, которые раскладывают на другую половину чашки. Чашку Петри закрывают крышкой и оставляют на один час. По истечении указанного времени семена осторожно снимают пинцетом, а пластинку агара обливают раствором йода. Результаты работы оформляют в виде рисунка, на котором показывают окраску отпечатков семян на агаре. Делают вывод о гидролитической активности амилаз в покоящихся и прорастающих семенах пшеницы.

Контрольный вопрос

1. Как происходит гидролиз крахмала в прорастающих семенах и каким образом можно обнаружить продукты его гидролиза?

Раздел 7. УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ

Растения часто подвергаются действию неблагоприятных факторов окружающей среды, которые принято называть *стрессорами*. Стрессоры бывают абиотического и биотического происхождения. К числу *абиотических стрессоров* относятся: экстремальные температуры, недостаток влаги в почве и воздухе (*засуха*), высокое содержание ионов в почве (*почвенное засоление*), недостаток кислорода (*гипоксия*), очень высокая или очень низкая освещенность, повышенное содержание токсичных газов (NO_2 , SO_2 и пр.) в атмосфере и другие. К *биотическим стрессорам* принадлежат *патогены* (болезнетворные вирусы, грибы и бактерии) и растительноядные насекомые. В этой связи под *устойчивостью* понимают способность растения сохранять постоянство внутренней среды и осуществлять жизненный цикл в условиях действия стрессоров.

Работа 18

Защитное действие сахарозы на цитоплазму При отрицательных температурах

Вводные пояснения. Растения относятся к числу *пойкилотермных организмов*, температура тела которых меняется в зависимости от температуры окружающей среды. В этой связи значение тепла для растений сложно переоценить: оно влияет практически на все процессы жизнедеятельности – фотосинтез, дыхание, транспирацию, прорастание семян, рост побегов, цветение и многие другие. Разные виды растений нуждаются в тепле неодинаково, поэтому разнообразие тепловых условий на планете во многом определяет границы ареалов, их топографическое размещение, а также зональную структуру растительного покрова.

Способность растений переносить охлаждение ниже 0 °С называется *морозостойкостью*. Негативное действие отрицательных температур на растительные организмы связано, в первую очередь, с образованием льда в межклетниках и клетках. При медленном замораживании лед образуется в межклетниках, и клетки после оттаивания, как правило, остаются живыми. При быстром охлаждении вода замерзает в периплазматическом пространстве, и в этом случае происходит повреждение поверхностных слоев цитоплазмы. При очень быстром замораживании свободная вода не успевает выйти из протопласта, и лед образуется внутри плазмы клетки (сначала в гиалоплазме, затем в клеточном соке), при этом клетка в основном погибает вследствие механических повреждений протопласта кристаллами льда.

Во-вторых, повреждение клеток при замораживании связано с их дегидратацией. Обезвоживание клетки происходит вследствие концентрирования раствора, находящегося в межклеточном пространстве, из-за образования в нем льда. В результате этого протопласты, отдающие воду, сжимаются, и содержание растворенных в них солей и органических кислот возрастает до токсичных концентраций. Перемещение воды и замерзание продолжают до тех пор, пока не установится равновесие сосущих сил между льдом и водой протопласта.

В холодное время года внеклеточное замерзание воды и связанное с ним обезвоживание способны успешно переносить *морозостойкие (льдоустойчивые) растения*, к числу которых относятся пшеница мяг-

кая (*Triticum aestivum* L.), ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.), овес посевной (*Avena sativa* L.), горох посевной (*Pisum sativum* L.), свекла обыкновенная (*Beta vulgaris* L.), капуста огородная (*Brassica oleracea* L.), некоторые наземные и пресноводные водоросли, водоросли приливной зоны, многочисленные многолетние наземные сосудистые растения областей с холодной зимой и все мхи. В теплый период года эти виды выдерживают заморозки до $-8...-10^{\circ}\text{C}$.

Устойчивость растений к действию отрицательных температур связана с синтезом в растительных клетках *криопротекторов* – белков, углеводов, гликопротеидов, многоатомных спиртов, аминокислот и других веществ, которые могут предотвратить или резко замедлить рост кристаллов льда. Гидрофильные белки, моно- и олигосахариды, обладающие криопротекторными свойствами, способны связывать значительные количества воды. Связанная таким образом вода уже не замерзает и не транспортируется из клетки.

Высокими протекторными свойствами в отношении действия отрицательных температур обладают растворимые сахара (сахароза, рафиноза, фруктозиды, сорбит, маннит и др.), которые накапливаются в цитоплазме и клеточных стенках растений при действии низких температур. Помимо того, что они повышают осмотическое давление и водоудерживающую способность клеток, сахара препятствуют образованию или уменьшают концентрацию эндогенных токсичных веществ (ацетальдегида, этанола и пр.), которые образуются при обезвоживании клеток. Наконец, сахара предотвращают изменения в биомембранах, происходящие на фоне отрицательных температур³².

О нарушении полупроницаемости мембран под действием отрицательных температур можно судить по выходу из растительных клеток пигментов и интенсивности окрашивания ими внешнего раствора.

Цель работы: доказать существование протекторных свойств у растворов сахарозы в отношении мембран растительных клеток при действии отрицательной температуры.

Под действием мороза мембранные белки дегидратируются и денатурируют, а фосфолипиды гидролизуются с образованием фосфорной кислоты. В итоге поврежденные мембраны теряют полупроницаемость, потеря воды и жизненно важных минеральных и органических веществ клетками усиливается, тургор падает, межклетники заполняются водой.

Объект исследования: корнеплод свеклы столовой (*Beta vulgaris* var. *rubra* L.).

Оборудование и реактивы: микроскоп, секундомер (часы), калькулятор, термометр до $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, пробирки в штативе (3 шт.), пипетка лабораторная на 5 мл, предметные стекла (3 шт.), покровные стекла, фарфоровая тарелка, пробочное сверло диаметром 5 мм, нож, пинцет, лезвие безопасной бритвы, фильтровальная бумага, маркер для стекла, 1,0 М раствор сахарозы ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), 0,5 М раствор сахарозы, 1,0 М раствор нитрата калия (KNO_3) в капельнице, дистиллированная вода, стакан с водопроводной водой комнатной температуры, охлаждающая смесь³³ в широкогорлом металлическом термосе.

Ход работы: из корнеплода столовой свеклы при помощи пробочного сверла вырезают три одинаковых кусочка длиной 2 см, тщательно промывают их водопроводной водой, подсушивают фильтровальной бумагой и помещают по одному в три пробирки. После этого в первую пробирку наливают 5 мл дистиллированной воды, во вторую – 5 мл 0,5 М раствора сахарозы, в третью – 5 мл 1,0 М раствора сахарозы. Пробирки подписывают и помещают в охлаждающую смесь, находящуюся в термосе.

Через 20 минут пробирки вынимают из охлаждающей смеси и опускают в стакан с водопроводной водой комнатной температуры. После оттаивания содержимое пробирок встряхивают и визуально отмечают интенсивность окраски растворов и высечек³⁴. Результаты наблюдений заносят в табл.

Лезвием безопасной бритвы делают тонкие срезы с трех высечек, помещают их на предметные стекла в каплю 1,0 М раствора KNO_3 , накрывают покровными стеклами и следят в микроскоп за изменениями в клетках. В каждом варианте подсчитывают количество клеток в поле зрения микроскопа и количество плазмолизированных клеток.

³³ Охлаждающая смесь готовится из 3 частей снега или колотого льда и 1 части поваренной соли. Температура охлаждающей смеси составляет около $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$.

³⁴ Окраска столовой свеклы обусловлена красными пигментами *бетацианинами*, которые синтезируются в цитоплазме клетки, а затем транспортируются в вакуоль и депонируются в ней. Молекулы бетацианинов хорошо растворимы в воде. Диффузия бетацианинов из вакуоли во внешнюю среду может проходить достаточно быстро при действии различных факторов и агентов, вызывающих изменение проницаемости мембран (тонопласта и плазмалеммы).

На основании полученных данных рассчитывают отношение числа плазмолизированных клеток к их общему числу.

Вариант	Интенсивность окраски внешнего раствора	Интенсивность окраски высечки	Число клеток в после зрения микроскопа		Отношение числа плазмолизированных клеток к их общ. числу, %
			всего	плазмолизированных	
Вода					
0,5 М раствор сахарозы					
Вариант	Интенсивность окраски внешнего раствора	Интенсивность окраски высечки	Число клеток в после зрения микроскопа		Отношение числа плазмолизированных клеток к их общ. числу, %
			всего	плазмолизированных	
1,0 М раствор сахарозы					

По результатам работы делают выводы о значении сахарозы как защитного вещества при действии отрицательных температур.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под термином «морозоустойчивость», и какие растения называют морозостойкими?
2. Каковы негативные последствия действия отрицательных температур на клетки растений?
3. Какие вещества называют криопротекторами, и какие функции они выполняют в клетке?

Работа 19

Защитное действие сахарозы на белки цитоплазмы при отрицательных температурах

Вводные пояснения. При повреждении клетки отрицательными температурами нарушается структура белков цитоплазмы и происхо-

дит их коагуляция. Выпадение хлопьевидного осадка белков из вытяжки растительной ткани служит показателем такого повреждения.

Сахароза стабилизирует нативную структуру белков, защищая их от негативного влияния отрицательных температур.

Цель работы: продемонстрировать криопротекторные свойства сахарозы в отношении белков цитоплазмы.

Объект исследования: клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L.).

Оборудование и реактивы: секундомер (часы), термометр до – 25 °С, пробирки в штативе (3 шт.), пипетка лабораторная градуированная на 5 мл (2 шт.), химический стакан, фарфоровая тарелка, нож, терка с мелкими отверстиями, ножницы, марля, маркер для стекла, 1,0 М раствор сахарозы (C₁₂H₂₂O₁₁), 0,5 М раствор сахарозы, дистиллированная вода, стакан с водопроводной водой комнатной температуры, охладительная смесь³⁵ в широкогорлом металлическом термосе.

Ход работы: клубень картофеля очищают и натирают на мелкой терке. Из полученной мякоти отжимают сок в стакан через двойной слой марли. После того, как основная масса крахмала осядет на дно, надосадочную жидкость наливают в три пробирки по 3 мл. В первую пробирку добавляют 3 мл дистиллированной воды, во вторую – 3 мл 0,5 М раствора сахарозы, в третью – 3 мл 1,0 М раствора сахарозы. Содержимое пробирок тщательно перемешивают. Пробирки подписывают и ставят в охладительную смесь.

Через 20 минут пробирки с растворами вынимают из охладительной смеси и, не встряхивая, размораживают в стакане с водопроводной водой комнатной температуры. Результаты опыта зарисовывают в тетрадь, отмечая варианты, в которых содержимое пробирок осталось в состоянии золя или выпал хлопьевидный осадок белков. Делают вывод о защитном действии сахарозы на белки цитоплазмы при отрицательных температурах.

Контрольный вопрос

1. Что происходит с белками цитоплазмы под действием отрицательных температур?

³⁵ Способ приготовления охладительной смеси дан в лабораторной работе № 18.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аксенова Л.А. Физиология растений: учеб. пособие. М.: Открытый лицей ВЗМШ; Книжный дом «Университет», 1999. 112 с.
2. Алексеенко В.А. Геоботанические исследования для решения ряда экологических задач и поисков месторождений полезных ископаемых: учеб. пособие. М.: Логос, 2011. 244 с.
3. Артамонов В.И. Занимательная физиология растений. М.: Агропромиздат, 1991. 336 с.
4. Березина Н.А., Афанасьева Н.Б. Экология растений: учеб. пособие. М.: Издательский центр «Академия», 2009. 400 с.
5. Большой практикум по физиологии растений. Минеральное питание. Физиология клетки. Рост и развитие: учеб. пособие / И.А. Чернавина, Н.Г. Потапов, Л.Г. Косулина [и др.]; под ред. Б.А. Рубина. М.: Высш. школа, 1978. 408 с.
6. Борисова Г.Г., Малева М.Г., Чукина Н.В. Растение и стресс: курс лекций. Екатеринбург: Уральский государственный университет им. А.М. Горького, 2008. URL: http://elar.urfu.ru/bitstream/10995/1580/4/1333214_lectures.pdf.
7. Ботаника. Анатомия и морфология растений / А.Е. Васильев, Н.С. Воронин, А.Г. Еленевский [и др.]. М.: Просвещение, 1978. 480 с.
8. Бухарина И.Л., Любимова О.В. Физиология растений: метод. пособие. Ижевск: Ижевская ГСХА, 2009. 59 с.
9. Вайнар Р. Движение у растений / пер. с нем. А.Н. Сладкова. М.: Знание, 1987. 176 с.
10. Васильева З.В., Кириллова Г.А. Руководство к практическим занятиям по физиологии растений: пособие для студ. педвузов. М.: Просвещение, 1968. 79 с.
11. Викторов Д.П. Малый практикум по физиологии растений: учеб. пособие. М.: Высш. школа, 1983. 135 с.
12. Воскресенская О.Л., Грошева Н.П., Скочилова Е.А. Физиология растений: учеб. пособие. Йошкар-Ола: Марийский гос. ун-т, 2008. 148 с.
13. Гайдукова Б.М., Харитонов С.В. Техника и технология лабораторных работ: учеб. пособие. М.: Изд. центр «Академия», 2006. 128 с.
14. Глинка Н.Л. Общая химия: учеб. пособие. М.: КНОРУС, 2014. 752 с.

15. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. Киев: Наукова думка, 1973. 592 с.
16. Грязнов В.П., Сиротина Л.В. Практикум по физиологии растений: учеб. пособие. Белгород: Изд-во Белгород. гос. ун-та, 2000. 68 с.
17. Добровольский В.В. Основы биогеохимии: учеб. пособие. М.: Изд. центр «Академия», 2003. 400 с.
18. Камия Н. Движение протоплазмы. М.: Иностранная литература, 1962. 306 с.
19. Кахнович Л.В. Фотосинтез: метод. рек. Минск: БГУ, 2003. 88 с.
20. Косулина Л.Г., Луценко Э.К., Аксенова В.А. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. Ростов н/Д.: Изд-во Ростов. ун-та, 2009. 236 с.
21. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений: учебник для вузов. М.: Высшая школа, 2005. 736 с.
22. Лебедев С.И. Физиология растений. М.: Агропромиздат, 1988. 544 с.
23. Малый практикум по физиологии растений: учеб. пособие / Т.А. Власова, В.Ф. Гавриленко, И.П. Ермаков [и др.]; под ред. А.Т. Мокроносова. М.: Изд-во МГУ, 1994. 184 с.
24. Медведев С.С. Электрофизиология растений: учеб. пособие. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 1997. 182 с.
25. Медведев С.С. Физиология растений: учебник. СПб.: БХВ-Петербург, 2012. 512 с.
26. Некрасова Г.Ф., Киселева И.С. Руководство к лабораторным и полевым работам по «Экологической физиологии растений». Екатеринбург: Уральский гос. ун-т, 2008. 157 с.
27. Овчинникова Т.А., Панкратов Т.А., Авдеева Н.В. Практикум по физиологии растений: метод. указания. Самара: Изд-во «Самарский университет», 1999. 62 с.
28. Оприлов В.А. H^+ -АТФаза плазматической мембраны – основная электрогенная система высших растений // Соросовский образовательный журнал. 2000. № 3. Т. 6. С. 28–32.
29. Панфилова О.Ф., Пильщикова Н.В., Фаттахова Н.Н. Практикум по физиологии и биохимии растений: учеб. пособие. М.: Изд-во РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, 2012. 50 с.

30. Полевой В.В. Физиология растений: учебник. М.: Высш. школа, 1989. 464 с.
31. Полевой В.В., Саламатов Т.С. Физиология роста и развития растений: учеб. пособие. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1991. 240 с.
32. Практикум по физиологии растений / под ред. И.И. Гунара. М.: Колос, 1972. 168 с.
33. Практикум по физиологии растений / И.В. Плотникова, Е.А. Живухина, О.Б. Михалевская [и др.]; под ред. В.Б. Иванова. М.: Изд. центр «Академия», 2001. 144 с.
34. Практикум по физиологии растений / Н.Н. Третьяков, Л.А. Паничкин, М.Н. Кондратьев [и др.]. М.: КолосС, 2003. 288 с.
35. Практикум по физиологии растений: учеб.-метод. пособие / В.Н. Воробьев, Ю.Ю. Невмержицкая, Л.З. Хуснетдинова [и др.]. Казань: Казанский университет, 2013. 80 с.
36. Реймерс Н.Ф. Популярный биологический словарь. М.: Наука, 1990. 544 с.
37. Словарь ботанических терминов / под ред. И.А. Дудки. Киев: Наукова Думка, 1984. 307 с.
38. Сыренжапова А.С., Лаврентьева И.Н., Рузавин Ю.Н. Физиология растений: учеб.-метод. пособие. Улан-Удэ: изд-во БГСХА им. В.Р. Филиппова, 2009. 165 с.
39. Устименко О.П. Практикум по дисциплине «Физиология растений». Усурийск: Приморская ГСХА, 2013. 135 с.
40. Физиология и биохимия растений: словарь терминов и понятий: учеб. пособие / В.Б. Шукин, Н.Д. Кононова, Н.В. Ильясова [и др.]. Оренбург: Издательский центр ОГАУ, 2013. 144 с.
41. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений / Н.Н. Третьяков, Е.И. Кошкин, Н.М. Макрушин [и др.]; под ред. Н.Н. Третьякова. М.: Колос, 2000. 640 с.
42. Физиология растений: учебник для вузов / Н.Д. Алехина, Ю.В. Балнокин, В.Ф. Гавриленко [и др.]; под. ред. И.П. Ермакова. М.: Изд. центр «Академия», 2007. 640 с.
43. Физиология растений: лабор. практикум / А.П. Кудряшов, Т.И. Дитченко, О.В. Молчан [и др.]. Минск: БГУ, 2011. URL: <http://www.elib.bsu.by>.
44. Физиология растительной клетки: метод. рекомендации / В.М. Юрин, А.П. Кудряшов, Т.И. Дитченко [и др.]. Минск: БГУ, 2009. 28 с.

45. Щукин В.Б., Громов А.А. Практикум по физиологии растений. Оренбург: Изд. центр ОГАУ, 2008. 176 с.
46. Юсуфов А.Г. Эволюционная физиология растений: учеб. пособие. М.: Высш. школа, 1996. 255 с.
47. Якушкина Н.И. Физиология растений: учеб. пособие. М.: Просвещение, 1980. 303 с.
48. Якушкина Н.И., Бахтенко Е.Ю. Физиология растений: учебник. М.: ВЛАДОС, 2005. 463 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Техника безопасности в лаборатории

1. В лаборатории используются кислоты, щелочи и другие опасные вещества. Чтобы избежать случайных ожогов и загрязнений одежды и тела, студенты допускаются к работе только в лабораторных халатах.

2. Запрещается загромождать рабочие места и проходы между столами посторонними предметами, сорить, шуметь, принимать пищу на рабочих местах, а также трогать и перемещать оборудование, реактивы и другие предметы, не имеющие отношения к выполняемой работе.

3. Запрещается без разрешения преподавателя проводить какие-либо опыты, не относящиеся к данной работе, или изменять их последовательность.

4. Нельзя уносить приборы и реактивы общего пользования на свое рабочее место.

5. Категорически запрещается пользоваться лабораторной посудой для еды и питья, употреблять в пищу приготовленные в качестве объектов исследования луковицы, корнеплоды, семена, т. к. они могут быть протравлены.

6. Пробирки при нагревании следует закреплять либо в штативной лапке, либо в пробиркодержателе ближе к отверстию пробирки. Отверстие пробирки необходимо направлять от себя и окружающих во избежание поражения при выбросе веществ из пробирки.

7. Особенно внимательно следует проводить сборку установок из стекла. Нельзя зажимать стеклянные изделия в лапки штативов без соответствующей мягкой подкладки. С предельной осторожностью следует обращаться с термометрами, тонкостенной посудой, кровяными стеклами.

8. Необходимо избегать непосредственных контактов кожи, глаз, дыхательных путей и слизистых оболочек с реактивами. Все работы с ядовитыми и сильнопахнущими веществами, с концентрированными растворами кислот и щелочей следует проводить только в вытяжном шкафу. Створки шкафа во время работы должны быть опущены до 18–20 см от его рабочей поверхности. Руки должны быть защищены

перчатками, глаза – очками. Отбирать в пипетку любые вещества следует при помощи сифона или резиновой груши.

9. С легковоспламеняющимися жидкостями нельзя работать вблизи нагревательных приборов и открытого пламени. В случае воспламенения горючих веществ следует быстро загасить горелку, выключить вентиляцию вытяжного шкафа, обесточить электронагревательные приборы, убрать сосуды с огнеопасными веществами. Очаг пожара погасить всеми имеющимися в распоряжении средствами: песком, асбестовым одеялом, огнетушителем. Горящие жидкости ни в коем случае не следует заливать водой.

10. Запрещается выливать в раковину органические растворители, крепкие кислоты, щелочи и другие сильно действующие вещества. Для слива реактивов используют специальные сосуды, установленные в вытяжном шкафу.

11. Перед работой с прибором студенты обязаны прочно усвоить принцип его действия и основные правила эксплуатации.

12. Обращаться с нагревательными приборами следует осторожно. Запрещается работать с неисправным оборудованием и приборами. Категорически запрещается использовать для подключения электроприборы с оголенными проводами или поврежденной изоляцией. При перегорании спирали электроплитку необходимо отключить от электросети.

13. После окончания лабораторного занятия дежурные проверяют отключение всех приборов от электросети, состояние водопроводных кранов, сохранность и чистоту лабораторного оборудования, порядок в лаборатории и отчитываются об этом преподавателю или лаборанту.

14. О любом происшествии в лаборатории, даже самом незначительном, необходимо сообщить преподавателю или лаборанту.

Оказание первой помощи при несчастных случаях

Для оказания первой помощи в лаборатории имеется аптечка. Основные правила первой помощи предполагают следующее:

1. *При мелких порезах стеклом* удаляют осколки из раны, дезинфицируют ее раствором йода и перевязывают бинтом.

2. При ожоге рук или лица химическим реактивом смывают большим количеством воды, затем в случае ожога щелочью – 1 % раствором уксусной кислоты, в случае ожога кислотой – 3 % раствором пищевой соды или борной кислоты, а затем опять водой. Одежду, соприкасавшуюся с реактивом, снимают.

3. При ожоге горячей жидкостью или горячим предметом обожженное место выдерживают под проточной холодной водой в течение 5–10 минут.

4. При попадании химического вещества в глаза их промывают в течение 10–15 минут струей теплой воды так, чтобы она стекала от носа к виску. В любом случае пострадавшего немедленно доставляют к врачу.

5. При попадании ядовитого вещества внутрь выпивают большое количество теплого раствора поваренной соли (3–4 чайные ложки на стакан воды) и вызывают рвоту. Если пострадавший потерял сознание или если отравление вызвано проглатыванием растворителя, кислоты или щелочи, то рвоту вызывать нельзя. Пострадавшего переносят на свежий воздух, оставляют в покое и немедленно вызывают бригаду скорой помощи.

6. При поражении электрическим током быстро отключают электроэнергию, выносят пострадавшего на свежий воздух и при необходимости делают ему искусственное дыхание и непрямой массаж сердца. Вызывают бригаду скорой помощи.

Для заметок

Учебное издание

Макарова Юлия Владимировна

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Лабораторный практикум

Редактор *Л. А. Кнохинова*

Подготовка оригинал-макета *Л. Н. Законовой*

Подписано в печать 16.05.2017.

Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная. Печать оперативная.

Печ. л. 7,0. Тираж 25 экз. Заказ № Арт.- 24/2017.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени академика С. П. КОРОЛЕВА»
(Самарский университет)

443086, САМАРА, МОСКОВСКОЕ ШОССЕ, 34.

Изд-во Самарского университета.

443086, Самара, Московское шоссе, 34.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени академика С.П. КОРОЛЕВА»
(Самарский университет)

Ю.В. МАКАРОВА

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

САМАРА
2017

ISBN 978-5-7883-1144-9



9 785788 311449