

Министерство образования и науки Республики Казахстан
Костанайский государственный университет имени А.Байтурсынова
Кафедра биологии и химии

Г.Ж. Султангазина

БИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ
(Физиология растений)

Учебное пособие

Костанай, 2017

УДК 581.1(075.8)

ББК 28.57 я73

С 89

Рецензенты:

Ситпаева Гульнара Токбергеновна - доктор биологических наук, Институт ботаники и фитоинтродукции Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

Айдарханова Гульнар Сабитовна - доктор биологических наук, доцент кафедры управления и инжиниринга в сфере охраны окружающей среды Евразийского национального университета им. Л.Н. Гумилева

Ручкина Галия Адгамовна - кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии и химии Костанайского государственного университета имени А. Байтурсынова

Автор:

Султангазина Гульнара Жалеловна, кандидат биологических наук, доцент С 89 Султангазина Г.Ж.

Биология растений (физиология растений). Учебное пособие предназначено для студентов сельскохозяйственных, биологических и технических специальностей. – Костанай, 2017. – 107 с.

ISBN 978-601-7387-72-3

В учебном пособии рассмотрены процессы жизнедеятельности и функции растений на клеточном, молекулярном уровнях и на уровне целостного организма. Представлены основные физиолого-биохимические методы изучения физиологии и биохимии растительной клетки, водного обмена, фотосинтеза, дыхания, минерального питания, роста и развития, приспособленности и устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды.

Учебное пособие предназначено для обучающихся сельскохозяйственных, биологических и технических специальностей.

УДК 581.1(075.8)

ББК 28.57 я73

Утверждено и рекомендовано к изданию Учебно-методическим советом Костанайского государственного университета имени А.Байтурсынова, 26.04.2017 г., протокол № 3

ISBN 978-601-7387-72-3

© Султангазина Г., 2017

Содержание

Введение	5
1 Физиология растительной клетки	7
1.1 Проницаемость живой и мертвой цитоплазмы для веществ клеточного сока	10
1.2 Влияние анионов и катионов на форму и время плазмолиза	11
1.3 Наблюдение колпачкового плазмолиза	12
1.4 Определение жизнеспособности семян методом окрашивания (по Д. Н. Нелюбову)	13
1.5 Определение изоэлектрической точки растительной ткани колориметрическим методом	14
2 Водный обмен растений	17
2.1 Определение содержания воды и сухого вещества в растительном материале	19
2.2 Определение состояния устьиц методом инфильтрации по Молишу ...	21
2.3 Определение осмотического давления клеточного сока плазмолитическим методом	22
2.4 Определение водного потенциала растительной ткани методом полосок (по Лилиенштерн)	24
2.5 Определение водного потенциала листьев методом Шардакова	25
2.6 Сравнение транспирации верхней и нижней сторон листа хлоркобальтовым методом	26
2.7 Определение интенсивности транспирации у срезанных листьев при помощи торсионных весов	27
2.8 Определение интенсивности транспирации и относительной транспирации с помощью технических весов	29
2.9 Определение водоудерживающей способности растений методом «завядания» по А.Арланду	32
2.10 Определение продуктивности транспирации и транспирационного коэффициента	33
3 Фотосинтез	35
3.1 Получение спиртового раствора (вытяжки) пигментов	37
3.2 Разделение пигментов по Краусу	37
3.3 Омыление хлорофилла щелочью	38
3.4 Получение феофитина и обратное замещение водорода атомом металла	38
3.5 Оптические свойства пигментов	39
3.6 Определение площади листьев	42
3.7 Определение интенсивности фотосинтеза методом ассимиляционной колбы (по Л.А.Иванову и Н.Л.Косович)	44
3.8 Определение интенсивности фотосинтеза по накоплению органического углерода (метод И.В.Тюрина, измененный Ф.З.Бородулиной)	47

3.9	Определение чистой продуктивности фотосинтеза	48
4	Дыхание растений	51
4.1	Потеря сухого вещества при прорастании семян	55
4.2	Определение интенсивности дыхания в закрытом сосуде	56
4.3	Определение интенсивности дыхания прорастающих семян в токе воздуха с помощью инфракрасного газоанализатора	58
4.4	Определение дыхательного коэффициента прорастающих семян	59
5	Минеральное питание	61
5.1	Изучение влияния элементов питания на рост растений	64
5.2	Рост корней пшеницы в растворе чистой соли и смеси солей	68
5.3	Микрохимический анализ золы	69
5.4	Определение общей и рабочей адсорбирующей поверхности корневой системы методом Сабинина и Колосова	70
6	Рост и развитие растений	73
6.1	Наблюдение периодичности роста побега	76
6.2	Определение силы роста семян методом морфофизиологической оценки проростков	76
6.3	Определение физиологической активности гиббереллинов в биотесте с удлинением гипокотилей проростков двудольных растений	78
6.4	Установление фотопериодической реакции горчицы сарептской	79
7	Приспособление и устойчивость растений	81
7.1	Выявление защитного действия сахаров на протоплазму	84
7.2	Ранняя диагностика устойчивости растений к вымоканию	85
7.3	Защитное действие сахарозы на белки при отрицательных температурах	85
7.4	Влияние сахарозы на морозоустойчивость растительных клеток	86
7.5	Способ закаливания и определение морозоустойчивости озимых с использованием экзогенных сахаров	88
7.6	Определение жаростойкости растений (по Ф.Ф. Мацкову)	89
7.7	Влияние высокой температуры на проницаемость цитоплазмы	89
7.8	Определение засухоустойчивости растений методом крахмальной пробы	91
7.9	Определение температурного порога коагуляции цитоплазмы (по П.А. Генкелю)	91
7.10	Определение солеустойчивости по ростовым процессам	92
8	Преобразование органических веществ в растениях	94
8.1	Обнаружение запасных сахаров в растительном материале	96
8.2	Обнаружение запасных белков в растениях	98
8.3	Кислотный гидролиз крахмала	99
8.4	Определение содержания суммарных белков	100
8.5	Определение активности липаз в процессе прорастания семян	104
	Список использованных источников	107

Введение

Физиология растений является одной из фундаментальных основ общебиологической подготовки обучающихся сельскохозяйственных, биологических и технических специальностей.

Исследование физиологических процессов, происходящих в растениях, возможно только при глубоком знании связи физиологии растений с неорганической, органической, биологической и физколлоидной химией, анатомией и морфологией растений, почвоведением, агрохимией, селекцией, генетикой, земледелием, овощеводством, плодоводством, растениеводством, а также математикой, физикой и кибернетикой.

Физиология растений, опираясь на законы и закономерности, совершенствует теоретические основы роста и развития растительного организма в целом и отдельных его органов с учетом почвенных и климатических особенностей. Жизнь, как особая форма движения материи, в основе своей одинакова как для растений, так и для животных. Умение вскрывать присущие физиологическим процессам противоречия, конкретизировать физиологические явления в различных видах и сортах растений расширяет и углубляет возможности активного вмешательства человека в физиологические процессы растений, позволяет овладеть этими процессами, направлять их течение согласно поставленным целям. Умение ориентироваться в процессах, протекающих в растениях, является необходимым условием для каждого специалиста агропромышленного комплекса.

Физиология растений является динамично развивающейся наукой, постоянно совершенствуются методы физиолого-биохимических исследований, создаются высокоточные приборы, позволяющие получать новую информацию о структуре и свойствах биогенных соединений, обеспечивающих участие и синхронность протекания метаболических процессов в живых организмах.

Целью физиологии растений в большей степени является логичное и полное объяснение процессов в растительном организме в соответствии с известными физическими и химическими законами. Это требует использования физических, химических методов, и активно развивающихся в последнее время методов биологической статистики.

«Биология растений» является дисциплиной обязательного компонента, установленной Типовым учебным планом специальности 5В080100-Агрономия, и состоит из двух разделов: ботаники и физиологии растений. Предлагаемое учебное пособие выполнено по второму разделу и позволяет сформировать знания, творческие навыки для самостоятельной экспериментальной деятельности обучающихся в области физиологии растений.

Для студентов специальностей 5В060700-Биология, 5В060600-Экология, 5В072700 - Технология продовольственных продуктов, 5В072800 - Технология перерабатывающих производств «Биология растений (физиология растений)» может быть рекомендована как элективная базовая дисциплина.

Учебное пособие по дисциплине «Биология растений (физиология растений)» предназначено для студентов сельскохозяйственных, биологических и технических специальностей и по своему содержанию соответствует программе курса, используемых при подготовке соответствующих специалистов. В работе изложены современные теоретические основы физиологии растений. Рассмотрены методы изучения физиологии растительной клетки; водного обмена; фотосинтеза; дыхания; минерального питания; обмена веществ; роста и развития растений, устойчивости растений к неблагоприятным внешним факторам. Наряду с классическими, пособие включает новые работы, апробированные в течение ряда лет на кафедре биологии и химии Костанайского государственного университета имени А.Байтурсынова. Выполнение всех работ за время, отводимое учебным планом, невозможно, преподаватель может выбрать те работы, выполнение которых возможно в предоставленных ему условиях.

Освоение практических знаний и навыков по данной дисциплине позволит обучающимся составить представление о физиологических процессах в растительном организме, методах их исследования, что составит базисные знания, необходимые для понимания в дальнейшем таких предметов, как агрохимия, растениеводство, биотехнология, биоинженерия и др.

Приобретенные на занятиях навыки экспериментальной работы могут быть использованы при выполнении курсовой, дипломной работ, организации научно-исследовательской работы обучающегося.

Выполнение каждой лабораторной работы предваряет краткий теоретический курс по изучаемой теме. В каждой работе дано описание принципа исследования, приводятся детализированные лабораторные методики. По результатам работы студентам предлагается сформулировать основные выводы и ответить на контрольные вопросы.

В качестве основных учебников были использованы:

1 Зитте П., Вайлер Э.В., Кадерайт Й.В., Брезински А., Кернер К. Ботаника. Т.2 Физиология растений. - М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 496 с.

2 Третьяков Н.Н., Паничкин Л.А., Кондратьев М.Н. и др. Практикум по физиологии растений. М.: КолосС, 2003.-288с.

3 Рогожин В.В. Практикум по физиологии и биохимии растений: учеб.пособие.-СПб.: ГИОРД, 2013. - 352с.

1 ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Информационный материал. Клетка растений представляет собой упорядоченную структуру, которая является элементарной функциональной единицей живых организмов. Клетка имеет определенные размеры и форму, что обусловлено упорядоченным расположением белков, несущих информацию как о строении клетки, так и о растении в целом. Функционирование клетки регламентируется информацией, заложенной в структуре ДНК, которая локализуется в ядре клетки. Благодаря этой информации формируется упорядоченная структура растения, определяется функционирование растительного организма, задается поведение живого организма и время его жизни.

Основу структуры клетки составляют мембраны. Так, эндоплазматический ретикулум (ЭПР) пронизывает всю цитоплазму клетки, расширяясь в небольшие вакуоли. Различают шероховатый и гладкий ЭПР. На внешней стороне мембраны шероховатого ЭПР располагаются рибосомы, которые являются элементами белоксинтезирующей системы. Гладкий ЭПР не имеет рибосом, но содержит ферменты, катализирующие синтез липидов. В целом ЭПР выполняет роль цитоскелета клетки и транспортной системы, соединяющей различные части клетки между собой. Кроме того, ЭПР регулирует транспортные потоки различных веществ, а синтезированные белки по каналам ретикулума могут перемещаться в определенном направлении.

Составными частями растительной клетки являются специализированные органеллы: ядро, ядрышко, митохондрии, хлоропласты, аппарат Гольджи, лизосомы, пероксисомы, рибосомы, вакуоль и др. В образовании и функционировании органелл и мембран клетки участвуют различные биогенные молекулы: аминокислоты, азотистые основания, нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы, вторичные метаболиты и др.

Ядро клетки имеет двойную мембрану, в структуре которой имеются поры размером 10...20 нм. Через поры осуществляется активный транспорт биогенных молекул из ядра в цитоплазму и обратно. Ядерная ДНК растений фрагментирована и входит в состав хромосом.

Митохондрии относятся к специализированным органеллам синтеза АТФ. Они имеют двойную мембрану. Число митохондрий в растительной клетке может быть от 300 до 1000. Митохондрии имеют собственную ДНК, а также РНК и рибосомы. Последние участвуют в процессе синтеза белков. Во внутренней мембране митохондрий локализуются ферментативные комплексы, катализирующие реакции окислительного фосфорилирования. Внутри митохондрий, в матриксе, содержатся ферменты цикла трикарбоновых кислот.

Хлоропласты - специализированные структуры клеток растений, в которых протекают реакции фотосинтеза. Хлоропласты имеют собственные ДНК, РНК и рибосомы.

Пероксисомы - это небольшие органеллы, внутри которых содержатся оксидоредуктазы (каталаза, пероксидаза, оксидазы, дегидрогеназы и др.),

участвующие в процессе фотодыхания. Эти ферменты катализируют реакции окисления различных веществ.

Сферосомы образуются из мембран эндоплазматического ретикулума; они содержат преимущественно липиды и ферменты, которые участвуют в процессах синтеза и распада. Высокое содержание сферосом наблюдается у масличных культур. При прорастании семян в этих органеллах активируются реакции расщепления резервированных липидов.

Аппарат Гольджи представляет собой стопки цистерн и пузырьков, окруженных мембранами. У цистерн аппарата Гольджи различают два конца.

На одном конце протекает процесс формирования новых цистерн (формирующий конец), а на другом образуются пузырьки (секретирующий конец). Данные процессы протекают непрерывно и последовательно. При этом формирование пузырьков происходит одновременно с образованием новых цистерн. Функционирование аппарата Гольджи обеспечивает плазмолемму и клеточную оболочку пластическим материалом.

Лизосомы являются органеллами, образованными из мембран эндоплазматического ретикулума или аппарата Гольджи, внутри которых содержатся преимущественно гидролитические ферменты. Последние катализируют реакции расщепления белков, нуклеиновых кислот, углеводов и липидов.

Вакуоль представляет собой полость, которая заполняет 90 % пространства взрослой растительной клетки. Внутри вакуоли содержатся аминокислоты, белки, углеводы, пигменты, ионы различных солей и кислот. Вакуоль участвует в поддержании осмотического давления клетки, регулируя поступление в нее воды и движение воды внутри растения. В вакуоли накапливаются продукты метаболических процессов и вторичные метаболиты, которые могут в дальнейшем вновь участвовать в метаболизме клетки.

К немембранным структурам растительной клетки относятся рибосомы и микротрубочки. Последние имеют форму трубки, внутри которой канал. Стенки трубочек состоят из глобулярных белков - тубулинов. Микротрубочки могут разрушаться и снова возникать в клетках растений.

Основной функцией микротрубочек является участие в формировании цитоскелета клетки и структуры клеточной стенки. Рибосомы участвуют в синтезе полипептидной цепочки. Они представляют собой сложные нуклеопротеиновые комплексы, состоящие из двух частей (малой и большой).

Основу рибосомы составляет рибосомальная РНК. Большинство рибосом прикрепляются к поверхности мембран эндо- плазматического ретикулума и в составе полисом участвуют в процессе биосинтеза белка.

Методические рекомендации по изучению темы. Прорабатывая этот раздел программы, следует обратить внимание, прежде всего на структурно-функциональную организацию клетки и физико-химические основы ее энергетики, так как именно клетка является носителем жизни. Рассмотрите строение клеточной оболочки и мембран, их роль в обмене веществ. Проанализируйте функции ядра и цитоплазмы, структурные основы

проницаемости цитоплазмы, а также зависимость проницаемости от внутренних и внешних факторов. Следует выяснить, что такое гетерогенность цитоплазмы.

Особое внимание необходимо уделить изучению химического состава цитоплазмы растительной клетки и функциональной роли основных ее компонентов.

Система ферментов является производным основной белковой структуры клеточных органелл. Активное участие в осуществлении ферментативных превращений к клетке принимают нуклеотиды.

Необходимо обратить внимание на структуру РНК и ДНК, их физиологическую роль в биосинтезе белков, на локализацию белково-липидных соединений в периферических слоях цитоплазмы, на физиологическую роль плазматических мембран.

Литература: 2, с.7-81; 3, с.11-85; 4, с.39-53; 5, с.3-19.

Вопросы для самопроверки:

1. С какими дисциплинами имеет связь физиология растений?
2. Задачи физиологии растений на современном этапе.
3. Физико-химические основы энергетики растительной клетки.
4. Структурная организация растительной клетки.
5. Функциональная организация растительной клетки.
6. Состав, строение и физиологическая роль мембран в жизнедеятельности клетки.

РАБОТА В ЛАБОРАТОРИИ

Выполнение лабораторной работы студентами состоит из трех основных этапов:

Подготовительный этап: Студенты самостоятельно изучают методические рекомендации по проведению лабораторной работы. Для каждой работы приведены список материалов и оборудования, краткое теоретическое объяснение, описание хода работы, указания по выполнению работы.

Основной этап: Студенты под руководством преподавателя и лаборанта выполняют данные им задания (отрабатывают поставленные учебные вопросы). При этом лабораторная работа считается выполненной только после записи ее результатов, которые должны содержать описание наблюдаемых изменений при выполнении эксперимента и краткий анализ полученных данных.

Заключительный этап: После выполнения лабораторной работы студенты оформляют результаты, формулируют выводы и отчитываются перед преподавателем о проделанной работе. Описание ожидаемых результатов и готовых выводов отсутствуют, такая методика развивает самостоятельность студентов и способствует более прочному усвоению изучаемого материала.

Подведение итогов занятия. После отработки всех учебных вопросов преподаватель подводит итоги лабораторного занятия, оценивает работу и выставляет каждому студенту баллы в журнал.

1.1 Проницаемость живой и мертвой цитоплазмы для веществ клеточного сока

Наружная цитоплазматическая мембрана клетки (плазмалемма) отделяет клетку от окружающей среды, контролирует транспорт веществ в клетку и из клетки.

Главное свойство мембран – их избирательная проницаемость. Избирательная проницаемость мембраны сохраняется до тех пор, пока клетка остается живой. После ее гибели мембраны становятся полностью проницаемыми. С наличием мембран связывают целый ряд внутриклеточных процессов и функций клетки:

- мембраны разделяют клетки и органеллы на компартменты, в которых осуществляется противоположно направленные процессы;
- локализация ферментов или интермедиатов метаболизма на мембране определяет последовательность реакций;
- избирательная проницаемость внешней мембраны клетки формирует определенный состав её внутреннего содержимого;
- низкая проницаемость мембран для протонов лежит в основе процессов, связанных с синтезом макроэргических соединений и с использованием АТФ для транспорта веществ.

Избирательная проницаемость - свойство живой цитоплазмы сохранять постоянство внутриклеточной среды (гомеостаз). При повреждении клетки цитоплазма теряет это свойство, и вещества, находящиеся в клетке, свободно выходят наружу. Степень повреждения коррелирует с количеством выделяющихся в водную среду пигмента антоциана. Интенсивность выхода веществ из клетки служит критерием ее повреждения.

Задание: Выявить различия в проницаемости мембран живых и мертвых клеток и сделать вывод о причинах этих различий.

Порядок выполнения работы. Вырезать из очищенного корнеплода красной свеклы четыре одинаковых брусочка длиной около 2 см и шириной 0,5 см (корнеплод должен быть свежим, т.е. иметь хороший тургор, так как с подвявшим материалом опыт не дает четких результатов). Положить брусочки в фарфоровую чашку и многократно промыть водопроводной водой до тех пор, пока не прекратится выделение окрашенного сока из перерезанных клеток. Поместить брусочки в 4 пробирки. Налить в две пробирки воду (до 1/2 объема) и прокипятить одну из них в течение 1-2 мин. В третью пробирку налить воду и 5 капель хлороформа, в четвертую - 30%-ный раствор уксусной кислоты. Наблюдать в течение 1-2 ч за изменением окраски жидкости в пробирках, время от времени взбалтывая их содержимое. Результаты записать в таблицу 1 по приведенной форме.

Таблица 1-Проницаемость живой и мертвой цитоплазмы для веществ клеточного сока

Вариант опыта	Скорость окрашивания жидкости
Вода комнатной температуры	
Кипячение	
Вода + хлороформ	
30%-ный раствор уксусной кислоты	

Материалы и оборудование: плитка, пробирки, штатив для пробирок, держатель для пробирок, фарфоровая чашка, химический стакан, мерный цилиндр, корнеплод столовой свеклы, фильтровальная бумага.

Реактивы: хлороформ, 30%-ный раствор уксусной кислоты.

1.2 Влияние анионов и катионов на форму и время плазмолиза

Плазмолиз – отставание цитоплазмы от стенок клетки, помещенной в раствор с большей концентрацией, чем концентрация клеточного сока (гипертонический раствор). В ходе плазмолиза очертания поверхности меняются: сначала она сокращается, а после полной потери тургора протопласт отстает от клеточной стенки по углам (уголковый плазмолиз), затем во многих местах (вогнутый плазмолиз) и, наконец, протопласт округляется (выпуклый плазмолиз).

Временем плазмолиза – называется период, который проходит с момента погружения ткани растения в раствор плазмолитика до наступления выпуклого плазмолиза. Этот показатель может характеризовать вязкость цитоплазмы: чем больше время плазмолиза, тем выше вязкость цитоплазмы.

Для каждой клетки можно подобрать следующие растворы:

- 1) гипотонический, осмотическое давление которого меньше осмотического давления клеточного сока,
- 2) изотонический, имеющий осмотическое давление, равное осмотическому давлению клеточного сока,
- 3) гипертонический, осмотическое давление которого больше, чем давление клеточного сока.

Избирательная проницаемость мембран обеспечивает прохождение через них молекул воды, препятствует проникновению растворенных в воде веществ и обуславливает явление плазмолиза при действии на клетку гипертонического раствора.

Деплазмолиз происходит в результате постепенного проникновения растворенного вещества в клетку, изменения водного потенциала снаружи и внутри, а также поступления воды в клетку из наружного раствора по градиенту водного потенциала.

Катионы и анионы солей оказывают специфическое и многообразное действие на цитоплазму. Одним из заметных внешних проявлений этого

действия являются изменения в степени набухания и вязкости цитоплазмы, для наблюдения за которыми используют время плазмолиза. При сравнении вязкости цитоплазмы в растворах солей калия и кальция можно отметить, что ионы калия, проникая в цитоплазму, повышают ее гидрофильность, уменьшают вязкость и способствуют ее быстрому отрыву от клеточной стенки.

Задание: зарисовать формы плазмолиза. На основании полученных результатов сделать вывод о влиянии катионов и анионов на вязкость цитоплазмы.

Порядок выполнения работы. Срез эпидермиса с выпуклой поверхности чешуи цветного лука помещают в каплю раствора испытуемой соли, накрывают покровным стеклом и сейчас же приступают к рассматриванию под микроскопом. Следят за сменой форм плазмолиза. Определяют время плазмолиза в каждой соли. Результаты опыта записывают в таблицу 2 по приведенной форме.

Таблица 2- Влияние анионов и катионов на форму и время плазмолиза

Вариант	Соль	Концентрация раствора, моль/л	Время погружения ткани в раствор	Время наступления выпуклого плазмолиза	Время плазмолиза, мин
1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.7			
2	KNO_3	1.0			
3	KCNS	1.0			

Материалы и оборудование: микроскопы, предметные и покровные стекла, лезвия безопасной бритвы, скальпель, препаровальная игла, луковица синего лука, фильтровальная бумага.

Реактивы: 0,7 М $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1 М KCNS , 1 М KNO_3 .

1.3 Наблюдение колпачкового плазмолиза

Колпачковый плазмолиз возникает при действии гипертонических растворов солей, проникающих через плазмалемму, и не проходящих или очень слабо проходящих через тонопласт. Такие соли вызывают набухание мезоплазмы, уменьшение степени ее дисперсности, изменение структуры. Колпачковый плазмолиз проявляется в образовании колпачков из набухшей цитоплазмы на узких сторонах вакуоли.

Задание: зарисовать одну клетку с хорошо выраженным колпачковым плазмолизом. На основании наблюдений делают вывод о свойствах мембран цитоплазмы.

Порядок выполнения работы. Срез эпидермиса с выпуклой поверхности пигментированной чешуи луковицы помещают на предметное стекло в каплю 1 М раствора KCNS и накрывают покровным стеклом. Сразу же

наблюдают за образованием колпачкового плазмолиза сначала при малом, а затем при среднем увеличении.

Материалы и оборудование: Микроскопы, предметные и покровные стекла, лезвия безопасной бритвы, скальпель, препаровальная игла, луковица синего лука, фильтровальная бумага.

Реактивы: 1 М KCNS.

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

Метод окрашивания семян для определения их всхожести основан на непроницаемости живой цитоплазмы для некоторых красок (индигокармин, кислый фуксин), тогда как мертвая цитоплазма легко прокрашивается. Бывают случаи, когда зародыш мертвый и тем не менее при погружении семени в раствор краски оно не окрашивается из-за того, что окружающие зародыш части семени не пропускают краску. В связи с этим необходимо предварительно обнажить зародыш: у семян с эндоспермом извлечь зародыш или разрезать семя вдоль, а у семян без эндосперма удалить семенные покровы.

Подготовленные описанным способом семена выдерживают в растворе краски от 1 до 3 ч (в зависимости от вида растения) и оценивают жизнеспособность семян: семена с полностью окрашенными зародышами или с окрашенными корешками считают невсхожими, семена неокрашенные или частично окрашенными семядолями относят к числу жизнеспособных.

Данный метод используют для быстрой оценки всхожести семян гороха, фасоли, люпина, льна, конопли, тыквенных.

Задание: оценить жизнеспособность семян гороха, фасоли, люпина.

Порядок выполнения работы. Отсчитать, не выбирая, две порции по 10 набухших семян гороха. Одну порцию поместить в стакан с водой и прокипятить в течение 5 мин (контроль). Осторожно, не повреждая семядоли, очистить препаровальной иглой семена обеих порций от кожуры, поместить в фарфоровые чашки, залить раствором индигокармина и выдержать 1 ч, после чего слить краску обратно в бутылочку, а семена смыть водой от избытка красителя.

Отметить окраску семян, убитых кипячением. В опытной порции подсчитать количество окрашенных, частично окрашенных и неокрашенных семян. Для проверки всхожести высадить все 10 семян в стакан с влажными опилками (перед набивкой стакана отжать из опилок избыток воды) поставить в темный шкаф и ежедневно поливать. Через несколько дней подсчитать количество проросших семян.

Результаты опыта записывают в таблицу 3 по приведенной форме.

Таблица 3- Определение жизнеспособности семян

Объект	Кол-во взятых семян, шт.	Количество семян, шт.				
		окрашенных полностью	окрашенных частично	неокрашен- ных	проро- сших	непроро- сших

Материалы и оборудование: семена гороха, фасоли, люпина, намоченные в воде за 10-15 ч до занятия, химический стакан, плитка, фарфоровые чашки, лезвие бритвы, препаровальная игла, опилки, фильтровальная бумага.

Реактивы: 0,1% раствор индигокармина (1 г на 1 л дистиллированной воды), кислый фуксин.

1.5 Определение изоэлектрической точки растительной ткани колориметрическим методом

Аминокислоты и белки цитоплазмы - амфотерные вещества. В растворе они диссоциируют и как кислоты, и как основания. Чем выше концентрация ионов водорода в среде, тем более подавлена кислотная диссоциация, и белок приобретает больший положительный заряд. Чем выше концентрация гидроксильных ионов в среде, тем сильнее подавлена основная диссоциация, и белок приобретает больший отрицательный заряд.

При определенной величине рН среды количество положительных и отрицательных зарядов уравнивается. Амфолит (молекула амфотерного вещества в состоянии диссоциации) становится электронейтральным. Данное значение рН среды называют изоэлектрической точкой (ИЭТ).

Каждый амфолит имеет свою величину ИЭТ. У белков и аминокислот она зависит от количества свободных кислотных (карбоксильных) и основных (аминных) групп. Зная ИЭТ белков, можно судить о соотношении в их составе кислых и основных аминокислот. Если в растворе амфотерного соединения диссоциация идет по типу основания (в средах с рН ниже ИЭТ), то положительный заряд будет связывать анионы, а если по кислотному типу (в средах с рН выше ИЭТ), то отрицательный заряд связывает катионы.

Для определения ИЭТ растительной ткани применяют кислый краситель - эозин, у которого ярко-розовой окраской обладает анион, и основной краситель - метиленовая синь (МС), цвет которого обусловлен катионом. При окрашивании амфотерного соединения этими красителями и погружении в среды, рН которых ниже ИЭТ, связываются преимущественно анионы эозина. Поэтому растительная ткань приобретает розовую окраску. В среде, где рН выше ИЭТ, растительная ткань удерживает преимущественно катионы метиленовой сини и окрашивается в синий цвет. В среде с рН, равным ИЭТ, окраска амфолитов растительной ткани будет промежуточной между розовой и синей - фиолетовой, так как в этом случае количество положительных и

отрицательных зарядов одинаковое.

В цитоплазме содержится смесь амфотерных веществ, поэтому переходная зона от розовой к синей окраске будет постепенной.

Задание: изучить колориметрический метод определения изоэлектрической точки, определить ИЭТ растительной ткани.

Порядок выполнения работы. В бюксах готовят по 10 мл буферных растворов со значениями рН в соответствии с приведенной таблицей. На расстоянии 0,5 см от кончика корня проростка гороха бритвой делают строго поперечные (не менее 24) срезы и помещают их в фарфоровую чашку с 70%-ным раствором этилового спирта на 5 мин для фиксации.

В одну фарфоровую чашку наливают 2-3 мл 0,1%-ного эозина, в другую - столько же 0,02%-ной метиленовой сини. Из спирта кисточкой срезы переносят в раствор эозина на 10 мин. Все они окрашиваются в розовый цвет. Затем срезы из эозина без промывания помещают в раствор метиленовой сини на 8—10 мин, чтобы они стали синими.

Окрашенные срезы кисточкой переносят в буферные растворы с различной концентрацией ионов водорода по три среза в каждую. В буферных растворах их выдерживают 1-1,5 ч. Затем срезы вынимают, размещают на предметных стеклах в заданном порядке и рассматривают под микроскопом при малом увеличении. В растворах с рН ниже ИЭТ окраска ткани будет розовой, при рН выше ИЭТ - синей. Переход окраски от розовой к синей для коры и центрального цилиндра будет при различных значениях рН (фиолетовый цвет). Следовательно, ИЭТ этих тканей неодинакова, что указывает на различный состав цитоплазмы в клетках этих тканей.

Результаты опыта записывают в таблицу 4 по приведенной форме. В зависимости от количества белков, содержащих кислые аминокислоты, в разных тканях корня рН ИЭТ варьирует от 3 до 6.

Таблица 4- Приготовление буферных растворов с различными рН и окраска растительных тканей при конкретной величине рН

рН	0,2М раствор NaHPO_4 , мл	0,1М раствор лимонной кислоты, мл	Окраска ткани		ИЭТ	
			Кора	Центральный цилиндр	Кора	Центральный цилиндр
2,2	0,20	9,80				
3,0	2,05	7,95				
3,6	3,22	6,78				
5,0	5,15	4,85				
5,4	5,57	4,43				
6,0	6,31	3,69				
7,0	8,23	1,77				
8,0	9,72	0,28				

Материалы и оборудование: пророщенные семена гороха или фасоли, лезвия

безопасной бритвы, кисточки, препаровальные иглы, фарфоровые чашки, бюксы, микроскопы, предметные и покровные стекла.

Реактивы: 0,1 М раствор лимонной кислоты, 0,2 М раствор NaHPO_4 , 0,1%-ный раствор эозина, 0,02%-ный раствор метиленовой сини, 70%-ный раствор спирта.

2 ВОДНЫЙ ОБМЕН РАСТЕНИЙ

Информационный материал. Вода в биологических системах выполняет самые разнообразные функции. Так, в жидком состоянии вода способна обеспечить максимальную растворимость биогенных молекул полярной природы. Может выполнять роль среды, в которой создаются оптимальные условия для формирования индивидуальных структур биогенных молекул (белков, липидов, ферментов, нуклеиновых кислот и др.). Вода участвует в формировании упорядоченных структур белково-липидных комплексов, мембран органелл и плазмалеммы.

Принимает участие в ферментативных реакциях, катализируемых гидролазами (липазы, пептидазы, нуклеазы и др.). Способна обеспечить транспорт ионов, биогенных молекул и газов (O_2 и CO_2). Обладая высокой теплоемкостью, вода выполняет роль терморегулятора, обеспечивая поддержание стабильной температуры в растениях. За счет тепловых эффектов вода обеспечивает энергетические потребности растительного организма, а наличие механизма транспирации обеспечивает направленное движение воды в растении. В воде происходит ограниченное растворение газов (кислорода, азота, CO_2 и др.), которые переносятся в различные органы и ткани растения.

В растения вода поступает из почвы и по восходящим и нисходящим путям распределяется в растительном организме. Направленное движение воды в различных частях растений обеспечивается за счет активной работы устьичного аппарата листьев, обуславливающих функционирование механизмов транспирации.

Содержание воды в растениях зависит от вида, возраста и функционального состояния растительного организма. Растения могут содержать от 60 до 90 % воды. Меньше всего содержится воды в семенах и спорах. Так, например, зерновки злаковых растений в период вынужденного покоя содержат от 8 до 10% воды. Высокая активность оксидаз, в том числе и пероксидазы, в зерновках пшеницы может свидетельствовать об участии этих ферментов в поддержании их жизнеспособности в период вынужденного покоя. Так, например, пероксидаза способна катализировать реакции оксидазного и пероксидазного окисления органических соединений в тканях растений. При этом в реакциях происходит последовательное восстановление кислорода до воды и за счет этого в период покоя семян может удовлетворяться потребность зародыша в воде.

Генерация воды в покоящихся зерновках является затратным процессом, так как он сопряжен с окислением биогенных соединений. Однако в связи с тем, что субстратами пероксидазы могут быть самые разные биогенные молекулы (углеводы, аминокислоты, фенолы и др.), окисление этих соединений не наносит существенного вреда клеткам зародыша. Участие биогенных молекул в оксидазных и пероксидазных реакциях определяется их сродством к активному центру фермента. В пероксидазных реакциях может наблюдаться субстрат-субстратная активация, что способствует ускорению окисления одних

биогенных молекул в присутствии других молекул, обуславливая ускорение генерации воды.

Можно выделить две формы воды в биологических системах: свободная (проявляет исходные физико-химические свойства) и связанная (с измененными физико-химическими свойствами вследствие взаимодействия с различными биогенными молекулами). Вода является хорошим растворителем для полярных органических соединений, содержащих amino-, карбокси-, сульфгидрильные и гидроксильные группы. Поэтому в воде хорошо растворимы углеводы (моно- и олигосахариды), спирты, альдегиды, кетоны, аминокислоты и летучие карбоновые кислоты. Растворимость этих соединений обусловлена тем, что их полярные группы способны образовать водородные связи с молекулами воды. В воде растворимы большинство солей, ионы которых в гидратированной форме присутствуют в растворе.

Полярность молекул воды обуславливает растворимость в воде полярных и заряженных молекул. Гидрофобные соединения, имеющие в своем составе предельные углеводородные радикалы, нерастворимы в воде и поэтому будут уходить от контакта с ее полярными молекулами, располагаясь преимущественно на поверхности воды. Некоторые соединения, содержащие как гидрофобные, так и гидрофильные группы, способны в воде образовывать агрегаты, формируя мицеллярные структуры. При этом гидрофильные группы этих соединений контактируют с молекулами воды, тогда как гидрофобные радикалы обращены вовнутрь мицеллы.

Таким образом, стабильность мицелл, формирующихся в полярной среде, поддерживается в основном за счет слабых гидрофобных взаимодействий. При этом растворимые в воде соединения способны изменять физические свойства воды. Энергия осмоса обеспечивает поступление воды в семена в период набухания, а также активное продвижение воды в ткани и органы растений в период их роста.

Методические рекомендации по изучению темы. Вода в жизни растений играет решающую роль. Поэтому необходимо знать, как осуществляется поглощение и выделение воды клеткой, что такое водный обмен растений, каково содержание и распределение воды в клетке, что такое термодинамические показатели водного режима растений – активность воды, химический потенциал, методы их определения, а также составляющие водного потенциала – осмотический потенциал, матричный потенциал, потенциал давления, гравитационный потенциал.

Изучая корневую систему как орган поглощения воды, следует обратить внимание на то, какие формы воды имеются в почве и поглощаются корнями растений, каковы константы почвенной влажности. Разберите, что такое восходящий ток в растении, его путь, скорость, движущие силы, что следует понимать под двигателями водного потока. Выясните роль промежуточных двигателей в поднятии воды, физиологическое значение передвижения воды в растении и обновления ее запаса.

В водном обмене растений велика роль транспирации. В связи с этим следует выяснить биологическое значение транспирации, ее зависимость от внешних факторов и состояния устьиц, их численности и распределения в листьях.

Следует выяснить, как определяют интенсивность и продуктивность транспирации, транспирационный коэффициент, а также фазовый, биологический и товарный коэффициенты водопотребления, как их используют при обосновании водного баланса растений, суммарного водопотребления фитоценозами и режима орошения сельскохозяйственных культур (оросительных и поливных ном, способов и сроков проведения поливов).

Литература: 1, с.71-93; 2, с.83-116; 3, с.276-304; 4, с.183-189; 5, с.38-70.

Вопросы для самопроверки:

1. Как происходит поглощение и выделение воды растительной клеткой?
2. Что такое химический потенциал воды и водный потенциал клетки?
3. Какое биологическое значение имеет транспирация?
4. Какие физиологические показатели могут быть использованы для оптимизации водного режима агрофитоценозов?
5. Какие основные функции воды в регуляции роста и развития растений?

РАБОТА В ЛАБОРАТОРИИ

2.1 Определение содержания воды и сухого вещества в растительном материале

Степень оводненности — важный показатель влагообеспеченности растений. С содержанием воды связаны концентрация клеточного сока, водный потенциал отдельных органов растения, отношение его к почвенной и атмосферной засухе. Определение содержания воды в листьях дает возможность выяснить эколого-физиологические особенности растений, вскрыть механизмы их адаптации к условиям среды.

Содержание влаги в растительных тканях вычисляют обычно в процентах сухой или сырой массы. В листьях большинства растений умеренной зоны в зависимости от погодных условий и этапов онтогенеза воды содержится 65-82% сырой массы. Растения с неодинаковой засухоустойчивостью различаются характером водного обмена. Растения влаголюбивых видов и сортов содержат много воды при достаточном количестве ее в почве. Однако при понижении влажности почвы они быстро теряют воду. У более устойчивых к засухе форм содержание влаги в растениях, как правило, ниже, но ее количество более стабильно.

Задание: рассчитать содержание воды в процентах сырой и сухой массы материала, сделать вывод о зависимости содержания воды в листьях от расположения их на растении.

Порядок выполнения работы. Количество воды и сухого вещества в листьях определяют весовым методом. Опыт ставят в двух вариантах, для чего используют листья верхнего и нижнего ярусов. Берут только нормально развитые, зеленые, не имеющие явных следов повреждения и подсыхания листья. Каждое определение выполняют в трехкратной повторности при навеске сырых листьев не менее 5 г. Следует точно установить, какие по счету листья относить к нижнему, а какие к верхнему ярусам, и соблюдать установленный порядок на всех опытных растениях.

Сначала определяют массу абсолютно сухого бюкса. Для этого чисто вымытый бюкс с крышкой, поставленной вертикально, помещают на полку сушильного шкафа при температуре 100-150°C. Через 1 ч бюкс берут тигельными щипцами и ставят открытым в эксикатор на 30 мин для охлаждения, затем закрывают крышкой и взвешивают на аналитических весах. Повторно бюкс ставят в сушильный шкаф на 20—30 мин, охлаждают в эксикаторе и снова взвешивают. Если масса бюкса не изменится, то в него можно помещать пробу.

Бюкс с растительным материалом взвешивают на аналитических весах, ставят на 5 ч в шкаф, нагретый до 105 °С, затем охлаждают в эксикаторе (бюкс должен быть открыт) и вновь взвешивают. Однако 5 ч для удаления всей влаги из растения бывает недостаточно, поэтому бюксы после взвешивания открывают и помещают в сушильный шкаф при той же температуре. Потом охлажденные в эксикаторе бюксы снова взвешивают. Так повторяют до тех пор, пока масса бюкса с материалом не будет постоянной или последующая масса не станет несколько больше предыдущей.

При работе необходимо соблюдать следующие правила. Сырой материал должен лежать в бюксе рыхло. Нельзя держать его в шкафу без перерыва дольше 5 ч. Бюкс с навеской нужно ставить в шкаф, нагретый до 105 °С. Температура в различных частях шкафа непостоянна, поэтому бюксы желательно помещать на одном уровне с шариком термометра. Не следует располагать бюксы близко к стенкам шкафа, так как здесь температура может быть более высокой, чем показывает термометр. Брать бюксы надо щипцами, на концы которых надеты каучуковые кольца, так как из-за прикосновения пальцами к бюксам может измениться масса.

Вычитая из массы исходного растительного материала массу высушенного материала, получают массу воды во взятой навеске. Рассчитывают содержание воды в процентах сырой и сухой массы материала, делают вывод о зависимости содержания воды в листьях от расположения их на растении.

Результаты опыта записывают в таблицу 5 по приведенной форме.

Таблица 5-Определение содержания воды в листьях

Культура	
Ярус листьев	
Повторность	

Номер бюкса	
Масса бюкса, г	
пустого	
с сырым материалом	
с сухим материалом	
Сырая масса, г	
Сухая масса, г	
Содержание воды	
в граммах	
% сырой массы	
% сухой массы	

Материалы и оборудование: пятнадцатидневные растения подсолнечника или кукурузы, аналитические весы, щипцы, сушильный шкаф, бюксы, эксикатор.

2.2 Определение состояния устьиц методом инфильтрации по Молишу

Причиной устьичных движений может быть действие света, изменение тканей, температуры, концентрации CO_2 , в межклетниках. В условиях недостаточного водообеспечения происходит гидроактивное закрывание устьиц. Поэтому степень открытости устьиц может служить физиологическим показателем для определения обеспеченности растений водой и установления сроков полива. Межклетники листа обычно заполнены воздухом, благодаря чему при рассматривании на свет лист кажется матовом. Если произойдет инфильтрация, т.е. заполнение межклетников какой-либо жидкостью, то соответствующие участки листа становятся прозрачными.

Определение состояния устьиц методом инфильтрации основано на способности жидкостей, смачивающих клеточные стенки, проникать в силу капиллярности через открытые устьичные щели в ближайшие межклетники, вытесняя из них воздух, в чем легко убедиться по появлению на листе прозрачных пятен. Жидкости проникают в устьичные щели в зависимости от их ширины: петролейный эфир - через слабо открытые устьица, ксилол - через средне открытые, а этиловый спирт - только через широко открытые.

Задание: Исследовать листья, выдержанные в разных условиях (свежие и подвявшие, освещенные и затемненные и т. п.). В каждом варианте исследовать 2-3 листа. Результаты записать в таблицу, отмечая проникновение жидкости знаком «+», а отсутствие проникновения знаком «-».

Порядок выполнения работы. На соседние участки нижней поверхности листа нанести последовательно капли бензола, ксилола и этилового спирта. Держать лист в горизонтальном положении до полного исчезновения капель, которые могут либо испариться, либо проникнуть внутрь листа. Рассматривают лист в проходящем свете. Если жидкость проникла в межклетники листа, то на нем появляются прозрачные пятна.

На основании полученных данных делают заключение о разной степени раскрытия устьиц, исходя из того, что при инфильтрации только ксилолом они открыты слабо, ксилолом и бензолом-средне, ксилолом, бензолом и спиртом-сильно. Результаты опыта записывают в таблицу 6 по приведенной форме.

Таблица 6- Определение степени раскрытия устьиц

Объект	Условия опыта	Бензол	Ксилол	Спирт	Состояние устьиц

Сделать выводы о влиянии внешних условий на устьичные движения.

Материалы и оборудование: капельницы, десяти-пятнадцатидневные растения подсолнечника, герань.

Реактивы: спирт, бензол, ксилол.

2.3 Определение осмотического давления клеточного сока плазмолитическим методом

Осмоз - диффузия воды или другого растворителя через полупроницаемую мембрану. Растительную клетку можно рассматривать как осмотическую систему, в которой роль раствора осмотически действующих веществ играет клеточный сок, а роль полупроницаемой перепонки – цитоплазматические мембраны.

Клеточный сок – водный раствор различных органических и неорганических веществ. Потенциальное осмотическое давление зависит от числа частиц, находящихся в этом растворе, т.е. от концентрации и степени диссоциации растворенных молекул. Потенциальное осмотическое давление выражает максимальную способность всасывать воду. Величина этого показателя указывает на возможность произрастания растения на почвах различной водоудерживающей силы. Повышение осмотического давления клеточного сока при засухе является критерием обезвоживания растений и необходимости полива.

Данный метод основан на подборе такой концентрации наружного раствора, которая вызывает начальный (уголковый) плазмолиз в клетках исследуемой ткани. В этом случае, осмотическое давление раствора примерно равно осмотическому давлению клеточного сока. Такой наружный раствор называется изотоническим.

Задание: Определить степень плазмолиза клетки в каждом растворе и найти изотоническую концентрацию. Определить величину осмотического потенциала клеток.

Порядок выполнения работы. В бюксах готовят по 10мл растворов согласно форме таблицы. Растворы тщательно перемешивают. Бюксы

закрывают крышками, чтобы предотвратить испарение, и ставят в ряд по убывающей концентрации.

Лезвием безопасной бритвы делают тонкие срезы с выпуклой поверхности чешуи лука размером примерно 25 мм² из среднего хорошо окрашенного участка.

В каждый бюкс, начиная с высокой концентрации, с интервалом в 3 мин. опускают по 2-3 среза. Через 30 мин после погружения срезов в первый бюкс их исследуют под микроскопом. Затем, через каждые 3 мин наблюдают срезы из последующих бюксов. Таким способом достигают равную продолжительность пребывания срезов в растворах плазмолитиков. Срезы рассматривают под микроскопом в капле раствора из того бюкса, откуда они были взяты.

Определяют степень плазмолиза клеток в каждом растворе и находят изотоническую концентрацию как среднее арифметическое между концентрацией, при которой плазмолиз только начинался, и концентрацией, которая уже не вызывает плазмолиз.

Результаты опыта записывают в таблицу 7 по приведенной форме.

Таблица 7- Определение потенциального осмотического давления

Концентрация раствора сахарозы, моль/л	Продолжительность пребывания срезов в растворе		Степень плазмолиза	Изотоническая концентрация, моль/л	Потенциальное осмотическое давление, кПа
	время погружения	время наблюдения			
0,7					
0,6					
0,5					
0,4					
0,3					
0,2					

Величину потенциального осмотического давления (в кПа) рассчитывают по формуле 1:

$$\Pi = R \cdot T \cdot c \cdot i \cdot 101,3 \quad (1)$$

где R – газовая постоянная, равная 0,0821 л атм./град моль;

T – абсолютная температура (273°C + комнатная);

c – изотоническая концентрация в молях;

i – изотонический коэффициент Вант-Гоффа;

101,3 – множитель для перевода атмосфер в килопаскали.

Коэффициент Вант-Гоффа характеризует ионизацию растворов и для неэлектролитов (сахароза) равен 1.

Материалы и оборудование: скальпель, лезвие бритвы, препаровальная игла, микроскоп, предметные и покровные стекла; карандаш по стеклу; фильтровальная бумага, пробирки (бюксы).

Реактивы: 1 М раствор сахарозы.

2.4 Определение водного потенциала растительной ткани методом полосок (по Лилиенштерн)

Водный потенциал (ϕ_{ω}) характеризует сосущую силу растительной ткани. Величина водного потенциала зависит от разности химических потенциалов воды в клетке и чистой воды. Водный потенциал всегда имеет отрицательный знак. Чем ниже водный потенциал, тем сильнее обезвожена растительная клетка, поэтому этот показатель определяют для того, чтобы вовремя уловить признаки обезвоживания растений и правильно выбрать время полива. Для конкретных культур различных почвенно-климатических зон установлены оптимальные значения водного потенциала. Это позволяет по справочным данным проводить поливы в оптимальные сроки.

Настоящий метод основан на подборе наружного раствора такой концентрации, при погружении в который полоска растительной ткани не меняет длины.

Если осмотический потенциал наружного раствора превышает водный потенциал ткани, то раствор отнимает воду от клеток, в результате их объем и длина полосок уменьшаются.

Если осмотический потенциал раствора меньше водного потенциала ткани, то клетки всасывая воду из раствора, увеличиваются в объеме и длина полоски становится больше.

В растворе, где осмотический потенциал равен водному потенциалу ткани, длина полоски не изменяется.

Задание: определить величину водного потенциала тканей клубня картофеля.

Порядок выполнения работы. Приготовить в пробирках по 10мл - 0,6 М; 0,5 М; 0,4 М; 0,3 М; 0,2 М; 0,1 М растворов сахарозы. Из клубня картофеля вырезать десять полосок длиной 4-6 см. и сечением около 4 мм². Концы полосок срезают наискось. Работать следует быстро, чтобы исключить подсыхание полосок. Миллиметровой линейкой точно измерить их длину и помещают по две в каждую пробирку. Через 20 мин. вынимают, обсушивают фильтровальной бумагой и снова измеряют длину. Для расчета величины водного потенциала берут концентрацию, при которой длина полосок не изменилась.

Величину водного потенциала (ϕ_{ω}) рассчитывают по формуле 2:

$$\phi_{\omega} = - \Pi \text{ раствора} = - R \cdot T \cdot C \cdot i \cdot 101,3 \quad (2)$$

Результаты опыта записывают в таблицу 8 по приведенной форме.

Таблица 8- Определение водного потенциала

Концентрация сахарозы, М	Длина полоски ткани, мм		Концентрация, при которой длина полосок не изменилась, М	Водный потенциал, кПа
	перед погружением в раствор	после пребывания в растворе		
0,6				
0,5				
0,4				
0,3				
0,2				
0,1				

Материалы и оборудование: пробирки, дистиллированная вода, пипетки, стеклянная палочка, картофель, миллиметровая линейка, фильтровальная бумага, дистиллированная вода.

Реактивы: 1М раствор сахарозы.

2.5 Определение водного потенциала листьев методом Шардакова

Метод основан на определении изменения концентрации раствора после выдерживания в нем исследуемых растительных тканей. Метод Шардакова основан на сравнении плотностей исходного (контрольного) раствора с этим же раствором после выдерживания в нем ткани. У раствора, не изменившего плотности, φ_p равен $\varphi_{тк}$.

Задание: определить и рассчитать величину водного потенциала тканей. Объяснить, в каких случаях капля подкрашенного раствора будет всплывать, опускаться или оставаться на месте.

Порядок выполнения работы. Пробирки расставляют в штативе в два ряда: пять вверху и пять внизу. В верхних готовят по 10 мл 0.5М; 0.4 М; 0.3 М; 0.2 М; 0.1 М растворов сахарозы путем разбавления 1М раствора сахарозы дистиллированной водой.

В пробирки нижнего ряда переносят по 0,5 мл раствора из верхних пробирок и все их закрывают пробками. Из листа сверлом вырезают 10 дисков. Для этого лист нижней стороной поворачивают вверх, подкладывают под него резиновую пластинку и между крупными жилками вырезают диски. В каждую пробирку нижнего ряда опускают по два диска на 40 мин. Через каждые 10 мин. пробирки с дисками встряхивают. Затем стеклянной палочкой удаляют диски и подкрашивают опытные растворы в пробирках нижнего ряда метиленовой синей, взятой в небольшом количестве (на кончике проволоки). Содержимое встряхивают, добиваясь равномерной окраски раствора. Пипеткой на 0,5 мл. набирают подкрашенный опытный раствор. Конец пипетки опускают в соответствующий исходный раствор в пробирки верхнего ряда так, чтобы уровень жидкости в пипетке превышал уровень раствора в пробирке. Медленно

выпускают жидкость из пипетки в исходный раствор, отмечая направление движения струйки. Если концентрация и, следовательно, плотность окрашенного раствора увеличилась по сравнению с исходным, то струйка пойдет вниз, если концентрация уменьшилась – струйка пойдет вверх. При равенстве концентраций струйка равномерно распределяется внутри пробирки с исходным раствором.

Величину водного потенциала рассчитывают по формуле 3:

$$\phi_{\omega} = - \Pi \text{ раствора} = - R \cdot T \cdot c \cdot i \cdot 101.3 \quad (3)$$

Результаты опыта записывают в таблицу 9 по приведенной форме.

Таблица 9- Определение водного потенциала

Концентрация сахарозы, М	Направление движения струйки	Концентрация внешнего раствора оставшегося неизменным	Водный потенциал, кПа
0,5			
0,4			
0,3			
0,2			
0,1			

Материалы и оборудование: пробирки, дистиллированная вода, пипетки, стеклянная палочка, листья растений, миллиметровая линейка, фильтровальная бумага, дистиллированная вода, метиленовая синь кристаллическая.

Реактивы: 1М раствор сахарозы.

2.6 Сравнение транспирации верхней и нижней сторон листа хлоркобальтовым методом

Метод хлоркобальтовой пробы по Шталю основан на изменении цвета фильтровальной бумаги, пропитанной хлоридом кобальта, при поглощении ею паров воды, испаряемых поверхностью листа. По времени, необходимому для перехода окраски хлоркобальтовой бумаги из голубой (цвет сухого CoCl_2) в розовую (цвет $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), судят о транспирации растений.

Хлоркобальтовый метод определения транспирации листьев, не отделенных от растения, очень прост и доступен. Однако его применение ограничено только сравнительными опытами, так как не позволяет определять абсолютные величины интенсивности транспирации. Существуют количественные модификации этого метода, основанные на взвешивании хлоркобальтовой бумаги до и после определенной экспозиции ее на листе, но они неточные.

Задание: Сравнить устьичную и кутикулярную транспирацию.

Порядок выполнения работы. Диски из хлоркобальтовой бумаги на целлюлоидной подложке прикладывают к верхней и нижней сторонам листа и укрепляют подложку канцелярской скрепкой. Наблюдают, через сколько минут бумажка на верхней и нижней сторонах листа порозовеет. По скорости порозовения определяют, с какой стороны листа испарение идет быстрее.

По окончании опыта под микроскопом исследуют эпидермис верхней и нижней сторон листа и подсчитывают количество устьиц в поле зрения. Для этого просматривают по три-пять полей зрения на трех препаратах каждого варианта и вычисляют среднее арифметическое значение.

Зарисовывают эпидермис верхней и нижней сторон листа. Делают выводы о причинах различной интенсивности испарения сторон листа данного растения и о соотношении между устьичной и кутикулярной транспирацией.

Результаты опыта записывают в таблицу 10 по приведенной форме.

Таблица 10- Сравнение транспирации верхней и нижней сторон листа

Сторона листа	Период наблюдения		Время, за которое порозовеет бумага, мин	Число устьиц в поле зрения микроскопа	
	Начало опыта	Конец опыта		Отдельные подсчеты	Среднее арифметическое

Материалы и оборудование: трехнедельные растения фасоли. Диски из хлоркобальтовой бумаги на целлюлоидной подложке, канцелярские скрепки, часы, микроскопы, стекла предметные и покровные, пинцеты, капельницы с водой, лезвия безопасной бритвы, препаровальные иглы.

Приготовление хлоркобальтовой бумаги. Берут равномерную по толщине фильтровальную бумагу или обеззоленные тонкие фильтры и намачивают в кювете с раствором хлорида кобальта, приготовленным по Камерлингу (в 100 мл воды растворяют 6,7 г $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ и 2,64 г NaCl), в течение 1 мин, а затем высушивают в подвешенном состоянии на стеклянных палочках до появления голубого цвета. Из бумаги вырезают кружочки диаметром 1 см и при помощи полиэтиленовой ленты с клейким слоем приклеивают по два к целлюлоидной подложке.

Хранят целлюлоидные камеры с хлоркобальтовой бумагой в эксикаторе над хлоридом кальция.

2.7 Определение интенсивности транспирации у срезанных листьев при помощи торсионных весов

Работа верхнего концевое двигателя обусловлена испарением воды с поверхности листьев - транспирацией. Присасывающее действие транспирации передается корням в форме гидродинамического натяжения, связывающего работу обоих двигателей. Работа верхнего концевое двигателя, основанная на

использовании в качестве источника энергии солнечной радиации, регулируется автоматически (усиление потери влаги снижает водный потенциал испаряющих клеток, что ведет к усилению поступления в них воды). У хорошо облиственных растений присасывающая сила транспирации во много раз превосходит силу корневого давления.

Количество воды, испаряемой растением с единицы листовой поверхности в единицу времени, называется интенсивностью транспирации.

Основную роль в регуляции испарения воды растениями играют устьица. Поэтому интенсивность транспирации в значительной мере зависит от степени их открытости. Кроме того, растение может уменьшать транспирацию, снижая испарение воды с поверхности клеток в межклетники за счет возрастания водоудерживающей способности протоплазмы и клеточных стенок.

Метод основан на учете изменений массы срезанного транспирирующего листа за короткие промежутки времени, что дает возможность наблюдать транспирацию при том состоянии насыщенности листа водой, в каком он находился на растении.

Интервал между взвешиваниями должен не превышать 5 мин, так как при более длительной экспозиции уменьшается содержание воды в листе и интенсивность транспирации снижается. Для быстрого взвешивания удобно пользоваться торзионными весами.

Задание: Определить интенсивность транспирации весовым методом.

Порядок выполнения работы. Устанавливают торсионные весы строго горизонтально по уровню при помощи двух винтов на подставке весов. Проверяют нулевую точку устанавливают указатель массы рычагом натяжения в положении 0, освобождают коромысло весов передвижением закрепительного рычага влево.

Затем приступают к взвешиванию. На крючок коромысла, находящийся сбоку весов в закрытой камере, подвешивают другой крючок и определяют его массу. Для этого освобождают коромысло весов передвижением закрепительного рычага вправо. Поворачивают указатель массы рычагом натяжения влево до совмещения указателя равновесия с чертой равновесия. В таком положении указатель массы показывает на шкале массу груза. Поворачивают закрепительный рычаг влево, стрелка показывает «закрыто» и возвращают указатель массы к нулевому делению на шкале.

Затем определяют интенсивность транспирации. Срезают лист, надевают на крючок и подвешивают на коромысло весов. Быстро взвешивают и помещают лист на наколку. Таким образом, взвешивают листья одного и того же яруса с десяти растений. Через 5 мин после взвешивания первого листа повторно взвешивают все листья в первоначальном порядке.

Массу листьев определяют вычитанием из показателей шкалы массы крючка. Убыль в массе листьев за время между первым и вторым взвешиванием показывает, сколько воды испарилось за этот период. Все расчеты проводят по суммарной массе десяти листьев каждого варианта.

Рассчитывают количество воды, испарившейся из 1 г сырых листьев за 1 час. Определяют интенсивность транспирации в комнатных условиях (контроль) и при сухом теплом ветре (с использованием фена).

Результаты опыта записывают в таблицу 11 по приведенной форме.

Таблица 11-Определение интенсивности транспирации у срезанных листьев

Вариант	Масса листьев, мг	Суммарная масса 10 листьев, мг	Потеря воды 10 листьями, мг	Интенсивность транспирации, г/(м ² ч)
Контроль				
Сухой теплый ветер				

Материалы и оборудование: десятидневные проростки овса или пшеницы, торсионные весы, фен, ножницы, подставки для подвешивания листьев.

2.8 Определение интенсивности транспирации и относительной транспирации с помощью технических весов

Метод основан на учете изменений массы срезанного транспирирующего листа за короткий промежуток времени, что дает возможность наблюдать транспирацию при том состоянии насыщенности листа водой, в каком он находился на растении.

Интервал между взвешиваниями должен не превышать 5 мин, так как при более длительной экспозиции уменьшается содержание воды в листе и интенсивность транспирации снижается. Для быстрого взвешивания удобно пользоваться торсионными весами.

Интенсивность транспирации – количество воды, испаренное с единицы листовой поверхности в единицу времени. Величина зависит от напряженности внешних факторов, времени суток и колеблется в пределах 15-250 г/м² ч.

Основной метод определения интенсивности транспирации – весовой, основанный на учете потери воды при испарении. Этим методом можно выявить транспирацию целого растения или отдельных его частей. Работа с целыми укорененными растениями представляет значительные трудности, поэтому чаще пользуются срезанными побегами или листьями. Чтобы во время опыта оводненность тканей не снижалась, их помещают в прибор Веска, заполненный водой.

Относительная транспирация – отношение интенсивности транспирации к интенсивности испарения со свободной водной поверхности при тех же условиях. Этот показатель характеризует способность растений регулировать транспирацию и выражается обычно цифрами 0,1-0,5 поднимаясь

иногда до 1 и опускаясь у некоторых хорошо защищенных от потери воды листьев до 0,01 и ниже.

Задание: определить интенсивность транспирации и относительной транспирации весовым методом.

Порядок выполнения работы. С растения подсолнечника срезают лист вместе с черешком. Черешок плотно укрепляют ваткой в отверстии каучуковой пробки. Нижний конец черешка подрезают наискось под водой примерно на 1 см для восстановления водных нитей в проводящих сосудах. Вставляют пробку с листом в прибор Веска, наполненный водой комнатной температуры так, чтобы черешок листа был погружен в воду. Смонтированный прибор Веска должен быть совершенно сухим, плотно закрытым: пробка должна касаться воды, а черешок листа погружен в воду.

Подготавливают, таким образом два прибора Веска, взвешивают их на технических весах и, снабдив этикетками, помещают один в темную камеру, другой на прямой свет. Через час взвешивают повторно. По разнице с первоначальной массой устанавливают количество воды, которое испарил лист за время опыта.

На основании полученных результатов рассчитывают интенсивность транспирации, т.е. количество воды в граммах, которое испаряет единица листовой поверхности ($1 \text{ м}^2/\text{ч}$) в единицу времени (1 ч).

Чтобы сделать такой расчет, нужно знать площадь листа, взятого для опыта. При ее определении можно использовать весовой метод. Вырезают из бумаги квадрат размером 100 см^2 ($10 \times 10 \text{ см}$) и взвешивают. На другой листок такой же бумаги кладут исследуемый лист, тщательно обводят его контур остро заточенным карандашом, вырезают его и также взвешивают. Из полученных данных составляют пропорцию и находят площадь листа. Если квадрат бумаги в 100 см^2 имеет массу \underline{A} г, а контур листа неизвестной площади \underline{B} г, то искомую площадь листа находят следующим образом:

$$S = \frac{100 * B}{A} \quad (4)$$

Интенсивность транспирации (в $\text{г}/\text{м}^2 \text{ ч}$) рассчитывают по 5 формуле:

$$I_T = \frac{10000 * C}{S * t} \quad (5)$$

где C – убыль в массе за время опыта, г,

S – площадь листа, см^2 ,

t – продолжительность опыта, ч.

Параллельно в тех же условиях определяют испарение со свободной водной поверхности. Для этого учитывают количество воды, испарившееся за 1ч с поверхности чашки Петри. Определив внутренний диаметр, вычисляют ее площадь по формуле:

$$S = \pi r^2 \quad (6)$$

Рассчитывают интенсивность испарения E со свободной водной поверхности, пользуясь формулой 5, и вычисляют величину относительной транспирации T :

$$T_{\text{отн}} = \frac{I_m}{E} \quad (7)$$

Сравнивают полученные величины и делают выводы о зависимости интенсивности транспирации и относительной транспирации от условий освещения и о способности растений регулировать транспирацию.

Результаты опыта записывают в таблицы 12 по приведенной форме.

Таблица 12- Определение интенсивности транспирации и относительной транспирации

Транспирация	
Масса прибора с листом, г в начале опыта в конце опыта	
Убыль массы, г	
Площадь листа, см ²	
Продолжительность опыта, ч	
Интенсивность транспирации г/(м ² ч)	

Продолжение таблицы 12

Испарение	
Масса чашки Петри с водой, г в начале опыта в конце опыта	
Убыль массы, г	
Площадь испаряющей поверхности, см ²	
Продолжительность опыта, ч	
Интенсивность испарения г/(м ² ч)	
Относительная транспирация	

Материалы и оборудование: технические весы, трехнедельные растения подсолнечника, герань, ножницы, скальпель, крышка чашки Петри, миллиметровая бумага.

2.9 Определение водоудерживающей способности растений методом «завядания» по А.Арланду

В регулировании растений значительная роль принадлежит их водоудерживающим силам, обусловленным в основном содержанием в клетках осмотически активных веществ и способностью коллоидов к набуханию.

Водоудерживающая способность клеток зависит от условий выращивания растений. В частности, большое внимание оказывают условия питания. При оптимальных условиях водоудерживающая способность возрастает. Определение водоудерживающей способности по Арланду основано на учете потери воды завядающими растениями.

Задание: определить водоудерживающую способность традесканции, герани сделать вывод о водоудерживающей способности растений.

Порядок выполнения работы. Берут пятнадцатидневные растения овса, выращенные на песке с внесением удобрений (опыт) и без удобрений (контроль). Из песка осторожно извлекают по 20 растений каждого варианта и отделяют надземную часть от корней. Затем часть стебля, которая находилась в песке, покрывают парафином, чтобы исключить ее участие в испарении воды. Для этого нижние этиолированные части стебля опускают в расплавленный парафин, подкрашенный Суданом III, с температурой не выше 50⁰С.

Взвешивают все растения вместе на технических весах, раскладывают их в штативы. Взвешивания повторяют через 30 мин, 1ч, 1,30 мин, 2 часа. Убыль в массе показывает абсолютное количество воды, которое теряют испытуемые растения за 30 мин. Используя полученные данные, вычисляют количество испарившейся воды и % к первоначальному весу испарившейся массы в течение 30 мин; 1; 1,5; 2 часов. Изображают графически динамику водоотдачи, делают заключение о водоудерживающей способности растений разных видов.

Результаты опыта записывают в таблицу 13 по приведенной форме.

Таблица 13- Определение водоудерживающей способности растений

Объект	Масса растений, г	Количество испарившейся воды, г	Потеря воды к исходному весу, %
	первоначальная		
	через 30 мин		
	через 1 ч		
	через 1 ч30 мин		
	через 2 часа		

Материалы и оборудование: пятнадцатидневные растения овса или пшеницы, парафин, подкрашенный Суданом III, штативы, технические веса, ножницы, водяная баня.

2.10 Определение продуктивности транспирации и транспирационного коэффициента

При выращивании сельскохозяйственных культур большое значение имеет эффективность использования воды растениями, показателем которой служит транспирационный коэффициент. На величину транспирационного коэффициента влияют условия минерального питания, обеспеченность водой, интенсивность освещения и другие факторы. Степень использования воды растением можно повысить, создавая для него оптимальные условия водоснабжения и питания. Закономерности водного обмена растений важно учитывать при разработке агротехнических приемов, направленных на получение высоких урожаев.

Для полной характеристики водного обмена растений необходимо знать показатели эффективности расходования воды: продуктивность транспирации, т. е. количество сухого вещества (г), образовавшееся при испарении 1 кг (1 л) воды, и обратную величину - транспирационный коэффициент.

При образовании 1 г сухого вещества расходуется в среднем 300 - 500 г воды. Более низкие значения транспирационного коэффициента у просовидных злаков, более высокие - у льна и многолетних трав. Значительное влияние на эффективность использования воды оказывают условия выращивания растений: чем лучше условия минерального питания и влагообеспечения растений, тем выше урожай и меньше расход воды на создание единицы массы.

Показатели продуктивности использования воды обычно определяют за вегетационный период. Однако следует иметь в виду, что в течение онтогенеза они меняются. Так, у яровой пшеницы в период всходов транспирационный коэффициент наибольший, затем он снижается и достигает минимума в конце кущения, вновь возрастает во время выхода в трубку, достигая максимума в фазах колошения и цветения, после чего снижается.

Задание: определить показатели эффективности расходования воды пшеницей в фазах кущения и колошения.

Порядок выполнения работы. Для работы в песчаной культуре на 0,5 нормы питательной смеси Хогланда-Снайдерса выращивают трех и пятидневные растения яровой пшеницы. Подбирают по шесть сосудов с выравненными растениями каждого срока посева.

Из трех сосудов каждого варианта аккуратно извлекают растения, отмывают корни от песка, просушивают фильтровальной бумагой и определяют начальную массу воздушно-сухого материала в каждом сосуде отдельно. Для этого растения измельчают и в открытых коробочках из кальки помещают в сушильный шкаф, предварительно нагретый до температуры 105°C; при этой температуре происходит полная инактивация всех ферментов, что предотвращает последующие изменения сухой массы. Затем материал высушивают на воздухе или в сушильном шкафу при 60°C и взвешивают на технических весах с точностью до второго знака.

Оставшиеся три сосуда каждого варианта нумеруют, поливают через

дренажную трубку до постоянной массы (влажность 60% НВ) и в течение недели учитывают количество израсходованной растениями воды.

Правильный учет возможен только при исключении испарения влаги корнеобитаемой средой. Для этого поверхность песка заливают расплавленным (не горячим!) парафином, который, затвердев, дает непроницаемый для воды слой. Можно заменить парафин слоем негигроскопичной ваты или мульчировать поверхность негигроскопичным гранулированным пенопластом. Через 1 неделю определяют воздушно-сухую массу растений каждого сосуда. Работу выполняют в той же последовательности, что и при первом наблюдении.

На основании данных о количестве израсходованной растениями каждого сосуда воды и накопленного сухого вещества за этот период вычисляют продуктивность транспирации и транспирационный коэффициент. Результаты определений сопоставляют по вариантам. Результаты опыта записывают в таблицу 14 по приведенной форме.

Таблица 14 - Определение показателей эффективности расходования воды

Возраст растения, нед.	Начальная воздушно-сухая масса, г	Количество израсходованной за 1 нед воды, г	Накоплено воздушно-сухой массы, г	Транспирационный коэффициент	Продуктивность транспирации

Материалы и оборудование: Трех- и пятинедельные растения пшеницы, выращенные в литровых сосудах в песчаной культуре. Технические весы, сушильный шкаф, кристаллизаторы, калька, фильтровальная бумага, стеклянные стаканчики.

3 ФОТОСИНТЕЗ

Информационный материал. Фотосинтез является процессом, в результате которого происходит трансформация поглощенной автотрофным организмом энергии света в химическую энергию биогенных соединений растений. При этом энергия света в основном используется для инициирования реакций восстановления CO_2 до образования различных моносахаридов. В процессе фотосинтеза могут восстанавливаться и другие соединения с образованием сульфатов, нитратов, водорода. Кроме того, энергия света расходуется на транспорт веществ через мембраны и на процессы биосинтеза.

В целом фотосинтез представляет собой окислительно-восстановительный процесс взаимодействия CO_2 и H_2O , который протекает при участии хлорофилла, осуществляющего перенос энергии света.

Фотосинтетические реакции протекают в хлоропластах. Хлоропласты высших растений обычно имеют шарообразную или дисковидную форму (от 1 до 10 мкм). В клетках высших растений содержится несколько десятков хлоропластов, общая суммарная поверхность которых может превышать площадь листьев в десятки и даже сотни раз. Снаружи хлоропласты окружены сплошной белково-липидной оболочкой, состоящей из двухслойной мембраны (внутренняя и внешняя мембраны). Внутренняя часть хлоропласта представлена ламеллами, которые погружены в строму. Большая часть ламелл плотно упакована в отдельные граны, уложенные поперек хлоропласта. Каждая грана представляет собой стопку дисков, которые в гранах называются тилакоидами. Последние имеют мембранную структуру.

В составе гран содержится основная масса хлорофиллов, находятся все пигменты фотосинтеза, а также функциональные белки, липиды и ферменты. Спаренные мембраны тилакоидов гран служат для улавливания квантов света.

Хлоропласты растений имеют собственную ДНК (хлДНК), которая представляет собой замкнутую кольцевую двухспиральную молекулу, образованную из последовательно связанных нуклеотидов. В составе первичной структуры ДНК может быть от $1,3 \cdot 10^5$ до $1,6 \cdot 10^5$ пар азотистых оснований. В настоящее время изучена первичная структура ДНК табака и риса. В структуре хлДНК проявляют свою селективность 130 генов.

ДНК хлоропластов содержит информацию о примерно 40 белках тилакоидной мембраны, участвующих в проявлении фотосинтетической активности хлоропластов, что составляет около половины общего состава белков тилакоидов. Следует отметить, что в хлДНК имеется ген, содержащий информацию о большой субъединице рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксылазы. Фермент катализирует лимитирующую стадию в цикле Кальвина.

Исследование фотосинтеза позволило выявить наличие двух последовательных стадий, которые протекают в присутствии и в отсутствии света. Под действием света осуществляются реакции фотолиза воды, которые протекают при участии пигментов и каталитических белков фотосинтетических систем. В результате световой стадии фотосинтеза

синтезируется НАДФН, реакцию катализирует фермент ферредоксин-НАДФ⁺-редуктаза.

Таким образом, фотосинтез представляет собой совокупность физико-химических процессов, инициируемых светом, в результате которых происходит процесс расщепления воды, обеспечивающий протекание реакций синтеза высокоэнергетических молекул (АТФ, ГТФ, ЦТФ и др.) и восстановленной формы НАДФ⁺, используемых в дальнейшем в темновых реакциях фотосинтеза. При этом аденозинтрифосфорная кислота расходуется в биологических реакциях, определяя направленность протекания биологических процессов, участвуя в синтезе различных биологических молекул, тогда как восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат используется в реакциях цикла Кальвина.

Световые реакции фотосинтеза протекают в тилакоидах, в мембранах которых располагаются компоненты фотосинтетических систем. Это, прежде всего, светособирающие пигменты и функциональные белки, а также электронтранспортные комплексы, НАДФН-синтезирующий фермент и АТФ-синтезирующий комплекс. Последний осуществляет фосфорилирование АДФ с образованием АТФ.

Темновые стадии фотосинтеза протекают в строме хлоропластов и представляют собой совокупность биохимических процессов, в результате которых происходит восстановление CO₂ до углеводов.

Методические рекомендации по изучению темы. При изучении этой темы необходимо уяснить, что фотосинтез является основой биоэнергетики на земном шаре, определить природу основных реакций фотосинтеза, его физико-химическую сущность, составляющие энергетического баланса, распределение поглощенного света по пигментам зеленой клетки, этапы развития представлений о процессе фотосинтеза.

Следует также изучить первичные процессы фотосинтеза у C₃-, C₄- и САМ-растений, пути миграции энергии, структуру и функции электроннотранспортной цепи фотосинтеза, квантовый расход и квантовый выход, циклическое и нециклическое фотофосфорилирование, основные закономерности функционирования электроннотранспортной цепи в связи с реакциями энергообмена.

Следует обратить внимание на системы регуляции фотосинтеза. Необходимо изучить интенсивность фотосинтеза, методы ее определения, зависимость этого показателя от освещенности и спектрального состава света, влияние внешних и внутренних факторов на интенсивность фотосинтеза, компенсационные точки, взаимодействие факторов и регуляторную роль фотосинтеза. Отметить возможные пути повышения фотосинтетической активности сельскохозяйственных культур.

Необходимо знать о международной биологической программе «Фотосинтез и продуктивность растений» и ее роли в обеспечении населения земного шара продуктами питания.

Литература: 1, с.93-164, 2, с.117-198, 3, с.108-208, 4, с.238-252; 5, 74-113.

Вопросы для самопроверки:

1. Современные представления о сущности световой фазы фотосинтеза.
2. Последовательность восстановления CO_2 в процессе фотосинтеза, первичные продукты фотосинтеза.
3. Биоэнергетика фотосинтеза. Теоретический коэффициент фотосинтеза, его определение.
4. Фитометрические параметры посевов высокой продуктивности.
5. Теоретические основы и практические приемы создания посевов высокой продуктивности.

РАБОТА В ЛАБОРАТОРИИ

3.1 Получение спиртового раствора (вытяжки) пигментов

Обычно пигменты из растительной ткани извлекают полярными растворителями (этиловый спирт, ацетон), которые разрушают связь хлорофиллов и ксантофиллов с липопротеидами пластид и тем самым обеспечивают их полное экстрагирование.

Задание: ознакомиться с методами экстракции пигментов.

Порядок выполнения работы. Сухие листья крапивы помещают в коническую колбу на 200 мл и ошпаривают кипятком, затем воду сливают. В колбу приливают 100 мл этилового спирта, закрывают ее корковой пробкой с обратным холодильником и ставят на баню с кипящей водой для экстрагирования пигментов. После пятиминутного кипячения содержимое колбы охлаждают и осторожно сливают в другую колбу. Экстракт используют в последующих опытах.

Материалы и оборудование: сухие или сырые листья, водяные бани, штативы с пробирками, пипетки на 1 мл, конические колбочки, мерный цилиндр, воронки, насос Камовского, стеклянный фильтр, фарфоровые чашки, ступки.

Реактивы: этиловый спирт.

3.2 Разделение пигментов по Краусу

Метод основан на различной растворимости пигментов в спирте и бензине. Указанные растворители в одном сосуде не смешиваются, а образуют две фазы – верхнюю бензиновую, нижнюю спиртовую, благодаря чему компоненты смеси пигментов разделяются.

Задание: зарисовать картину распределения пигментов и сделать выводы.

Порядок выполнения работы. В пробирку наливают 2-3 мл спиртового экстракта пигментов, добавляют 3-4 мл бензина. Содержимое пробирки сильно встряхивают, предварительно закрыв ее пробкой или большим пальцем, и оставляют отстояться. По мере расслоения эмульсии бензиновый слой будет

окрашиваться в зеленый цвет из-за лучшей растворимости в нем хлорофилла. В бензин переходит и каротин, но его окраска маскируется окраской хлорофилла. Ксантофилл остается в спиртовом слое и придает ему золотисто-желтую окраску.

Если пигменты разделяются не достаточно четко, добавляют три-четыре капли воды и снова встряхивают. При избытке воды возможно помутнение нижнего слоя. В этом случае следует прилить немного этилового спирта и взболтать содержимое пробирки.

Материалы и оборудование: спиртовая вытяжка пигментов, штативы с пробирками, пипетки на 1 мл, конические колбочки, резиновые пробки.

Реактивы: бензин, этиловый спирт.

3.3 Омыление хлорофилла щелочью

Обрабатывая хлорофилл щелочью, можно вызвать омыление эфирных групп, т.е. отщепление остатков метилового спирта и фитола.

Образующаяся при этом соль хлорофиллиновой кислоты сохраняет зеленую окраску и оптические свойства хлорофилла, но отличается от него большей гидрофильностью.

Задание: зарисовать окраску слоев, указывая распределение пигментов, сделать выводы.

Порядок выполнения работы. В пробирку с 2-3 мл спиртового раствора пигментов приливают 1 мл 20%-ного раствора NaOH и взбалтывают. После смешивания экстракта с щелочью пробирку ставят на кипящую водяную баню. Как только раствор закипит, пробирку вынимают и охлаждают. К охлажденному раствору добавляют равный объем бензина и несколько капель воды для лучшего разделения смеси. Затем содержимое пробирки резко встряхивают и дают отстояться. В бензиновый слой переходят каротин и ксантофилл, а в спиртовой - натриевая соль хлорофиллиновой кислоты.

Материалы и оборудование: спиртовая вытяжка пигментов, конические колбы с обратным холодильником, водяные бани, штативы с пробирками, пипетки на 1 мл, конические колбочки, воронки, мерный цилиндр.

Реактивы: этиловый спирт, 20% -ный раствор NaOH, бензин.

3.4 Получение феофитина и обратное замещение водорода атомом металла

Атом магния сравнительно слабо удерживается в порфириновом ядре хлорофилла и при осторожном воздействии сильных кислот легко замещается двумя протонами с образованием феофитина бурого цвета.

Если на феофитин действовать солями меди, цинка или ртути, то вместо двух протонов в ядро входит соответствующий металл и продукты реакции

окрашиваются в зеленый цвет. Полученная окраска несколько отличается от окраски хлорофилла.

Цвет хлорофиллов обусловлен металлорганической связью в их молекулах. Обратное введение магния в феофитин сильно затруднено.

Задание: зарисовать окраску феофитина и медьпроизводного хлорофилла, сделать выводы.

Порядок выполнения работы. В две пробирки берут по 2-3 мл спиртовой вытяжки пигментов и добавляют по одной – две капли 10%-ного раствора соляной кислоты. При взбалтывании зеленая окраска хлорофилла переходит в бурую, характерную для феофитина. Одну пробирку с феофитином оставляют для контроля, а во вторую вносят несколько кристаллов ацетата меди и нагревают раствор на водяной бане до кипения. По мере нагревания бурый цвет раствора меняется на зеленый в результате образования хлорофиллоподобного производного меди.

Материалы и оборудование: спиртовая вытяжка пигментов, конические колбы с обратным холодильником, водяные бани, штативы с пробирками, пипетки на 1 мл, конические колбочки, воронки, мерный цилиндр.

Реактивы: 10%-ный раствор соляной кислоты в капельнице, ацетат меди.

3.5 Оптические свойства пигментов

В процессе фотосинтеза световая энергия, перед преобразованием в химическую, должна быть поглощена пигментами: пластидные пигменты поглощают свет видимой части спектра (380-720 нм), чем обусловлено название излучения этой области спектра (фотосинтетически активная радиация, или ФАР). Пигменты поглощают видимый свет не полностью, а избирательно, т. е. каждый пигмент имеет свой характерный спектр поглощения. В частности, важнейшая особенность спектра поглощения хлорофилла **a** и **b** - наличие у них двух ярко выраженных максимумов: в красной области - соответственно 660 и 640 нм и в сине-фиолетовой - 430 и 450 нм. Минимум поглощения лежит в зоне зеленых лучей. Этим и объясняется зеленая окраска пигментов. В живом листе у хлорофиллов более широкий и выравненный спектр поглощения. Так, красный максимум поглощения хлорофилла **a** в хлоропласте имеет несколько пиков: 670, 683, 700, 710 нм; у хлорофилла **b** он приходится на длины волн 650-655 нм. Аналогичное смещение в сторону длинноволновой части характерно и для синего максимума. Указанные различия между спектрами поглощения хлорофиллов в растворе и листе обусловлены степенью агрегации молекул пигмента и характером их связи с липопротеидным комплексом в ламеллах тилакоидов.

Каротины и ксантофиллы поглощают свет только сине-фиолетовой части спектра. Оптические свойства пигментов определяются особенностями их химической структуры. В молекулах хлорофиллов и каротиноидов существует система конъюгированных (сопряженных) двойных связей. Скелет системы

составляют атомы углерода, соединенные между собой простыми (двухэлектронными) ковалентными связями - σ -электронами. В образовании двойных связей, помимо σ -электронов, участвуют два π -электрона. В подобных системах π -электроны не связаны с определенными атомами углерода, поэтому могут перемещаться по всей молекуле, образуя делокализованное электронное облако. Возбуждение π -электронов может осуществляться за счет квантов видимого света. Присутствие магния в ядре обуславливает еще большее усиление поглощения в красной области и ослабление - в зеленой и желтой областях спектра. Замещение магния протонами при обработке хлорофилла кислотой приводит к образованию феофитина имеющего буро-зеленый цвет и ослабленный красный максимум поглощения.

На положение максимумов спектра поглощения влияют природа растворителя и взаимодействие молекул хлорофилла друг с другом, а также с другими компонентами, липидами и белками. Так, у молекул хлорофилла, находящегося в хлоропластах, красный максимум поглощения сдвинут в более длинноволновую область (до 680 нм) по сравнению с раствором хлорофилла в этиловом спирте (660-663 нм).

Для установления спектра поглощения пигментов используют спектроскоп. В него одновременно поступают два световых потока. Один идет непосредственно от источника света и проходит через кювету с пигментом, а потом разлагается призмой на составные части, другой отражается зеркалом в боковую щель, где попадает на грань второй призмы. В результате возникают два параллельных спектра, расположенных один над другим. Спектр отраженного от зеркала света служит контролем. По положению темных полос в опытном спектре определяют, какие лучи поглощаются исследуемым пигментом.

Задание: изучить устройство спектроскопа, определить спектры поглощения хлорофилла, каротина и ксантофилла.

Порядок выполнения работы. Определение спектра поглощения хлорофилла. Спектроскоп устанавливают по отношению к свету так, чтобы все области спектра имели одинаковую яркость. В кювету наливают спиртовую вытяжку хлорофилла, помещают ее перед щелью спектроскопа и определяют положение темных полос, которые соответствуют лучам, поглощаемым хлорофиллом.

Ширина полос зависит от концентрации пигмента или толщины слоя его раствора. Для наблюдения спектров поглощения растворов с разной концентрацией хлорофилла разбавляют вытяжку спиртом в отношениях 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5 и т. д. и исследуют оптические свойства полученных растворов.

По окончании опыта делают заключение о зависимости спектра поглощения хлорофилла от концентрации его раствора и объясняют установленный факт.

Спектры поглощения каротина и ксантофилла. Для получения спектра поглощения каротиноидов пипеткой осторожно берут бензиновый раствор, в который перешли каротин и ксантофилл после омыления

хлорофилла, переносят его в кювету и помещают перед щелью спектроскопа. Рассматривают спектр поглощения и сравнивают его со спектром поглощения хлорофилла. Зарисовывают оба спектра.

Флуоресценция хлорофилла. Флуоресценция - испускание света возбужденной молекулой хлорофилла. Суть явления состоит в следующем. При комнатной температуре и в темноте молекула хлорофилла находится в основном состоянии, т. е. энергия ее соответствует нижнему синглетному уровню (S_0). Поглощение кванта света сопровождается переходом - одного из электронов на более высокий энергетический уровень. В результате возникает синглетное электронно-возбужденное состояние молекулы.

Синглетным называют такое возбужденное состояние, при котором переход электрона на более высокий энергетический уровень не сопровождается изменением знака спина. В спектрах поглощения ему соответствует одна линия. Если при этом поглощается квант красного света, то электрон переходит на первый синглетный уровень (S_1) с энергией 1,7 эВ и временем жизни 10^{-8} - 10^{-9} с. В случае захвата кванта синего света электрон оказывается на втором синглетном уровне (S_2) с энергией 2,9 эВ, а время жизни электрона в таком состоянии уменьшается до 10^{-12} - 10^{-13} с.

Независимо от того, в какое электронно-возбужденное состояние молекула была переведена поглощенным квантом, она в конечном счете переходит на низший колебательный подуровень первого синглетного возбужденного состояния (S_1). Энергия этого состояния может использоваться на осуществление фотохимических процессов, мигрировать от одной молекулы хлорофилла к другой, растрачиваться в виде тепла или флуоресцентного излучения. В последнем случае электрон возвращается в исходное положение.

Таким образом, независимо от длины возбуждающего света хлорофилл флуоресцирует только в красной части спектра. Уменьшение энергии кванта, излученного возбужденной молекулой, по сравнению с энергией поглощенного кванта получило название стоксового сдвига.

Флуоресцируют только хлорофилл **a** и хлорофилл **b** каротиноиды не обладают этой способностью. В этиловом спирте у хлорофилла **a** наблюдается рубиново-красная флуоресценция с максимумом 668 нм, у хлорофилла **b** - 648 нм

В живом листе основным флуоресцирующим пигментом служит хлорофилл **a**. При этом в листьях флуоресценция выражена гораздо слабее, чем в растворе, так как часть поглощенной энергии используется на сенсбилизацию фотохимических реакций. Поэтому возрастание интенсивности фотосинтеза, как правило, влечет за собой ослабление флуоресценции. Изучение флуоресценции дает ценные сведения не только об использовании энергии в фотохимических процессах, но и о характере взаимодействия молекул различных пигментов в ламеллах тилакоидов хлоропласта, миграции энергии в фотосистемах и др.

Для определения флуоресценции спиртовую вытяжку пигментов или раствор хлорофилла в бензине, полученный при разделении пигментов по

Краусу, помещают на темную бумагу у источника освещения и рассматривают в отраженном свете. Вытяжка хлорофилла будет темно-красного цвета.

Материалы и оборудование: спиртовая вытяжка пигментов листа, раствор каротина и ксантофилла (бензиновый слой, полученный после омыления хлорофилла), пипетки на 1 мл, спектроскопы.

3.6 Определение площади листьев

При изучении интенсивности фотосинтеза, дыхания, транспирации чаще всего получаемые величины рассчитывают на единицу листовой поверхности, поэтому возникает необходимость ее измерения. Определение площади листьев имеет и самостоятельное значение при установлении листового индекса, фотосинтетического потенциала и др.

Листовой индекс - это отношение общей площади листьев растений к площади посева. В зависимости от культуры и условий произрастания он обычно варьирует от 1 до 7 и более, по нему можно судить о степени обеспеченности посева водой и элементами минерального питания. У большинства сельскохозяйственных растений оптимальный листовой индекс составляет 4-5 м²/м² посева.

Для характеристики фотосинтетической работы посева используют специальный показатель - фотосинтетический потенциал. Его находят, суммируя площади листьев (м² на 1 га посева за каждые сутки вегетационного периода или определенной его части). Для хороших посевов фотосинтетический потенциал за вегетацию составляет 2,2-3 млн м²/(га-сут), средних - 1,0-1,5 и плохих - 0,5-0,7 млн м²/(га-сут). Данный показатель хорошо коррелирует с показателем урожайности. Например, фотосинтетический потенциал около 3 млн м²/(га-сут) может обеспечить получение 4 - 6 т/га зерна или 70 - 80 т/га корне- и клубнеплодов.

Для определения площади листовой поверхности разработано множество методов и приемов. Рассмотрим некоторые из них.

Задание: изучить методы высечек, отпечатков, определить площадь листьев пшеницы.

Порядок выполнения работы. Метод отпечатков. Лист растения накладывают на однородную бумагу и обводят контур остро отточенным карандашом. Отпечаток листа можно получить и при помощи светочувствительной бумаги. Для этого лист кладут на светочувствительную бумагу, прижимают ее стеклянной пластинкой и выставляют на солнечный свет или освещают яркой электрической лампой в течение 3-5 мин. Затем контур отпечатка обводят карандашом. Иногда светочувствительную бумагу с отпечатками листьев помещают на 1-2 мин в эксикатор, на дно которого предварительно наливают раствор аммиака. Под влиянием его паров получают четкие контуры листовых пластинок. Проявленные отпечатки листа можно хранить очень долго.

Получив тем или иным способом отпечаток листа, определяют его площадь весовым методом. Для этого вырезают бумагу по контуру листовой пластинки и взвешивают на торзионных или аналитических весах. Одновременно из такой же бумаги вырезают квадрат, например площадью 100 см² (10x10 см), и также определяют его массу. Площадь исследуемого листа находят по формуле:

$$S=aC/b \quad (8)$$

где **a** - общая масса сырых листьев, г;

C - общая площадь высечек, см²;

b - общая масса сырых высечек, г.

Описанный метод прост и достаточно точен, но малопроизводителен. Кроме того, его практически нельзя использовать при исследовании гофрированных и сложных листьев.

Метод высечек. Этот наиболее доступный и продуктивный метод особенно ценен в полевых опытах. Суть его в следующем. Отбирают среднюю пробу растений, быстро срезают листья и определяют их массу. Затем из каждого листа выбивают пробочным сверлом определенного диаметра несколько высечек, объединяют их вместе и устанавливают массу. Диаметр сверла выбирают в зависимости от размеров листовой пластинки и ее поверхностной плотности. Недостаток метода - относительно невысокая точность.

Определение площади листа по его параметрам. Метод основан на сопоставлении формы листа с некоторой простой геометрической фигурой, достаточно хорошо совпадающей с конфигурацией данного листа.

Лист вписывают в соответствующую фигуру так, чтобы основные параметры их были общими. Так, листья злаков легко вписываются в вытянутый прямоугольник. Измеряя ширину (**a**) и длину (**b**) такого прямоугольника, находят его площадь (**S**), которая равна **S=ab**. Однако листовая пластинка не занимает всю площадь прямоугольника, и действительная площадь листа (**S_л**), определенная похожим методом отпечатков, будет меньше площади фигуры (**S**). Поэтому устанавливают поправочный коэффициент **K**, равный отношению **S_л /S**. Отсюда фактическая площадь листа злака будет равна:

$$S_{л}=abK \quad (9)$$

Аналогично находят поправочные коэффициенты для листьев других растений, моделируя их с соответствующими геометрическими фигурами. Причем коэффициент **K** получают на основании анализа многих листьев и несколько раз в течение вегетационного периода, так как нередко конфигурация листьев претерпевает значительные возрастные изменения.

Кроме того, систематически проверяют ранее рассчитанные поправочные коэффициенты.

Метод определения площади листьев по параметрам можно использовать только при работе с растениями, имеющими сравнительно простую и устойчивую форму. Метод характеризуется простотой, относительно высокой производительностью, возможностью определения листовой поверхности без отделения листьев от растений. Одновременно следует отметить его невысокую точность.

Автоматическое планиметрирование. Для определения площади листьев все шире применяют различные модели фотопланиметров: с параллельным пучком, с интегрирующей сферой, со сканирующим лучом. Основное преимущество фотопланиметров - высокая производительность. Однако работать с ними можно только на отделенных от растения листьях и в лабораторных условиях. Кроме того, фотопланиметры имеют ряд существенных конструктивных недостатков, служащих источником различных ошибок.

Материалы и оборудование: растения пшеницы, ячменя, подсолнечника, свеклы. Торзионные или аналитические весы, обычная и светочувствительная бумага, линейки, сверла, ножницы, стеклянные пластинки, эксикатор с аммиаком, электрические лампы на 300 Вт.

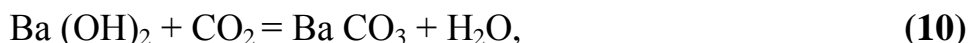
3.7 Определение интенсивности фотосинтеза методом ассимиляционной колбы (по Л.А.Иванову и Н.Л.Косович)

На ход фотосинтеза большое влияние оказывают как внутренние факторы (вид растения, его онтогенетическое состояние, структура и возраст листа, содержание хлорофилла, отток ассимилятов), так и внешние условия (интенсивность света, концентрация CO_2 , температура, уровень снабжения элементами минерального питания и водой).

Для характеристики ассимиляционной деятельности растений обычно используют величины интенсивности фотосинтеза. Наблюдения за изменениями этого показателя имеют важное значение для познания физиологии, сравнительной физиологической оценки растений, их взаимоотношений в фитоценозах.

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

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



Из приведенных уравнений видно, что 1 молю HCl соответствует 0,5 моля CO_2 , т.е. $44 : 2 = 22 \text{ г } \text{CO}_2$.

При концентрации HCl 0,025 н. в 1 мл этого раствора содержится 0,000025 моля HCl , что эквивалентно $22 \cdot 0,000025 = 0,00055 \text{ г}$, или 0,55 мг CO_2 .

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

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

Задание: определить и вычислить интенсивность фотосинтеза.

Порядок выполнения работы. Взять две одинаковые колбы и обернуть их горла кусками бумаги или салфетками. Выдержать колбы в одинаковых условиях открытыми в течении 20-30 мин для заполнения воздухом. Затем одновременно вставить в них пробки с отверстиями, закрытыми стеклянными пробками, не допуская нагревания колб прикосновением рук. Срезать веточку или отдельный лист, обновить бритвой срез под водой и поставить в заполненную водой пробирку, прикрепленную к палочке, вставленной в пробку (воду употреблять кипяченую, чтобы не было пузырьков воздуха). Быстрым, но спокойным движением вынуть из колбы пробку № 1 и вставить пробку № 2 (с растением). Выставить колбу на свет и отметить время. Во время опыта необходимо следить за температурой внутри колбы и в случае перегрева охладить колбу водой. Особенно важно, чтобы в конце опыта температура была такой же, как и в начале, иначе воздух может войти в колбу или выйти из нее.

Продолжительность опыта должна быть такой, чтобы листья успели поглотить не более 25% содержащегося в колбе CO_2 , при хорошем освещении для колбы вместительностью 1 л экспозиция не должна превышать 5 мин, для более крупных колб – 15-20 мин. По окончании опыта извлечь из колбы растение и быстро закрыть ее пробкой № 1, отметив время. Контрольную колбу

также приоткрыть на несколько секунд. Налить в колбы через отверстие в пробке по 20 мл 0,025н. раствора Ва(ОН)₂, по 2-3 капли фенолфталеина и немедленно закрыть отверстие стеклянной пробкой.

Для увеличения поверхности соприкосновения Ва(ОН)₂ с воздухом осторожно смочить этим раствором стенки колб и в течение 20 мин периодически взбалтывать, после чего провести отверстие в пробке титрование 0,025 н соляной кислотой до исчезновения розового окрашивания. Определить площадь листьев методом.

Результаты опыта записывают в таблицу 15 по приведенной форме.

Таблица 15- Определение интенсивности фотосинтеза

Объект	Площадь листьев, дм ²	Объем прилитого Ва(ОН) ₂ , мл	Расход НСІ, мл		Интенсивность фотосинтеза, мг/ дм ² ч
			опыт	контроль	

Интенсивность фотосинтеза I_{ϕ} вычислить по формуле 18:

$$I_{\phi} = (A - B) 0,55 \cdot 60 / St \quad (12)$$

где **A** – количество мл НСІ, пошедших на титрование барита в опытной колбе;
B – количество мл НСІ, пошедших на титрование барита в контрольной колбе;
0,55 – число мг СО₂ соответствующее 1 мл 0,025 н. НСІ;
S – площадь листьев, дм²;
t – экспозиция, мин 60 – коэффициент перевода минут в часы.

Материалы и оборудование: Комнатные растения или свежесрезанные побеги, поставленные в банку с водой, Одинаковые круглодонные колбы емкостью 1,5-3л 2 шт. Салфетки или куски бумаги 2 шт, резиновые пробки для закрывания колб, 3шт, две пробирки с отверстием, закрытым стеклянной пробкой, в третью пробку вставлены металлическая или стеклянная палочка с привязанной к ней маленькой пробкой и термометр, штатив или широкогорлые сосуды для установки колб в перевернутом положении, бритва, кристаллизатор, электрическая лампа мощностью 200-300 Вт, кипяченая вода, технические весы с разновесами, ножницы, миллиметровая бумага.

Реактивы: 0,025 н. раствор барита в бутылки, соединенной с бюреткой, закрытой пробкой, в которую вставлена трубка с натронной известью, 0,025н НСІ с бюреткой, фенолфталеин в капельнице.

3.8 Определение интенсивности фотосинтеза по накоплению органического углерода (метод И.В.Тюрина, измененный Ф.З.Бородулиной)

Конечный результат фотосинтеза – восстановление углерода углекислого газа и аккумуляция его в синтезируемых органических веществах. Поскольку между количеством образующихся ассимиляторов и фотосинтетической активностью листа существует прямая зависимость, то по накоплению углерода органического вещества можно судить об интенсивности фотосинтеза.

В простейшей форме сущность метода сводится к следующему: из листа соответствующего яруса высекают сверлом диски определенной площади и устанавливают в них содержание углерода. После 2-3 часов пребывания растений на свету из оставшейся части листовой пластины вновь берут такое же количество дисков для вторичного определения углерода.

Количество его в конце и начале опыта, а потом рассчитывают на единицу листовой поверхности и единицу времени.

Задание: определить и вычислить интенсивность фотосинтеза.

Порядок выполнения работы. Сверлом вырезают из листа определенного яруса диски 5 шт. Общей площадью 3 см² и помещают в коническую колбу на 250 мл куда заранее из бюретки наливают 10 мл 0,4 раствора K₂Cr₂O₇. Колбу закрывают маленькой воронкой, служащей обратным холодильником, и ставят на электрическую плиту. Чтобы избежать неравномерного кипения в колбу опускают несколько стеклянных палочек. Как только раствор закипит, замечают время и кипятят точно 5 минут. Затем колбу снимают с плитки и охлаждают. Жидкость должна быть буроватого цвета. Если окраска зеленоватая, то это указывает на недостаточное количество бихромата калия, взятого для окисления органических веществ. В этом случае определение повторяют с большим количеством реактива или меньшим числом высечек.

К охлажденному раствору приливают 150 мл дистиллированной воды, 3 мл 85% ортофосфорной кислоты и 10 капель дефениламина, взбалтывают содержимое колбы и оттитровывают 0,2 н раствором соли Мора. Внимательно следят за переходом бурой окраски в синюю и продолжают титровать до превращения ее в зеленую от одной капли соли Мора. Одновременно проводят контрольное определение (без растительного материала), тщательно соблюдая все указанные виды операции.

Количество углерода органического вещества (в мг), содержащегося в 1 дм² листовой поверхности рассчитывают по формуле 19:

$$X = \frac{(a - b) \cdot K \cdot 0.6 \cdot 100}{S} \quad (13)$$

где **a** – количество раствора соли Мора, израсходованное на титрование контрольного раствора, мл;

b- количество раствора соли Мора, пошедшее на титрование опытного раствора, мл;

K- поправка к титру раствора соли Мора;

0,6 мг углерода, соответствующие 1 мл точно 0,2 н раствора соли Мора;

S- площадь высечек, см².

Результаты опыта записывают в таблицу 16 по приведенной форме.

Таблица 16- Определение интенсивности фотосинтеза

Объект	Время определен ия	Пошло соли Мора		Площадь высечек	Количес тво углерода мг/дм ²	Интенсивность фотосинтеза, мг/ дм ² ч
		контроль	опыт			
	начало опыта					
	после 2-х часового пребывани я на свету					

Материалы и оборудование: герань, коническая колба на 250 мл, бюретки, маленькие воронки, электрическая плита, стеклянные палочки, сверла.

Реактивы: 0,4н раствор K₂Cr₂O₇, 0,2 н соль Мора, 85% ортофосфорная кислота, дефениламин.

Литература: 8, с. 77-80.

3.9 Определение чистой продуктивности фотосинтеза

На долю органических соединений, создаваемых в ходе фотосинтеза, приходится около 85% общей биомассы растительного организма. Поэтому изменение сухой массы может довольно объективно отражать ассимиляционную деятельность растений. Именно этот показатель положен в основу метода определения «нетто-ассимиляции», или чистой продуктивности фотосинтеза.

Чистая продуктивность фотосинтеза (ЧПФ) представляет собой прирост сухой массы растений в граммах за определенное время (сутки), отнесенный к единице листовой поверхности (м²). Ее учитывают периодическим отбором проб растений, у которых определяют общую массу, массу отдельных органов и площадь листьев. Далее «нетто-ассимиляцию» [в г/(м²·сут)] рассчитывают по формуле 14:

$$\text{ЧПФ} = \frac{B_2 - B_1}{0,5(L_1 + L_2) \cdot n}, \quad (14)$$

где **B₁** и **B₂** - сухая масса растений в начале и в конце учетного периода;

$(B_2 - B_1)$ - прирост сухой массы за n дней;

L_1 и L_2 - площади листьев в начале и в конце периода, m^2 ;

$0,5(L_1 + L_2)$ — средняя рабочая площадь листьев за время опыта;

n - период между двумя наблюдениями, дней.

При использовании формулы допускают, что листовая поверхность за время наблюдения нарастает равномерно. В действительности в большинстве случаев площадь листьев увеличивается неравномерно. В связи с этим зарубежными исследователями предложена иная формула для определения чистой продуктивности фотосинтеза:

$$\text{ЧПФ} = \frac{(B_2 - B_1)(\ln L_2 - \ln L_1)}{(L_2 - L_1) \cdot n} \quad (15)$$

где $\ln L_1$ и $\ln L_2$ - натуральные логарифмы показателей площадей листьев в начале и в конце учитываемого периода; остальные показатели те же, что и в предыдущей формуле.

Уравнение наиболее удовлетворительно выражает зависимость «нетто-ассимиляции» от прироста сухого вещества и динамики нарастания листовой поверхности, однако проще пользоваться первой формулой. Следует иметь в виду, что чем больше разрыв между пробами, тем менее точны результаты определения. Оптимальное время между пробами составляет 7-10 дней, в периоды интенсивного роста растений оно может быть сокращено до 5 дней.

Другой источник погрешностей метода связан с трудностью отбора проб растений, обусловленной большим разнообразием культур, ценозов и условий произрастания.

Невозможно точно учесть и изменения массы подземных частей, которые у некоторых растений служат основным местом накопления пластических веществ. Кроме того, часть фотосинтетически усвоенного углерода расходуется на дыхание и экзоосмос. Наконец, в период физиологической зрелости растений наблюдается стабилизация массы сухого вещества, а с возрастом отмечается даже снижение количества биомассы в результате отмирания части листового аппарата и других органов растения. Однако скорость фотосинтеза у функционирующих листьев может не меняться или меняться очень слабо.

В данном случае показатель «нетто-ассимиляции» уже не будет отражать реальное состояние фотосинтетической активности растений. Перечисленные обстоятельства необходимо учитывать при использовании рассматриваемого метода. Метод определения «нетто-ассимиляции» эффективен при исследовании фотосинтеза в природных условиях. Он позволяет получать ценный материал для изыскания наиболее рациональных путей повышения продуктивности культурных и естественных ценозов, прогнозирования и программирования урожаев, целесообразного географического размещения сельскохозяйственных растений.

Показатели чистой продуктивности фотосинтеза в природных условиях обычно колеблются от 0,1 до 20 г и более сухого вещества на $1 m^2$ площади

листьев в сутки: у злаков в фазе интенсивного роста - 40-50, у основных сельскохозяйственных культур при благоприятных условиях - 4-10 г/(м².сут).

Задание: изучить метод определения «нетто- ассимиляции», определить чистую продуктивность фотосинтеза пшеницы.

Порядок выполнения работы. На опытных посевах берут пробы растений. Для уменьшения разброса результатов в пробу включают наиболее типичные и однородные для данного посева и фазы развития экземпляры. У злаков, например, берут не менее пятидесяти параллельных проб, каждая из которых состоит из 10-20 растений. В пробу включают все опавшие и засохшие листья и побеги. Отобранные растения помечают этикетками, заворачивают в бумагу и переносят для анализа в лабораторию, где быстро разделяют на отдельные органы и каждую часть взвешивают. Пожелтевшие или отмершие листья учитывают отдельно.

Дальнейшая обработка материала заключается в отборе проб для определения сухого вещества в отдельных органах растений и измерении площади листьев.

Для нахождения содержания сухого вещества из растительной массы каждой части (%) берут две-три порции материала, помещают в бюксы (или металлические стаканчики), взвешивают и высушивают в термостате при 105°С до постоянной массы. Затем рассчитывают содержание сухого вещества и устанавливают массу абсолютно сухих частей, а в итоге общую сухую массу растений, взятых для исследования.

Площадь листьев определяют по одному из методов, описанных в работе. Определение следует выполнять быстро и только на зеленых листьях.

Через 7-10 дней таким же образом вновь отбирают растения и описанные определения повторяют.

Если наблюдения провести в течение вегетации растений, можно получить ценные данные о продуктивности работы листьев в отдельные периоды жизни исследуемой культуры или в зависимости от условий ее произрастания. Результаты наблюдений записывают в таблицу 17.

Таблица 17- Определение чистой продуктивности фотосинтеза

Дата наблюдения	Вариант опыта	Повторность	Число растений в пробе	Сырая масса, г				Сухая масса, г				Площадь листьев, см ²	Чистая продуктивность фотосинтеза г/(м ² .сут)
				листьев	стеблей	соцветий	общая	листьев	стеблей	соцветий	общая		

Материалы и оборудование: растения пшеницы, ячменя, овса, кукурузы, технические и аналитические весы, термостат, бюксы или металлические стаканчики, ножницы, бумага.

4 ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ

Информационный материал. Дыханием называется процесс окислительного фосфорилирования, протекающий в митохондриях клеток растений при участии кислорода, который сопровождается окислением органических соединений до CO_2 и воды.

Все живые организмы для активного функционирования нуждаются в энергии, которая накапливается в клетках в виде макроэргических (богатых энергией) соединений. К числу таких соединений относится аденозинтрифосфорная кислота (АТФ). Молекулы АТФ необходимы для протекания в клетках анаболических и катаболических процессов. Основным местом синтеза АТФ являются митохондрии. Процессу синтеза АТФ предшествуют процессы окисления органических соединений. Энергия, высвобождающаяся в результате химических реакций окисления, преобразуется в электрохимическую и в дальнейшем используется для синтеза АТФ.

Процесс образования АТФ сопряжен с транспортом электронов по цепи переносчиков от НАДН или ФАДН к O_2 . При этом вначале происходит окисление восстановленных коферментов и создание трансмембранного потенциала, обусловленного зарядом биомембраны протонами (H^+), перенесенными из матрикса в межмембранное пространство митохондрий. Затем электроны и протоны переносятся на молекулу кислорода, восстанавливая ее до молекулы воды. Эти окислительно-восстановительные процессы обуславливают протекание процесса фосфорилирования АДФ с образованием АТФ.

В реакциях окисления участвуют ферменты, располагающиеся во внутренней мембране митохондрий и использующие в качестве носителя заряда ион водорода. В результате окислительной реакции происходит перенос электронов от молекулы-донора к молекуле-акцептору. При этом мультиферментный комплекс из оксидоредуктаз, катализирующих процесс внутриклеточного дыхания, называют дыхательной цепью. Окислительное фосфорилирование катализируется четырьмя ферментативными комплексами, расположенными на внутренней мембране митохондрий, структура и механизм действия которых еще недостаточно изучены. Комплекс I - НАДН: убихинон-оксидоредуктаза (ФМН, FeS), комплекс II - сукцинат: убихинон-оксидоредуктаза (ФАД, FeS), комплекс III - убихинон: феррицитохром *c*-оксидоредуктаза (цит. *v* и *c*, FeS), комплекс IV- ферроцитохром *c*-кислород-оксидоредуктаза (цит. *a* и a_3 Cu^{2+}). Цитохромы располагаются в порядке возрастания окислительно-восстановительного потенциала. Терминальный цитохром *aa_3* (цитохромоксидаза) осуществляет конечную стадию процесса - перенос восстановительных эквивалентов на молекулярный кислород.

В состав комплекса I могут входить от 13 до 46 субъединиц с общей молекулярной массой 700...980 кДа. Располагается комплекс I в окружении фосфолипидов мембраны. Содержит комплекс I в своем составе флавин (ФМН)

и более 20 атомов железа, связанных с атомами серы в виде железосерных кластеров. Комплекс II содержит убихинон, гидрофобный хвост которого погружен в липидный слой мембраны, а полярная головка располагается на поверхности мембраны. Убихинон осуществляет ступенчатое присоединение электронов и протонов; его полувосстановленная форма называется убисемихинон. Комплекс III содержит железо, связанное с атомами серы и протопорфирина. В составе комплекса IV два различных гема и несколько атомов меди, связанных прочно с белком.

Процесс окислительного фосфорилирования начинается с присоединения НАДН к комплексу I. Два электрона отщепляются от кофермента и переносятся на убихинон, который связывается с другим активным центром, расположенным внутри мембраны. При этом протоны остаются в водной среде межмембранного пространства митохондрий, а электроны возвращаются на другую молекулу окислителя. В результате на мембране возникает трансмембранный потенциал. При этом комплекс I осуществляет постоянную регенерацию окисленной формы НАД, которая необходима для протекания катаболических процессов углеводов, липидов, аминокислот и других соединений. Восстановленный убихинон отдает электроны на атом железа гема цитохрома *c*. Процесс катализируется ферментами комплекса III. В свою очередь восстановленный цитохром *c* связывается с комплексом IV. В завершающей стадии процесса участвует кислород, который акцептирует электроны и протоны, восстанавливаясь до молекулы воды. При окислении ФАДН кофермент связывается с комплексом II, компоненты которого передают далее электроны по электронтранспортному пути на кислород.

Некоторые белки комплексов могут выполнять роль протонных насосов, приводимых в действие потоком электронов дыхательной цепи. Энергия, выделяющаяся при переносе электронов, расходуется на функционирование протонных насосов, обеспечивающих транспорт протонов из матрикса в межмембранное пространство. В результате наблюдается избыток протонов (H^+) на наружной стороне мембраны, которая приобретает положительный заряд. При этом в матриксе образуется избыток OH^- ; в результате этого внутренняя сторона мембраны заряжается отрицательно. Такое распределение зарядов обуславливает возникновение градиента электрического потенциала. При этом обратный поток протонов по градиенту их концентрации в сторону матрикса осуществляется АТФ-синтетазным комплексом, инициируя процесс синтеза АТФ. По цепи переноса электронов располагаются три протонных насоса, инициирующих три реакции фосфорилирования, в результате которых синтезируются три молекулы АТФ. Поэтому в результате окисления одной молекулы НАДН синтезируется 3 молекулы АТФ, а одной молекулы ФАДН - 2 молекулы АТФ.

Таким образом, в основном молекулы кислорода принимают участие в процессах окислительного фосфорилирования, но часть молекул кислорода могут инициировать реакции перекисного окисления липидов. Причем при действии неблагоприятных факторов интенсивность этих процессов возрастает.

В клетке существует несколько специальных механизмов противоокислительной системы, включающих глутатион, аскорбат, каротиноиды и ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатионредуктаза). За счет наличия баланса антиоксидантов и прооксидантов в тканях поддерживается нормальный гомеостаз живых организмов, в которых физиологически обусловлена генерация свободных радикалов, то есть активных форм кислорода: $^1\text{O}_2$, $\bullet\text{O}_2^-$, $\text{H}_2\text{O}^\bullet$, HO_2^\bullet .

Генерация супероксидного радикала может происходить в результате активности НАДФН-цитохром- b_5 -редуктазы, митохондриальной НАДН-дегидрогеназы, ксантиноксидазы и пероксидазы, а также фотодинамического действия света на хлорофилл, приводящего к образованию синглетного кислорода или супероксидрадикала. Процесс начинается стадией инициирования, причем в роли инициаторов в основном выступают супероксидный $\bullet\text{O}_2^-$ или гидроксильный HO^\bullet радикалы. Это наиболее реакционноспособные промежуточные соединения кислорода, обладающие большим сродством к электрону, способные модифицировать молекулы белков, нуклеиновых кислот, разрушать липидные компоненты мембран клеток и т. д. Образовавшиеся радикалы ненасыщенных жирных кислот R^\bullet далее взаимодействуют с кислородом, образуя перекисные радикалы RO_2^\bullet , а те в свою очередь вступают в реакцию с новой молекулой жирной кислоты с образованием R и накоплением гидроперекисей липидов ROOH . Процесс подавляется антиоксидантами, которые способны реагировать со свободными радикалами, образуя малоактивные радикалы, не способные вступать в реакцию с новыми молекулами ненасыщенных жирных кислот.

Свободнорадикальные процессы и перекисное окисление липидов необходимы для регулирования липидного состава и проницаемости мембран, а также синтетических и регуляторных процессов в растительных тканях, нормальный уровень которых поддерживается за счет функционирования системы ингибиторов свободнорадикального окисления. Срыв в функционировании защитных систем может приводить к развитию окислительного повреждения тканей, развитию окислительного стресса.

Накопление активных форм кислорода приводит к инициации перекисного окисления липидов биологических мембран, следствием чего является частичная их дезинтеграция и увеличение проницаемости для ионов, изменение степени гидрофильности и микровязкости мембранных липидов, а также степени олигомеризации мембранных белков и их взаимодействия с липидами. Следствием этих процессов может быть изменение условий функционирования рецепторных комплексов, ответственных за связь с гормональными веществами, и нарушение регулирования метаболических процессов. Кроме того, активные формы кислорода являются вторичными посредниками клеточной активации и пролиферации и служат компонентами свободнорадикального механизма в регуляции размножения клеток.

В случаях инфекционных заболеваний появление активных форм кислорода может служить фактором фитоиммунитета. Для различных стрессов,

возникающих под действием неблагоприятных факторов среды (инфекции, различные ксенобиотики, гербициды, тяжелые металлы, ультрафиолетовое излучение, рентгеновское облучение и др.), является характерным повышение в тканях содержания супероксидных радикалов и других активных форм кислорода, активизация ПОЛ. Разнообразие факторов и неспецифичность проявляется в общем их механизме действия. К наиболее широко распространенным факторам физического воздействия на семена и вегетирующие растения в научных исследованиях и в производственной практике относится ионизирующее излучение. Светозависимое перекисное окисление липидов, имеющее характер свободнорадикальной цепной реакции, является причиной повреждения мембран хлоропластов растений.

Для предотвращения существенного повреждения функциональных систем в организме существует система, ограничивающая действие свободных радикалов, ответственная за поддержание их концентрации на достаточно низком уровне. Составной частью этой системы защиты являются в тканях растений естественные антиоксиданты. Действие антиоксидантов связано с обрывом цепной реакции, в результате чего образуются гидропероксид субстрата и обладающий низкой реакционной способностью свободный радикал ингибитора.

Таким образом, уровень ПОЛ в клетках растений находится под контролем высокоактивной системы антиоксидантной защиты, куда входят низко- и высокомолекулярные соединения. Антиоксиданты регулируют процессы свободнорадикального окисления, создают оптимальные условия для нормального метаболизма и функционирования клеток и тканей, их основной функцией в растительных клетках является торможение развития свободнорадикальных процессов окисления. Поэтому общая антиокислительная активность липидов зависит как от количества биоантиоксидантов и их взаимовлияния, так и от присутствия веществ, которые сами не оказывают антиоксидантного или прооксидантного действия, но способны усилить или ослабить действие биоантиоксидантов.

Методические рекомендации по изучению темы. При изучении этой темы необходимо раскрыть физиологическую сущность дыхания как процесса диссимиляции углеводов и генерации энергии, биологию процессов диссимиляции, выяснить теорию биологического окисления и восстановления, иметь четкое представление о механизме окислительно-восстановительных процессов с учетом современных научных данных. Необходимо отметить роль окислительно-восстановительных ферментов в осуществлении последовательного окисления органических субстратов, сравнить биологию дыхания, брожения, биологического окисления.

Следует выяснить как проходит гликолиз, каковы две стадии этого процесса, определить баланс гликолиза и пути его регулирования. Важно знать, что такое цикл трикарбоновых кислот, какова его природа, место локализации ферментов и механизм регулирования данного цикла.

Необходимо изучить дыхательную цепь – путь переноса электронов и энергетику этого процесса, механизмы фосфорилирования, физиологическое значение окислительного фосфорилирования, энергетическую эффективность анаэробной и аэробной фаз дыхания.

Важно выявить особенности дыхательной способности различных органов растения, ознакомиться с методами определения интенсивности дыхания и дыхательного коэффициента, определить зависимость дыхания от внутренних и внешних факторов.

Литература: 1, с.166-181; 2, с.267-306; 3, с.212-273; 4,191-236; 5, с.114-135.

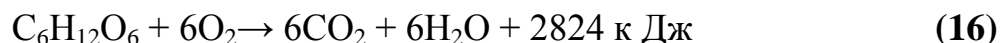
Вопросы для самопроверки:

1. В чем заключается двойственная природа цикла трикарбоновых кислот и каково ее значение в метаболизме?
2. Какова роль фосфора в процессе дыхания?
3. В чем сходство и различие между процессами фотосинтеза и дыхания?
4. Как образуется АТФ при протонном цикле в митохондриальных мембранах?
5. Как объяснить изменения сырой и сухой массы в процессе прорастания?
6. Почему высшие растения не могут длительно поддерживать свою жизнь в анаэробных условиях?

РАБОТА В ЛАБОРАТОРИИ

4.1 Потеря сухого вещества при прорастании семян

Дыхание – это сложная многозвенная система сопряженных ферментативных реакций, в ходе которых происходит окисление органических соединений (дыхательных субстратов) и использование содержащейся в них химической энергии. Этот процесс может быть выражен следующим суммарным уравнением:



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

Семена рекомендуется высушивать в течение 2 ч при 130⁰ С, так, как при этой температуре полностью разрушаются белковые глобулы и освобождается

заклученная в глобулах иммобилизованная вода. Свежий растительный материал (листья, проростки и пр.) можно довести до абсолютно сухого состояния при 100-105⁰ С.

Задание: сделать выводы о причинах изменения сырой и сухой массы при прорастании семян.

Порядок выполнения работы. Поместить на чашку весов 10 здоровых и по возможности одинаковых семян и уравновесить их второй порцией из десяти таких же семян. Одну порцию поместить на 1-2 ч в сосуд с небольшим количеством воды, чтобы вызвать набухание семян. Вторую порцию семян взвесить, поместить в бюкс, высушить при температуре 130⁰ С (не менее 2 ч), охладить в эксикаторе и снова взвесить.

Наполнить стакан влажными и отжатыми от избытка воды опилками, отсыпать часть опилок, разложить набухшие семена и покрыть их сверху опилками, которые следует слегка уплотнить. Поместить стакан в темноту и по мере подсыхания опилок поливать водой.

Через 1-2 недели извлечь проростки из опилок, тщательно промыть корни, обсушить проростки фильтровальной бумагой и взвесить. Поместить проростки в пакет из фильтровальной или газетной бумаги, высушить при 100-105⁰С до абсолютно сухого состояния (для этого требуется 4-6 ч), охладить в эксикаторе и взвесить. Если проросли не все семена, то учитывают только проросшие, а затем пересчитывают сырую и сухую массу проростков на 10 экземпляров.

Результаты опыта записывают в таблицу 18 по приведенной форме.

Таблица 18- Потеря сухого вещества при прорастании семян

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

Материалы и оборудование: семена пшеницы, сушильный шкаф, технические весы, эксикатор, опилки, химический стакан, фильтровальная бумага.

4.2 Определение интенсивности дыхания в закрытом сосуде

Метод заключается в учете количества углекислого газа, выделяемого семенами при дыхании. СО₂ поглощается баритом.

Избыток барита не прореагировавшего с кислотой (СО₂) оттитровывают щавелевой кислотой.

Задание: определить и вычислить интенсивность дыхания проросших семян пшеницы, сравнить интенсивность дыхания разных объектов.

Порядок выполнения работы. В марлевый мешочек помещают 4 г проросших семян пшеницы. В две конические колбы наливают при помощи бюретки наливают по 10 мл 0,1н Ва(ОН)₂ и закрывают колбы пробками. Необходимо помнить что барит ядовит. Его нельзя оставлять открытым на воздухе, так как он легко поглощает СО₂ из воздуха.

В одну колбу, приоткрыв её, подвешивают на крючок пробки мешочек с семенами, другую колбу оставляют в качестве контроля. Оставляют обе колбы на один час при комнатной температуре. В течение опыта периодически осторожно покачивают колбы, чтобы разрушить пленку ВаСО₃ образующуюся на поверхности барита, препятствующую полноте поглощения СО₂. Затем вынимают из колбы мешочек с семенами, добавляют 3 капли фенолфталеина и оттитровывают барит 0,1н щавелевой кислотой до слабо-розового окрашивания, исчезающего от одной капли кислоты. Также оттитровывают барит в контрольной колбе. При титровании колбу закрывают пробкой, через которую проходит кончик пипетки, присоединенный к бутылке с баритом.

Интенсивность дыхания **I** (в мг СО₂, выделенного 1г сухих семян за 1 час) рассчитывают по формуле:

$$I = \frac{(a - b) K \times 2,2}{n} \quad (17)$$

где **a** и **b** — количество 0,1н щавелевой кислоты, израсходованной на титрование барита соответственно в контрольном и опытном вариантах, мл;

K- поправка к титру 0,1н раствора щавелевой кислоты;

2,2 — количество СО₂, соответствующее 1 мл 0,1н раствора щавелевой кислоты;

n - масса сухих семян, г.

Параллельно определяют дыхание семян при температуре 30⁰С. Результаты опыта записывают в таблицу 19 по приведенной форме.

Таблица 19-Определение интенсивности дыхания семян

Объект	навеска семян, г	влажность семян, г	масса сухих семян, г	объем барита, мл	количество щавелевой кислоты, пошедшей на титрование, мл		интенсивность дыхания, мг СО ₂ /(г х ч)
					контр.	опыт	

Материалы и оборудование: проросшие и непроросшие семена, почки, листья, стебли, цветки, и другой растительный материал, бюретки, пробки, весы с разновесами, конические колбы на 250-300 мл, резиновые пробки с

металлическими крючками 3 шт, куски марли 10 на 10 см 2 шт, стакан химический.

Реактивы: 0,1н раствор Ва(ОН)₂, раствор щавелевой кислоты, фенолфталеин в капельнице.

4.3 Определение интенсивности дыхания прорастающих семян в токе воздуха с помощью инфракрасного газоанализатора

Метод основан на учете количества диоксида углерода, выделяемого семенами при дыхании, в потоке воздуха, прошедшего мимо семян. Для этого семена помещают в приемник, через который непрерывно с определенной скоростью продувают воздух, и учитывают разность содержания СО₂ в воздухе, прошедшем через приемник с семенами и без семян. При известном расходе воздуха, регистрируемом с помощью реометра, рассчитывают количество СО₂, выделенного семенами. Измерение концентрации СО₂ выполняют при помощи инфракрасного газоанализатора.

Величины интенсивности дыхания семян варьируют в широких пределах от едва уловимых даже с помощью высокочувствительных приборов до нескольких миллиграммов СО₂ на 1 г дышащей массы в 1 ч, что обусловлено влажностью и степенью прорастания семян.

Задание: освоить метод, определить интенсивность дыхания проросших семян пшеницы.

Порядок выполнения работы. Берут сухие, набухшие, наклюнувшиеся и проросшие семена пшеницы. В начале пропускают воздух через пустой приемник для семян и регистрируют положение нулевой точки, соответствующее содержанию СО₂ в воздухе. Затем в приемник последовательно вносят по 2 г семян опытных вариантов и регистрируют положение экспериментальных точек. Интенсивность дыхания, мг СО₂/(г·ч), рассчитывают по формуле:

$$I_d = \frac{(b - a) \cdot KV}{m}, \quad (18)$$

где **a** и **b** - соответственно положение нулевой и экспериментальной точек на шкале самописца;

K - цена деления шкалы прибора (для ГИП-100,00247 мг/ деление);

V - скорость потока воздуха, л/ч;

m - дышащая масса, которую определяют по разности между навеской и содержанием воды в семенах (влажность 40%). Результаты записывают в таблицу 20.

Таблица 20- Определение интенсивности дыхания семян

Вариант	Навес	Дыша	Скорость	Положение точки	Интенсивнос
---------	-------	------	----------	-----------------	-------------

опыта	ка семян г	щая масса, г	потока воздуха, л/ч	Нулевое (а)	Эксперимента- льное (b)	ть дыхания, мг CO ₂ /(г.ч)

Материалы и оборудование: сухие, набухшие и проросшие семена пшеницы. Инфракрасный газоанализатор, приемник семян, самописец, реометр, осушители воздуха, технические весы.

4.4 Определение дыхательного коэффициента прорастающих семян

Важный показатель химической природы дыхательного субстрата - дыхательный коэффициент (ДК), т. е. отношение объема выделенного диоксида углерода (V_{CO_2}) к объему поглощенного кислорода (V_{O_2}). При окислении углеводов ДК=1, при окислении жиров (более восстановленных соединений) кислорода поглощается больше, чем выделяется диоксида углерода, и ДК<1, при окислении органических кислот (менее восстановленных соединений, чем углеводы) ДК>1.

Величина ДК зависит и от других причин. В некоторых тканях из-за затрудненного доступа кислорода наряду с аэробным происходит анаэробное дыхание, не сопровождающееся поглощением кислорода, что приводит к повышению значения ДК. Величина коэффициента обусловлена также полнотой окисления дыхательного субстрата. Если, кроме конечных продуктов, в тканях накапливаются менее окисленные соединения (органические кислоты), то ДК<1.

Прибор для определения дыхательного коэффициента прорастающих семян состоит из большой пробирки с плотно пригнанной каучуковой пробкой, в которую вставлена изогнутая под прямым углом измерительная трубка со шкалой из миллиметровой бумаги.

Задание: определить дыхательный коэффициент прорастающих семян подсолнечника.

Порядок выполнения работы. Половину пробирки заполняют прорастающими семенами подсолнечника. Плотнo закрывают пробирку каучуковой пробкой с измерительной трубкой и при помощи пипетки в конец этой трубки вводят небольшую каплю воды, создавая таким образом внутри прибора замкнутую атмосферу. Во время опыта обязательно поддерживают постоянную температуру. Для этого ставят прибор в штатив или колбу и не нагревают руками или дыханием. Измеряют, на сколько делений шкалы продвинется капля внутрь трубки за 2 мин. Для получения точного результата вычисляют среднюю величину из нескольких отсчетов. Полученная величина (**A**) выражает разницу между объемами поглощенного при дыхании кислорода и выделенного диоксида углерода.

Открывают пробирку с семенами и вкладывают в нее пинцетом свернутую в кольцо полоску фильтровальной бумаги, смоченную 20%-ным

раствором едкого натра. Снова закрывают пробирку, помещают в измерительную трубку новую каплю воды и продолжают измерение скорости ее движения при той же температуре. Новые данные, из которых опять вычисляют среднюю величину за тот же период, выражают объем поглощенного при дыхании кислорода **(В)**, так как выделенный диоксид углерода поглощается щелочью.

$$ДК = \frac{V_{CO_2}}{V} = \frac{(B - A)}{B}. \quad (19)$$

Результаты опыта записывают в таблицу 21.

Таблица 21- Определение дыхательного коэффициента прорастающих семян

Условия опыта	Отсчеты, мм, за 2 мин				$ДК = \frac{(B - A)}{B}$
	1	2	3	среднее	
Без щелочи (А)					
С щелочью (В)					

Материалы и оборудование: прорастающие семена подсолнечника, прибор для определения дыхательного коэффициента, пинцеты, полоски фильтровальной бумаги, песочные часы на 2 мин, стеклянные чашки, пипетки, стеклянные палочки, конические колбы на 250 мл.

Реактивы: 20%-ный раствор едкого натра.

5 МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ

Информационный материал. Для нормального роста и развития растениям требуются различные элементы, которые входят в состав биогенных соединений. К основным базовым элементам живых организмов относятся углерод (С), водород (Н), кислород (О) и азот (N). Они составляют более 95 % сухой массы растительных тканей. Остальные элементы можно условно разделить на две группы - макро- и микроэлементы. К макроэлементам относят элементы живых организмов, присутствующие в высоких концентрациях (более 1 мМ), обладающие индивидуальным действием или входящие в состав биогенных молекул.

Макроэлементы в основном представлены ионами K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , а также S и P. Микроэлементами являются элементы живых организмов, присутствующие в низких концентрациях (менее 1 мМ), проявляющие действие в составе функциональных белков или низкомолекулярных соединений (витаминов, гормонов и субстратов ферментативных реакций). К микроэлементам относятся ионы Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , F^- , Br^- , I^- , Se^{2+} , Cr^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} и др.

Азот входит в состав аминокислот, белков, азотистых оснований, нуклеиновых кислот, витаминов, коферментов и других биогенных соединений. Растения способны усваивать азот только в виде ионов аммония и нитратов.

Преимущественным местом накопления калия служит цитоплазма растительной клетки. Ионы K^+ совместно с ионами Na^+ и Cl^- поддерживают кислотно-щелочной баланс, а также регулируют осмотическое давление клеток, участвуют в создании трансмембранного потенциала. Больше всего калий накапливается в активно растущих частях растения, обеспечивая поступление в клетку различных питательных соединений. Калий обеспечивает работу аппарата, открывающего и закрывающего устьица.

Магний в основном накапливается в активно растущих частях растений.

Присутствует в растительных тканях в виде ионов Mg^{2+} . Ионы магния связываются с АТФ с образованием комплексов Mg^{2+} -АТФ. активизируют ДНК- и РНК-полимеразу, полинуклеотидфосфорилазу, нуклеотидазу, рибонуклеазу, дезоксирибонуклеазу и другие ферменты нуклеинового обмена.

Ионы Mn^{2+} входят в состав пируваткарбоксилазы и оксалацетатдекарбоксилазы. Активируют аргиназу, которая катализирует реакцию образования мочевины из аргинина. Марганец участвует в каталитическом действии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, аминоксилтрансферазы, изоцитратдегидрогеназы, фосфодиэстеразы и др.

Кальций присутствует в растительном организме в виде солей фосфорной кислоты. Накапливается кальций в митохондриях, хлоропластах и ядре. В семенах ионы кальция присутствуют в составе инозитфосфорной кислоты.

Кальций участвует в формировании четвертичной структуры белков, в образовании мостиков в фермент-субстратных комплексах, оказывает влияние

на активность аллостерических ферментов. Присутствие ионов Ca^{2+} в составе белков повышает их стабильность к высоким температурам.

Фосфор в составе неорганических соединений представлен в виде остатков ортофосфорной кислоты, которые переносятся в процессе фосфорилирования и трансфосфорилирования на различные органические соединения с образованием фосфоригированных форм биогенных соединений (АМФ, АДФ, АТФ, цАМФ, креатинфосфат, НАД, ФАД, НАДФ, HS-КоА, ТПФ, ФП и др.). Фосфор входит в состав структурной части РНК и ДНК.

Сера содержится в растительных тканях в виде анионов SO_4^{2-} . Входит в состав серосодержащих аминокислот (метионина, цистеина), трипептида глутатиона. Сера является компонентом витаминов В₁ (тиамин) и Н (биотин), а также обнаруживается в составе HS-КоА, таурина, S-аденозилметионина. В белках сера принимает участие в формировании SH-групп и дисульфидных (S-S-) связей. Последние стабилизируют третичную структуру белков.

Цинк присутствует в растительных тканях в виде ионов Zn^{2+} . Входит в состав ключевых ферментов метаболических процессов карбоангидразы, фосфоглицеринальдегиддегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы, тимидинкиназы, РНК- и ДНК-полимераз и др.

Молибден входит в состав ксантиноксидазы, ксантиндегидрогеназы, нитратредуктазы, нитрогеназы, сульфитоксидазы и альдегидоксидазы. Располагаясь в активном центре фермента, атом молибдена образует связь с серой, принадлежащей остатку цистеина. Кофактором молибденсодержащих ферментов служит флавиновая группа. Для растений молибден имеет наибольшую значимость в составе ферментов азотного обмена.

Железо в растительном организме находится в виде восстановленной Fe^{2+} - или окисленной Fe^{3+} -формах. Входит в состав железосодержащих белков и ферментов (ферритин, пероксидаза, каталаза, цитохром-с-пероксидаза, цитохромоксидаза и др.), проявляющих действие при наличии окисленной формы. Причем все гемсодержащие белки обладают пероксидазной активностью. Железо в составе протопорфирина IX принимает участие в окислительно-восстановительных реакциях фотосинтетического и окислительного фосфорилирования в составе цитохромов и ферридоксина.

Медь содержится в растительных тканях в форме иона Cu^{2+} , особенно много его накапливается в семенах и активно растущих частях растения. Входит в состав медьсодержащих белков и ферментов (аскорбатоксидаза, ортодифенолоксидаза, лакказы, галактозооксидаза, тиразиноксидаза, цитохромоксидаза и др.).

Кобальт входит в состав трансфераз, изомераз и дипептидаз. Ускоряет протекание ферментативной реакции с участием пируваткарбоксилазы, рибофлавинкиназы, щелочной фосфатазы, аргиназы, каталазы, альдолазы и др.

В растительных тканях кремний входит в состав полиуронидов (пектиновой и альгиновой кислот). На одну молекулу пектина цитрусовых приходится от 10 до 20 атомов кремния.

Для определения элементов в тканях растений предварительно проводят озоление растительной массы. Под действием высокой температуры ткани растений разрушаются. При этом углерод, водород, азот и частично кислород улетучиваются и в остатке остаются лишь нелетучие соединения, основу которых составляют макро- и микроэлементы. Содержание и состав зольных элементов растительных тканей зависит от вида, а также природноклиматических условий роста и развития растений. Кроме того, концентрация элементов в разных тканях одного и того же растения может существенно отличаться.

Качественный и количественный состав зольных элементов определяется с помощью различных видов спектроскопии. Для определения отдельных элементов разработаны методы спектрофотометрического анализа, в основе которого используется взаимодействие элемента с реагентом. В результате образуется комплекс, который приобретает окраску. При этом интенсивность окраски пропорциональна концентрации элемента.

В настоящее время широкое применение в исследовании элементов нашли методы эмиссионной фотометрии пламени (ЭФП) и атомно-абсорбционной спектроскопии. Так, эмиссионная фотометрия пламени используется как метод количественного элементного анализа, основанного на измерении интенсивности электромагнитного излучения, испускаемого атомным паром определенного элемента в пламени. Применяется при определении щелочных элементов - лития, натрия, калия и рубидия, которые благодаря своим низким значениям энергии возбуждения имеют резонансные линии в видимой области спектра. Кроме того, хорошими метрологическими характеристиками в пламени ацетилен-воздух обладают еще и щелочноземельные элементы - магний, кальций, стронций и барий.

Применение ЭФП для определения других элементов признается нецелесообразным из-за высоких пределов обнаружения и наличия спектральных и химических помех.

Метод атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) используется как метод количественного элементного анализа, основанного на измерении поглощения атомным паром монохроматического излучения, энергия кванта которого соответствует резонансному переходу в атомах определенного элемента. С помощью метода ААС можно количественно определить в растениях до 70 элементов. При этом пределы обнаружения находятся в интервале 1...100 нг/мл.

Методические рекомендации по изучению темы. Рассматривая корневую систему как основной орган поглощения и усвоения минеральных веществ, следует обратить внимание на ритмичность поглощающей и выделительной деятельности корней. В процессе питания растений происходит поглощение не только отдельных элементов, но и ионов и целых молекул. Поэтому необходимо представлять себе как происходит поглощение растворенных веществ, ионов, молекул и как осуществляется их транспорт. Сравните активный и пассивный транспорт ионов.

При недостатке отдельных элементов питания или поступлении вредных веществ отмечаются физиологические расстройства, как в организме растения, так и животных, и человека, использовавших в пищу такую растительную продукцию. Поэтому необходимо уметь организовать контроль за питанием растений с помощью листовой, тканевой и почвенной диагностики, активно вмешиваться при необходимости в процесс питания растений.

Выясните различия между физиологически кислыми, щелочными и нейтральными минеральными удобрениями. Обратите внимание на особенности их использования растениями. Рассмотрите влияние физиологически активных веществ на корневое питание растений.

Приведите подтверждение синтетической роли корня. Изучите синтез аминокислот в корнях, их содержание в различных частях и зонах корня, метаболизм в онтогенезе растений. Выясните связь дыхания корней с биосинтезом аминокислот и белков. Рассмотрите корень как место синтеза вторичных соединений – полисахаридов, фитогормонов, гликозидов, алкалоидов, сапонинов и других.

Необходимо выяснить влияние факторов среды обитания растений на поглощение питательных веществ корневой системой.

Следует ознакомиться с физиологическими основами выращивания растений без почвы (водные, песчаные и гравийные среды), изучить принципиальные основы гидропоники и аэропоники, камеры искусственного климата.

Литература: 1, с.51-64; 2, с.201-249; 3, с.306-414; 4, с.76-91; 5, с.137-155.

Вопросы для самопроверки:

1. Корневая система как основной орган поглощения и усвоения минеральных элементов.
2. Роль корня в биосинтезах и влияние внешних факторов на деятельность корневой системы.
3. Примерное содержание химических элементов и органических веществ в сельскохозяйственных растениях.
4. Физиологическая роль макро- и микроэлементов.
5. Принципиальные основы выращивания растений в условиях гидропоники и аэропоники.

РАБОТА В ЛАБОРАТОРИИ

5.1 Изучение влияния элементов питания на рост растений

Исключение любого из макроэлементов приводит к нарушению структур и обмена веществ растений, торможению их роста и в последующем - к гибели. Однако видимые повреждения проявляются не сразу и не одновременно. Наиболее быстро сказывается исключение азота и кальция: первого - из-за высокой потребности в нем растущих растений, второго - из-за неспособности

к повторному использованию, или реутилизации. К нереутилизируемым или трудно реутилизируемым минеральным элементам относятся также микроэлементы, кроме бора, хлора, йода. Высокой степенью реутилизации отличаются азот, фосфор, сера, калий, в меньшей степени - магний. Поэтому недостаток перечисленных элементов проявляется в длительных опытах (более 2 нед).

Задание: изучить методику приготовления питательных смесей, сделать вывод о развитии растений в зависимости от состава питательной смеси.

Порядок выполнения работы. Приготовление питательных смесей. Готовят полную питательную смесь по Хогланду-Снайдерсу и питательные смеси с исключением азота, фосфора и калия. При исключении из питательной смеси любого элемента, связанные с ним элементы вносят в эквивалентных количествах в виде солей, не содержащих исключаемый элемент.

Для приготовления концентрированных маточных растворов солей, входящих в смесь Хогланда-Снайдерса, составляют рабочие таблицы, в которых указывают необходимое количество солей на выбранный объем раствора. Маточную питательную смесь готовят из того расчета, что 10 мл раствора солей макроэлементов соответствует их количеству в 1 н. смеси Хогланда-Снайдерса (на 1л или 1 кг субстрата). Микроэлементы вносят по 2 мл на 1 л питательной смеси.

Смесь без азота. В состав смеси азот входит в виде солей $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и KNO_3 . Для того чтобы после исключения его из питательного раствора концентрации калия и кальция сохранялись на прежнем уровне, KNO_3 заменяют на KCl , а $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – на $\text{Ca}(\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$.

Примечание: посуда для приготовления растворов макро- и микроэлементов должна быть из цветного стекла, чтобы избежать размножения микроскопических водорослей.

Таблица 22-Приготовление питательная смеси по Хогланду-Снайдерсу

Соль	Масса соли для приготовления маточного раствора,г	для приготовления 1 л смеси Хогланда—Снайдерса добавляют маточного раствора, мл		
		1 норма	0,5 нормы	0,2 нормы
Макроэлементы (на 10л)				
KNO_3	510	10,0	5,0	2,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	10%-ный раствор $d_4^{18} 1,0771$	8,2	4,1	1,6
KH_2PO_4	136	10.0	5.0	2.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	490	10.0	5.0	2.0
Микроэлементы (на2л)				
$\text{MgCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.35			
H_3BO_3	0.55			

ZnSO ₄	0.05			
CuSO ₄	0.05			
MoO ₂	0.024			
FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.0			

Расчет выполняют, пользуясь данными таблицы. Определим количество калия, связанного с анионом NO₃⁻, в соли KNO₃. Грамм-молекула KNO₃ (101,11 г) содержит 39,10 г калия, а в 0,51 г KNO₃ его находится x г; составляем пропорцию: 101,11 г - 39,10 г

0,51 г - xг,

отсюда

$$x = \frac{39,10 \cdot 0,51}{101,11} = \mathbf{0.20г} \quad (20)$$

Определим, сколько KCl необходимо внести в питательную смесь, чтобы сохранить количество калия, эквивалентное его содержанию в 0,51 г KNO₃. Грамм-молекула KCl (74,60 г) содержит 39,10 г калия, а 0,20 г калия находится в x г KCl: 74,60 г - 39,10 г

x г - 0,20 г,

отсюда

$$x = \frac{74,60 \cdot 0,20}{39,1} = \mathbf{0.38г} \quad (21)$$

Итак, вместо 0,51 г KNO₃, исключенного по азоту из питательной смеси, в раствор вносят эквивалентное по содержанию калия количество KCl, равное 0,38 г.

Определяем количество кальция, связанного в соли Ca(NO₃)₂. Грамм-молекула Ca(NO₃)₂ (164,10 г) содержит 40,08 г кальция, а в 0,82 г Ca(NO₃)₂ его находится x г: 164,10 г - 40,08 г

0,82 г - x г,

Отсюда

$$x = \frac{0,82 \cdot 40,08}{164,10} = \mathbf{0.20г} \quad (22)$$

Определим, сколько необходимо внести CaSO₄·2H₂O, чтобы сохранить количество кальция, эквивалентное его содержанию в 0,82 г Ca(NO₃)₂. Грамм-молекула CaSO₄ · 2H₂O (172,16 г) содержит 40,08 г кальция, а в 0,20 находится xг CaSO₄ · 2H₂O: 172,16 г - 40,08 г

x г - 0,20 г,

отсюда

$$x = \frac{172,16 \cdot 0,20}{40,08} = 0,8 \text{ г}, \quad (23)$$

Следовательно, вместо 0,82 г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ вносят 0,86 г $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Смесь без фосфора. Соль KH_2PO_4 замещают солью KCl . Расчеты выполняют по приведенному выше образцу:



$$x_1 = \frac{39,10 \cdot 0,136}{136,20} = 0,04 \text{ г}, \quad (30) \quad x_2 = \frac{74,60 \cdot 0,04}{39,10} = 0,08 \text{ г} \quad (24)$$

Итак, вместо 0,136 г KH_2PO_4 берут 0,08 г KCl .

Смесь без калия. Соль KH_2PO_4 заменяют $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, а соль KNO_3 – NaNO_3 . Вначале по известным пропорциям определяют содержание P в 0,136 г KH_2PO_4 , затем вычисляют эквивалентное по фосфору количество $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:



$$x_1 = \frac{31,00 \cdot 0,136}{136,20} = 0,031 \text{ г}; \quad (25) \quad x_2 = \frac{138,00 \cdot 0,031}{31,00} = 0,138 \text{ г} \quad (26)$$

Следовательно, на 1 л смеси берут 0,138 г соли NaH_2PO_4 . Аналогично вычисляем необходимое и эквивалентное по азоту количество NaNO_3 вместо 0,51 г KNO_3 . Из таблицы известно, что концентрация калия в соли KNO_3 составляет 0,005 г-моль/л. Зная, что масса грамм-молекулы NaNO_3 составляет 85 г, необходимое количество этой соли, соответствующее 0,005 г-моль/л Na, будет равно $85 \cdot 5/1000 = 0,425$ г.

Подобным же образом можно проводить расчеты при исключении других катионов и анионов смеси.

Закладка опыта и учет результатов. В литровую банку наливают 700 мл водопроводной воды, поочередно вводят туда в виде растворов все соли питательной смеси ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ вносят в порошке). После прибавления очередного раствора содержимое сосуда помешивают стеклянной палочкой. После внесения всех солей доливают водой до отметки 850 или 900 мл. Закрывают банку деревянной пробкой, служащей опорой для растения. Высаживают в отверстия пробки одинаковое число выровненных проростков и закрепляют их негигроскопичной ватой.

Корни погружают в раствор, уровень которого должен быть ниже пробки

в зависимости от длины корней на 1 - 5 см. Закрывают корни от света и предохраняют раствор от перегрева, для чего надевают на банку бумажный чехол или помещают ее в холщовый мешок (желательно, чтобы внутренняя сторона его была черная, а наружная - белая). Прикрепляют этикетку, на которой простым карандашом обозначают факультет, номер группы, фамилию и вариант опыта.

Питательные растворы ежедневно продувают воздухом через распылители при помощи компрессора или резиновой груши в течение 15 - 20 мин. По мере убыли питательного раствора за счет транспирации сосуды доливают водой до исходного уровня. Длительность опыта 4 нед. Результаты опыта записывают в таблицу 23 по приведенной форме.

Таблица 23-Развитие растений в зависимости от состава питательной смеси

Питательная смесь	Повторность	Высота растения, см	Число листьев	Масса надземной части		Масса корней		Отношение массы надземной части к массе корней	Число устьиц в поле зрения микроскопа	Внешний вид растений (окраска листьев, характер повреждений)
				г/сосуд						
				сырая	сухая	сырая	сухая			
Полная Без N Без P Без K										

Материалы и оборудование: проростки растений, литровые стеклянные банки, бумажные чехлы для банок, шпагат, деревянные пробки, бюретки на 50 мл.

Реактивы: концентрированные растворы KNO_3 , $Ca(NO_3)_2$, KCl , $NaCl$, KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, приготовленные с таким расчетом, чтобы 5-10 мл этого раствора соответствовали концентрации соли в нормальной смеси Хогланда-Снайдерса; навески с $CaSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5%-ный раствор цитрата или тартрата железа; растворы борной кислоты и сульфата марганца.

5.2 Рост корней пшеницы в растворе чистой соли и смеси солей

Подбирая различные концентрации отдельных ионов, можно составить такую комбинацию, при которой данные растения будут развиваться лучше всего. Такой раствор называют уравновешенным.

Задание: изучить развитие проростков пшеницы в зависимости от состава питательной смеси.

Порядок выполнения работы. В конические колбы на 100 мл наливают растворы по схеме опыта и закрывают горла колб пропарафинированными

марлевыми крышками. На каждую марлеву крышку высаживают одинаковое количество проростков пшеницы. Корни погружают в раствор. Спустя 2 нед. измеряют высоту проростков, число и длину корней и делают соответствующие выводы.

Результаты записывают в таблицу 24 по приведенной форме.

Таблица 24- Развитие растений в зависимости от состава питательной смеси

Вариант опыта	Раствор	Объем раствора, мл	Длина надземной части, см	Длина корней, см
1	Полная смесь: NaCl CaCl ₂ KCl	100 1 2		
2	CaCl ₂	100		
3	NaCl	100		
4	KCl	100		

Примечание. Все растворы отдельных солей 0,12 н.

Материалы и оборудование: десятидневные проростки пшеницы, конические колбы на 100 мл, марля, шпагат, крафт-бумага.

Реактивы: растворы химически чистых солей - KCl, CaCl₂, NaCl,

5.3 Микрохимический анализ золы

Зола, получаемая при сжигании растений, содержит большое количество элементов, среди которых различают макроэлементы (фосфор, сера, калий, кальций, магний) и микроэлементы (железо, медь, цинк, марганец, молибден, бор, и ряд других).

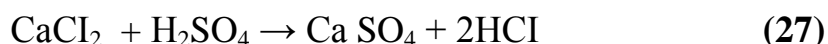
Для изучения химического состава золы можно использовать микрохимический метод, для которого требуется небольшое количество материала.

Задание: при оформлении работы зарисовать характерные формы кристаллов обнаруженных в золе исследованных растений.

Порядок выполнения работы. Насыпать в пробирку небольшое количество золы и залить ее примерно четырехкратным объемом 10 % -ной HCl. Отфильтровать полученный раствор в чистую пробирку через маленький фильтр. Провести на предметных стеклах реакции на Ca, Mg и P. Для этого тупым концом стеклянной палочки нанести на предметное стекло маленькую каплю вытяжки и на расстоянии 4-5 мм от нее – каплю соответствующего реактива. Затем заостренным концом стеклянной палочки соединить капли дугообразным каналом. В месте соединения произойдет реакция, причем по краям канала будет наблюдаться быстрая кристаллизация продуктов реакции. Рассмотреть образующиеся кристаллы в микроскоп. Стеклянные палочки после

нанесения каждого реактива необходимо вымыть и вытереть фильтровальной бумагой.

Реактивом на ион кальция служит 1%-ная H_2SO_4 при этом хлорид кальция, содержащийся в вытяжке, реагирует с кислотой по уравнению

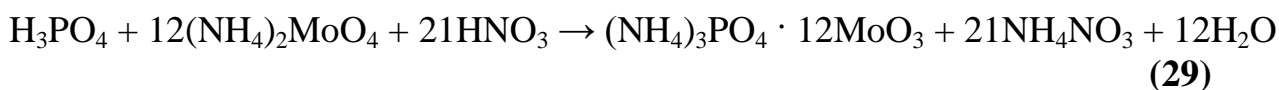


Образующийся гипс осаждается в виде игольчатых кристаллов.

Для обнаружения магния к капле испытуемого раствора следует с начала добавить каплю раствора аммиака, а затем соединить канальцем с реактивом, которым служит 1%-ный раствор фосфорнокислого натрия. При этом образуется фосфорно-аммиачномагнезиальная соль, кристаллизующаяся в виде прямоугольников, крышечек, звезд, или крыльев, в результате следующей реакции:



Для обнаружения фосфора соединить каплю вытяжки с 1%-ным раствором молибдата аммония в азотной кислоте. Получается зеленовато – желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония:



Железо можно обнаружить с помощью раствора желтой кровяной соли. В результате образуется берлинская лазурь:



Материалы и оборудование: древесная зола или табачный пепел, стакан химический, стеклянная палочка, воронки, пипетки, предметное стекло, микроскоп, фильтровальная бумага.

Реактивы: 10 % -ный раствор HCl , 1%-ный раствор H_2SO_4 , 10 % -ный раствор NH_3 , 1%-ный раствор фосфорнокислого натрия, 1%-ный раствор молибдата аммония в азотной кислоте, 1%-ный раствор желтой кровяной соли.

5.4 Определение общей и рабочей адсорбирующей поверхности корневой системы методом Сабинина и Колосова

Важнейшей характеристикой функциональной активности корней являются их возраст, масса и поглощающая поверхность. Считается, что молодые корни более взрослых растений поглощают элементы питания слабее, чем корни того же возраста у молодых растений. Так как корневая система взрослого растения представлена поливозрастными структурными

образованиями, следовательно, возраст корня не должен оказывать заметного влияния на поступление питательных элементов.

В связи с тем, что клеточные оболочки обладают катионообменной и, в меньшей степени, анионообменной способностью, важную роль при их поглощении играют адсорбционные процессы. Д.А. Сабинин и И.И. Колосов, считавшие, что первичный акт поглотительного процесса – адсорбция, разработали метод определения общей поверхности корней, включающий рабочую и недеятельную их поверхности.

Задание: определить адсорбирующую поверхность корневой системы, сделать вывод о результатах работы.

Порядок выполнения работы. Для работы лучше использовать корни растений, выращенных в водной культуре. Объединенные вместе корни десяти проростков образуют поглощающую корневую массу. Важно не допустить погружения в раствор метиленовой сини (МС) зерновок, находящихся на десяти – четырнадцатидневных проростках. В три бюкса наливают 0,0003 н. раствор МС, объем которого примерно в 10 раз больше объема корней. В четвертый бюкс наливают раствор CaCl_2 слегка обсушив корни фильтровальной бумагой, последовательно погружают их в три бюкса с раствором МС на 1,5 мин в каждый. После каждого погружения дают возможность раствору красителя стечь в тот же бюкс, из которого были извлечены корни.

Уменьшение концентрации метиленовой сини определяют, сравнивая найденную для каждого бюкса концентрацию после погружения с исходной, т.е. с 0,0003н раствором МС (112 мг метиленовой сини на 1 л; молекулярная масса МС с тремя молекулами воды равна 373,68г), предварительно разбавленным, как и раствор МС в бюксах, в 10 раз. Разбавление МС перед установлением ее концентрации повышает точность определения.

По количеству поглощенной метиленовой сини в первых двух бюксах рассчитывают общую адсорбирующую поверхность корней, по ее количеству, поглощенному в третьем бюксе, - рабочей адсорбирующей поверхностями, что дает представление о недеятельной поверхности корней. Частное от деления величин общей и рабочей поверхности на объем корней (более грубо – на их сырую массу в граммах) дает представление о соответствующих величинах удельной адсорбирующей поверхности корней.

Окрашенные корни после извлечения из третьего бюкса промывают водой и помещают в бюкс с CaCl_2 , метиленовая синь, несущая положительный заряд, в результате обменной адсорбции ионов Ca^{2+} выделяется из корней и окрашивает раствор в синий цвет.

Результаты опыта записывают в таблицу 25 по приведенной форме.

Таблица 25- Определение адсорбирующей поверхности корней

Вариант опыта	
Номер бюкса	

Объем раствора МС бюксе, мл	
Масса МС в бюксе, мг до погружения корней после погружения корней поглощенной	
Адсорбирующая поверхность, м ² общая рабочая недеятельная	
Удельная адсорбирующая поверхность, м ² /м ³ общая рабочая недеятельная	

Материалы и оборудование: корни растений, выращенные в водной культуре, бюксы или стаканы на 25-50 мл, фотоэлектроколориметр, калибровочный график на МС в интервале концентраций 1 -12 мг/л, весы, фильтровальная бумага.

Реактивы: 0,0003н раствор метиленовой сини (на 1 л 112,0 мг предварительно подсушенной при 95 -100⁰С МС), 0,2 М раствор CaCl₂ (22,2 г/л).

6 РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ

Информационный материал. Для семян растений важным приспособительным механизмом сохранения вида является покой. Покой - это такое состояние жизнеспособного организма, при котором возможность прорастания исключена, несмотря на наличие соответствующих благоприятных факторов среды (достаточная влажность, благоприятная температура, наличие кислорода), и регулируется составом фитогормонов.

Кроме того, покой может быть обусловлен низкой проницаемостью поверхностной оболочки для воды и кислорода, а также может быть вынужденным, при котором жизнеспособные растительные организмы не прорастают в силу каких-либо ограничений в окружающей среде. Поэтому состояние покоя можно рассматривать как защитно-приспособительный механизм, который обеспечивает растениям возможность переносить неблагоприятные для их существования периоды года.

Процесс прорастания семян регулируется специализированными механизмами, активность которых определяется условиями среды (благоприятная температура среды и почвы, достаточное количество влаги в почве и окружающей среде, наличие кислорода, достаточное количество света и тепла, сбалансированный газовый состав атмосферы с наличием углекислого газа, богатый минеральный состав почвы, присутствие азота и фосфора в усвояемой для растений форме и др.).

Одним из условий прорастания семян, находящихся в состоянии вынужденного покоя, является наличие воды. Основная часть воды в воздушно-сухих семенах присутствует в зародыше и находится в основном в связанном состоянии. При этом влажность таких семян может составлять всего 8... 12%, а присутствующие в них высокомолекулярные биогенные соединения (белки, нуклеопротеины и полисахариды) связывают имеющуюся воду. На поверхности полисахаридов эндосперма могут адсорбироваться функционально активные вещества (ИУК, гиббереллины, цитокинины). В клетках семян отмечается низкая дыхательная активность митохондрий. Процесс окислительного фосфорилирования сдвинут в сторону окисления. Метаболические процессы протекают очень медленно. Синтеза АТФ практически нет. Оксидазы работают как гены раторы воды. В клетках воздушно-сухих семян должны быть компоненты белок-синтезирующей системы, РНК, факторы инициации и элонгации, аминокислоты и аминокил-тРНК-синтетазы, ДНК-полимеразы, белки теплового шока и их мРНК, а также АТФазы, пероксидаза и другие ферменты. Процессы биосинтеза белков и нуклеиновых кислот в покоящихся семенах прекращаются. Рибосомы концентрируются внутри митохондрий, которые лишены внутренней структуры. Однако при наличии благоприятных условий среды (благоприятная температура, наличие воды и кислорода) в клетках все имеющиеся элементы белок-синтезирующей системы способны обеспечить начало синтеза белка.

Начальным этапом прорастания семян является процесс их набухания, обусловленный поступлением воды и обычно сопровождаемый активацией метаболических процессов как в осевых органах, так и семядолях. При этом возрастает дыхательная активность митохондрий, инициируются процессы синтеза белков, в которых участвуют проформированные и вновь синтезированные мРНК. В присутствии воды повышается активность гидролаз, расщепляющих полисахариды и белки, и в осевых органах начинают протекать процессы, обуславливающие растяжение клеток. В результате этих процессов в зародыше семян происходит накопление осмотически активных веществ и закисление клеточных оболочек, характеризующих начало этапа проклевывания семян.

Кроме того, активизируется дыхательная активность митохондрий. Так, при достижении оводненности семян сои 20 % и более отмечается скачок дыхательной активности митохондрий, коррелирующий с возрастанием активности цитохром-*c*-редуктазы. При влажности выше 20...25% наблюдаются процессы, обуславливающие появление в семенах слабосвязанной воды. То есть в семенах начинает накапливаться вода, которая не только связывается с белками, полисахаридами и нуклеопротеинами, но и вода, формирующая полярную среду семян растений, выполняющая роль растворителя, участвующая в реакциях гидролиза. В этих условиях белки приобретают нативную конформацию, становясь функционально активными. При достижении семенами влажности 45...50% в их клетках конформационную устойчивость приобретают структуры органелл клеток. При этом активируются ферменты ядра клеток, участвующие в процессе транскрипции, обуславливая появление новых ядерных РНК, которые запускают процессы синтеза белков на полисомах. При этом синтез функциональных белков может иметь колебательный характер.

По мере накопления осмотически активных веществ в семенах инициируются процессы, обуславливающие растяжение клеток. Однако в этих процессах не участвуют ИУК и цитокинины. Этот этап называется проклевыванием. В период проклевывания в семенах накапливаются функционально активные вещества, в частности фитогормоны, стимулирующие последующий рост гипо- и эпикотилия. Этап сопровождается появлением первых листочков или семядольных листьев и первых корешков. В листьях при наличии света формируются хлоропласты, в составе которых хлорофилл, участвующий в процессе фотосинтеза, то есть инициируется автотрофный процесс ювенильной фазы развития растения.

Методические рекомендации по изучению темы. Учение о росте и развитии растений является одним из важных разделов физиологии растений. Поэтому необходимо определить, что понимают под ростом и развитием, каковы принципы регуляции роста и развития, дифференциальная активация генов, факторы, регулирующие рост и развитие, фитогормоны, спектр биологического их действия взаимоотношения между ростом и развитием.

Интерес представляет физиология прорастания семян. Поэтому необходимо определить причины покоя семян, какие вещества индуцируют прорастание, какие процессы происходят при этом, как влияет свет и температура на прорастание, какие ферменты при этом участвуют, каковы особенности обмена веществ в прорастающих семенах и зависимость прорастания от внутренних и внешних условий.

Определенное значение в сельскохозяйственной практике приобретают фитогормоны. Следует выяснить их роль в жизнедеятельности растений, передвижение, распределение и локализацию по органам ауксина, гиббереллина, цитокинина, абсцизовой кислоты и этилена, а также их действие на рост тканей и органов, формирование семян и плодов.

Необходимо изучить ритмику физиологических процессов, влияние температуры и света на суточные ритмы, фотопериодизм, суточную и сезонную периодичность роста, рост органов, зоны роста, показатели роста, ростовые функции и органообразовательные процессы. Определить физиологические процессы, происходящие при опылении и оплодотворении, какие гормоны и ингибиторы участвуют в процессе цветения.

Представляют интерес ростовые и тургорные реакции растений: раздражение, возбуждение, движение живых органов, тропизмы, настии, эндогенные движения, таксисы, чисто механические движения. Выяснить этапы органогенеза, управление ростом и развитием растений в онтогенезе и его использование при интенсивных технологиях возделывания сельскохозяйственных культур.

Физиология формирования семян, плодов и других продуктивных частей растений. Изучая эту тему, необходимо выяснить как взаимодействуют вегетативные и репродуктивные органы в процессе формирования зерновки злаковых культур, как происходит созревание сочных плодов, каким образом протекает рост и созревание корнеплодов и клубнеплодов. Следует обратить внимание на физиолого-биохимические процессы, происходящие при созревании семян и сочных плодов, какие органические вещества образуются при созревании, выяснить места локализации крахмала, сахарозы, инулина и других запасных веществ, отметить влияние почвенно-климатических условий и технологий возделывания на процессы формирования семян, плодов и других продуктов растений, их созревание и качественные показатели.

Литература: 1, с. 229-416; 2, с.307-401; 3, с.416-508; 4, с.253-276; 5, с.180-194.

Вопросы для самопроверки:

1. Понятие о росте и развитии растений. Рост как интегральный процесс жизнедеятельности растений.
2. Влияние на рост внешних факторов (температура, свет, влажность воздуха и почвы, удобрения, аэрация и др.).
3. Клеточные основы роста. Типы роста у растений.
4. Культура изолированных протопластов, клеток и тканей в решении задач физиологии растений и биотехнологии.
5. Физиология прорастания семян.

РАБОТА В ЛАБОРАТОРИИ

6.1 Наблюдение периодичности роста побега

Побег растет неравномерно. Вначале наблюдается медленный рост, затем скорость роста увеличивается, достигает максимума, снова замедляется, и, наконец, рост прекращается. Таким образом, наблюдается периодичность роста побега, которая характеризуется законом большого периода роста.

Периодичность роста проявляется в том, что междоузлия, образующиеся по мере нарастания побега, имеют неодинаковую длину. В большинстве случаев она увеличивается от основания к середине побега, где достигает максимума, а к верхушке побега опять уменьшается.

Задание: измерить длину междоузлий побега древесного растения, построить график прироста междоузлий и побега.

Порядок выполнения работы. Измеряют линейкой длину междоузлий годовичного побега какого-либо травянистого или древесного растения. На основании полученных данных строят графики прироста междоузлий и побега. По оси ординат откладывают длину междоузлий и длину побега, по оси абсцисс — номера междоузлий, считая от основания побега. Делают вывод о периодичности роста побега.

Результаты измерений записывают в таблицу 26 по приведенной форме.

Таблица 26- Наблюдения за ростом древесных побегов

Длина, см	Номер междоузлия от основания побега										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	и т.д.
Междоузлия побега											

Материалы и оборудование: завершившие рост побеги травянистых или древесных растений, линейки.

6.2 Определение силы роста семян методом морфофизиологической оценки проростков

Наиболее полно истинные посевные качества семян характеризуются силой роста, т.е. способностью проростков к быстрому, дружному прорастанию и интенсивному росту. На силу роста большое влияние оказывают крупность семян, условия их формирования и хранения. Для посева используют семена с силой роста не менее 80%.

Силу роста определяют путем проращивания семян в рулонах и выражают в процентах относительной доли сильных проростков к общему числу семян в пробе.

Задание: изучить зависимость силы роста от массы семян (зерновок), метеорологических условий года получения урожая, длительности хранения семян, а также исследовать влияние кумарина как одного из аллелопатических агентов на прораствание семян зерновых культур.

Порядок выполнения работы. Для каждого варианта берут отдельную полоску полиэтиленовой пленки размером 60x15 см, накрывают ее такой же полоской фильтровальной бумаги, которую используют в качестве ложа для семян. Во всю длину карандашом проводят линию на расстоянии 5 см от верхнего края. На эту линию укладывают 50 семян зародышем вниз на расстоянии 1 см одно от другого. Семена по всей длине ложа накрывают увлажненной полоской фильтровальной бумаги шириной 5 см, свертывают в рулон, связывают шпагатом, снабжают этикеткой и ставят вертикально в сосуд, на дно которого налита вода. При изучении влияния кумарина на силу роста семян контрольные семена ставят на прораствание в воду, опытные - в раствор кумарина концентрацией 50 мг/л.

Прораствают семена в темноте в течение 5-7 дней при температуре 20°C. Затем рулон разворачивают и оценивают проростки по пятибалльной шкале. Определяют сырую массу надземной части и корней для всех 50 проростков вместе. Качество проростков оценивают по следующей шкале:

Сильные проростки	5 баллов	Длина ростка превышает 5 см, лист вышел из колеоптиля или равен его длине, число зародышевых корешков пять и более
	4 балла	Длина ростка не менее 4 см, лист в колеоптиле превышает 3/4 его длины, число зародышевых корешков не менее четыре
	3 балла	Длина ростка не менее 2,5 см, лист в колеоптиле более 1/2 его длины, число зародышевых корешков не менее трех
Слабые проростки	2 балла	Длина роста менее 2,5 см, лист менее 1/2 длины колеоптиля, число зародышевых корешков два и более
	1 балл	Росток по длине менее двух длин зерновки, число зародышевых корешков два и более

Кроме того, учитывают количество ненормально проросших и непроросших (набухших, загнивших твердых) семян. Результаты наблюдений записывают в таблицу 27 по приведенной форме. Делают выводы о влиянии условий выращивания, длительности хранения семян и действии химических регуляторов на силу роста.

Таблица 27-Морфологическая оценка проростков

Вариант опыта	Оценка в баллах	Сумма баллов	Сила рост	Сырая масса, г	Отношение массы
---------------	-----------------	--------------	-----------	----------------	-----------------

	5	4	3	2	1		а, %	Надзем- ной части	корней	надземной части к массе корней

Материалы и оборудование: Технические весы, кристаллизаторы, полоски полиэтиленовой пленки и фильтровальной бумаги, шпагат, семена пшеницы и ржи разных лет уборки урожая (крупная и мелкая фракции семян), кумарин, метеорологические данные трех последних лет.

6.3 Определение физиологической активности гиббереллинов в биотесте с удлинением гипокотилей проростков двудольных растений

Многие фитогормоны из класса гиббереллинов стимулируют деление и растяжение клеток в растущих тканях растений. На этом основано определение их активности в специальных биопробах (биотестах) с использованием наиболее чувствительных объектов - гипокотилей салата или горчицы, а также эпикотилей гороха. Наибольшей чувствительностью в таком биотесте обладают генотипы с невысоким содержанием собственных (эндогенных) гиббереллинов. Как правило, это кочанные сорта салата, позднеспелые сорта горчицы, долго остающиеся в состоянии розеточного растения, карликовые сорта гороха, кукурузы, риса. Именно их чаще всего используют в биотестах.

Задание: изучить метод определения физиологической активности гиббереллинов.

Порядок выполнения работы. Семена горчицы сарептской *Brassica juncea* (L.) Coss. проращивают в темноте на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри при температуре 24-26°C в течение 30-36 ч. Наибольшей чувствительностью обладают проростки с начальной длиной гипокотилея (подсемядольного колена) 3-4 мм.

В стеклянные стаканчики объемом 10-20 мл наливают дистиллированную воду (контроль) или водные растворы гибберелловой кислоты (гиббереллина А₃ или ГА₃) в концентрациях 10⁻⁸-10⁻³ М (молекулярная масса гибберелловой кислоты 346). (Наряду с гиббереллином А₃ в работе можно использовать для сравнительного определения физиологической эффективности и другие доступные препараты гиббереллинов, например ГА₄₊₇, ГА₁.) Объем жидкости, вливаемой в стаканчик, определяется его размерами: толщина слоя жидкости на дне должна составлять 1-2 мм. Для получения указанных концентраций 1 мл исходного 10⁻³ М раствора гибберелловой кислоты (навеску сухого препарата сначала растворяют в небольшом количестве этанола, а затем в воде) наливают в мерный цилиндр на 10 мл, доливают водой до черты и тщательно перемешивают. Разлив нужное количество полученного таким образом 10⁻⁴ М раствора в стаканчик(и), берут 1 мл и снова доливают до черты, получается раствор 10⁻⁵ М и т. д.

На дно стаканчиков с испытываемыми растворами пинцетом аккуратно

раскладывают по 5 проростков так, чтобы корни были полностью погружены в жидкость. Стаканчики помещают во влажную камеру и выращивают проростки на непрерывном свете (люминесцентные лампы, освещенность 4-6 клк) в течение 2-3 сут. Влажную камеру можно подготовить, например, с использованием прозрачной фотографической кюветы, на дно которой наливают небольшое количество воды, на платформе из стекла устанавливают стаканчики с растениями, а сверху все накрывают еще одним более крупным стеклом.

По окончании экспозиции при помощи миллиметровой линейки измеряют длину гипокотилия каждого проростка. Вычисляют среднюю длину гипокотилия в каждом варианте концентрации GA_3 , и выражают ее в процентах от контроля (воды). На миллиметровой бумаге строят график зависимости конечной длины гипокотилия от концентрации гибберелловой кислоты. Для этого по оси абсцисс в логарифмическом масштабе откладывают значения использованных в опыте концентраций рабочих растворов, а по оси ординат - длину гипокотилия в процентах к контролю. Делают вывод о характере и степени стимуляции роста гипокотилия в зависимости от концентрации гибберелловой кислоты. Результаты измерений (удлинение гипокотилия горчицы) записывают в таблицу 28 по приведенной форме.

Таблица 28-Определение физиологической активности гиббереллинов

Вариант опыта	Длина гипокотилия	
	мм	% к контролю

Материалы и оборудование: семена горчицы, гибберелловая кислота, чашки Петри, стаканчики на 10-20 мл, мерные цилиндры на 10 мл, влажная камера, облучатель с люминесцентными лампами, миллиметровая линейка и бумага.

6.4 Установление фотопериодической реакции горчицы сарептской

Реакция растений на длину дня, получившая название фотопериодизма, способствует приспособлению их онтогенеза (жизненного цикла) к сезонным изменениям жизненно важных факторов внешней среды (температуры, влажности). При этом обеспечиваются синхронизация цветения с наиболее благоприятным периодом в течение года и переживание неблагоприятных условий за счет перехода растений в состояние покоя. У фотопериодически чувствительных растений длина дня влияет на вызревание древесины, переход почек к покою, время листопада у древесных и кустарниковых многолетников, вегетативное размножение и генеративное развитие у однолетних, двулетних и многолетних растений.

У однолетних растений с верхушечным соцветием существует обратная коррелятивная связь между скоростью генеративного развития и числом ярусов

листьев до соцветия главного побега. Чем быстрее идет развитие, тем меньше листьев на побеге. Это хорошо проявляется у длиннодневного растения горчицы сарептской.

Задание: установить влияние длины дня на развитие растений горчицы сарептской.

Порядок выполнения работы. Предварительно выращивают в фотопериодических камерах растения горчицы сарептской при длине дня 14, 16, 18 и 24 ч. Посев проводят соответственно за 2; 1,5 и 1 мес до занятия студентов при длине дня 14, 16, 18 и 24 ч. Фиксируют сроки посева, бутонизации и цветения растений каждого фотопериодического варианта, данные сообщают студентам во время занятия. Студенты определяют у растений всех вариантов следующие показатели: число листьев главного побега до соцветия, высоту стебля, число бутонов, цветков, стручков (если они образовались), количество цветущих и вегетативных боковых побегов. На основании полученных данных делают вывод о влиянии длины дня на скорость развития растения, число листьев и генеративных органов. Результаты записывают в таблицу 29 по приведенной форме. При выполнении данной работы целесообразно испытать сорта с разным уровнем фотопериодической чувствительности.

Таблица 29-Влияние длины дня на развитие растений

Показатель	Длина дня, ч			
	14	16	18	24

Материалы и оборудование: фотопериодические камеры, вегетационные сосуды с песчаной культурой горчицы сарептской.

7 ПРИСПОСОБЛЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ

Информационный материал. Обязательным условием для нормального функционирования живых организмов является постоянное их взаимодействие с внешней средой.

Структура защитно-приспособительного комплекса растений определяется особенностями почвенно-климатических и биотических условий, в которых проходила эволюция вида. В свою очередь, дальнейшая экологическая и географическая дифференциация вида, формирование его эколого-географического полиморфизма зависят от специфики защитноприспособительного комплекса вида.

Адаптация к условиям окружающей среды - необходимое условие выживания и жизнедеятельности организмов любого уровня эволюционного развития. Способность к жизнедеятельности в условиях постоянных изменений факторов среды определяется разными приспособительными механизмами (биохимическими, физиологическими, морфологическими, поведенческими).

Механизмы адаптации возникли одновременно с самой жизнью и развивались последовательно вместе с усложнением жизненных процессов. Чем выше уровень эволюционного развития организма, тем совершеннее и разнообразнее у него адаптационные процессы. При этом примитивные формы более устойчивы к воздействиям различных факторов среды и имеют более высокий потенциал резистентности и приспособленности.

Развитие приспособительных механизмов организма соответствует потребностям, многообразие и сложность которых также увеличиваются в эволюционном ряду и находят свое проявление в поведении - важнейшем способе адаптации к среде. Это определяется тем, что потребности отражают избирательную зависимость живых организмов от факторов внешней среды, существенных для самосохранения и саморазвития, и служат источником активности живых систем, побуждением и целью их поведения в окружающем мире.

Адаптация - это процесс реализации тех резервных возможностей, которые заложены в любом живом активно функционирующем организме и позволяют ему выживать в экстремальных условиях. В 1936 г. Г. Селье впервые предложил синдром, вызываемый различными вредоносными агентами, названный впоследствии как общий адаптационный синдром, или синдром биологического стресса.

Стресс представляет собой неспецифический компонент адаптации, который играет мобилизующую роль и обуславливает привлечение энергетических и пластических ресурсов для специфической адаптивной перестройки различных систем организма. При этом протекание адаптационных реакций можно разделить в два этапа: начальный этап срочной, но несовершенной адаптации, и последующий этап совершенной, долговременной адаптации. Реализация срочного этапа адаптации возможна только благодаря тем резервам организма, которые обусловлены генетически,

за счет ранее сформированных физиолого-биохимических механизмов. Продолжительность этапа полностью зависит от запаса пластических и энергетических ресурсов в организме. Проявляется сразу в ответ на действие фактора, но, однако, ограничено тем, что деятельность организма протекает на пределе его функциональных возможностей и не всегда может быть совершенной.

Долговременный этап адаптации развивается на основе многократной реализации срочной адаптации. При этом организм вырабатывает устойчивый комплекс адаптационно приспособительных механизмов, которые позволяют ему противодействовать более разрушительным факторам и выдерживать нагрузки, действие которых ранее было несовместимо с жизнью.

Действие приспособительного потенциала на биохимическом уровне проявляется участием белков и функционально активных молекул в регуляции метаболических процессов. В работах последних лет показано, что температура, рН среды, УФ-облучение и другие факторы окружающей среды могут оказывать влияние на кинетические и структурные свойства ферментов, которые в живых организмах выполняют каталитические функции, определяя молекулярную природу приспособительных механизмов организмов к меняющимся факторам среды. В частности, показано, что одной из наиболее общих особенностей воздействия температуры на ферментативные реакции следует считать влияние на степень сродства фермента к субстрату. Изменение кинетического параметра (константы Михаэлиса-Ментен) в области оптимальных температур имеет минимальное значение, и положение этого минимума соответствует оптимальным температурным условиям обитания живых организмов, находящихся в разных температурных условиях, а также при акклиматизации к различным температурам. Во многих случаях влияние температуры на сродство фермента к субстрату осуществляется через изменение внутриклеточного рН. Это вызывает структурные перестройки в ферментах, реализуя, таким образом, на молекулярном уровне адаптивные возможности, заложенные в лабильности белковых глобул, обеспечиваемые за счет перераспределения водородных связей и гидрофобных взаимодействий.

Кроме того, приспособительный потенциал живых организмов может реализоваться путем синтеза новых белков и изоформ некоторых ферментов.

Эти виды проявления действия стрессирующих факторов на ферментативный аппарат клетки живых организмов служит примером биохимических адаптаций к меняющимся условиям внешней среды, что, возможно, наиболее резко должно наблюдаться у организмов, обитающих в районах с континентальным климатом.

Таким образом, каждый живой организм имеет адаптационный (жизненный) потенциал, который обеспечивает возможность его выживания в экстремальных или меняющихся условиях. Однако величина потенциала у разных организмов индивидуальна. Благодаря своим функциональным резервам растения способны выдерживать значительные воздействия со стороны различных факторов окружающей среды, а в случае необходимости

повышать потенциал толерантности системы, увеличивая свои адаптационные возможности, реализуя действия собственной системы неспецифической резистентности.

Методические рекомендации по изучению темы. Данная тема отражает стойкость растений к различным неблагоприятным факторам среды, а также вредным газообразным выделениям промышленности и транспорта. Поэтому необходимо изучить приспособленность онтогенеза растений к условиям среды.

Необходимо уяснить биологические основы холодоустойчивости растений, какие физиолого-биохимические изменения происходят у теплолюбивых растений при пониженных положительных температурах и определить способы повышения холодоустойчивости растений.

Важным моментом при изучении этой темы является определение морозоустойчивости растений. Она включает знание основ замерзания растительных клеток и тканей, условий и причин вымерзания растений, фаз закаливания и способов повышения морозоустойчивости.

Немаловажное значение имеет зимостойкость растений, являющаяся комплексным свойством устойчивости растений к неблагоприятным факторам перезимовки (выпревание, вымокание, выпирание, ледяная корка, зимняя засуха).

Существенное влияние на продуктивность растений оказывает жароустойчивость. Необходимо выяснить изменения, происходящие в обмене веществ, в росте и развитии растений при возделывании на них максимальных температур, и приемы, обеспечивающие повышение жароустойчивости растений.

Совокупное действие недостатка влаги и высокой температуры на растение определяет их засухоустойчивость.

Следует обратить внимание на солеустойчивость растений, отметить современное состояние физиологии солеустойчивости, влияние засоления на растения и выяснить механизмы толерантности, типы галофитов, солеустойчивости сортов и определить методы диагностирования солеустойчивости растений.

Антропогенное воздействие на окружающую среду определило проблему борьбы с вредными газообразными выделениями промышленности и транспорта, остаточным действием веществ, используемых для борьбы с болезнями, вредителями и сорняками.

Литература: 2, с.403-442; 3, с.510-584; 4, 279-303; 5, с.196-235.

Вопросы для самопроверки:

1. Что понимается под приспособленностью и устойчивостью растений?
2. Как изменяются функциональные свойства растений при повреждениях?
3. Холодоустойчивость растений.
4. Морозоустойчивость растений.
5. Устойчивость растений к антропогенным токсическим веществам.

РАБОТА В ЛАБОРАТОРИИ

7.1 Выявление защитного действия сахаров на протоплазму

При воздействии отрицательных температур на растительные ткани в межклетниках образуется лед, который, оттягивая воду из клеток, обезвоживает протоплазму. При определенной степени обезвоживания, индивидуальной для каждого организма, протоплазма коагулирует. Кристаллы льда, образующиеся непосредственно в клетках, оказывают механическое воздействие, в результате нарушается внутренняя структура протоплазмы, резко повышается ее проницаемость, а при длительной экспозиции на морозе наступает отмирание. Скорость отмирания протоплазмы клеток зависит как от температуры и времени экспозиции, так и от водоудерживающей способности самой клетки. Увеличение количества растворимых сахаров в зимующих органах растений повышает водоудерживающую способность тканей.

Задание: установить связь между интенсивностью окрашивания растворов и составом смесей, сделать вывод о роли сахаров в сохранении жизнеспособности клеток растительных тканей при их замораживании.

Порядок выполнения работы. Из поперечного среза столовой свеклы толщиной 0,5 см при помощи пробочного сверла диаметром 5-6 мм делают высечки. Тщательно промывают их под водопроводной водой и помещают в три пробирки по три высечки в каждую. В первую пробирку наливают 5 мл дистиллированной воды, во вторую - 0,5 мл 0,5 М раствора сахарозы, в третью - 0,5 мл 1 М раствора сахарозы. Пробирки этикетировывают и на 20 мин погружают в охлаждающую смесь, состоящую из трех частей льда или снега и одной части поваренной соли. Затем пробирки вынимают из охлаждающей смеси и размораживают в стакане воды комнатной температуры.

После оттаивания пробирки встряхивают. Отмечают различия в интенсивности окрашивания жидкости в пробирках и объясняют их. Из анализируемых высечек готовят тонкие срезы и рассматривают их под микроскопом при малом увеличении в капле раствора, в котором они находились. Подсчитывают общее число клеток в поле зрения и число обесцвеченных клеток, из которых вышел антоциан. Результаты опыта записывают в таблицу 30 по приведенной форме.

Таблица 30- Определение защитного действия сахаров на протоплазму

Условия, вариант	Число клеток в поле зрения микроскопа		Отношение числа окрашенных клеток к общему их числу, %	Вывод
	всего	окрашенных		

Материалы и оборудование. Корнеплоды свеклы, лед колотый или снег. Термометр, нож, пробочные сверла диаметром 6 мм, бритвы, пробирки, микроскопы, предметные и покровные стекла, кисточки, карандаши по стеклу, фильтровальная бумага, лопатка для охлаждающей смеси и стакан.

Реактивы: 0,5 и 1 М растворы сахарозы, поваренная соль.

7.2 Ранняя диагностика устойчивости растений к вымоканию

Наибольшая чувствительность растений к избытку влаги проявляется на ранних этапах их развития – в период от набухания до прорастания семян.

Задание: оценить устойчивость растений по прорастанию семян в условиях избыточного увлажнения.

Порядок выполнения работы. Семена двух-трех сортов, различающихся по устойчивости к вымоканию, погружают в кюветы, заполненные водой слоем 3-4 см выше уровня семян. На пятые сутки семена с фильтровальной бумагой закручивают в рулон, этикетируют и помещают в растильни с водой на проращивание. Для крупносемянных культур 1-й этап работ можно проводить сразу, начиная с рулонов, при этом уровень воды в первые 5 дней должен быть выше уровня семян также на 3-4 см. В последующий период избыток воды сливают. В этом случае можно использовать химические стаканы емкостью до 1л. Через 6-7 сут подсчитывают число нормально развившихся проростков, длину корневой системы, надземной части в сантиметрах. Результаты опыта записывают в таблицу 31:

Таблица 31- Устойчивость растений к вымоканию

Вид растения	Количество проросших семян, % общего числа	Вывод

Материалы и оборудование: семена видов и сортов культур, отличающихся устойчивостью к вымоканию, кюветы, растильни, шкаф для проращивания семян, полиэтиленовая пленка, полоски фильтровальной бумаги, стаканы (1 л).

7.3 Защитное действие сахарозы на белки при отрицательных температурах

В экстремальных условиях, например при низких температурах, может произойти денатурация белков. Выпадение хлопьевидного осадка белков из сока, отжатого из растительной ткани, служит показателем повреждения. Сахароза образует связи с гидрофильными группами белков и способствует сохранению их нативной структуры при повреждающем воздействии низких температур.

Задание: выяснить, влияет ли на устойчивость белков к низким температурам повышение осмотического давления среды.

Порядок выполнения работы. Опыт заключается в замораживании и оттаивании отжатого из растительной ткани сока с добавлением сахарозы и без нее. Чтобы выяснить, влияет ли на устойчивость белков к низким температурам повышение осмотического давления среды, берут в качестве контроля к сахарозе не только воду, но и изотонический раствор нейтральной соли, например NaCl.

Листья капусты или очищенный клубень картофеля натереть на терке, отжать сок в стакан через двойной слой марли, дать отстояться. Налить по 3 мл надосадочной жидкости в 4 пронумерованные пробирки. В первую пробирку добавить 2 мл 1 М раствор сахарозы, во вторую 2 мл 0,6 М раствора NaCl, в третью и четвертую – по 2 мл воды и перемешать. Первую, вторую и третью пробирки поместить в охлаждающую смесь снега или толченого льда с солью (3:1 по объему), пробирку № 4 оставить при комнатной температуре (контроль). Через 20 мин, когда сок в пробирках замерзнет, перенести пробирки в стакан с водой.

После оттаивания определить, не встряхивая, по внешнему виду жидкости в пробирках, остались ли белки в состоянии золя или произошла их коагуляция (образование хлопьев). Результаты опыта записывают в таблицу 32 по приведенной форме.

Таблица 32- Защитное действие сахарозы на белки

Объект	№ пробирки	Вариант опыта	Образование хлопьев
	1	Сахароза, – 20 ⁰ С	
	2	NaCl, - 20 ⁰ С	
	3	Вода, - 20 ⁰ С	
	4	Вода, комнатная температура	

Материалы и оборудование: листья капусты, клубень картофеля, снег или толченый лед, термометр до – 25⁰С, шпатель, скальпель, терка, стаканы химические, пробирки, пипетки градуированные на 5 мл, марлевые салфетки.

Реактивы: 1 М раствор сахарозы, 0,6 М раствор NaCl, соль поваренная.

7.4 Влияние сахарозы на морозоустойчивость растительных клеток

При замерзании растительных тканей в межклетниках образуются кристаллы льда, которые оттягивают воду от клеток. Если цитоплазма недостаточно морозоустойчива, то она, не выдержав обезвоживания, а также механического давления кристаллов льда, коагулирует, а мембраны утрачивают полупроницаемость. О степени повреждения клеток можно судить по их способности удерживать клеточный сок. Морозоустойчивость клеток может быть повышена защитными веществами, среди которых важная роль принадлежит сахарозе и другим олигосахаридам.

Задание: объяснить различия между вариантами опыта, отметив

значение сахарозы как защитного вещества. Подсчитать процент плазмолизированных клеток.

Порядок выполнения работы. Вырезать из свежего (тургесцентного) корнеплода красной свеклы пластинку толщиной около 5 мм, из которой сделать 9-12 высечек с помощью пробочного сверла (диаметр сверла должен быть меньше диаметра пробирок). Поместить высечки в фарфоровую чашку и тщательно промыть водопроводной водой до полного удаления сока, вытекшего из поврежденных клеток. Перенести одинаковое количество высечек в 3 пробирки, снабженные этикетками. В 1-ю пробирку налить на 1/4 воды, во 2-ю - столько же 0,5 М раствора сахарозы, в 3-ю - 1 М раствора сахарозы.

Приготовить охлаждающую смесь: к трем частям снега или толченого льда добавить одну часть поваренной соли (по объему) и тщательно перемешать шпателем или лопаткой. Проверить температуру смеси, которая должна быть около -20°C . Погрузить все пробирки в охлаждающую смесь на 15-20 мин, после чего поставить в стакан с водой комнатной температуры.

После полного оттаивания отметить окраску жидкости в пробирках и окраску высечек. Проверить жизнеспособность клеток, для чего приготовить из высечек тонкие срезы, поместить их на предметные стекла в капли 8%-ного (гипертонического) раствора NaCl и закрыть покровными стеклами. Через 20 мин рассмотреть в микроскоп не менее трех полей зрения и подсчитать процент плазмолизированных клеток.

Результаты опыта записывают в таблицу 33 по приведенной форме.

Таблица 33- Влияние сахарозы на морозоустойчивость растительных клеток

Вариант опыта	Окраска наружного раствора	Окраска высечек	Количество плазмолизированных клеток, %
Вода			
Сахароза 0,5 М			
Сахароза 1М			

Материалы и оборудование: корнеплод красной свеклы, снег или толченый лед, шпатель, термометр до -25°C , скальпель, пинцет, пробочное сверло диаметром 5-6 мм, лезвие бритвы, микроскоп, предметные и покровные стекла, фарфоровая чашка, стакан, пробирки с резиновыми колечками (3 шт.), фильтровальная бумага, карандаш по стеклу.

Реактивы: растворы сахарозы 0,5 и 1 М, 8%-ный раствор NaCl в капельнице, поваренная соль.

7.5 Способ закаливания и определение морозоустойчивости озимых с использованием экзогенных сахаров

Для сравнительного определения потенциальной морозоустойчивости сортов зерновых культур можно использовать лабораторные способы закаливания. Для прохождения первой фазы закаливания (И.И. Туманов) растениям необходимо хорошо освещенное помещение, температура в котором поддерживается около 0°C. В условиях достаточного освещения в результате фотосинтеза в клетках накапливаются сахара. Для упрощения методики в Институте физиологии растений разработан метод закаливания в темноте. Проводят оценку морозоустойчивости по накоплению сахаров за счет поглощения их из растворов при низкой температуре.

Задание: определить морозоустойчивость озимой пшеницы с использованием экзогенных сахаров.

Порядок выполнения работы. Растения 2-3 сортов озимой пшеницы, различающихся по морозоустойчивости, выращивают в оптимальных условиях до фазы кущения. Затем их выкапывают, отмывают от почвы и в пучках по 20-25 растений помещают в стаканчики объемом 50 мл, которые на 1/3 заполнены раствором сахарозы (корни и узлы кущения должны быть полностью погружены).

Для закаливания растения последовательно помещают в 5, 10, 15%-ные растворы сахарозы, выдерживая в каждом из них по 4-5 дней. При этом поддерживают температуру, близкую к 0°C. Для предупреждения появления грибов в растворе к нему добавляют каплю толуола. Затем растения вынимают из холодильника и, не разворачивая бумагу (чтобы избежать быстрого оттаивания), переносят в холодное помещение с температурой около 2°C. Оттаявшие растения отращивают. Живые растения учитывают через 1-2 нед после высадки. Результаты опытов записывают в таблицу 34 по приведенной форме.

Таблица 34- Определение морозоустойчивости растений

Вариант опыта	Количество отросших растений (%) После промораживания при температуре, °C				Выводы о морозостойкости растений
	0	5	16	25	

Материалы и оборудование: семена растений сортов с различной морозоустойчивостью, ящики для посадки растений, бумага, холодильник, ящики для отращивания растений.

Реактивы: 5, 10, 20%-ные растворы сахарозы, толуол.

7.6 Определение жаростойкости растений (по Ф.Ф. Мацкову)

Если подвергнуть лист действию высокой температуры, а затем погрузить в слабый раствор соляной кислоты, то поврежденные и мертвые клетки побуреют вследствие свободного проникновения в них кислоты, которая вызовет превращение хлорофилла в феофитин, тогда как неповрежденные клетки останутся зелеными. У растений с кислым клеточным соком феофитинизация может произойти и без обработки соляной кислотой, так как при нарушении полупроницаемости тонопласта органические кислоты проникают из клеточного сока в цитоплазму и вытесняют магний из молекулы хлорофилла.

Задание: определить жаростойкость листьев тополя и березы, сделать вывод о степени жаростойкости исследованных растений.

Порядок выполнения работы. Нагреть водяную баню до 40⁰С, погрузить в нее по 5 листьев исследуемых растений и выдержать листья в воде в течение 30 мин, поддерживая температуру на уровне 40⁰С. Затем взять первую пробу: извлечь по одному листу каждого вида растений и поместить их в чашку Петри с холодной водой (на чашке необходимо сделать соответствующую надпись). Поднять температуру в водяной бане до 50⁰С, через 10 мин после этого извлечь из бани еще по одному листу и перенести их в новую чашку с холодной водой. Постепенно довести температуру до 80⁰С, беря пробы через каждые 10 мин при повышении температуры на 10⁰.

Заменить воду в чашках 0,2 н. HCl и через 20 мин учесть степень повреждения листа по количеству появившихся бурых пятен. Результаты исследования разных объектов записать в таблицу, обозначив отсутствие побурения знаком «-», слабое побурение - «+», побурение более 50% площади листа - «++» и сплошное побурение - «+++». Результаты опыта записывают в таблицу 35 по приведенной форме.

Таблица 35 - Определение жаростойкости растений

Растение	Степень повреждения листьев при t, ⁰ С				
	40	50	60	70	80

Материалы и оборудование: свежие листья различных растений, водяная баня, термометр, пинцет, чашки Петри (5 шт.), стакан с водой, карандаш по стеклу.

Реактивы: 0,2 н HCl.

7.7 Влияние высокой температуры на проницаемость цитоплазмы

При нагревании растений до температуры выше оптимальной в клетках нарушается обмен веществ: происходит разобщение дыхания и фосфорилирования, прекращается синтез белков и усиливается их распад,

накапливаются ядовитые вещества. При более высоких температурах резко повышается проницаемость цитоплазматических мембран, и затем наступают коагуляция белков и отмирание клеток.

Задание: определить летальную температуру - наименьшую температуру, вызывающую наибольший выход пигмента из клеток. Вычертить кривую выделения антоциана из клеток, откладывая по оси абсцисс температуру, а по оси ординат - оптическую плотность.

Порядок выполнения работы. Вырезать из очищенного корнеплода красной свеклы 7 прямоугольных кусочков размером 3x10x40мм, поместить их в фарфоровую чашку, многократно промыть водопроводной водой до полного обесцвечивания промывных вод и оставить в чашке под слоем воды.

Нагреть в стакане воду до 75°C, захватить пинцетом один кусочек свеклы и погрузить его ровно на 1 мин в нагретую воду, а затем перенести в пробирку с 10 мл холодной дистиллированной воды, сделав на ней надпись карандашом по стеклу. Добавлением холодной воды охлаждать содержимое стакана до 70-65-60-55-50 и 45°C и при каждой температуре проделывать то же, что описано выше: выдержать очередной кусочек в стакане в течение 1 мин и перенести в пробирку с 10 мл дистиллированной воды.

Встряхивать пробирки в течение 15 мин и определить интенсивность окраски жидкости на фотоэлектроколориметре (ФЭК) при зеленом светофильтре (против дистиллированной воды). Результаты опыта записывают в таблицу 36 по приведенной форме.

Таблица 36- Влияние высокой температуры на проницаемость цитоплазмы

Номер пробирки	Температура, °С	Оптическая плотность
1	75	
2	70	
3	65	
4	60	
5	55	
6	50	
7	45	

Материалы и оборудование: корнеплод красной свеклы, скальпель, пинцет, термометр, фотоэлектроколориметр, электроплитка, песочные часы на 1 мин, штатив с пробирками (7 шт.), фарфоровая чашка, стаканы химические (2 шт.), колба с дистиллированной водой, пипетка на 10 мл, 4 карандаш по стеклу, салфетка.

7.8 Определение засухоустойчивости растений методом крахмальной пробы

Засухоустойчивые растения сохраняют более высокую синтетическую способность при действии засухи и содержат больше крахмала, чем растения с низкой устойчивостью. Пул крахмала имеет большое значение в процессах репарации.

Задание: определить засухоустойчивость растений в зависимости от количества крахмала в листьях.

Порядок выполнения работы. Определения проводят на листьях картофеля, проса, подсолнечника. В опытах сравнивают партии растений одного вида, получивших различную обработку, изменившую их засухоустойчивость.

В солнечную погоду в 11-12 ч дня, когда в листьях скапливается значительное количество крахмала, срывают с опытных растений 5-20 листьев одного яруса и оставляют их в тени на 2-3 ч. Затем каждый лист или его часть (4-5 см) обесцвечивают спиртом и определяют содержание крахмала, действуя раствором Люголя. Чем больше образуется крахмала, тем засухоустойчивее сорт. Результаты (среднее арифметическое) выражают в баллах: 1 - крахмала нет, 2 - крахмал есть, 3 - крахмала много. Результаты опыта записывают в таблицу 37 по приведенной форме.

Таблица 37-Определение засухоустойчивости растений

Вариант опыта	Количество крахмала, баллы	Вывод

Материалы и оборудование: листья растений, различающихся по засухоустойчивости, спирт, раствор Люголя, микроскоп, чашки Петри, эксикаторы, термостат, ножницы, пинцет, химический стакан, секундомер.

7.9 Определение температурного порога коагуляции цитоплазмы (по П.А. Генкелю)

Клетки разных растений имеют неодинаковую жаростойкость. Температура, при которой в течение 10 мин полностью коагулируют белки цитоплазмы, считается условной границей жаростойкости растений. Гибель клеток устанавливается по потере ими способности плазмолизироваться.

Задание: определить температурный порог коагуляции цитоплазмы. Сделать выводы, сопоставляя температурный порог коагуляции белков цитоплазмы разных растений.

Порядок выполнения работы. Приготовить 12 срезов эпидермиса листа исследуемого растения и поместить по два среза в пробирки, в которые налито небольшое количество водопроводной воды.

Нагреть в большой колбе воду. Смешивая горячую воду с холодной, приготовить в шести химических стаканах водяные бани с температурой 48, 50, 52, 54, 56 и 58°C (сделать на стаканах надписи карандашом по стеклу). Одновременно погрузить в водяные бани пробирки со срезами, поддерживая установленную температуру путем осторожного подливания в стаканы горячей воды. Через 10 мин извлечь срезы щеточкой из пробирок и перенести на предметные стекла, снабженные соответствующими надписями. Если клетки не содержат пигментов, следует окрасить их, выдержав в растворе нейтрального красного в течение 5-10 мин, затем удалить раствор краски фильтровальной бумагой, нанести на срезы по капле 1 М раствора сахарозы, закрыть покровными стеклами и через 15-20 мин рассмотреть в микроскоп.

Занести результаты в таблицу, обозначая знаком «+» плазмолиз и знаком «-» отсутствие плазмолиза у большинства клеток. Результаты опыта записывают в таблицу 38 по приведенной форме.

Таблица 38- Определение температурного порога коагуляции цитоплазмы

Растение	Плазмолиз при температуре, °С					
	48	50	52	54	56	58

Материалы и оборудование: свежие листья различных растений, стаканы химические большие (6 шт.), электроплитка, пробирки (5 шт.), большая колба, термометр, лезвие бритвы, препаровальная игла, кисточка, микроскоп, предметные и покровные стекла, кусочки фильтровальной бумаги, карандаш по стеклу.

Реактивы: 1 М раствор сахарозы в капельнице, 0,02%-ный раствор нейтрального красного.

7.10 Определение солеустойчивости по ростовым процессам

В условиях избыточной засоленности почвы всхожесть семян и интенсивность роста растений часто снижаются. При определении солеустойчивости растений данным методом показателем устойчивости служит количество проросших семян в растворах соли по сравнению с дистиллированной водой.

Задание: оценить токсическое и осмотическое действие разных солей, на различные сорта сельскохозяйственных культур.

Порядок выполнения работы. Подбирают выполненные семена зерновых или овощных культур одной репродукции. Семена каждого вида и сорта помещают в марлевые мешочки с этикетками внутри и обрабатывают раствором формалина (1 мл на 3000 мл воды) в течение- 5 мин. Затем слегка просушивают и раскладывают в чашки Петри. Чашки Петри с фильтровальной бумагой предварительно прогревают в термостате при температуре 150°C.

В чашки Петри наливают по 10 мл 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 и 1,5%-ного NaCl (с осмотическим давлением 290, 440, 570, 700 и 1070 кПа) и 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0%-ного NaHCO₃ (240, 340, 440 и 580 кПа), а для контроля - 10 мл дистиллированной воды. Для каждого образца берут по две чашки. На дно шкафа для проращивания семян ставят кювету с водой. По окончании проращивания (6-7 сут) по каждому варианту определяют число проросших семян (среднее из двух повторностей) и среднюю длину корней. Число семян, проросших в дистиллированной воде, принимают за 100%, а проросших в растворах солей вычисляют в процентах от контроля. Менее солеустойчивые растения характеризуются более резкими изменениями в прорастании семян при увеличении засоленности субстрата.

Результаты опыта записывают в таблицу 39 по приведенной форме.

Таблица 39- Определение солеустойчивости растений

Вариант опыта	Число проросших семян	Длина корней, см	Длина надземной части, см	Вывод

Материалы и оборудование: семена растений различной солеустойчивости, фильтровальная бумага, чашки Петри, марлевые мешочки, термостат, шкаф для проращивания растений, линейки.

Реактивы: раствор формалина, раствор NaCl и NaHCO₃ различной концентрации.

8 ПРЕВРАЩЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В РАСТЕНИЯХ

Информационный материал. Под обменом веществ понимают последовательное потребление, превращение, использование, накопление и потерю веществ и энергии в живых организмах в процессе жизни, позволяющие им самосохраняться, расти, развиваться и самовоспроизводиться в условиях воздействия окружающей среды, а также адаптироваться к ней и ее изменениям.

Если обмен веществ происходит между организмом и средой - это внешний обмен веществ. Если вещества транспортируются и превращаются в самом организме - это внутренний, или промежуточный, обмен веществ.

Обмен веществ растительного организма представляет собой огромное число химических реакций и физиологических процессов, объединенных в пространстве и во времени в единое упорядоченное целое и подчиняющихся законам термодинамики.

Энергия, необходимая для сохранения сложной структуры живой растительности клетки, называется поддерживающей. Энергию, необходимую для осуществления функций живой клетки (поглощения или выделения веществ, биосинтез) называют функциональной.

Источником энергии служит расщепление органических веществ клетки - диссимиляция. Этот процесс включает реакции расщепления (катаболические), которые идут преимущественно с выделением энергии и поэтому называются экзотермическими, или экзергоническими.

Запас органических веществ, расходуемых в процессе диссимиляции, у растений пополняется путем синтеза из неорганических веществ при использовании внешних источников энергии (фотосинтез, хемосинтез). Для процессов воспроизводства живого организма (рост, обновление клеток и т. д.) необходим приток органических веществ, который называется ассимиляцией. Она включает в себя также множество отдельных реакций, преимущественно биосинтетических (анаболических), которые идут с затратой энергии и носят название эндотермических, или эндергонических.

Совокупность анаболических и катаболических реакций, протекающих в клетке в любой момент времени, называют ее метаболизмом.

Упорядоченность хода реакций обмена веществ (метаболизма) достигается с помощью эффективных механизмов регуляции - биомембран (компартаментация), ферментов, фитогормонов, специфических ингибиторов.

Понятие обмена веществ подразумевает образование и превращение как первичных, так и вторичных растительных продуктов. Такие важнейшие первичные органические соединения, как углеводы, липиды, белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, органические кислоты, содержатся в каждой растительной клетке и интенсивно превращаются в основном обмене веществ. Наряду с этим существуют локально синтезируемые и медленно перемещаемые вторичные вещества (например, алкалоиды, гликозиды, сапонины). Указанные вещества, как правило, не служат ни источниками

энергии, ни запасными веществами.

Цель лабораторных работ данного раздела - ознакомление с современными не очень сложными и доступными для лабораторий методами биохимических исследований обмена веществ растений.

Определение содержания белков и активности протеиназ осуществляют в процессе прорастания и формирования семян. Прорастание зерновки пшеницы или ржи первоначально характеризуется структурной дезагрегацией белкового комплекса клейковины с постепенным разрывом водородных и дисульфидных связей, затем сопровождается гидролизом высокомолекулярных белков до низкомолекулярных белков, пептидов и аминокислот, из которых строятся белки растущей зародыша. Максимальная скорость гидролиза запасных белков совпадает с максимумом скорости роста проростка. Однако семядоли и эндосперм прорастающих семян не только обеспечивают растущий зародыш запасными питательными веществами, но и способны к синтезу *de novo* определенных ферментов. В запасных тканях происходят синтез РНК, а также ее деградация.

Как правило, запасные белки в семенах растений откладываются в виде алейроновых зерен - белковых тел, содержащих в среднем белка - 69% , липидов - 22, нуклеиновых кислот - 5, фитиновой кислоты - 4%. При образовании, например, зерновки пшеницы - ходе развития эндосперма в клетках увеличиваются число белковых тел и их размер. Накопление отдельных фракций белков в процессе формирования зерна пшеницы, кукурузы, ячменя идет следующим образом: альбумины и глобулины синтезируются в зерне на более ранних фазах, чем проламины и глютелины. Накопление последних наиболее интенсивно происходит с начала фазы молочной спелости продолжается до конца созревания зерна.

Методические рекомендации по изучению темы. При изучении этой темы уясните, какие вещества образуются в растениях, как органические вещества превращаются, передвигаются и локализуются, как происходит обмен углеводов, их биосинтез, какие ферменты участвуют в обмене углеводов, каковы транспортные и запасные формы углеводов, как протекает трансформация углеводов в растительной клетке, как происходит углеводный обмен при прорастании и формировании семян и плодов, в процессе их хранения и какова зависимость обмена углеводов от экологических факторов и условий выращивания.

Особое внимание следует обратить на схему превращения азотистых веществ в растениях, протекание обмена аминокислот и белков, биосинтез аминокислот.

Необходимо изучить обмен липидов, биосинтез жиров, липазы, какая существует связь биосинтеза жиров с процессами фотосинтеза и дыхания.

Следует уяснить биосинтез и физиологическую роль водорастворимых витаминов, жирорастворимых витаминов, выявить изменения содержания витаминов в растениях в онтогенезе и в зависимости от экологических

факторов и условий выращивания. Необходимо понять, какие вещества называют запасными конституционными и транспортными.

Литература: 1, с.183-226;3, с.588-614; 4, с.55-75; 5, с.159-177.

Вопросы для самопроверки:

1. Обмен веществ в растениях, его физиологическая сущность.
2. Биосинтез и взаимные превращения углеводов.
3. Углеводный обмен при прорастании, формировании семян и плодов.
4. Углеводный обмен при хранении семян и плодов.
5. Биосинтез аминокислот и белков в растениях.

РАБОТА В ЛАБОРАТОРИИ

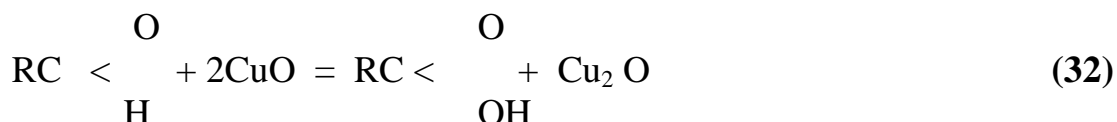
8.1 Обнаружение запасных сахаров в растительном материале

Все моносахара, а также дисахариды типа мальтозы благодаря присутствию альдегидной или кетонной группы являются редуцирующими, т.е. обладают восстанавливающими свойствами. Распространенная в растениях сахароза – нередуцирующее вещество, так как ее молекула состоит из остатков глюкозы и фруктозы, соединенный за счет альдегидной группы глюкозы и кетонной группы фруктозы.

Характерная реакция на редуцирующие сахара – реакция восстановления фелинговой жидкости. Эту жидкость готовят непосредственно перед употреблением путем смешивания равных объемов раствора медного купороса и раствора щелочи с сегнетовой солью. Последнюю прибавляют для того, чтобы не дать образовавшемуся гидрату оксида меди (II) выпасть в осадок:



Для обнаружения редуцирующих сахаров, т.е. сахаров с альдегидной или кетонной группой к исследуемому раствору приливают фелингову жидкость в равном объеме и доводят до кипения. При этом CuO восстанавливается с образованием кирпично-красного осадка Cu_2O :



Для обнаружения сахарозы сначала необходимо подвергнуть ее гидролизу на глюкозу и фруктозу и лишь, затем провести реакцию с фелинговой жидкостью. По количеству осадка Cu_2O можно судить о количестве редуцирующих веществ, как содержащихся в исходном материале, так и образовавшихся в результате гидролиза сахарозы.

Задание: сделать выводы о присутствии в луке, моркови и сахарной свекле редуцирующих сахаров и сахарозы.

Порядок выполнения работы. Перед тем как приступить к анализу растительного материала, следует приготовить фелинговую жидкость и сделать следующие качественные анализы:

1) Поместить в пробирку щепотку глюкозы, растворить в небольшом количестве воды, прилить равный объем фелинговой жидкости и нагреть до кипения.

2) Растворить в воде щепотку сахарозы, добавить равный объем фелинговой жидкости и довести до кипения.

3) Приготовить в пробирке раствор сахарозы, добавить 2-3 капли 20%-ной HCl и кипятить в течение 1 мин, нейтрализовать кислоту содой (сыпать до прекращения выделения CO₂), прилить равный объем фелинговой жидкости и вновь довести до кипения.

Отметить, образуется ли в пробирках кирпично-красный осадок, и сделать выводы о причинах наблюдаемых явлений.

Растительный материал. Нарезать на мелкие кусочки луковицу лука, корнеплоды моркови и сахарной свеклы. Поместить материал в отдельные пробирки (примерно по ¼ пробирки), залить небольшим количеством воды и нагревать не менее 5 мин в кипящей водяной бане. Полученную вытяжку профильтровать и перенести с помощью пипетки одинаковые порции фильтрата в две чистые пробирки. С одной порцией сделать реакцию на редуцирующие сахара, с другой - провести гидролиз сахарозы соляной кислотой, после нейтрализации кислоты прилить фелингову жидкость в равном объеме и вновь нагреть до 100° С.

Полученные результаты записать в таблицу 40, оценивая количество Cu₂O по пятибалльной шкале.

Таблица 40- Обнаружение запасных сахаров в растительном материале

Объект	Количество Cu ₂ O	
	без гидролиза	после гидролиза

Материалы и оборудование: свежий или высушенный растительный материал (лук, морковь, сахарная свекла), терка для овощей, скальпели, штатив с пробирками, водяная баня, электроплитка, мерный цилиндр на 100-200 мл, колба для фелинговой жидкости, пипетки на 2-3 мл, воронки, бумажные фильтры, стакан химический.

Реактивы: глюкоза, сахароза, 4 %-ный раствор CuSO₄, щелочной раствор сегнетовой соли (200 г сегнетовой соли и 150 г КОН или NaOH в 1 л воды), 20 %-ная HCl в капельнице, Na₂CO₂ порошкообразный.

8.2 Обнаружение запасных белков в растениях

Запасные белки принадлежат к группе простых белков, или протеинов. По всей растворимости они делятся на следующие группы:

- 1) альбумины – растворимые в воде
- 2) глобулины – растворимые в слабых растворах нейтральных солей
- 3) проламины – растворимые в 60-80 %-ном спирте
- 4) глютелины – растворимые в слабых растворах щелочей.

В запасных белках растений альбумины почти не встречаются. Глобулины широко распространены в растениях, они составляют большую часть белков семян бобовых и масличных культур. Белки группы проламинов являются характерными для семян злаков.

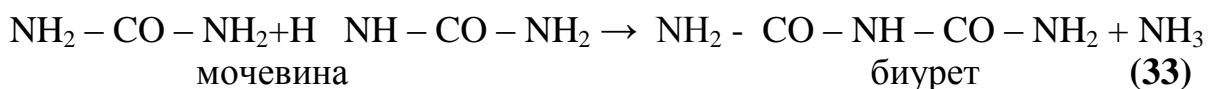
Задание: по результатам наблюдений сделать заключение о наличии белков в семенах пшеницы и фасоли.

Порядок выполнения работы. Для обнаружения запасных белков в семенах пшеницы берут 25 г пшеничной муки, переносят в фарфоровую чашку, приливают к ней 12,5 мл воды и замешивают крутое тесто, которое оставляют полежать 15-20 минут. После этого комочек теста осторожно отмывают под краном от крахмала и отрубянистых частей. В отмытой резинообразной клейкой массе – клейковине находятся белки пшеничной муки. Клейковина имеет важное значение в хлебопечении и является показателем хороших хлебопекарных свойств пшеничной муки. Отмытая клейковина помещается в чашечку с водой. Для проведения цветных реакций на белки от клейковины отрывают небольшой комочек (величиной с горошину), помещают в пробирку и обрабатывают соответствующими реактивами.

Исследование белков из фасолевой или гороховой муки. К 3-5 г муки, перенесенной в колбу или чашку, приливают 20-30 мл 10%-ного раствора поваренной соли, размешивают и оставляют настаиваться 25-30 минут, затем раствор фильтруют через бумажный фильтр, берут по 2-3 мл фильтрата, переносят в пробирку и прибавляют соответствующие реактивы для обнаружения белков.

Наличие белков в клейковине и вытяжке из фасолевой муки устанавливается следующими реакциями:

Биуретовая реакция. Название свое эта реакция получила от биурета – продукта нагревания мочевины, при котором выделяется аммиак по реакции:



Биурет с раствором CuSO_4 в присутствии щелочей дает фиолетовое окрашивание. Такое же окрашивание дают белки при действии на них щелочей и CuSO_4 , как содержащие свойственную биурету группу – $\text{CO} - \text{NH}$.

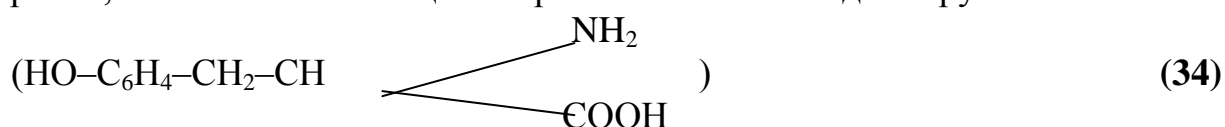
К раствору белка или комочку клейковины приливают 1 мл крепкой щелочи и 2-3 мл раствора медного купороса (избегать избытка CuSO_4). При

наличии белков раствор приобретает фиолетовую окраску, а клейковина покрывается фиолетовым налетом.

Ксантопротеиновая реакция указывает на наличие белков, в состав которых входят аминокислоты с бензольной группировкой – триптофан, фенилаланин, тирозин. С крепкой азотной кислотой они образуют нитросоединения, которые при нагревании до кипения дают осадок желтого цвета. Для их определения к материалу, содержащему белки, приливают крепкой HNO_3 и подогревают до кипения.

Пожелтение комочка клейковины или раствора указывает на наличие в ней белка. Желтая окраска переходит в оранжевую от прибавления после охлаждения аммиака.

Милоновой реакцией можно обнаружить белки, в состав которых входит тирозин, в бензольном кольце которого имеется свободная группа OH .



При определении белка берут 1-2 мл раствора белка или комочек клейковины, приливают несколько капель реактива Миллона (раствор азотнокислой ртути в азотной кислоте) и кипятят. При наличии белков комочек клейковины приобретает мясокрасную окраску, а раствор белка дает покраснение.

Материалы и оборудование: пшеничная мука, фасолева или гороховая мука, фарфоровая чашка, пробирки, соль, фильтровальная бумага.

Реактивы: 30%-ный раствор NaOH , медный купорос, раствор Миллона, HNO_3 .

8.3 Кислотный гидролиз крахмала

Крахмал представляет собой полисахарид, точнее смесь двух полисахаридов; амилозы и амилопектина.

Молекула крахмала состоит из большого количества молекул глюкозы, соединенных попарно в мальтозу. Крахмал не растворим в холодной воде, а в горячей воде образует коллоидный раствор - крахмальный клейстер. При кипячении крахмального клейстера с минеральной кислотой крахмал гидролизуеться до глюкозы через ряд промежуточных продуктов с постоянно уменьшающейся молекулярной массой, называемых декстринами. Проследить за процессом гидролиза крахмала можно при помощи реакции с раствором йода, который окрашивает крахмал в синий цвет, амилодекотрины в фиолетовый, эритродекстрин в красный, ахродекстрин в оранжевый, а с мальтодекстрином и мальтозой окрашивание не дает.

Задание: сделать выводы о причинах изменения окраски растворов и указать время в течение которого произошел полный гидролиз крахмала.

Порядок выполнения работы. Приготовить 0,1% крахмальный клейстер, для этого отвесить на технических весах 0,05г (50мг) крахмала,

высыпать крахмал в стаканчик, долить 10 мл воды. 40 мл воды нагреть до кипения, вылить в неё содержимое стаканчика дать раствору ещё раз закипеть и снять с огня. Поставить в штатив 6-7 пробирок. Отлить в первую пробирку 4-5 мл крахмального клейстера. Добавить в колбу 1,5 мл 20% соляной кислоты и нагреть на электроплитке. При появлении первых пузырьков (начало кипения) отлить 4-5 мл клейстера во вторую пробирку. Продолжать кипятить содержимое колбы отливая через 10 мин по 4-5 мл в следующие пробирки. Дать пробиркам охладиться, добавить воды и по 5 капель KI в каждую пробирку. При отсутствии окрашивания содержимого пробирок йодом, гидролиз можно считать окончанным. Провести с раствором, оставшимся в колбе реакцию на редуцирующие сахара. Результаты опыта записывают в таблицу 41 по приведенной форме.

Таблица 41- Кислотный гидролиз крахмала

Продолжительность гидролиза, мин	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Окраска раствора									

Материалы и оборудование: электроплитка, штатив с пробирками, пипетка градуированная на 2 мл, мерный цилиндр, колба.

Реактивы: 1%-ный крахмальный клейстер, 20%-ная соляная кислота, раствор I в KI в капельнице, фелингова жидкость, Na_2SO_3

8.4 Определение содержания суммарных белков

Существует несколько методов количественного определения белков в растительных и животных тканях: колориметрический, спектрофотометрический, а также по количеству азота, содержащегося в чистом препарате белков после минерализации последнего.

Задание: изучить количественный метод определения белков в растительных тканях.

Порядок выполнения работы. Подготовительные операции. Экстракция белков и тканей растений основана на способности белков при разрушении клеток (обработка детергентами, ультразвуком, растирание материала в ступке с кварцевым песком, гомогенизация в блендере, размалывание на ударных и шаровых мельницах сухого растительного материала) растворяться в воде, растворах солей, органических соединениях, кислотах и щелочах, буферных растворах. Буферные растворы обеспечивают мягкие условия выделения белков, при которых сохраняется природная структура их молекул. Для выделения большей части белковых веществ (препарат суммарного белка) используют буферные растворы с pH 8.

Выделение суммарных белков из свежего растительного материала. В фарфоровую ступку помещают 0,5 г сырых проросших семян зернобобовых

культур (люпин, горох, фасоль) или 1 г зерновок пшеницы, ржи (без корешков и побегов). Добавляют небольшое количество промытого и прокаленного кварцевого песка и растирают с 40 мл боратного буфера (pH 10), в который добавлено 0,2% бисульфита натрия и несколько капель октилового спирта. Затем в два-три приема содержимое количественно переносят в коническую колбу на 100 мл. Ступку и пестик дважды ополаскивают небольшим количеством (по 5 мл) боратного буфера, промывные воды также сливают в колбу. Общий объем раствора в колбе должен составлять 50 мл.

Выделение суммарных белков из сухого растительного материала. На аналитических весах взвешивают 0,3 г размолотых до состояния муки сухих семядолей бобовых или 0,8-1 г зерновок, полученных после прорастания. Навеску помещают в коническую колбу на 100 мл, заливают 50 мл боратного буфера с pH 10, содержащего 0,2 бисульфита натрия и пять-шесть капель октилового спирта.

Колбу тщательно закрывают пробкой и оставляют при комнатной температуре на 1 ч, для того чтобы сухой материал впитал в себя буфер. Затем колбу помещают в ротатор. Последующие операции при выделении суммарных белков общие для обоих видов экстракции.

Содержимое колб взбалтывают на ротаторе в течение 1 ч. Затем колбы вынимают из ротатора, открывают пробки и дают раствору суммарных белков отстояться в течение 15 мин. После этого при помощи пипетки из верхней части раствора осторожно отбирают 10 мл и количественно переносят в центрифужные пробирки, помещенные в специальный штатив. Пробирки помечают восковым карандашом, уравнивают между собой (добавляя буфер с pH 10). Если используют центрифугу со свингатором, помещают в центрифугу и центрифугируют 15 мин (время исчисляют с момента выхода ротора центрифуги на заданное число оборотов). По окончании центрифугирования пробирки помещают в штатив и пипеткой отбирают 1 мл надосадочной жидкости и переносят в другую чистую стеклянную пробирку. Туда же приливают 9 мл боратного буфера с pH 10, тщательно перемешивают, после чего раствор суммарных белков, готов к спектрофотометрированию.

Спектрофотометрический метод. Содержание белков можно определить на любом спектрофотометре.

Ароматические аминокислоты тирозин и триптофан, содержащиеся в белках, поглощают свет в области спектра 280 нм. Однако сильное поглощение ультрафиолетовых лучей в этой области характерно и для нуклеиновых кислот, хотя в целом пик поглощения последними ультрафиолетовых лучей приходится на область спектра 260 нм. Поэтому при определении концентрации белка в растворах описанным методом показания светопоглощения (синонимы - оптическая плотность, экстинкция) снимают при 280 и 260 нм. Показания светопоглощения шкалы прибора подставляют в уравнение Варбурга-Христиана:

$$C=1,55E_{280} - 0,76E_{260}, \quad (35)$$

где С - концентрация белка, мг/мл;

E_{280} и E_{260} - светопоглощение раствора белков при 280 и 260 нм;

1,55 и 0,76 — расчетные коэффициенты.

В одну из кварцевых кювет спектрофотометра на 2/3 объема наливают раствор исходного боратного буфера (эталон) и устанавливают ее в гнездо 1 кюветодержателя. В другие кюветы помещают исследуемые растворы белков и ставят в гнезда 2, 3, 4 кюветодержателя. Кюветодержатель устанавливают в кюветную камеру. Операции по измерению коэффициентов светопоглощения эталонного и рабочих растворов аналогичны таковым при определении содержания пигментов в вытяжке из листьев. Результаты записывают в таблицу 42 по приведенной форме.

Таблица 42-Определение белков в растении

Вариант опыта	Навеска растительного материала (Н), г		Объем экстракта белков (V), мл	Светопоглощение при длине волны		Концентрация белков в навеске (С), мг/мл	Масса белков в навеске (M=C·V), мг	Концентрация белков в навеске $\left(\frac{M \cdot 100\%}{H \cdot 1000}\right)$ г
	сырого	сухого		280 нм (E_{280})	260 нм (E_{260})			

Окончательный расчет содержания суммарных белков (ССБ) в навеске злаковых и зернобобовых культур (мг/г сухой массы) выполняют по формуле

$$ССБ = \frac{C \cdot 50 \cdot 10}{H} \cdot \frac{100}{86 \text{ или } 60} \quad (36)$$

где С - концентрация белков в навеске, мг/мл;

Н - навеска растительного материала, г;

50 — объем экстрагирующего раствора, мл;

10 - разведение;

86 - сухая масса воздушной навески, %;

60 - сухая масса проросших семян, %.

Колориметрический метод. Анализ начинают с построения калибровочного графика, для чего используют растворы альбумина или казеина.

На аналитических весах отвешивают 1 г казеина и через воронку для сыпучих веществ вносят в мерную колбу на 100 мл, приливают раствор буфера с рН 10 (2/3 объема колбы). Колбу плотно закрывают и встряхивают на ротаторе до полного растворения казеина. Затем ее вынимают из ротатора, содержимое доводят буфером до метки, тщательно перемешивают несколько раз, после чего стандартный раствор белка можно считать готовым. В 1 мл

такого раствора содержится 10 мг белка. Из рабочего стандартного раствора готовят производные растворы с содержанием белка от 0,1 до 2 мг или шкалу.

Приготовление шкалы раствора представлено в таблице 43.

Таблица 43- Приготовление шкалы раствора

№ колбы	Объем колбы, мл	Стандартный раствор казеина, мл	Баратный буфер с рН 10, мл	Концентрация белка, мг/ мл
1	100	1	99	0,1
2	100	3	97	0,3
3	100	5	95	0,5
4	100	10	99	10,
5	100	15	85	1,5
6	100	20	80	2,0

Пипеткой соответствующего объема берут необходимое количество стандартного раствора белка и переносят в пустую колбу на 100 мл, на которой заранее написан номер. Содержимое доводят буферным раствором до метки и перемешивают. Чтобы шкалой можно было пользоваться длительное время, в колбы с раствором вносят по одной - две капли антисептика (толуол, каприловая кислота).

Шкалу и исследуемые растворы окрашивают в градуированных пробирках на 10 мл. В пробирки с номерами по порядку (для шкалы номера с первого по шестой, далее нумеруют пробирки с исследуемыми растворами) из соответствующих колб наливают по 1 мл раствора белков, добавляют 4 мл биуретового реактива. Содержимое каждой пробирки осторожно встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин, после чего колориметрируют на спектрофотометрах СФ-26, «Спекол» или фотоэлектроколориметре ФЭК-60 при 540 нм.

Данные, полученные для стандартных растворов, изображают графически. На оси ординат откладывают величины светопоглощения белковых растворов (E), а на оси абсцисс - концентрацию белка (мг/мл), которая соответствует данному светопоглощению. Пользуясь калибровочной кривой, по величинам оптической плотности исследуемых растворов находят соответствующее количество белка. Рассчитывают общее содержание белков в семенах исследуемых культур в процессе их прорастания. Результаты по содержанию белков записывают в таблицу 44 по приведенной форме.

Таблица 44- Определение содержания белков

№ пробирки	Навеска растительного материала (Н),г	Объем экстракта (V), мл	Светопоглощение при 540 нм	Концентрация белков	Масса (M=CV),	Концентрация белков
------------	---------------------------------------	-------------------------	----------------------------	---------------------	---------------	---------------------

	сырого	сухого			(С), мг/мл	мг	$\left(\frac{M \cdot 100\%}{H \cdot 1000} \right)$, %
Шкала растворов							
1			100		0,1		
2			100		0,3		
3			100		0,5		
4			100		1,0		
5			100		1,5		
6			100		2,0		
Исследуемые растворы							
7							
8							
9							
10							

Материалы и оборудование: проросшие семена гороха, фасоли, пшеницы или ржи, кварцевый песок, фарфоровые ступки с пестиками, центрифужные пробирки на 20 и 60 мл, резиновые пробки, мерные цилиндры на 10 и 25 мл, пипетки на 20 мл, мерные колбы на 100 мл, центрифуга, пипетки на 1, 10 (с делениями), 15 и 20 мл, пробирки с делениями на 10 мл, спектрофотометры СФ-26, «Спекол» или фотоэлектроколориметр ФЭК-60.

Реактивы: боратный буфер с рН 10, октиловый спирт, боратный буфер с рН 10 содержащий 0,2% бисульфита натрия; казеин или альбумин, биуретовый реактив (0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 50 мл H_2O , затем при активном перемешивании приливают 30 мл 10%-ного раствора NaOH и 0,1 г KI , раствор доводят водой до 100 мл), толуол или каприловая кислота.

8.5 Определение активности липаз в процессе прорастания семян

При прорастании семян масличных культур, отличающихся высоким содержанием триглицеридов, быстро уменьшается содержание жиров и одновременно увеличивается концентрация сахарозы. Образование углеводов из жиров - многоэтапный процесс, четко разграниченный в пространстве и во времени. С момента начала набухания семян масличных культур первым ферментом, воздействующим на молекулу жира (триглицерид), служит нейтральная липаза. Установлено, что, например, в семенах клецевины липаза активируется одной из протеиназ, присутствующих в эндосперме. Липаза ступенчато гидролизует триглицерид до диглицерида, моноглицерида и, наконец, до свободного глицерина и жирных кислот.

Липазы, присутствующие в семенах масличных растений, проявляют активность при различных значениях рН. Поэтому иногда употребляют названия нейтральной, кислой и щелочной липазы. В семенах масличных наиболее активны кислая и щелочная липазы. Определение их активности

основано на учете концентраций жирных кислот, образующихся при действии на чистый препарат какого-либо жира (масла) экстрактом липаз, выделенным из семян разных периодов проращивания.

Задание: определить активность липаз в семенах масличных культур.

Порядок выполнения работы. Две навески очищенных от кожуры прорастающих семян подсолнечника (по 3 г каждая) помещают в фарфоровые ступки, приливают по 1 мл чистого подсолнечного масла и тщательно растирают в течение 3-4 мин. Затем в одну из ступок приливают 5 мл ацетатного буфера с рН 4,7, а в другую - 5 мл боратного буфера с рН 8,5, продолжают растирание еще 2 мин. После этого содержимое ступок количественно переносят в две конические колбы на 100 мл. Ступку и пестик ополаскивают 5 мл воды, сливая промывные воды в соответствующую колбу, добавляют по пять капель толуола, колбы плотно закрывают пробками и ставят на ротатор, где перемешивают в течение 30 мин. После этого колбы ставят на 20 ч в термостат при температуре 30°C.

Одновременно готовят две контрольные колбы (для каждого рН), с которыми проделывают те же операции, что и при исследовании образцов, однако перед помещением контрольных колб в термостат их содержимое кипятят 5-10 мин на электроплитке для инактивации липаз.

Через 20 ч (на следующий день) колбы вынимают из термостата, в каждую из них приливают по 50 мл смеси этилового спирта с эфиром в соотношении 4:1, встряхивают и дают несколько минут отстояться. Далее добавляют по четыре-пять капель фенолфталеина и содержимое колб титруют 0,1 н. спиртовым раствором NaOH. Активность кислых и щелочных липаз выражают в миллилитрах 0,1 н. спиртового раствора NaOH, пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся в результате действия липаз на 1 г семян. Расчет активности липаз (кислой или щелочной) ведут по формуле:

$$AЛ = \frac{aT - bT}{H} \quad (37)$$

где *a* и *b* - количества 0,1 н. спиртового раствора NaOH, затраченного на титрование опытного и контрольного образцов, мл;

T — поправка к титру 0,1 н. раствора NaOH;

H - навеска семян, г.

Данные записывают в таблицу 45 по приведенной форме.

Таблица 45- Определение активности липаз

№ колбы	Объект исследования рН	Навеска материала (H), г	Пошло на титрование 0,1 н. раствора NaOH, мл		Активность липазы (AЛ), мл 0,1 н. раствора NaOH/ г
			исследуемого раствора (a)	контрольного раствора (b)	

					семян

Материалы и оборудование: семена подсолнечника, отобранные в различные периоды прорастания; подсолнечное масло; фарфоровые ступки с пестиками, конические колбы на 100 мл, мерные цилиндры на 10 и 50 мл, ротатор, аналитические весы, термостат, электроплитка.

Реактивы: ацетатный буфер с рН 4,7, боратный буфер с рН 8,5, 0,1 н. спиртовой раствор NaOH, смесь этилового спирта с эфиром (4:1), толуол; 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина.

Список использованных источников

- 1 Зитте П., Вайлер Э.В., Кадерайт Й.В., Брезински А., Кернер К. Ботаника. Т.2 Физиология растений.-М.: Издательский центр «Академия», 2008.-496с.
- 2 Якушкина Н.И. Физиология растений.- М.; Владос, 2005.- 464 с.
- 3 Алехин Н.Д.,Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. Физиология растений.- М.: Издательский центр «Академия», 2007.-640 с.
- 4 Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Практикум по физиологии и биохимии растений. –СПб.: ГИОРД, 2013.-352с.
- 5 Третьяков Н.Н., Паничкин Л.А., Кондратьев и др. Практикум по физиологии растений.- М.:КолосС, 2003.-288с.
- 6 Веретенников А.В. Физиология растений.- М.: Академический проект, 2006.- 480 с.
- 7 Иванов В.Б., Плотникова И.В., Живухина Е.А. и др. Практикум по физиологии растений.- М.: Издательский центр «Академия», 2004.-144 с.
- 8 Султангазина Г.Ж., Абилева Г.А. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды (электронное учебное пособие), Костанай, 2016. -10,8 Гб.
- 9 Hans Mohr, Peter Schopfer. Plant Physiology.- Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1995.- 629 p.
- 10 Thomas C. Moore. Research Experiences in Plant Physiology. A Laboratory Manual.- Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York, 1974.- 462 p.