ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
Государственное образовательное учреждение Высшего
профессионального образования
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ЛЕСА

О.В.Чернышенко

Практикум
по физиологии растений

(для студентов направления подготовки 35.03.01 «Лесное дело»,
Бакалавриат, 4 года)

Издательство Московского государственного университета леса
Москва – 2015

УДК 581.1

Чернышенко О.В., Практикум по физиологии растений: (для студентов направления подготовки 35.03.01 «Лесное дело», бакалавриат). - М.: МГУЛ, 2015. – 44с.

Практикум включает лабораторные работы по всем разделам курса с теоретическими пояснениями.

Разработано в соответствии с Государственным образовательным стандартом ВПО для направления подготовки студентов бакалавриата 35.03.01 «Лесное дело», программы дисциплины «Физиология растений».

Одобрено и рекомендовано к изданию в качестве учебно-методического пособия редакционно-издательским советом университета.

Рецензенты: профессор Дроздов И.И., кафедра искусственного лесовыращивания и механизации лесохозяйственных работ,
доцент Мельник П.Г.
кафедра лесоводства и подсочки леса.

Кафедра ботаники и физиологии растений

Автор:
Оксана Васильевна Чернышенко, профессор

© Чернышенко О.В. 2015
© Московский государственный университет леса, 2015

Предисловие

В настоящем практикуме представлены лабораторные работы по физиологии растений. Подбор лабораторных работ определяется учебной программой по дисциплине «Физиология растений». Учебный план включает 18 час лекционного курса, 36 час лабораторных работ и 3 дня летней учебной практики. Курс физиологии растений помогает развитию биологического мировоззрения и является фундаментом при освоении любой специальной дисциплины по лесному делу, его внимательное изучение является залогом успеха в будущей практической деятельности специалистов лесного хозяйства.

Основная цель данного пособия – закрепить знания студентов по теоретическим основам курса у студентов факультета лесного хозяйства, развитие творческих навыков для самостоятельной и экспериментальной работы. В лабораторных занятиях студенты знакомятся с методами исследований в области физиологии растений, которые могут быть использованы лесоводами в практической деятельности, например, при оценке физиологического состояния дерева и древостоя.

Каждая работа выполняется двумя студентами, получающими один из вариантов. Конечные результаты по всем вариантам обобщаются в общей таблице и обсуждаются всеми студентами группы. Таким образом, каждая лабораторная работа приобретает коллективный характер и представляет собой небольшое законченное научное исследование, рассчитанное на 2 академических часа.

Лабораторные работы по курсу оформляются в отдельной тетради каждым студентом. Для каждого лабораторного занятия указывается дата проведения опыта, название темы, по которой выполняется работа, название проводимой работы с указанием методов ее выполнения и объектов исследования, порядок обработки полученных результатов. В конце каждой лабораторной работы пишут выводы, в которых излагаются конечные результаты, записываются уравнения реакций, объясняются причины различия в интенсивности физиологических процессов.

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

1. ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Р а б о т а 1. Явления тургора, плазмолиза и деплазмолиза

Отдельная клетка растения является основной физиологически целостной элементарной структурой, которая взаимодействует с другими клетками растительного организма. Суммарная жизнедеятельность отдельных клеток, тканей, органов создает единое целое – живой растительный организм.

Растительная клетка состоит из клеточной стенки, протопласта с органеллами и вакуолей с клеточным соком. Клеточный сок состоит из водного

раствора минеральных и органических веществ, иногда содержатся водорастворимые пигменты, например, антоциан. Цитоплазматические мембраны (наружная – плазмалемма, вакуолярная – тонопласт) обладают свойствами полупроницаемости. Они легко пропускают воду и очень медленно растворенные в ней вещества. Живая растительная клетка представляет собой осмотическую систему. Помещение клетки в раствор, концентрация которого выше концентрации клеточного сока, вызывает диффузию или отток воды из клетки, сокращается объем клеточного сока и отставание цитоплазмы от клеточных стенок. Это явление называют *плазмолизом*. Вещества, вызывающие плазмолиз, получили название плазмолитиков, в качестве которых могут выступать соли одно- и двухвалентных металлов, растворимые в воде органические соединения (сахароза).

Деплазмолиз – возвращение цитоплазмы в исходное состояние в клетке при помещении ее в воду или раствор с меньшей концентрацией, чем внутри клетки. По мере поступления воды в вакуоль, клетка увеличивается в размерах, цитоплазма давит на клеточную стенку с большим давлением, вызывая противодавление клеточной стенки. Такое противодавление клеточной стенки называется *тургорным*.

Материалы и оборудование. 1. Луковица *Allium cepa*, в клетках эпидермиса которой содержится антоциан. 2. 1 *N* раствор KNO_3 . 3. Стеклянные палочки. 4. Препаровальные иглы. 5. Бритвы или скальпели, пинцеты. 6. Микроскопы. 7. Фильтровальная бумага. 8. Предметные и покровные стекла.

Ход работы. Приготовить бритвой тонкие срезы окрашенного антоцианом нижнего эпидермиса лука. Положить срез в каплю воды на предметное стекло и, закрыв покровным стеклом, наблюдать в микроскоп живые клетки в состоянии тургора. Хорошо видно окрашенную вакуоль и клеточные стенки; протопласт, как правило, не заметен. С одной стороны покровного стекла помещают каплю 1 *N* раствора азотнокислого калия, а с противоположной стороны воду отсасывают фильтровальной бумагой. Постепенно наблюдается отставание протоплазмы от стенок клетки, так как из клеток выходит воды. Сначала наблюдается отставание цитоплазмы лишь в уголках клеток, а затем и от всей поверхности оболочки клеток.

Зарисовать несколько клеток в состоянии плазмолиза различной степени (сильный плазмолиз - содержимое клетки сокращается более чем на 1/3 объема; средний - на 1/3 и меньше; слабый - отставание протопласта только в уголках клеток).

После этого таким же способом заменить раствор азотнокислого калия водой. Наблюдать прекращение плазмолиза и увеличение объема протопласта до перехода клеток в состояние тургора. Наступает деплазмолиз.

Р а б о т а 2. Различные формы плазмолиза

Материалы и оборудование. Те же, но вместо KNO_3 8-10%-ный раствор глицерина или мочевины, вазелин, спиртовка.

Ход работы. Кусочек нижнего эпидермиса лука помещают в каплю раствора азотнокислого калия, препарат заливают по краям покровного стекла разогретым вазелином. Для этого разогревают на спиртовке стеклянную палочку, которой берут вазелин. Препарат рассматривают под микроскопом.

Сначала наблюдают отставание протопласта по краям, чаще в уголках клеток (уголковый плазмолиз), переходящий в вогнутый плазмолиз. Позже, минут через 20, протопласт округляется и переходит в выпуклый плазмолиз. Иногда на одном срезе можно наблюдать одновременно все три вида плазмолиза.

Зарисовать формы плазмолиза.

Р а б о т а 3. Определение осмотического давления клеточного сока методом плазмолиза

Материалы и оборудование. 1. Лук, листочки элодеи, красная капуста, листья традесканции двухцветной. 2. Растворы сахарозы :1 *М*, 0,9 *М*, 0,8 *М*, 0,7 *М*, 0,6 *М*, 0,5 *М*, 0,4 *М*, 0,3 *М*, 0,2 *М*, 0,1*М*. 3. Микроскопы. 4. Препаровальные иглы, пинцеты, бритвы, предметные и покровные стекла.

Ход работ. Сделать тонкие срезы окрашенного эпидермиса лука или других растений с окрашенным клеточным соком. Срезы помещают на пронумерованные предметные стекла в растворы сахарозы концентрации 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 и 1 М/л.

Через 20 мин. срезы помещают в каплю той же концентрации на предметное стекло, закрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом. Определяется степень плазмолиза – сильная или средняя. Та концентрация, где будет уголковый плазмолиз (начальная стадия плазмолиза) считается изотонической. Изотоническая концентрация сахарозы – это та концентрация, которая имеет одинаковое осмотическое давление с осмотическим давлением клеточного сока.

По изотонической концентрации вычисляется осмотическое давление клеточного сока двумя способами:

1. $P = RTCi$,

где P – осмотическое давление, А;

R – газовая постоянная; R=0,0821 л А/град М;

T – абсолютная температура, К°;

C – концентрация раствора, М/л;

i – изотонический коэффициент, характеризующий ионизацию раствора; $i = 1 + a(n-1)$, где a - степень диссоциации; n - число ионов, на которые диссоциирует молекула. Для неэлектролитов, в том числе и сахарозы, $i = 1$.

2. $P = 22,4\ C$,

где 22,4 – осмотическое давление любого вещества в растворе при концентрации 1 М/л.

Для перевода данных в атмосферах в килопаскали их умножают на 101,3 (1 А= 101,3 кПа).

Результаты опыта записывают в табл. 1.

Таблица 1

Концентрация раствора сахарозы, М	Степень плазмолиза	Изотоническая концентрация	Осмотическое давление	
			Атм.	КПа
1,0 М	сильный	0,5	1.	
0,9	сильный			
0,8	средний			
0,7	средний			
0,6	слабый		2.	
0,5	уголковый			
0,4	нет			
0,3	нет			
0,2	нет			
0,1	Нет			

Р а б о т а 4. Определение сосущей силы клеток по изменению концентрации растворов

Силу, с которой клетка способно поглощать воду, называют сосущей силой клетки (*S*). Сосущая сила клетки растения равна разности между осмотическим давлением (*P*) и тургорным давлением (*T*):

$$S = P - T.$$

При погружении растительный клетки в концентрированный раствор водообмен между ними определяется соотношением их осмотического потенциала: вода перемещается в сторону большей сосущей силы. Для определения сосущей силы клеток растительную ткань (высечки) помещают в ряд раствором известной концентрации. Если погрузить растительную ткань в раствор, сосущая сила которого больше сосущей силы клеток, вода из растения будет переходить в раствор, а концентрация раствора уменьшиться. И наоборот, если сосущая сила клеток больше сосущей силы раствора, то клетки всасывают воду из раствора, и концентрация раствора увеличивается. При равенстве концентраций в растворе и в растительной ткани, концентрация раствора остается неизменной.

Изменение концентрации можно установить путем определения показателя преломления (рефрактометрический метод). Рефрактометр – оптический прибор, с помощью которого определяют показатель преломления луча при прохождении его через призму с нанесенным на нее исследуемым раствором. Показатель преломления зависти от концентрации раствора и температуры. Основная часть прибора две призмы, между которыми нужно поместить 2-3 капли испытуемого раствора и немедленно опустить верхнюю призму до отказа. Глядя в окуляр, совместить границу светлой и темной ча-

стей поля зрения с пересечением с пунктирной линией и сделать отсчет по шкале коэффициентов преломления. После каждого определения удалить с поверхности призм капли раствора сухой фильтровальной бумагой, затем протереть бумагой, смоченной дистиллированной водой дважды.

Материалы и оборудование: 1. Молярный раствор сахарозы. 2. Листья растений разных древесных пород. 3. Пробирки. 4. Пробочные сверла, пробки. 5. Стеклянные палочки. 6. Фильтровальная бумага. 7. Рефрактометр РЛ.

Ход работы. Приготовить ряд растворов сахарозы по 10 мл концентрации 1,0; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 и 0,1 М/л. Растворы готовятся из одномолярного раствора сахарозы разбавлением водой. В десять пробирок налить по 5 мл раствора сахарозы перечисленных концентраций в убывающем порядке. В них помещают по 5 высечек из листьев одного вида растений. Высечки листьев должны быть полностью погружены в раствор. Через 40 мин. определяется на рефрактометре концентрация исходного раствора и соответствующего раствора, в котором находились высечки.

Раствор сахарозы в пробирке, где концентрация раствора не изменилась после выдерживания в ней высечек, будет иметь осмотический потенциал, равный сосущей силе тканей растения.

Результаты записывают в таблицу 2.

Таблица 2

№	Концентрация растворов сахарозы, М/л	Показатель преломления до опыта	Показатель преломления после опыта	Изотоническая концентрация	Сосущая сила, А
1	1,0				
2	0,9				
3	0,8				
4	0,7				
5	0,6				
6	0,5				
7	0,4				
8	0,3				
9	0,2				
10	0,1				

Произвести расчет сосущей силы клеток растения по формуле:

$S = 22{,}4\ C$,

где S – сосущая сила клеток;

C – концентрация раствора в *М/л.*

Р а б о т а 5. Определение концентрации и осмотического давления клеточного сока рефрактометрическим методом

Рефрактометрический метод с помощью специальных таблиц позволяет быстро и точно определять концентрацию клеточного сока и осмотическое давление и очень удобен в работе. Вместе с тем имеются некоторые ограни-

чения для использования этого метода. Так как клеточный сок содержит не только сахара, но и другие соединения, преломление света которыми не всегда совпадает с преломлением света раствора сахарозы. Поэтому таблица показателей осмотического давления будет наиболее точна для таких растений, как сахарный тростник. Этим методом можно изучать изменение осмотического давления только в пределах вида или сорта растений.

Материалы и оборудование. 1. Листья растений. 2. Ручной пресс или ступка с пестиком. 3. Марля, ножницы, пипетка. 4. Рефрактометр РЛ. 5. Фильтровальная бумага.

Ход работы. При помощи ручного пресса приготовить сок из 2-3 листьев исследуемых растений, предварительно завернув их в кусочек марли; или измельченные листья растирают в ступке и отжимают сок через марлю.

С помощью зеркала рефрактометра добиваются хорошего освещения призмы. На нижнюю призму наносят пипеткой 2 капли клеточного сока и прижимают верхнюю призму к нижней. Глядя в окуляр и вращая винт, добиваются большей резкости изображения шкалы концентраций и контрастности светлой и темной части в поле зрения. Движением ручки, перемещая окуляр вниз или вверх, добиваются совмещения линии раздела светлого и темного полей с тремя рисками в окуляре. На шкале по линии раздела полей снимают показания коэффициента преломления света в относительных числах или процентах. После определения каждого варианта опыта призму протирают сначала сухой, а затем влажно фильтровальной бумагой, чтобы удалить предыдущий раствор. По таблице находят концентрацию клеточного сока и осмотическое давление в атмосферах. Для перевода в килопаскали найденную *величину* умножают на 101,3.

Результаты опытов записывают в табл. 3.

Таблица 3

Вариант опыта	Показатель шкалы рефрактометра	Концентрация клеточного сока (гМ)	Осмотическое давление атм ¦ кПа

Вопросы для самоконтроля

1. Почему растительную клетку можно назвать осмотической системой, и чем она отличается от осмометра?
2. Какой раствор можно назвать изотоническим и как можно определить концентрацию клетки?
3. У какого растения будет выше осмотическое давление клеточного сока: у выросшего во влажном месте обитания или у растущего в степи и почему?

4. У какого растения будет выше осмотическое давление клеточного сока: у выросшего в степи на солончаках или на незасоленных почвах, почему?
5. Чему равна сосущая сила клеток растений при полном насыщении, плазмолизе и циторризе?
6. При каких условиях в растительной клетке возникает плазмолиз в природных условиях?
7. От чего зависит вид плазмолиза в растительных клетках?
8. Может ли сосущая сила растений изменяться в течение вегетации?
9. Что занимает пространство между клеточной стенкой и протопластом в клетке во время плазмолиза?
10. Как характеризует осмотическое давление клеток растений условия их произрастания.

II. ВОДНЫЙ РЕЖИМ РАСТЕНИЙ

Р а б о т а 6. Влияние внешних условий на состояние устьиц

Метод инфильтрации основан на способности жидкостей проникать через открытые устьичные щели в ближайшие межклетники, которые обычно заполнены воздухом. Воздух вытесняется, и на листе появляются прозрачные пятна. Жидкости проникают в устьичные щели в зависимости от их ширины: ксилол – через закрытые , бензол – через средне открытые, спирт – через только широко открытые. Метод используется в полевых условиях для экспресс-диагностики степени открытия устьиц у древесных растениях.

Материалы и оборудование: 1. Побеги различных видов древесных растений или комнатные растения, различающиеся по условиям произрастания; 2.капельницы с бензолом, ксилолом, спиртом.

Ход работы. На нижнюю поверхность листьев нанести отдельные капельки ксилола, бензола и спирта. Держать в горизонтальном положении до полного проникновения или испарения капель и рассмотреть лист на свет. Для определения взять 3 листа каждого вида древесного растения. Для комнатных растений исследовать листья, выдержанные в разных условиях произрастания (обильно поливаемые и в засушливых условиях, затененные и хорошо освещенные, испытывающие засоление почвы и нет). Результаты записать в табл.4.

Таблица 4

№	Объект исследования	Условия эксперимента	Проникновение жидкости			Степень открытия устьиц
			ксилол	бензол	спирт	

Р а б о т а 7. Определение интенсивности транспирации методом быстрого взвешивания листьев при помощи торзионных весов

Интенсивность транспирации растений выражается массой выделенных паров воды единицей поверхности листа или хвои (или единицей массы) за единицу времени. Особенность данного метода – при использовании срезанных листьев промежуток времени от начала и до конца опыта не должен превышать 4 минуты. Это позволяет получить цифры, близкие к естественной транспирации листа на дереве.

Для опыта удобно использовать всходы древесных растений, имеющих зеленые семядоли, первичные листья, 2-4-недельные. Данный метод позволяет количественно определить интенсивность транспирации у отдельных зеленых частей всходов древесных растений или листьев различных древесных пород.

Материалы и оборудование: 1. Всходы древесных растений или срезанные побеги. 2. Торзионные весы. 3. Сушильный шкаф. 4. Секундомер. 5. Бюксы.6.Безопастная бритва.

Ход работы. Установить весы на столе строго горизонтально по уровню при помощи двух винтов на подставке весов. Срезав листья растений безопасной бритвой, быстро взвесить их на торзионных весах (вес P_1). Время взвешивания не должно превышать 1 минуты. Точно через 3 мин. повторить взвешивание (вес P_2).

Рассчитать интенсивность транспирации различных побегов древесных растений или всходов.

$$И.т. = \frac{(P_1 - P_2)}{P_1} \cdot 15, \text{ мг/г в час}$$

Результаты опыта записывают в табл.5.

Таблица 5

Объект исследования	Повторности опыта				Среднее из 4-х определений
	1	2	3	4	
Побеги древесных растений					

Определить листовую поверхность, используя миллиметровую бумагу или весовым методом, и рассчитать интенсивность транспирации и скорость потери водного запаса в мг воды на 1 $дм^2$ *в час*.

Определить сухой вес листьев и хвои P_0 . Для этого положить листья в тарированные бюксы и поместить в сушильный шкаф при температуре +105ºС на 6 часов, после чего их взвесить на торзионных весах.

Затем определить степень оводненности тканей растений. Взвешенные листья переложить в прономерованные бюксы. Бюксы поместить в в сушильный шкаф при температуре 105°С на 6 часов. Повторное взвешивание высушенного растительного материала необходимо проводить быстро.

Оводненность листьев (%) рассчитать по формуле:

$$Ов. = \frac{P_1 - Pсух}{} \cdot 100,$$

P_1

где P_1 - сырая масса, *Рсух* - абсолютно сухая масса листьев.

Содержание воды меняется в течение вегетации и под действием неблагоприятных условий среды. Данные об оводненности необходимы при оценке жизненного состояния растений, их устойчивости.

Р а б о т а 8. Определение водоудерживающей способности растений методом завядания

В регулировании водообмена растений существенная роль принадлежит водоудерживающим силам клеток растений. Водоудерживающая способность клеток зависит от устойчивости видов к экстремальным условиям и от условий выращивания. Кроме того, водоудерживающая способность листьев зависит от реакции устьичного аппарата на срезание, так как у устойчивых видов устьица быстрее закрываются, чем у неустойчивых. Таким образом, этот показатель может характеризовать засухоустойчивость и газоустойчивость видов.

Материалы и оборудование. 1. Листья растений мезофитов и ксерофитов. 2. Вазелин. 3. Торзионные весы. 4. Ножницы.

Ход работы. Срезать по три листа растений, покрыть срез черешка разогретым вазелином. Взвешивают каждый лист и записывают вес и время взвешивания. Повторно листья взвешивают через 30 мин., 60 мин. и 90 мин. Убыль в весе листа показывает абсолютное количество потери воды за интервал времени. По полученным данным вычисляют количество испаренной воды в процентах к первоначальному весу листа. Показать на графике динамику относительной водоотдачи вида по среднему показателю. Сделать заключение о водоудерживающей способности растений.

Вопросы для самоконтроля

1. Происходит ли транспирация при закрытых устьицах и у безлистных побегов.
2. От чего зависит степень открытия устьиц у растений в течение суток?
3. Почему К.А. Тимирязев назвал транспирацию «необходимым злом»?
4. Как объяснить завядание листьев в жаркий летний день?
5. Назовите внешние морфологические признаки водного дефицита растений.
6. Дайте определение водоудерживающей способности листьев растений.
7. Объясните механизм закрывания и открывания устьиц.
8. Как меняется интенсивность транспирации растений в течение вегетации?
9. Какие факторы влияют на интенсивность транспирации растений?
10. В каких случаях используют антитранспиранты.

III.ФОТОСИНТЕЗ

Р а б о т а 9. Химические свойства пигментов листа

Фотосинтез происходит в хлоропластах, который включает систему ламинарных двойных мембран – тилакоидов, образованных внутренней мембраной. В тилакоидах осуществляется световая фаза фотосинтеза - световая энергия солнечных лучей преобразуется в энергию АТФ, а биохимические реакции восстановления CO_2 и синтеза углеводов происходят в межтилакоидном пространстве. В мембранах тилакоида содержатся пигменты:

зеленые пигменты – хлорофилл *а* $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ и хлорофилл *б* $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$;

желтые пигменты – каротиноиды, представленные каротинами и ксантофиллами.

По химической природе хлорофиллы представляют собой сложные эфиры дикарбоновой кислоты хлорофиллина и двух спиртов – метилового (CH_3OH) и фитола ($C_{20}H_{39}OH$). В центре молекулы хлорофилла располагается атом магния, соединенный с азотом четырех пиррольных колец двумя основными и двумя дополнительными связями (металлорганическая связь).

Каротиноиды представляют собой производные непредельного углеводорода изопрена $CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2$. Они имеют конъюгированные связи и также являются фотоактивными пигментами. Эмпирическая формула каротина – $C_{40}H_{56}$. Ксантофиллы – кислородные производные каротина тетратерпены, которые содержат гидроксильную группу и поэтому легко растворяются в спирте. Пигменты растворимы во многих органических растворителях, но не растворимы в воде.

Материалы и оборудование: 1. Высушенные листья крапивы. 2. Этиловый спирт. 3. Бензин. 4. Ступки с пестиками. 5. Штативы с пробирками. 6. Воронки. 7. Фильтры. 8. 20 %-ный раствор *NaOH*. 9. 10 %-ная соляная кислота. 10. Уксуснокислая медь или цинк. 11. Спиртовка, спички.

1. Получение спиртовой вытяжки пигментов

Обычно пигменты легко извлекаются из сухих или свежих листьев полярными растворителями (спирт, ацетон), которые разрушают связь хлорофиллов и ксантофиллов с липопротеидами пластид и тем самым обеспечивают их полное экстрагирование.

Ход работы. Сухие листья крапивы (2–3 г) растереть в фарфоровой ступке с небольшим количеством кварцевого песка, добавляя 3–5 мл этилового спирта. Для нейтрализации кислотности можно добавить щепотку растертого мела. Отфильтровать полученную вытяжку через складчатый фильтр или вату. Оставшуюся в ступке массу повторно растирают с небольшим количеством спирта и отфильтровывают в ту же пробирку.

Полученный фильтр содержит зеленые и желтые пигменты, но из-за преобладания хлорофиллов имеет интенсивно зеленую окраску.

2. Разделение пигментов по Краусу

Метод основан на различной растворимости пигментов в спирте и бензине. Эти растворители при сливании не смешиваются и образуют два слоя - верхний бензиновый и нижний спиртовой.

Ход работы. В чистую пробирку налить 2-3 мл спиртовой вытяжки пигментов и добавить двойное количество бензина. Закрыть пробирку пробкой и несколько раз сильно встряхнуть, чтобы перемешать содержимое, а затем дать отстоятся. Произойдет расслоение смеси: в верхний бензиновый слой зеленого цвета перейдут хлорофиллы и каротин, а ксантофиллы, которые не растворяются в бензине, остаются в нижнем спиртовом слое.

Если разделение пигментов произошло не совсем чисто и нижний ксантофилловый слой сохраняет зеленоватое окрашивание, в раствор добавляют 2-3 капли дистиллированной воды и вновь встряхивают. При помутнении ксантофиллового слоя следует прилить в пробирку немного этилового спирта и снова встряхнуть ее.

Зарисовать результат опыта цветными карандашами с указанием слоев и пигментов в них.

2. Омыление хлорофилла щелочью

Обрабатывая хлорофилл щелочью, можно вызвать омыление эфирных групп, то есть отщепление остатков метилового спирта и фитола, и осаждение образующейся при этом соли хлорофиллиновой кислоты в раствор спирта. Соль хлорофиллиновой кислоты сохраняет зеленую окраску и оптические свойства хлорофилла, но отличается большей гидрофильностью. В верхнем бензиновом слое остается каротин, придавая ему желтовато-оранжевую окраску.

Ход работы. В пробирку налить 1–2 мл спиртового раствора пигментов и несколько капель 20 %-ного раствора щелочи или несколько гранул щелочи, перемешать. Прилить равный объем бензина и взболтать содержимое, дать отстоятся. Произойдет разделение содержимого пробирки на два слоя, но теперь зеленым будет нижний спиртовой слой, а бензиновый - желтый.

Зарисовать пробирку с образовавшимися слоями и указать распределение пигментов.

4. Получение феофитина и восстановление металлорганической связи

Хлорофиллы содержат в порфириновом ядре слабо удерживаемый атом магния. При действии сильной кислоты магний хлорофилла замещается двумя атомами водорода, что приводит к образованию вещества бурого цвета – феофитина.

Если на феофитин подействовать солями меди, цинка или ртути, то два протона в порфериновом ядре вновь замещаются на атом металла и восстанавливается зеленая окраска. Следовательно, цвет хлорофилла связан с наличием металлоорганической связи в молекуле.

Ход работы. В пробирку наливают 2–3 мл спиртовой вытяжки пигментов и прибавляют 2 капли 10 %-ной *HCl*. При взбалтывании пробирки зеленая окраска хлорофилла переходит в бурую – образуется феофитин. Затем в пробирку с феофитином добавляют несколько кристалликов уксуснокислой меди или цинка и пробирку осторожно нагревают на спиртовке до начала кипения раствора. Отметить восстановление зеленой окраски раствора.

Обдумать результаты и сделать выводы о химических свойствах пигментов.

Р а б о т а 10. Оптические свойства пластидных пигментов

Оптические свойства пигментов листа включают спектры поглощения света и флуоресценцию.

Материалы и оборудование: 1. Спиртовая вытяжка пигментов. 2. Раствор каротина (бензиновый слой, полученный после омыления хлорофилла) и ксантофилла. 3. Пипетки на 1 мл. 4. Спектроскоп. 5. Пробирки.

1. Определение спектра поглощения хлорофилла и каротиноидов

Хлорофилл способен поглощать энергию солнца в пределах видимой части спектра (380 – 720 нм). Поглощение света является избирательным. Спектр поглощения каротиноидов охватывает только коротковолновую видимую часть спектра (до 540 нм).

Спектры поглощения света отдельных пигментов зависят от физико-химического строения молекулы и их свойств. У хлорофилла "а" и "б" имеются два максимума поглощения света: в красной области соответственно 665 и 649 нм и в сине-фиолетовой - 430 и 450 нм. Минимум поглощения лежит в зоне зеленых лучей, чем объясняется зеленая окраска пигментов и растений.

В живом листе спектр поглощения света хлорофиллами несколько иной. Расширение спектров поглощения света и сдвиг максимумов в длинноволновую область у хлорофиллов в живом листе вызван влиянием липопротеидного комплекса хлоропластов, в котором они встроены.

Ход работы. Устанавливают спектроскоп по отношению к свету так, чтобы все области спектра имели одинаковую яркость. В кювету или пробирку наливают спиртовую вытяжку хлорофилла, помещают ее перед щелью спектроскопа и определяют положение темных полос, которые соответствуют лучам, поглощаемым хлорофиллом. Ширина и интенсивность темных полос зависят от концентрации пигмента и толщины слоя его раствора. Разбавляют вытяжку пигментов спиртом в отношении 1:1; 1:2; 1:4 и сравнивают спектры поглощения растворов с разной концентрацией хлорофилла.
Зарисовать спектры поглощения света и объяснить полученную разницу.
Для получения спектра поглощения каротина осторожно пипеткой берут бензиновый раствор, в котором остался каротин после омыления хлорофиллов щелочью, переносят его в кювету и помещают перед щелью спектроскопа. Рассматривают и зарисовывают спектр поглощения света каротином.

2. Наблюдение флуоресценции хлорофилла

При поглощении хлорофиллом кванта света, один из его электронов переходит на более высокий энергетический уровень, и молекула оказывается в "возбужденном" состоянии. При переходе "возбужденной" молекулы хлорофилла в обычное состояние энергия кванта может выделяться в виде излучения, или флуоресценции, но с большей длиной волны. Независимо от длины волны возбуждающего света хлорофилл флуоресцирует только в

красной части спектра. В живых листьях хлорофилл излучает свет гораздо слабее, так как часть поглощенной энергии расходуется на фотохимические реакции. Возрастание интенсивности фотосинтеза ведет к ослаблению флуоресценции.

Способность зеленых листьев сбрасывать избыточную энергию в процессе флуоресценции имеет важное приспособительное значение, так как в естественных условиях не все растения переносят высокую освещенность местообитания. Сбрасывая излишне поглощенную энергию, растения предотвращают фотоокисление хлорофиллов, а в экстремальных условиях стресса – клеток листа.

Ход работы. Для наблюдения флуоресценции спиртовую вытяжку пигментов или раствор хлорофилла в бензине, полученный при разделении пигментов по Краусу, сначала рассматривают в проходящем свете, например, перед лампой накаливания или перед окном. Раствор пигмента будет иметь изумрудно-зеленый цвет. Затем ту же пробирку рассматривают в отраженном свете, поместив на темный фон и за источником света. Отметить вишнево-красную окраску раствора.

Флуоресценцию можно наблюдать и в живом листе. Для этого живой лист с дерева с окрашенным эпидермисом помещают в каплю воды на предметное стекло и освещают сине-фиолетовым светом. Под действием света хлоропласты начинают светиться красным светом.

Р а б о т а 11. Спектрофотометрический метод определения содержания пигментов в листьях растений

Содержание пигментов в листьях зависит от условий освещения, минерального питания, возраста листа, и других факторов. Концентрация пластидных пигментов спектрофотометрическим методом определяется по оптической плотности вытяжки пигментов. Он позволяет с большой точностью проводить анализ пигментов без предварительного их разделения.

Материалы и оборудование. 1. Спектрофотометр. 2. Ступки с пестиками, мерные колбы на 25 мл, воронки, штатив с пробирками. 3. Торзионные весы, ножницы, вата, кюветы. 4. 80 %-ный ацетон или 96 %-ный раствор этилового спирта.

Ход работы. Навеску растительного материала (100 мг) измельчают ножницами, помещают в фарфоровую ступку и растирают с добавлением 1-2 мл 80 %-ного ацетона или 96 %-ного этилового спирта. Для нейтрализации кислот клеточного сока и предотвращения образования феофитина в ступку добавляют небольшое количество растертого мела. Добавляют еще 4-5мл ацетона или спирта и полученную вытяжку фильтруют в пробирку через плотно вставленный в воронку ватный тампон. Ступку ополаскивают новыми порциями ацетона или спирта, которые количественно без потерь сливают каждый раз в воронку. Общий объем использованного для одной пробы растворителя должен быть 10 мл. Фильтрат содержит смесь зеленых и желтых пигментов.

Концентрацию хлорофилла "*а*" и "*б*" и суммы каротиноидов определяют в одной вытяжке. Измерение оптической плотности производят в следующем порядке.

1. Включить спектрофотометр. Установить в кюветное отделение кюветы с контрольным раствором (ацетоном или спиртом), по отношению к которому производится измерение, и с исследуемым раствором. Закрыть кюветное отделение.

2. В световой пучок установить кювету с контрольным раствором (рукоятка кюветодержателя - влево до упора). Установить длину волны, на которой проводится измерение. Длина волны высветится на верхнем цифровом табло. Нажать клавишу "Г", а затем "П". На нижнем световом табло высветится "П 100,0".

3. При закрытом кюветном отделении ввести в световой пучок кювету с исследуемым раствором (рукоятку кюветодержателя установить вправо до упора). Нажать клавишу "Е" и снять отсчет на нижнем световом табло.

Концентрацию хлорофилла "*а*" и "*б*" рассчитывают по формулам:

Для 80 %-ного ацетона:

$$C_{хл."а"} = 11{,}63\ Д_{665} - 2{,}39\ Д_{649};$$
$$C_{хл."б"} = 20{,}11\ Д_{649} - 5{,}18\ Д_{665}.$$

Для 96 %-ного раствора этилового спирта:

$$C_{хл."а"} = 13{,}70\ Д_{665} - 5{,}76\ Д_{649};$$
$$C_{хл."б"} = 25{,}80\ Д_{649} - 7{,}60\ Д_{665}.$$

где $C_{хл."а"}$, $C_{хл."б"}$ - соответственно концентрации хлорофиллов "а" и "б", мг/л;

$Д_{665}$ *и* $Д_{649}$ - экспериментально полученные величины оптической плотности при соответствующих длинах волн (665 и 649 нм).

Для определения концентрации суммы каротиноидов в суммарной вытяжке пигментов используют формулу:

$$C_{кар.} = 4{,}695\ Д_{440{,}5} - 0{,}268\ (C_{хл."а"} + C_{хл."б"}),$$

где $C_{хл."а"}$, $C_{хл."б"}$, $C_{кар.}$ - концентрации соответственно хлорофиллов "а", "б" и каротиноидов, мг/л;

$Д_{440,5}$ - оптическая плотность при длине волны 440,5 нм.

Установив концентрацию пигментов в вытяжке, рассчитывают их содержание в листьях с учетом объема вытяжки и навески листьев по формуле:

$$A = \frac{V \cdot C}{P \cdot 1000},$$

где A - содержание пигмента в листьях, мг/г сырой массы;

C - концентрация пигмента, мг/л;

V - объем вытяжки, мл;

P - навеска листьев, г.

Рассчитать отношения хлорофилла "а" к хлорофиллу "б" и суммы хлорофиллов к каротиноидам. Данные записать в табл. 6.

Таблица 6

Вид растения	Оптическая плотность			Концентрация Пигментов (С)			Содержание Пигментов (А)			$\frac{С_{хл.а}}{С_{хл.б}}$	$\frac{С_{хл.а+б}}{С_{кар}}$
	$Д_{665}$	$Д_{649}$	$Д_{440,5}$	$С_{хл.а}$	$С_{хл.б}$	$С_{кар}$	$А_{хл.а}$	$А_{хл.б}$	$А_{кар}$		

Сравнить полученные показатели у разных видов. По отношению содержания пластидных пигментов сделать выводы о светолюбивости или теневыносливости видов.

Р а б о т а 12. Спектрофотометрический метод определения содержания углерода в листьях мокрым сжиганием

Об интенсивности фотосинтеза можно судить по накоплению углерода в синтезируемых органических веществах. Этот метод позволяет с большой точностью определить содержание углерода в растительном материале. Количество ассимилированного углерода определяют по разнице между содержанием его в листьях в начале опыта и через три часа пребывания растения на свету.

Значительные погрешности метода связаны с трудностью учета затрат органических веществ на дыхание и оттока их из листа в другие органы растения. Об этом нужно помнить, анализируя полученные данные.

Материалы и оборудование. 1. Пробирки на 10 *мл*. 2. Пробочные сверла диаметром 5–10 *мм*. 3. Мерные стаканчики. 4. Бюретки. 5. Спектрофотометр КФК-3.

Приготовление хромовой смеси. Для приготовления 1 л 0,4 *N* раствора бихромата калия 19,614 г $K_2Cr_2O_7$ растворяют в 500 *мл* дистиллированной воды, переносят в мерную колбу на 1 л. В качестве катализатора приливают 10 мл 10%-го раствора $CuSO_4$ и раствор доводят до метки дистиллированной водой. Хромовую смесь получают разбавлением концентрированной серной кислотой в соотношении 1:1.

Ход работы. На дереве из листа определенного яруса высекают сверлом диски (от 5 до 10 штук) и помещают их в пробирку, в которую приливают 10 мл 0,2 *N* хромовой смеси. Реакционную смесь слабо кипятят в течение 5 мин. на песчаной бане. После полного охлаждения раствор из пробирки количественно переносят дистиллированной водой в мерный стаканчик на 50 *мл*, доводят до метки и тщательно перемешивают. Через 3 часа из оставшейся части листовой пластинки вновь берут такое же число дисков для вторичного определения и проделывают ту же работу. Для контроля в песчаную баню помещают пробирку с хромовой смесью, но без растительного материала. Ее также кипятят и разводят дистиллированной водой до 50 мл.

Оптическую плотность полученных растворов определяют в кювете с толщиной слоя 2 *см* на спектрофотометре при длине волны 582 *нм*, беря за 100 % оптическую плотность контрольного раствора хромовой смеси.

Показания шкалы переводят в величины концентрации глюкозы при помощи калибровочного графика. Для построения калибровочного графика берут 10 пробирок, в которые приливают соответственно 0,1; 0,2; 0,3 и т.д. до 1,0 *мл* стандартного раствора глюкозы и по 10 мл 0,2 *N* хромовой смеси. Содержание всех пробирок слабо кипятят в течение 5 мин. на водяной бане. После охлаждения растворы из пробирок количественно переносят в мерные стаканчики на 50 мл и доводят дистиллированной водой до метки. Содержимое перемешивают и измеряют их оптическую плотность. На оси абсцисс откладывают концентрацию глюкозы (мг на 50 *мл*), а на оси ординат - соответствующие им значения оптической плотности. Точки пересечения соединяют и получают калибровочный график.

Учитывая соотношения атомной (или молекулярной) массы, выполняют пересчет органического вещества на углерод (*Мс*) или диоксид углерода (*$Мco_2$*):

$$Мс = 0{,}4\ Мгл;$$
$$Мco_2 = 1{,}47\ Мгл,$$

где *Мгл* - количество глюкозы, соответствующее содержанию органического вещества в растительной пробе, мг; 0,4 и 1,47 - коэффициенты пересчета соответственно на углерод и диоксид углерода.

Количество углерода органического вещества (в мг), содержащегося в кусочке листа площадью в 1 $дм^2$, рассчитывают по формуле:

$$X = 0{,}4\ Мгл \cdot 100/S,$$

где *S* - площадь высечек в $см^2$.

Результаты опыта записывают в табл. 7.

Таблица 7

Вариант	Площадь высечек, $см^2$	Объем раствора, мл	Показания шкалы	Содержание глюкозы, мг/ 50 мл	Содержание углерода, мг/$дм^2$	Интенсивность фотосинтеза, мг /$дм^2$ ·час
Начало опыта						
Через 3 часа						

Р а б о т а 13. Накопление первичного (ассимиляционного) крахмала в клетках листьев C_3– и C_4 – растений

Растения, у которых первый стабильный продукт фотосинтеза представлен трехуглеродной фосфоглицериновой кислотой (ФГК), принято называть C_3– растениями. Синтез сахаров в фотосинтезе осуществляется у них в цепи реакций, образующих цикл Кальвина. У C_3 –растений во всех фотосинтезирующих клетках функционирует цикл Кальвина и поэтому во всех клетках листа образуется крахмал. У C_4– растений первичная ассимиляция CO_2 осуществляется в цикле Кальвина и в цикле Хетча-Слека в клетках мезофилла листа. Первыми продуктами этого цикла являются четырех-

углеродные органические кислоты (ЩУК), поэтому такие растения принято называть C_4 -растениями. Цикл Кальвина функционирует у них только в клетках обкладки проводящих пучков листа. Поэтому крахмал образуется только в этих клетках, но не в клетках мезофилла.

Материалы и оборудование: 1. Микроскопы. 2. Осветители. 3. Предметные и покровные стекла. 4. Лезвия безопасной бритвы. 5. Стакан с водой. 6. Препаровальные иглы. 7. Стеклянные палочки. 8.Фильтровальная бумага. 9. Кусочки пенопласта или бузины. 10. Раствор Люголя. 11. 30% раствор *NaOH* или *KOH*. 12. Листья растений кукурузы и **(**C_3 –растений (хлорофитум, традесканция и др.), выдержанные несколько часов на ярком свету, свежие или фиксированные 70% этиловым спиртом**)**.

Ход работы. Продольные и поперечные срезы листьев кукурузы и C_4– растений делают острым лезвием безопасной бритвы. Для получения поперечных срезов используют кусочки бузины или пенопласта. Срезы помещают на предметное стекло в каплю 30% раствора щелочи для их просветления. Через 10–15 мин. щелочь отсасывают фильтровальной бумагой, срезы промывают водой и добавляют каплю раствора Люголя. Затем срезы накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом при малом и при большом увеличении.

Изучая срезы, обращают внимание на локализацию крахмала в клетках листа. У кукурузы крахмал локализуется в клетках обкладки проводящих пучков и в клетках устьиц. В остальных клетках мезофилла, расположенных между жилками, крахмала нет. Поэтому на продольном срезе проводящие пучки с обкладкой четко выделяются как темные полосы, а на поперечном срезе выглядят в виде черной короны (так называемая кранц-анатомия), окружающей неокрашенные ткани ксилемы. В листьях C_3– растений крахмал находится во всех клетках мезофилла, а также в замыкающих клетках устьиц. Неокрашенными остаются только клетки эпидермы и сосудистые пучки. Зарисовать срезы растений.

Вопросы для самоконтроля

1. Какими методами можно разделить пигменты зеленого листа?
2. При каких условиях из хлорофилла образуется феофитин и почему он бурого цвета?
3. Почему в проходящем и отраженном свете спиртовая вытяжка хлорофилла меняет окраску?
4. Какие показатели характеризуют светолюбие и теневыносливость листьев?
5. Что такое листовая мозаика? У каких растений наблюдается это явление – у светолюбивых или теневыносливых?
6. Почему содержание углерода может характеризовать интенсивность фотосинтеза растений?
7. В каких клетках локализируется крахмал у C_3 – и C_4 – растений?

8. Почему многие лесные травы (кислица, недотрога и др.) гибнут после вырубки леса?
9. Какие особенности фотосинтеза суккулентов?
10. Какими методами можно определить интенсивность фотосинтеза растений?

IV.ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ

Р а б о т а 14. Определение активности пероксидазы по А.Н.Бояркину

Метод основан на измерении времени, за которое опытный раствор достигает определенной оптической плотности. В качестве субстрата используют бензидин, в результате окисления которого образуется соединение синего цвета.

Фермент пероксидаза относится к классу оксидоредуктаз, представляя группу оксидаз. Отщепляя водород от окисляемого вещества AH_2, оксидазы передают его и электроны кислороду, активируют его с образованием перекиси водорода: $AH_2+O_2=A+H_2O_2$.

В экстремальных условиях у растений активизируется дыхание и повышается активность пероксидазы. По активации пероксидазы можно оценить степень влияния фактора и физиологическое состояние растений.

Материалы и оборудование. 1. Листья растений. 2. Ацетатный буферный раствор с *pH* = 5,4. 3. Раствор бензидина на ацетатном буфере. 4. 0,03 %-ная перекись водорода. 5. Центрифуга с пробирками. 6. Спектрофотометр. 7. Секундомер. 8. Мерные колбы на 25 мл, пипетки на 2 мл, фарфоровые ступки с пестиками, воронки, фильтры.

Приготовление бензидина. В мерную колбу емкостью 200 мл наливают на 2/3 дистиллированой воды, прибавляют 2,3 мл (2,4 г) ледяной уксусной кислоты и 184 мг бензидина. Колбу подогревают до 50–60°С на водяной бане при постоянном взбалтывании содержимого. После полного растворения бензидина (10–15 мин.) добавляют 5,45 г уксуснокислого натрия, полностью его растворяют и доливают раствор водой до метки (200 *мл*). Раствор может храниться в темном месте 7–10 дней.

Ход работы. 100 мг растительного материала растирают в ступке с 15 *мл* ацетатного буфера. Вытяжку переносят в пробирку центрифуги и центрифугируют в течение 10 мин. при 3000 об./мин. Аккуратно сливают надосадочную жидкость. Осадок отбрасывают. Для измерения активности фермента лучше брать вытяжку такого разведения, чтобы окраска изменялась до заданной плотности за 10-40 с, так как активность пероксидазы пропорциональна концентрации центрифугата только в самом начале реакции.

В кювету толщиной 2 см наливают по 2 *мл* центрифугата, 2 *мл* ацетатного буфера и 2 *мл* бензидина. Включить спектрофотометр. Установить в кюветное отделение кювету с исследуемым раствором. Закрыть кюветное отделение. Отвести рукоятку кюветодержателя влево до упора. Установить длину волны – 580 *нм*. Длина волны высветится на верхнем цифровом таб-

ло. Нажать клавишу "Г", а затем "П". На нижнем световом табло высветится "П 100,0".

При закрытом кюветном отделении ввести в световой пучок кювету с исследуемым раствором (рукоятку кюветодержателя установить вправо до упора). Нажать клавишу "Е" и записать значение оптической плотности на нижнем световом табло. Затем набрать в мерную пипетку с широким носиком 2 мл H_2O_2, открыть кюветное отделение, быстро влить перекись водорода в кювету и закрыть кюветное отделение. Одновременно с первой каплей перекиси водорода включают секундомер. В опытной кювете раствор синеет и оптическая плотность увеличивается. В момент достижения раствором первоначального значения оптической плотности секундомер останавливают и записывают время. Проводят три определения и рассчитывают среднее значение времени.

Активность фермента рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{V \cdot a \cdot b}{m \cdot t \cdot d},$$

где A - активность пероксидазы (изменение оптической плотности за 1 с на 1 г сырой массы растительной ткани);

V - количество жидкости, взятой для приготовления вытяжки в мл (в нашем случае - 15 мл);

m - масса навески, г;

a - степень постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси (при данных условиях - 4);

b - степень дополнительного разведения вытяжки (если это потребуется);

t - время, с;

d - толщина слоя жидкости в кювете, см.

Результаты записывают в табл. 8. Сделать выводы об активности пероксидазы у различных экологических групп растений.

Таблица 8

№	Вид растения	Время посинения раствора, с	Активность пероксидазы

Р а б о т а 15. Определение дыхательного коэффициента прорастающих маслянистых семян

Дыхательным коэффициентом (ДК) называется отношение объема выделенного при дыхании CO_2 к объему поглощенного O_2, при окисление субстрата дыхания до CO_2 и H_2O. Величина этого отношения характеризует химизм дыхания и может изменяться в зависимости от используемых на дыхание органических соединений, содержания и использования кислорода.

Если дыхательным субстратом служат углеводы, реакция идет по уравнению:

$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = 6CO_2 + 6H_2O$, то есть $ДК = \frac{6CO_2}{6O_2} = 1.$

Если дыхательным субстратом служат органические кислоты, содержащие больше кислорода на 1 атом углерода, чем углеводы, то дыхательный коэффициент будет больше 1.

Так, при дыхании за счет щавелевой кислоты дыхательный коэффициент будет равен:

$2H_2C_2O_4 + O_2 = 4CO_2 + 2H_2O$, то есть $ДК = \frac{4CO_2}{O_2} = 4.$

Если на дыхание используются липиды или белки – соединения, в молекулах которых много атомов водорода и мало кислорода, то дыхательный коэффициент будет иметь значение меньше 1, так как на окисление водорода потребуется дополнительное количество кислорода. Например, при окислении стеариновой кислоты –

$C_{18}H_{36}O_3 + 26O_2 = 18CO_2 + 18H_2O$, то есть $ДК = \frac{18CO_2}{26O_2} = 0{,}69.$

ДК зависит от условий внешней среды, от структуры различных органов растений. При недостатке кислорода в атмосфере или затруднении его доступа в клетки и ткани (погруженные в воду семена, ткани в глубине массивных органов) усиливается анаэробное дыхание. При этом окисление субстрата и выделение CO_2 происходят без поглощения кислорода воздуха. В этом случае ДК будет больше 1.

Материалы и оборудование. 1. Прибор для определения дыхательного коэффициента, который состоит из колбы с плотно пригнанной пробкой, в которую вставлена изогнутая под острым углом измерительная трубка. 2. Наклюнувшие семена сосны, ели, лиственницы, ясеня и других маслянистых пород. 3. Стеклянные бюксы, пинцет, фильтровальная бумага, ватка на нитке, штатив. 4. Часы. 5. Раствор концентрированной $NaOH$. 6. Раствор эозина или любого красителя, не окрашивающего стекло.

Ход работы. Предварительно замочить семена деревьев для прорастания. В колбу, примерно до половины, насыпать проросшие семена одного вида и плотно закрыть пробкой.

Конец капиллярной трубки опустить в бюкс с раствором эозина, а колбу укрепить на штативе. Опыт ведется при комнатной температуре. Отметить положение мениска окрашенного раствора в трубке. Через 5 или 10 мин. в зависимости от интенсивности дыхания отмечают число делений, на которые поднялся эозин. Измерение еще раз повторить за тот же промежуток времени. После этого осторожно открыть и вынуть трубку из раствора эозина. В колбу под пробку поместить комочек ваты на нитке, смоченный в щелочи. Плотно закрыть колбу, укрепить на штативе и поместить конец изме-

рительной трубки в эозин. Снова провести измерение движения раствора эозина в трубке за те же интервалы времени. Опыт поставить в 3-кратной повторности. После окончания опыта семена подсушить на фильтровальной бумаге и взвесить.

Первый отсчет (*А*) будет соответствовать разности объемов поглощенного кислорода и выделенного углекислого газа за данный промежуток времени. Отсчет в варианте с щелочью (*В*) выражает объем только поглощенного кислорода, так как выделенный углекислый газ поглощает щелочь.

Объем выделенного CO_2 находят по формуле: $B - A$.

Отсюда $ДК = (B-A) / B$.

Если можно деления шкалы измерительной трубки перевести в миллилитры, то по данным опыта можно вычислить интенсивность дыхания проросших семян в мл O_2 или CO_2 на 1 г семян за 1 час.

$$Ид = \frac{(B-A)\cdot 60}{M\cdot T} \text{ (в мл } CO_2 \text{ на 1 г} \cdot \text{ час);}$$

$$Ид = \frac{B\cdot 60}{M\cdot T} \text{ (в мл } O_2 \text{ на 1 г в час),}$$

где *Ид* – интенсивность дыхания;

М – вес семян, г;

Т – интервал времени измерения, мин.

Результаты записывают в табл.9.

Таблица 9

Объект исследования	Объем газа, мм								ДК
	без щелочи				со щелочью				
	1	2	3	4	1	2	3	4	
Семена сосны									
Семена ели									
Семена лиственницы									

Сделать выводы об интенсивности дыхания и дыхательном субстрате различных видов семян.

Вопросы для самоконтроля.

1. Какова функция фермента пероксидазы? Почему по ее активности можно судить об устойчивости растений к неблагоприятным факторам?
2. Как определяется дыхательный коэффициент?
3. Какова связь между величиной дыхательного коэффициента и энергетической составляющей эффективностью дыхания?

4. Почему у крахмалистых и маслянистых семян разные дыхательные коэффициенты?
5. Почему дыхательные коэффициенты у исследованных лесных семян различаются?

V.МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ РАСТЕНИЙ

Р а б о т а 16. Количественное определение содержания золы в различных органах и частях древесных растений

Содержание зольных элементов в растении весьма непостоянно и изменяется под влиянием различных условий в довольно широких пределах. Однако количественное соотношение элементов в различных органах растений остается более или менее постоянным. Из всех органов наиболее богаты зольными элементами листья (до 15 %) и мелкие всасывающие корни, относительно высокое содержание золы в коре деревьев и корнях, несколько меньшее - в стеблях травянистых растений и в семенах, а меньше всего - в древесине (десятые доли процента).

Масса золы неодинакова у различных видов деревьев и в различных условиях местообитания, а также зависит от возраста. При определении минерального статуса дерева, питательных качеств лесной почвы, в оценки качества сырья необходимо определять зольность различных органов древесных растений.

Материалы и оборудование. 1. Древесина, кора, побеги, почки, листья, семена, хвоя и почки различных растений. 2. Муфельная печь, тигли. 3. Торзионные весы. 4. Щипцы с изогнутым концом. 5. Вытяжной шкаф. 6. Эксикатор.

Ход работы. Взвесить материал для сжигания. Примерная навеска сжигаемого материала (М) - 1 г для листьев и побегов и 4 г для древесины. Весь отвешенный материал переносят без потерь в тигли, пронумерованные с нижней стороны мягким карандашом. Поместить тигли в муфельную печь и обугливать сначала при средней нагретости. После прекращения выделения дыма (работа ведется в вытяжном шкафу) тигли с озоляемым материалом прокалить при более сильном нагреве 15-20 мин. до получения белой или коричневатой окраски золы.

Тигли вынимают из муфеля с помощью тигельных щипцов, ставят на асбестовую подставку, дают немного остыть и переносят в эксикатор.

Охлажденный до температуры руки тигель с золой взвешивают на весах с точностью до 0,01 г. Записывают вес тигля с золой (А).

Освобождают тигель от золы и снова взвешивают с той же точностью. Записывают вес тигля без золы (В).

Определяют вес золы: $m = A - B$.

Вычисляют вес золы во взятом материале:

$$X = m/M \cdot 100\%.$$

Полученные данные для различных частей дерева и для отдельных пород занести в табл. 10.

Таблица 10

Порода	Содержание зольных веществ, %		
	древесина	побеги	почки или хвоя
Сосна обыкновенная			
Береза повислая			

Сравнить полученные данные для различных частей деревьев разных пород. Объяснить, с чем это связано.

Оставшуюся после работы золу аккуратно переносят в пробирки с этикеткой для микрохимического анализа.

Р а б о т а 17. Качественное обнаружение макро и микроэлементов в золе древесины ствола дерева

Химический состав золы древесины сложен и разнообразен. Он зависит от биологических особенностей дерева и состава почвы, на которой оно выросло. В основе метода лежит способность некоторых солей с реактивами давать кристаллы характерной формы, свойственные только этим солям. Этим методом определяются кальций и магний. С некоторыми солями реактивы дают специфическое окрашивание. Этот прием используется для определения фосфора и железа.

Материалы и оборудование. 1. Зола березы или сосны. 2. Микроскоп. 3. Пробирки, фильтровальная бумага, предметные стекла, воронки, стеклянные палочки. 4. 10%-ный раствор соляной кислоты, 1%-ный раствор Na_2HPO_4, 1%-ная серная кислота, 10%-ный раствор аммиака, 1 %-ный раствор желтой кровяной соли, 1%-ный раствор молибденовокислого аммония в 15 %-ной азотной кислоте.

Ход работы. В пробирку с золой наливают 10 %-ный раствор соляной кислоты в объеме примерно в 4 раза большем, чем объем золы. Взбалтывают до растворения. Полученный раствор отфильтровывают через складчатый фильтр. Берут 3 тщательно вымытых сухих предметных стекла и раскладывают на бумаге. На стекла наносят тонкими стеклянными палочками по капле соответствующего реактива. Рядом от капли реактива наносят каплю испытуемого раствора. Обе капли соединяют, чтобы содержимое смешалось. Стекла этикетируют и оставляют до тех пор, пока не подсохнут. При малом и большом увеличении микроскопа рассматривают образовавшиеся кристаллы зольных элементов.

Для обнаружения ***кальция*** берут 1 %-ный раствор серной кислоты:

$$CaCl_2 + H_2SO_4 = CaSO_4 + 2HCl.$$

В результате реакции выпадает осадок – игольчатые кристаллы.

Чтобы обнаружить ***магний***, каплю испытуемого раствора сначала нейтрализуют аммиаком (в каплю испытуемого раствора вносят небольшую каплю аммиака), а затем соединяют капли реактива, которым является 1 %-ный раствор кислого фосфорнокислого натрия. В результате смешивания выпадают характерные кристаллы фосфорноаммиачномагнезиальной соли:

$$MgCl_2 + NH_3 + Na_2HPO_4 = NH_4MgPO_4 + 2NaCl.$$

Для открытия ***фосфора*** каплю раствора соединяют с 1 %-ным раствором молибденовокислого аммония в 15 %-ной азотной кислоте. Получается зеленовато-желтый скрытокристаллический осадок фосфорномолибденового аммиака – аммонийнофосфорного молибдата $(NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3$, принимающего со временем все более интенсивную зеленую окраску.

$$H_3PO_4 + 12\,(NH_4)_2MoO_3 + 21\,HNO_3 = (NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3 + 21\,NH_4NO_3 + 12H_2O.$$

Для открытия ***железа*** пользуются обычной цветной реакцией с 1 %- ным раствором желтой кровяной соли (реакция проводится в пробирке). При этом образуется берлинская лазурь с интенсивно синей окраской.

$$4FeCl_3 + 3K_2Fe(CN)_6 = Fe_4[Fe(CN)_6]_3 + 12KCl.$$

Зарисовать все виды и формы кристаллов при определении исследуемых зольных элементов. Указать, почему зола является одним из ценнейших комплексных удобрений.

Р а б о т а 18. Диагностика потребности растений в азоте и фосфоре

Азотное и фосфорное питание растений происходит путем поглощения из почвы анионов – нитратов, нитритов и фосфатов. При большом количестве в почве и энергичном поглощении часть ионов не успевает перерабатываться растением и может быть обнаружена в клеточном соке. Это указывает на высокую обеспеченность растений азотом и фосфором. Недостаток в почве указанных ионов снижает их количество в клеточном соке, что ведет к снижению продуктивности растений. Для правильных выводов об уровне азотного и фосфорного питания растений необходим одновременный анализ почвы и растений.

Материалы и оборудование. 1. Листья растений. 2. Дифениламиновый реактив. 3. Реактив Кирсанова. 4. Оловянные палочки. 5. Чашки Петри. 6. Стеклянные палочки.

Приготовление дифениламинового реактива. Растворить на холоду в 10 мл серной кислоты 100 мг дифениламина.

Приготовление реактива Кирсанова. Растворить при осторожном нагревании 1 г $(NH_4)_2MbO_4$ в 20 мл воды, охладить и добавить 20 мл HCl и 160 мл воды.

Ход работы. Для всех определений брать небольшие (с пшеничное зерно) кусочки черешков листьев. Раздавить их стеклянной палочкой, добавить 2–3 капли реактива на соответствующий ион и смешать его с соком, выдавленным из ткани. Для определения количества ионов NO_3^- используют раствор дифениламина в серной кислоте. Для открытия ионов PO_4^{2-} использу-

ют реактив Кирсанова, при этом необходимо произвести растирание оловянной палочкой для насыщения раствора хлористым оловом. Оценка концентрации ионов в клеточном соке производится по калибровочной шкале. Полученные данные заносят в табл. 11.

Таблица 11

Вариант опыта	Концентрация нитрат- ионов	Концентрация фосфат - ионов	Выводы

Вопросы для самоконтроля.

1. Почему у хвойных и лиственных видов содержание зольных элементов отличается?
2. В каких органах растений в эксперименте больше зольных элементов и почему?
3. Назовите зольные элементы, обнаруженные химическим путем.
4. В каких листьях содержится больше зольных элементов – в молодых или старых?
5. Для чего необходимо определять количество нитратов и фосфатов в листьях растений?

VI. ПРЕВРАЩЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В РАСТЕНИЯХ

Работа 19. Обнаружение дубильных веществ, гуттаперчи, каучука и алкалоидов

Древесные растения синтезируют большое количество защитных веществ вторичного обмена – живицу у хвойных, танины или дубильные вещества, алкалоиды и др. Танинами особенно богата кора ели, пихты, сосны, дуба, осины, скумпии. Гутта и каучук синтезируются в особых образованиях – млечниках (у гваюлы), хлоренхимы листьев и коры. Особенно много каучука содержится в млечниках тропического дерева гевеи(20 – 60% на сухую массу и у дерева умеренной зоны гваюлы (более 10%). Латекс на воздухе окисляется и превращается в гутту или гуттаперчу. Каучук образуют лишь покрытосеменные двудольные, большинство их из семейств молочайных (гевея), тутовых, сложноцветных (гваюля, кок-сагыз и др), бересклетовых (бересклет европейский и бородавчатый) и др. Алкалоиды (кофеин, хинин, стрихнин и др.) – растительные щелочи, содержащие азот. Много алкалоидов в различных в различных частях древесных растений: хинном дереве, тиссе ягодном, кофейном дереве, бузине черной, лохе, волчьем лыке, ракитнике идр.

Материалы и оборудование: 1. Кора дуба, ели, листья скумпии и сумаха, кора корней бересклета, черешки листа фикуса; 2. Микроскоп; 3. Предметные и покровные стекла; 4. Спиртовка; 5. Воронки и фильтры; 6.

1%-й раствор железа хлорного; 7. 1%-й раствор желатины; 8. Слабый раствор уксусной кислоты; 9. 0,1 нормальный раствор соляной кислоты; 10. Азотистый натрий в кристаллах; 11. 0,1% нормальный раствор перманганатакалия; 12. Раствор индигосульфокислоты.

Ход работы.

Обнаружение дубильных веществ. Взвесить 1 г коры деревьев, измельчить и поместить в колбу на 100 мл. Прилить в колбу 50 мл воды и прокипятить на спиртовке. Отфильтровать. В 3 пробирки прилить по 3 мл фильтрата. В первую пробирку добавить несколько капель железа хлорного. Наблюдается зеленение или почернение фильтрата (образование дубильных чернил). Во вторую пробирку прилить 1 мл раствора желатины. Наблюдается выпадение мути. Это свойство связывания дубильных веществ с белками используется при дублении кож животных. В третью пробирку прибавить несколько кристаллов азотнокислого натрия и 3 капли соляной кислоты. При наличии дубильных веществ появляется коричневое окрашивание.

Для количественного определения дубильных веществ используют метод А.Л. Курсанова, основанный на способности дубильных веществ быстро окисляться перманганатом калия (*$KMnO_4$*).Взвесить 2 г измельченного сухого материала (коры, листьев), просеять сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, поместить в колбу на 100 мл, залить 50 мл дистиллированной воды и нагревать на водяной бане в течение 3-5 мин при помешивании. Дать жидкости отстояться в течение 3-5 мин и процедить через вату в мерную колбу на 250 мл. Частица материала не должны попасть на вату. Сырье в колбе повторно извлекают новыми порциями воды до исчезновения реакции на дубильные вещества. Экстракт в мерной колбе охлаждают и доводят до метки. 25 мл полученного фильтрата помещают в коническую колбу на 1 л, добавляют 750 мл дистиллированной воды и 25 мл индигосулфокислоты и оттитровать при помешивании 0,1 нормальным раствором в перманганата калия до золотисто-желтого окрашивания. В данном случае 1 мл 0,1 нормального раствора *$KMnO_4$* соответствует 4,157 мг дубильных веществ. Параллельно поводится контрольное титрование: 25 мл индигосульфокислоты в 750 мл воды оттитровать 0,1 нормальным раствором перманганата калия.

Содержание дубильных веществ в % определить п формуле:

$$x = \frac{(V_1 - V_2)\, k \cdot d \cdot V100 \cdot 100}{m \cdot V_3 \cdot (100 - w)},$$

где V_1 – объем перманганата, пошедшего на титрование опытного раствора; V_2 – то же, но контрольного; k – поправка на титр (по щавелевой кислоте); d – коэффициент пересчета на танин: для гидролизуемых дубильных веществ равен 4, 157, для конденсированных – 0,00582; V – общий объем экстрата, мл, взятого на титрование, мл; m – масса навески сырья, г; w – потеря в массе сырья при высушивании, %.

Обнаружении гутты. Взять небольшие кусочки корней бересклета, поместить в пробирку с водой и прокипятить. После охлаждения извлечь

кусочки коры и осторожно их разорвать. Между разорванными частями кусочков коры образуются нити гутты.

Обнаружение каучука. Поместить каплю млечного сока из черешка листа фикуса на предметное стекло, накрыть покровным стеклом и рассмотреть при большом увеличении микроскопа. Можно увидеть многочисленные капельки каучука. Чтобы вызвать коагуляцию эмульсии каучука, необходимо прососать через препарат под покровным стеклом несколько капель уксусной кислоты. Можно увидеть хлопья каучука, выпавшие из латекса. Такая реакция используется для выделения каучука из млечного сока каучуконосов.

Обнаружение каучуконосов. Взять небольшие размоченные в воде кусочки коры волчего лыка, раздавить их с помощью стеклянной палочки на фарфоровой пластинке. Смочить полученную кашицу раствором йода в йодистом калии. Появляется коричнево-красное окрашивание, которое характеризует наличие алкалоидов в ткани. Провести такую же реакцию с комнатными растениями, не имеющими алкалоидов.

В выводах указать какую роль играют вещества вторичного происхождения в метаболизме и устойчивости древесных растений.

Р а б о т а 20. Превращение запасных веществ в побегах древесных растений в зимнее время

П. А. Генкель и Е. З. Окнина (1954) разработали и предложили осуществлять диагностику морозоустойчивости древесных растений по глубине покоя их тканей и клеток. Зимой некоторые запасные вещества подвергаются превращениям, и в клетках накапливаются соединения, повышающие их устойчивость к низким температурам. Метод позволяет определить степень обособления протоплазмы в клетках, исчезновение плазмодесм, изменение биохимического состава веществ. Такие процессы происходят в осенне-зимний период у всех древесных растений, но разница между морозоустойчивыми и неустойчивыми видами заключается в разной интенсивности и выраженности этих процессов.

У зимостойких видов в глубоком покое в клетках почек более полно идет обособление протоплазмы и исчезновение плазмодесм, полностью исчезает крахмал, превращаясь в сахара и жиры.

У незимостойких видов обособление протоплазмы и исчезновение плазмодесм выражено слабее и не весь крахмал превращается в сахар и жиры.

Материалы и оборудование: 1. Почки древесных растений разной зимостойкости (осина, ясень зеленый). 2. Микроскопы. 3. Предметные и покровные стекла, пинцеты, препаровальные иглы, бритвы. 4. Раствор Люголя. 5. Спиртовой раствор α-нафтола. 6. Концентрированная H_2SO_4. 7. Раствор Судана - III или Шарлаха. 8. Раствор сахарозы1 м/л. 9. Раствор роданистого калия (9,7 г в 100 мл дистиллированной воды). 10. Глицерин.

Ход работы.

1. Реакция на крахмал

Тонкие срезы почек древесных растений поместить в раствор Люголя на часовом стекле на 5 мин. Рассмотреть срез под микроскопом. При наличии крахмала появляется сине-фиолетовая или черная окраска. Если окраска интенсивно черная, раствор Люголя следует разбавить. Содержание крахмала оценивают в баллах по 4 или 5-балльной системе. Необходимо учитывать окраску не одной клетки, а среднюю окраску в нескольких полях зрения на 3-4 срезах.

2. Реакция на сахара

Тонкие срезы почек древесных растений окрашивают на предметном стекле раствором α-нафтола. Добавить 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Сахара окрашиваются в цвета от розового до темно-малинового. Оценить количество сахаров в баллах.

3. Реакция на жиры и липоиды

Тонкие срезы почек помещают на 5 мин. в раствор Судана III или Шарлаха, затем переносят на предметное стекло в раствор глицерина и рассматривают в микроскоп. Жиры окрашиваются в ярко-красный или оранжевый цвет. Провести оценку содержания жиров в баллах.

4. Характер плазмолиза клеток

О покое можно судить по форме плазмолиза в одномолярном растворе сахарозы. Срезы почек помещают на часовом стекле в каплю сахарозы и оставляют на 5 мин., затем рассматривают под микроскопом. В вегетирующих клетках появляется вогнутый плазмолиз, а в покоящихся – выпуклый.

5. Время наступления колпачкового плазмолиза

Время наступления колпачкового плазмолиза является показателем набухаемости протоплазмы и глубины покоя клеток. Чем более зимостоек вид, тем глубже у него покой и тем больше надо времени для появления колпачкового плазмолиза.

Тонкие срезы почек древесных растений помещают в каплю раствора роданистого калия. В начале под микроскопом виден выпуклый плазмолиз, затем под влиянием проникающих в мезоплазму ионов роданита (CNS^-) происходит набухание вне мезоплазмы с образованием колпачков.

Обычно в покоящихся клетках колпачковый плазмолиз наступает через 10–15 мин. и более, а в вегетирующих – через 1–3 мин.

После проведения всего цикла исследований записать данные в табл. 12.

Таблица 12

Вид	Содержание в баллах			Время наступления колпачкового плазмолиза
	крахмал	сахара	липиды	

Оценить глубину покоя и морозоустойчивость видов и описать характер изменений у разных по морозоустойчивости видов при переходе от глубокого к вынужденному покою.

Для большей наглядности можно исследования проводить на почках, взятых непосредственно с деревьев и с ветвей этих же видов, подвергнутых в течение 10–15 дней выгонке при комнатной температуре.

Вопросы для самоконтроля.

1. Назовите вещества вторичного происхождения в растениях.
2. В каких органах растений встречаются вещества вторичного происхождения?
3. Почему вещества вторичного происхождения используются в систематике растений?
4. Какие биохимические изменения в тканях происходят при переходе древесных растений в состояние глубокого физиологического покоя.
5. Дайте определение морозоустойчивости древесных растений.
6. В какое время года побеги древесных растений содержат максимальное количество крахмала?
7. У какого из исследованных древесных растений не обнаружено крахмала в клетках?
8. Почки каких растений находятся в состоянии глубокого физиологического покоя, а каких в состоянии вынужденного? Объясните почему.

VII. РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ

Р а б о т а 21. Влияние выделений листьев растений на рост корней семян

Растительные фитонциды оказывают на прорастание корней как стимулирующее, так и ингибирующее влияние. Угнетающим или стимулирующим действием обладают не только эфирномасличные растения, но и такие как очиток едкий, цмин песчаный и другие виды. Наибольший эффект влияния фитонцидов наблюдается во время цветения растений и особенно безоблачные дни. В лабораторных условиях легко можно убедиться фитонциды каких растений стимулируют прорастание семян, а какие угнетают.

Материалы и оборудование: 1. Чашки Петри диаметром 10 и 3 см; 2. Фильтровальная бумаг; 3. Проросшие семена ячменя, овса, ржи или пшеницы; 4.Листья древесных и комнатных растений.

Ход работы. В чашки Петри диаметром 10 см поместить увлажненную фильтровальную бумагу, а по периферии – проросшие семена ячменя, овса, ржи или пшеницы в количестве 20 шт. Семена отобрать по размеру и весу. В центр поставить чашку Петри диаметром 3 см. В меньшую чашку поместить кашицу растертых листьев. В качестве контроля вместо кашицы из растертых листьев. Для каждого вида растений необходимо поставить эксперимент из 3-х чашек Петри. Через неделю со дня постановки лаборатор-

ной работы посчитать число проросших семян и измерить длину корешков. Результаты занести в табл. 13.

Таблица 13

Вид	Показатели активности фитонцидов	Контроль			Опыт		
		Вариант опыта			Вариант опыта		
	Число проросших семян, %	1	2	3	1	2	3
	Длина корешков, мм						
	Среднее значение						

Сделать выводы об активности фитонцидов у листьев растений.

Р а б о т а 22. Выведение из состояния покоя побегов древесных растений

Почки древесных растений находятся в состоянии предварительного, глубокого и вынужденного покоя в зимнее время. Предварительный покой - характерен для периода от момента формирования новой почки до листопада, глубокий – от листопада до примерно середины зимы, вынужденный – от середины зимы до весны, когда почки не распускаются из-за пониженных температур воздуха и почвы.

Материалы и оборудование: 1. Банки; 2. Питательный раствор по методу Рупрехта (0,08%-ный раствор алюмокалиевых квасцов, 0,03%-ный раствор $NaNO_3$ или 0,03% $NaCl$ или полная питательная смесь Кнопа (1 г $Ca(NO_3)_2$, 0,25г KH_2PO_4, 0,25 г $MgSO_4$, 0,125 г KCl, следы $FeCl_3$ на 1 л); 3. 0,01% -ный раствор лимонной кислоты или 1%-ый раствор сахарозы; 4.Растворы для выгонки: 50 мг/л ГК, 30 мг/л кинетина, 0,5 мл диэтиловый эфир, 30 мг/л АБК; 5.Ветви древесных растений.

Ход работы. Выбрать древесные виды для исследования. Для выгонки можно использовать сирень обыкновенную, айву японскую, яблони декоративные, дерен красный, конский каштан обыкновенный, черемуху виргинскую, березу повислую, иву белую, лиственницу гибридную и др. Для этого срезать побеги 35-40 см длиной, пометить в банку с питательным раствором на 15 см, обрезать побеги под водой при смене раствора. Выгонку проводить при температуре 20 – 22°С, понижая температуру до 16 – 18°С с началом распускания почек. Продолжительность светового периода 10 – 12 ч в сутки. Все ветви поставить в банки с питательным раствором, кроме контроля. Раствор менять не реже 1 раза в неделю. Поставить ветви древесных растений в 5 вариантах:

1. Контроль с водой.
2. Тепловая ванна. Можно создавать различные температуры от 35°С до 15°С. Чем выше температура тепловой ванны, тем меньше продолжи-

тельность выдерживания в ней побегов. При 35С– 10-12 ч, 18°С –18 ч, при 15°С – 20 ч.

3. Эфиризация. Под стеклянный колпак помещают побеги и склянку с 0,5 мл диэтилового эфира в сосуд с водой, насыщая воздух парами эфира на 12 ч при температуре воздуха 18-20°С.
4. Активаторы роста: 50 мл/л ГК и 30 мг/л кинетина.
5. Ингибиторы роста: 30 мг/л АБК.

Обязательно отметить условия проведения эксперимента: освещенность, температуру, влажность воздуха, частоту смены раствора, вариант опыта, вид древесного растения и т.д. Вести наблюдения за распусканием почек на всех побегах. Для каждого вида древесного растений сделать табл.14.

Таблица 14

№	Вариант опыта	Количество почек на 10 ветках	Дата					Количество распустившихся почек	
			набухания почек	распускания листьев	полного облиствления	бутонизации	цветения	в опыте	% к контролю
1	Контроль (вода)								
2	Тепловая ванна								
3	Эфиризация								
4	Активаторы роста								
5	Ингибиторы роста								

В течение 1 месяца наблюдать за побегами древесных растений. Для предупреждения засыхания почек, ветви каждые 3 дня опрыскивать водой. По окончанию эксперимента сделать выводы.

Вопросы для самоконтроля.

1. С помощью каких приемов можно ускорить переход растения в состояние покоя или задержать распускание почек?
2. Какие факторы внешней среды служат сигналом к осеннему листопаду древесных растений в умеренной зоне?
3. Какие органы растений синтезируют фитонциды?

Р а б о т а 23. Значение листьев для укоренения черенков

Ауксины образуются в верхушечных меристемах и в листьях. Из листьев ауксины транспортируются в стебли и способствуют образованию придаточных корней. Для вегетативного размножения большинства растений используют зеленые (облиственные) черенки.

Материалы и оборудование. 1.Традесканция; 2. Стеклянные стаканы, обернутые черной бумагой; 3. Бритва.

Ход работы. Срезать шесть черенков традесканции с 5-6 листьями. У двух черенков удалить все листья, у двух других оставить два верхних листа, у двух оставить все листья. Черенки поместить в стаканчики с водопроводной водой. Через 1-2 недели сделать выводы о значении листьев для образования придаточных корней, зарисовать растения, измерить количество придаточных корней линейкой.

VIII. УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ УСЛОВИЯМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Р а б о т а 24. Изучение защитного действия криопротекторов на устойчивость растительных клеток к действию низких температур

При воздействии отрицательных температур на растительные ткани в межклетниках образуются кристаллы льда, которые повреждают мембраны, оттягивают воду из клеток и обезвоживают протопласт. При определенной степени обезвоживания, индивидуальной для каждого растения, протоплазма коагулирует.

Кристаллы льда, образующиеся непосредственно в клетках, оказывают механическое воздействие, в результате чего нарушается внутренняя структура протоплазмы, резко повышается ее проницаемость, а при дальнейшем пребывании на морозе наступает отмирание клеток. Скорость отмирания протоплазмы клеток зависит как от температуры и времени экспозиции, так и от водоудерживающей способности самой клетки. У морозоустойчивых видов наблюдается увеличение криопротекторов (растворимых сахаров) в зимующих органах растений, что повышает водоудерживающую способность тканей.

Материалы и оборудование. 1. 1 *М* растворы сахарозы; 2. 1 *М* раствор глицерина, 3. 8%-й раствор *NaCl*, 4. свекла; 5. пробочные сверла; 6. пробирки, лезвия; 5. морозильная камера; 6. микроскопы; 7. поваренная соль.

Ход работы. Из поперечного среза красной столовой свеклы толщиной 0,5 см при помощи пробочного сверла 5-6 мм диаметром делают высечки. Высечки тщательно ополаскивают водой и помещают в три пробирки по 3-4 высечки в каждую. В первую пробирку наливают 5 мл дистиллированной воды, во вторую – 5 мл 1 М раствора сахарозы, в третью – 5 мл 1 М раствора глицерина, в четвертую – 2,5 мл 1 М раствора сахарозы и 2,5 мл 1 М раствора глицерина. Пробирки этикетируют и на 20 минут погружают в охладительную смесь, состоящую из трех частей снега или льда и одной части поваренной соли. Температура охладительной смеси около – 20°С. Затем про-

бирки вынимают из охладительной смеси и размораживают в стакане воды комнатной температуры.

Отмечают различия в интенсивности окрашивания жидкостей в пробирках и объясняют их. Из анализируемых высечек готовят тонкие срезы и рассматривают их под микроскопом при малом увеличении в капле того же раствора, в котором они находились. Подсчитывают общее число клеток в одном поле зрения и число обесцвеченных клеток, из которых вышел бетацианин.

Для проверки жизнеспособности клеток можно провести плазмолиз. Тонкие срезы клеток помещают в раствор 8%-й раствор *NaCl* на 10 мин, а затем препараты рассматривают под микроскопом и подсчитывают процент плазмолизированных клеток в поле зрения.

Результаты опыта записывают в табл. 15 и делают выводы.

Таблица 15

Условия	Число клеток в поле зрения микроскопа, %		Число плазмолизированных клеток в поле зрения микроскопа, %
	всего	окрашенных	
Вода			
5 мл 1*M* р-р сахарозы			
5 мл 1*M* р-р глицерина			
2,5 мл 1 *M* р-р сахарозы и 2,5 1*M* р-р глицерина			

Р а б о т а 25. Определение жароустойчивости растений (по Ф.Ф. Мацкову)

Метод основан на выдерживании листьев растений, обладающих разной жароустойчивостью, в воде, температура которой постепенно повышается, и определение степени нарушения клеточных мембран в зависимости от температуры воды. Жароустойчивые растения имеют более высокий температурный порог разрушения мембран клеток.

Материалы и оборудование: 1 – раствор 0,2 *N* соляной кислоты; 2 – листья суккулентов, ксерофитов и мезофитов; 3 – водяная баня; 4 – термометр; 5 – кристаллизаторы с холодной водой; 6 – пинцет; 7 – ножницы.

Ход работы. Водяную баню нагревают до +40°С и в воду опускают листья испытуемых на жароустойчивость растений. Число листьев каждого вида растений должно соответствовать количеству проводимых измерений. Через 30 минут вынимают из воды первую партию листьев и переносят в кристаллизатор с холодной водой. Температуру воды в бане поднимают на 5°С и через 10 минут вынимают вторую партию листьев, которые также переносят в холодную воду.

Постепенно температуру воды доводят до +80°С, беря пробы через интервалы в 5°С. После этого холодную воду в кристаллизаторах заменяют на

раствор соляной кислоты и через 20 минут учитывают результаты опыта. Неповрежденные листья останутся зелеными, а поврежденные буреют.

Высокая температура вызывает разрушение мембран клетки и коагуляцию белков в протоплазме. Соляная кислота проникает в поврежденные клетки и вызывает превращение хлорофилла в феофитин, который имеет бурую окраску. У растений с кислым клеточным соком появление феофитина может происходить и без действия соляной кислоты.

Определить процент повреждения листьев у растений после прогрева и действия соляной кислоты.

Результаты исследования записать в табл. 16.

Таблица 16

№	Объект исследования	Степень повреждения листьев, %				
		40°С	50°С	60°С	70°С	80°С

Сделать выводы о степени жаростойкости исследованных растений.

Р а б о т а 26. Определение газоустойчивости растений по повреждаемости листьев газом

Газоустойчивость растений принято определять по величине некрозов на листьях или проценту их поврежденности. При определении газоустойчивости необходимо учитывать влияние экологических, почвенных и гидрологических условий произрастания. Газоустойчивость растений можно определять как в природных фитоценозах, подверженных действию промышленных выбросов, так и в лабораторных условиях в специальных газовых камерах на срезанных ветвях. В последнем случае можно использовать более высокие расчетные концентрации газов для получения четких различий в газоустойчивости между породами.

Материалы и оборудование. 1 – полиэтиленовые камеры объемом 0,062 и 0,125 м^3; 2 – безводный Na_2SO_3; 3 – концентрированная H_2SO_4; 4 – 25 %-ный аммиак; 5 – конические колбы на 0,5 л; 6 – скрепки; 7 – стеклянные бюксы, чашки Петри, фильтры круглые, пипетки.

Ход работы. В полиэтиленовую камеру ставят ветви исследуемых растений в колбе с водой. Необходимо взять по 3–5 ветвей или побегов растений разных видов. В камеру с растениями помещают бюкс с Na_2SO_3. Щель камеры зашпиливают скрепками. Через отверстие пипеткой вносят избыточное количество H_2SO_4. В результате реакции образуется сернистый газ. Время газации 20-30 минут. Концентрация SO_2 в камере создается от 200 до 900 мг/м^3 в зависимости от количества листовой массы, освещенности и температуры. Концентрацию газа в камере любого объема можно рассчитать по уравнению реакции:

$$Na_2SO_3 + H_2SO_4 = SO_2 + Na_2SO_4 + H_2O.$$

Для определения устойчивости растений к аммиаку в камеру с растениями пипеткой вносится 1–4 мл 12 %-ного водного раствора аммиака. Время газации 20–30 минут.

После газации в обоих случаях растения в колбах выдерживаются 24 ч при максимально возможной освещенности (у окна, под сильными источниками света). После этого определяется поврежденность листьев в процентах площади некрозов от общей поверхности листа. По показателям средней поврежденности видов распределяют растения на устойчивые (0–20% некрозов), среднеустойчивые (21–50%) и неустойчивые (51–100%).

Результаты записывают в табл. 17.

Таблица 17

№	Вид растения	Повреждаемость листьев, %		Выводы об устойчивости
		SO_2	NH_3	

Р а б о т а 27. Определение степени солеустойчивости древесных растений

Показатель всхожести семян в растворах минеральных солей разной концентрации можно использовать при определении степени солеустойчивости древесных растений. Самая высокая всхожесть семян в концентрированных растворах солей обычно характерна для более солеустойчивых древесных растений.

Материалы и оборудование. 1. Семена древесныхрастений; 2. термостат; 3. Чашки Петри; 4. Раствор формальдегида (1 мл в 300 мл воды); 5. 3-, 7-, 12%-ные растворы *NaCl*.

Ход работы. Семена древесных растений обработать формальдегидом в течение 5 мин. Разложить в стерильные чашки Петри кружки фильтровальной бумаги и семена растений (50 шт.), опыт провести в трехкратной повторности. Затем в чашки Петри влить раствор *NaCl* различных концентраций, написать этикетки каждому варианту. В контрольную чашку Петри влить дистиллированную воду. Через неделю подсчитать число проросших семян по вариантам опыта и сравнить их с контролем. Результаты опыта занести в табл. 18. Сделать выводы об устойчивости исследованных видов.

Таблица 18

Семена	Повторности	Концентрация *NaCl*			Контроль
Ясеня об.		3%	7%	12%	
	1				
	2				
	3				
	среднее				

Вопросы для самоконтроля.

1. Назовите, какие вещества являются растительными криопротекторами. Как они защищают растительные клетки?
2. В чем проявляется защитное действие сахарозы на белки?
3. Как влияют высокие температуры на повреждаемость клеток растений?
4. Назовите виды растений, устойчивые к сернистому газу и аммиаку.
5. По какому принципу растения были разделены на устойчивые, среднеустойчивые и неустойчивые виды?
6. Почему газоустойчивость растений может меняться? Когда это происходит и от чего это зависит?
7. Какая концентрация солей является лимитирующей для прорастания семян древесных растений?

Рекомендуемая литература

1. В.В.Кузнецов, Г.А. Дмитриева. Физиология растений. М.:Абрис, 2011.-783 с.

2. Алехина Н.Д., Балиокин Ю.В., Гавриленко В.Ф./ Под.ред. И.П. Ермакова Физиология растений.М.:Академия,2007.-640 с.

3.Веретенников А.В. Физиология растений. – Москва, 2006.– 480 с.

4. Афанасьева Н.Б, Березина Н.А. Введение в экологию растений. М.: Издательство Московского университета, 2011.- 800с.

Приложение

Рефрактометрические показатели концентрации и осмотическое давление растворов сахарозы

Показатель шкалы рефрактометра	Концентрации		Осмотическое давление в А	Показатель шкалы рефрактометра	Концентрации		Осмотическое давление в А
	%	Г/М			%	Г/М	
1	2	3	4	5	6	7	8
1,3365	2,41	0,071	1,88	1,3397	4,61	0,138	3,64
1,3366	2,51	0,074	1,97	1,3398	4,70	0,140	3,72
1,3367	2,58	0,076	2,02	1,3399	4,75	0,141	3,76
1,3368	2,65	0,078	2,06	1,3400	4,80	0,143	3,80
1,3369	2,72	0,080	2,11	1,3401	4,91	0,146	3,88
1,3370	2,80	0,082	2,18	1,3402	4,95	0,147	3,91
1,3371	2,85	0,084	2,23	1,3403	5,01	0,149	3,95
1,3372	2,95	0,087	2,31	1,3404	5,11	0,152	4,03
1,3373	3,00	0,088	2,34	1,3405	5,16	0,154	4,07
1,3374	3,05	0,090	2,37	1,3406	5,21	0,156	4,11
1,3375	3,10	0,091	2,42	1,3407	5,31	0,158	4,19
1,3376	3,19	0,094	2,49	1,3408	5,36	0,159	4,23
1,3377	3,29	0,097	2,57	1,3409	5,41	0,161	4,27
1,3378	3,35	0,098	2,62	1,3410	5,47	0,163	4,32
1,3379	3,40	0,100	2,65	1,3411	5,54	0,165	4,38
1,3380	3,45	0,101	2,70	1,3412	5,61	0,167	4,43
1,3381	3,50	0,103	2,73	1,3413	5,67	0,169	4,48
1,3382	3,60	0,106	2,81	1,3414	5,73	0,171	4,54
1,3383	3,67	0,108	2,87	1,3415	5,80	0,173	4,59
1,3384	3,70	0,109	2,89	1,3416	5,87	0,175	4,64
1,3385	3,80	0,113	3,00	1,3417	5,93	0,177	4,70
1,3386	3,86	0,115	3,04	1,3418	5,99	0,179	4,74
1,3387	3,91	0,116	3,08	1,3419	6,06	0,181	4,79
1,3388	4,00	0,119	3,16	1,3420	6,12	0,183	4,85
1,3389	4,06	0,121	3,20	1,3421	6,19	0,185	4,89
1,3390	4,11	0,122	3,24	1,3422	6,26	0,187	4,94
1,3391	4,21	0,125	3,33	1,3423	6,32	0,189	5,00
1,3392	4,31	0,128	3,41	1,3424	6,39	0,191	5,04
1,3393	4,34	0,129	3,44	1,3425	6,48	0,194	5,12
1,3394	4,41	0,131	3,49	1,3426	6,55	0,196	5,17
1,3395	4,51	0,134	3,57	1,3427	6,61	0,198	5,22
1,3396	4,56	0,136	3,61	1,3428	6,68	0,200	5,27

1	2	3	4	5	6	7	8
1,3429	6,74	0,202	5,32	1,3464	9,06	0,274	7,39
1,3430	6,81	0,204	5,38	1,3465	9,12	0,276	7,45
1,3431	6,91	0,207	5,48	1,3466	9,19	0,278	7,50
1,3432	6,97	0,209	5,54	1,3467	9,25	0,280	7,55
1,3433	7,04	0,211	5,59	1,3468	9,31	0,282	7,61
1,3434	7,10	0,213	5,64	1,3469	9,37	0,284	7,67
1,3435	7,17	0,215	5,70	1,3470	9,44	0,286	7,72
1,3436	7,24	0,217	5,75	1,3471	9,51	0,288	7,78
1,3437	7,30	0,219	5,80	1,3472	9,57	0,290	7,84
1,3438	7,37	0,221	5,86	1,3473	9,63	0,292	7,90
1,3439	7,43	0,223	5,91	1,3474	9,69	0,294	7,97
1,3440	7,50	0,225	5,96	1,3475	9,79	0,297	8,06
1,3441	7,56	0,227	6,020	1,3476	9,85	0,299	8,12
1,3442	7,63	0,229	6,07	1,3477	9,91	0,301	8,17
1,3443	7,70	0,231	6,13	1,3478	9,97	0,303	8,23
1,3444	7,76	0,233	6,19	1,3479	10,03	0,305	8,29
1,3445	7,83	0,235	6,25	1,3480	10,10	0,307	8,34
1,3446	7,89	0,237	6,33	1,3481	10,19	0,309	8,40
1,3447	7,95	0,239	6,38	1,3482	10,25	0,311	8,45
1,3448	8,02	0,241	6,44	1,3483	10,31	0,313	8,51
1,3449	8,08	0,243	6,50	1,3484	10,37	0,315	8,57
1,3450	8,15	0,245	6,55	1,3485	10,44	0,317	8,63
1,3451	8,21	0,247	6,61	1,3486	10,50	0,319	8,69
1,3452	8,27	0,249	6,66	1,3487	10,56	0,321	8,75
1,3453	8,34	0,251	6,71	1,3488	10,62	0,323	8,82
1,3454	8,40	0,253	6,77	1,3489	10,68	0,325	8,88
1,3455	8,47	0,255	6,83	1,3490	10,75	0,327	8,94
1,3456	8,53	0,257	6,88	1,3491	10,81	0,329	9,00
1,3457	8,59	0,259	6,94	1,3492	10,87	0,331	9,06
1,3458	8,66	0,261	6,99	1,3493	10,93	0,333	9,12
1,3459	8,75	0,264	7,09	1,3494	10,99	0,335	9,18
1,3460	8,81	0,266	7,09	1,3494	10,99	0,335	9,18
1,3461	8,88	0,268	7,22	1,3496	11,15	0,340	9,32
1,3462	8,94	0,270	7,28	1,3497	11,21	0,342	9,38
1,3463	9,00	0,272	7,33	1,3498	11,27	0,344	9,44

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Лабораторные работы	3
1.Физиология растительной клетки	3
1.Явления тургора, плазмолиза и деплазмолиза	3
2.Различные формы плазмолиза	5
3. Определение осмотического давления клеточного сока методом плазмолиза	5
4.Определение сосущей силы клеток по изменению концентрации растворов	6
5.Определение концентрации и осмотического давления клеточного сока рефрактометрическим методом	8
II.Водный режим растений	9
6.Влияние внешних условий на состояние устьиц	9
7. Определение интенсивности транспирации методом быстрого взвешивания листьев при помощи торзионных весов	10
8. Определение водоудерживающей способности растений методом завядания	11
III.Фотосинтез	12
9. Химические свойства пигментов листа	12
10. Оптические свойства пластидных пигментов	14
11. Спектрофотометрический метод определения содержания пигментов в листьях растений	15
12. Спектрофотометрический метод определения содержания углерода в листьях мокрым сжиганием	17
13. Накопление первичного (ассимиляционного) крахмала в клетках листьев C_3– и C_4 – растений	19
IV.Дыхание растений	20
14. Определение активности пероксидазы по А.Н.Бояркину	20
15. Определение дыхательного коэффициента прорастающих маслянистых семян	22
V.Минеральное питание растений	24
16. Количественное определение содержания золы в различных органах и частях древесных растений	24
17. Качественное обнаружение макро и микроэлементов в золе древесины ствола дерева	26
18. Диагностика потребности растений в азоте и фосфоре	27
VI. Превращение органических веществ в растениях	28
19. Обнаружение дубильных веществ, гуттаперчи, каучука и алкалоидов	28
20. Превращение запасных веществ в побегах древесных растений в зимнее время	30

VII. Рост и развитие растений	32
21. Влияние выделений листьев растений на рост корней семян	32
22. Выведение из состояния покоя побегов древесных растений	33
23. Значение листьев для укоренения черенков	35
VIII. Устойчивость растений к неблагоприятным условиям внешней среды	35
24. Изучение защитного действия криопротекторов на устойчивость растительных клеток к действию низких температур	35
25. Определение жароустойчивости растений (по Ф.Ф. Мацкову)	36
26. Определение газоустойчивости растений по повреждаемости листьев газом	37
27. Определение степени солеустойчивости древесных растений	38
Рекомендуемая литература	39
Приложение	40

Учебное издание

Оксана Васильевна Чернышенко

ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

По тематическому плану внутривузовских изданий учебной литературы на 2014 г., поз.9

Лицензия ЛР № 020718 от 02.02.1998 г.
Лицензия ПД № 00326 от 14.02.2000 г.

Подписано к печати		Формат 60×88/16
Бумага 80 г/м^2 «Снегурочка»		Ризография
Объем 3,0 п.л.	Тираж 100 экз.	Заказ №

Издательство Московского государственного университета леса.
141005, Мытищи-5, Московская обл., 1-я Институтская, 1, МГУЛ.
Телефоны: (095) 588-57-62, 588-53-48, 588-54-15. Факс: 588-51-09.
E-mail: izdat@mgul.ac.ru