

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

ПРАКТИКУМ

За редакцією доктора біологічних наук,
професора Т.В. Паршиково

ВИДАВНИЦТВО
ТЕРЕН
ЛУЦЬК 2010

УДК 581.1
ББК28я73
М 91

*Рекомендовано Міністерством освіти і науки України
як навчальний посібник для студентів
біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів
(лист № 1.4/18 – Г – 338 від 04.07 2006 р.)*

Рецензенти:

Д.б.н., академік НААНУ **І.М. Гудков**
(Національний університет біоресурсів
і природокористування України)
Д.б.н., член-кореспондент. НАНУ **Л.І. Мусатенко**
(Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України)
Д.б.н., професор **М.І. Бойко**
(Донецький національний університет)

Автори: к.б.н., доц. **О.В. Войцехівська;**

к.б.н., доц. **А.В. Капустян;**
к.б.н., доц. **О.І. Косик;**
д.б.н., проф. **М.М. Мусієнко;**
к.б.н., доц. **О.П. Ольхович;**
к.б.н., доц. **О.О. Панюта;**
д.б.н., проф. **Т.В. Паршикова;**
к.б.н., доц. **П.С. Славни**

Фізіологія рослин: практикум / О.В. Войцехівська, А.В. Капустян, О.І. Косик та ін. За заг.ред. Т.В. Паршикової – Луцьк: Терен, 2010. – 420 с.

У посібнику обґрунтовано практичні роботи з основних розділів фізіології рослин. Розглянуто особливості водного режиму, фотосинтезу, дихання, кореневого живлення, стійкості, росту та розвитку рослин, а також питання фітотехнології. Для кращого засвоєння лекційного і практичного матеріалу, самоконтролю знань студентів в кінці кожної роботи та розділу наведено контрольні запитання та завдання. Виконання представлених у практикумі робіт допоможе студентам у пізнанні процесів життєдіяльності культурних і дикорослих рослин, а також сприятиме набуттю студентами навичок експериментальних і самостійних науково-дослідних робіт.

Для викладачів, студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів.

ISBN 978-966-2276-___-__ © Войцехівська О.В.; Капустян А.В.; Косик О.І.;
Мусієнко М.М.; Ольхович О.П.; Панюта О.О.;
Паршикова Т.В.; Славний П.С., 2010

ЗМІСТ

Передмова

РОЗДІЛ 1. Фізіологія рослинної клітини

(Ольхович О. П., Войцехівська О. В.)

Робота 1. Проникність нативних і пошкоджених мембран клітини для речовин клітинного соку залежно від температури
Робота 2. Діагностика пошкодження рослинних тканин за зміною проникності мембран цитоплазми
Робота 3. Порівняльна здатність проникності плазмалемми і тонопласта
Робота 4. Визначення ізоелектричної точки (ІЕТ) рослинних тканин
Робота 5. Плазмоліз і деплазмоліз у рослинних клітинах
Робота 6. Ковпачковий плазмоліз
Робота 7. Визначення структурної в'язкості цитоплазми плазмолітичним методом
Робота 8. Визначення в'язкості цитоплазми рослин методом центрифугування
Робота 9. Вплив йонів K^+ на в'язкість цитоплазми
Робота 10. Визначення концентрації клітинного соку і осмотичного потенціалу рефрактометричним методом
Робота 11. Визначення осмотичного потенціалу клітинного соку плазмолітичним методом
Робота 12. Визначення сисної сили тканини за зміною концентрації розчину (за методом В.С.Шардакова)
Робота 13. Вплив деяких факторів на швидкість руху цитоплазми в клітинах
Робота 14. Визначення швидкості руху хлоропластів (за Н.М.Смірноюю, Л.Я.Сіренко)
Робота 15. Визначення періоду фотовицвітання хлоропластів за допомогою люмінесцентного мікроскопа
Робота 16. Оцінка змін у прижиттєвому забарвленні клітин у відповідь на токсичний вплив
Контрольні запитання та завдання до розділу „ Фізіологія рослинної клітини”

РОЗДІЛ 2. Водний режим рослин (Славний П. С., Ольхович О. П.)

Робота 17. Визначення кількості води та сухої речовини у рослинах різних екологічних груп

Робота 18. Визначення інтенсивності транспірації та відносної транспірації ваговим методом

Робота 19. Визначення інтенсивності транспірації у різних екологічних груп рослин (за Л. А. Івановим)

Робота 20. Спостереження за динамікою транспірації на гілках деревних рослин упродовж дня

Робота 21. Визначення відносної активності води у рослині

Робота 22. Визначення водоутримної здатності рослин методом «в'янення» (за А. Арландом)

Робота 23. Визначення водного дефіциту рослин

Робота 24. Визначення полуденного та залишкового водного дефіциту

Робота 25. Визначення швидкості втрати води під час в'янення рослин із різними морфолого-фізіологічними ознаками

Робота 26. Спостереження за перерозподілом калію у зв'язку із рухом продихів

Робота 27. Визначення сисної сили ґрунту капілярним методом (за Г. Уршпрунгом)

Робота 28. Визначення повної вологоємності субстрату

Контрольні запитання та завдання до розділу „Водний режим рослин”

РОЗДІЛ 3. Фотосинтез (Паршикова Т. В., Мусієнко М. М.)

Робота 29. Екстракція пластидних пігментів

Робота 30. Хімічні властивості пігментів листка: розподіл пігментів за методом К. Крауса, одержання хлорофілінів

Робота 31. Утворення феофітину і відновлення металоорганічного зв'язку

Робота 32. Визначення кількості хлорофілів та каротиноїдів у листках вищих рослин

Робота 33. Розділення пігментів хлоропластів хроматографічним методом та визначення їх кількості у листках

Робота 34. Спостереження за флуоресценцією хлорофілу

Робота 35. Визначення фотосенсибілізуючої дії хлорофілу (за методом О. А. Красновського)

Робота 36. Визначення активності реакції Хілла в хлоропластах за швидкістю відновлення акцептора електронів

Робота 37. Визначення міцності зв'язку хлорофілу з білок-ліпідним комплексом (ХБЛК) за М. М. Окунцовим

Робота 38. Визначення міцності хлорофіл-ліпо-протеїдного комплексу методом О. Г. Судьїної і М. Голод

Робота 39. Виділення та визначення кількості протохлорофіліду за

допомогою полярних і неполярних розчинників

Робота 40. Кількісне визначення фікобілінів

Робота 41. Визначення фікоціаніну за методом Р. М. Ротфарб, Т. Н. Годнева, В. Н. Гвардіян

Робота 42. Непластидні пігменти рослин. Визначення кількості антоціанів

Робота 43. Спектри поглинання пігментів

Робота 44. Визначення активності хлорофілази методом розділення фітольних і безфітольних пігментів

Робота 45. Визначення активності ферменту рибулозобісфосфат-карбоксилази (РУБІСКО)

Робота 46. Визначення інтенсивності фотосинтезу за накопиченням в листках органічного вуглецю (за методом Ф. З. Бородуліної)

Робота 47. Визначення інтенсивності фотосинтезу водних рослин за кількістю CO_2 , розчиненого у воді

Робота 48. Визначення інтенсивності фотосинтезу за поглинанням CO_2 у замкнутому просторі (за методом Л. А. Іванова і Н. Л. Коссовича)

Робота 49. Визначення інтенсивності фотосинтезу газометричним методом у течії повітря (за методом Й. Чатського і Б. Славіка)

Робота 50. Йодометричний метод визначення вмісту кисню у воді як продукту фотосинтезу (за методом Л. В. Вінклера)

Робота 51. Виявлення первинного крохмалю, синтезованого в процесі фотосинтезу в листках рослин (проба Ю. Сакса)

Робота 52. Виділення кисню в процесі фотосинтезу

Контрольні запитання та завдання до розділу „Фотосинтез”

РОЗДІЛ 4. Дихання рослин (Паршикова Т. В., Мусієнко М. М.)

Робота 53. Визначення інтенсивності дихання за кількістю виділеної вуглекислоти (за П. Бойсен-Йенсен)

Робота 54. Визначення дихального коефіцієнта у різних рослин

Робота 55. Визначення інтенсивності дихання та дихального коефіцієнта допомогою респіраторного приладу І. М. Толмачова

Робота 56. Визначення загальної дегідрогеназної активності за Т. Тунбергом

Робота 57. Мікрометод визначення активності дегідрогеназ за допомогою вакуум-інфільтрації (за В. В. Пильневим)

Робота 58. Визначення активності пероксидази

Робота 59. Визначення пероксидазної активності в соку картоплі

Робота 60. Визначення активності поліфенолоксидази в рослинних тканинах (за О. М. Бояркіним)

Робота 61. Визначення активності поліфенолоксидази в присутності

пероксидази (за Д. М. Міхліним та С. Броновицькою)
Робота 62. Вплив динітрофенолу на постування води в тканини бульби картоплі
Робота 63. Визначення вмісту аскорбінової кислоти, глутатіону та загальної редуруючої активності рослинної тканини (за Петт в модифікації С. М. Прокошева)
Контрольні запитання та завдання до розділу „Дихання рослин”

РОЗДІЛ 5. Кореневе живлення рослин (Войцехівська О.В., Косик О.І.)

Робота 64. Визначення вмісту золи у різних органах рослин
Робота 65. Мікрохімічний аналіз золи
Робота 66. Визначення в золі макро- і мікроелементів
Робота 67. Виготовлення живильних розчинів
Робота 68. Вирощування рослин методом водної культури з вилученням того чи іншого поживного елемента
Робота 69. Вплив кореневої системи на рН живильного розчину
Робота 70. Вплив різної концентрації водневих йонів живильного розчину на морфометричні показники рослин
Робота 71. Визначення об'єму кореневої системи (методом Д. А. Сабініна та І. І. Колосова)
Робота 72. Визначення загальної, робочої і неробочої адсорбційної поверхні кореневої системи
Робота 73. Виявлення антагоністичного впливу йонів на ріст і розвиток рослин
Робота 74. Антагоністичний вплив йонів K^+ та Ca^{2+} на цитоплазму рослинної клітини
Робота 75. Фізіологічна роль мікроелементів (бору і мангану) у житті рослин
Робота 76. Хімічний аналіз соку рослин (за К. П. Магницьким)
Робота 77. Визначення нітратів в рослинах і субстратах живлення (методом Гранваль-Ляжу)
Робота 78. Спрощений метод визначення нітратів у рослинах
Робота 79. Визначення поглинання рослинами нітратів та амонію ...
Робота 80. Визначення нітратного та амонійного азоту в рослинах потенціометричним методом
Робота 81. Визначення нітритів (NO_2) у рослинах
Робота 82. Визначення аміаку з використанням реактиву Неслера
Робота 83. Виявлення радіоактивних елементів у рослин методом радіоавтографії
Контрольні запитання та завдання до розділу „Кореневе живлення рослин”

РОЗДІЛ 6. Стійкість рослин (Капустян А. В.)

Робота 84. Структурно-функціональні ознаки пристосування рослин до нестачі води. Ярусна мінливість ксеноморфних ознак (закон В. Р. Заленського)
Робота 85. Визначення жаростійкості рослин (за Ф. Ф. Мацковим)
Робота 86. Діагностика жаростійкості рослин за в'язкістю цитоплазми
Робота 87. Визначення температурної межі коагуляції цитоплазми (за П. А. Генкелем)
Робота 88. Оцінка холодостійкості рослин на перших етапах росту й розвитку
Робота 89. Захисна дія цукрів на цитоплазму
Робота 90. Захисний вплив цукрів на коагуляцію білків цитоплазми за дії низьких температур
Робота 91. Визначення морозостійкості органів плодів культур
Робота 92. Перетворення запасних речовин у пагонах деревних рослин у зимовий період
Робота 93. Визначення життєздатності озимих зернових культур
Робота 94. Діагностика газостійкості рослин
Контрольні запитання та завдання до розділу „Стійкість рослин”

РОЗДІЛ 7. Ріст і розвиток рослин (Панюта О. О., Славний П. С.)

Робота 95. Виявлення зон росту коренів і стебел методом позначок ...
Робота 96. Особливості клітин в зоні росту коренів
Робота 97. Виявлення впливу індолілоцтової кислоти (ІОК) на ріст відрізків колеоптилів вівса.....
Робота 98. Вплив ауксинів на ріст відрізків колеоптилів злаків
Робота 99. Вплив індолілоцтової кислоти на ризогенез (укорінення) живців
Робота 100. Апікальне домінування у рослин
Робота 101. Виявлення значення гіберелінів у проростанні насіння
Робота 102. Вплив гібереліну на активність гідролітичних ферментів у зернівках злаків
Робота 103. Гістохімічне виявлення розподілу ауксинів у рослинах
Робота 104. Спостереження за фізіологічними ефектами цитокиніну ...
Робота 105. Виявлення антагонізму дії цитокиніну і абсцизової кислоти
Робота 106. Вплив етилену на ростові процеси у рослин
Робота 107. Спостереження за швидкістю росту пилкових трубок
Робота 108. Визначення фертильності пилкових зерен

Робота 109. Вплив ауксину, гібереліну й цитокініну на проростання пилку	
Робота 110. Визначення життєздатності насіння люмінесцентним методом	
Робота 111. Визначення життєздатності насіння із застосуванням анілінових барвників	
Робота 112. Визначення схожості насіння пшениці за методом Гуревича.....	
Робота 113. Визначення закінчення яровизації за методом М.О. Бассарської.....	
Робота 114. Виявлення амілази в насінні, що проростає	
Робота 115. Перетворення речовин під час проростання насіння.....	
Робота 116. Спостереження за фототропічною реакцією рослини	
Робота 117. Спостереження за геотропічною реакцією рослини	
Робота 118. Спостереження за гідротропічною реакцією рослини	
Робота 119. Розмноження рослин трав'янистими живцями	
Робота 120. Розмноження рослин дерев'янілими живцями	
Робота 121. Розмноження рослин щепленням	
<i>Контрольні запитання та завдання до розділу „Ріст і розвиток рослин”</i>	

РОЗДІЛ 8. Фітобіотехнологія (Панюта О. О., Мусієнко М. М.)

Робота 122. Методи стерилізації посуду, інструментів і допоміжних матеріалів	
Робота 123. Приготування маточних розчинів для середовища Мурасиге і Скуга.....	
Робота 124. Приготування середовища Мурасиге і Скуга.....	
Робота 125. Стерилізація насіння та вирощування асептичних рослин.....	
Робота 126. Стерилізація бульб, коренеплодів і кореневищ	
Робота 127. Мікроклональне розмноження рослин живцями	
Робота 128. Отримання первинної калюсної культури.....	
Робота 129. Дослідження фізіологічної полярності.....	
Робота 130. Отримання перевивної калюсної культури	
Робота 131. Вплив співвідношення ауксин: цитокінін на ріст калюсної тканини та її тип.....	
Робота 132. Отримання клітинної суспензії.....	
<i>Контрольні запитання та завдання до розділу „Фітобіотехнологія”.</i>	

Додатки

Список літератури

ПЕРЕДМОВА

Запропонований увазі читачів практикум розрахований на поглиблення вивчення лекційного курсу і набуття навичок експериментальних досліджень. В ньому представлені завдання, які сприятимуть формуванню у студентів уявлень щодо фізіолого-біохімічних процесів, що відбуваються у рослинах, а також можливості їх регуляції зовнішніми факторами та вмотивованими діями. Впроваджена нами система проведення малого практикуму дозволяє студентам оволодіти основними методами фітофізіології, привчає їх до вдумливого аналізу одержаних результатів, вміння ставити завдання та знаходити шляхи їх вирішення.

Практикум складається з 8 розділів: фізіологія рослинної клітини, водний режим, фотосинтез, дихання, кореневе живлення, стійкість рослин до несприятливих факторів середовища, ріст і розвиток рослин, фітобіотехнологія. Заняття з розділу 1 «Фізіологія рослинної клітини» дають можливість досліджувати функції клітинних мембран, в'язкість цитоплазми, вести спостереження явищ плазмолізу і деплазмолізу, вивчати фізіологічні реакції, що відбуваються в рослинній клітині за дії несприятливих факторів довкілля. Розділ 2 «Водний режим рослин» розглядає питання, присвячені дослідженню значення води в життєдіяльності рослин, процесів надходження води в рослину, спостереженням за транспірацією у рослин. Розділ 3 «Фотосинтез» основну увагу зосереджує на вивченні хімічної будови та властивостей фотосинтезуючих пігментів рослин, визначенні активності деяких ферментів фотосинтезу, методів оцінки інтенсивності фотосинтезу наземних та водних рослин. У розділі 4 «Дихання» подаються апаратні та біохімічні методи вивчення дихання рослин, а також каталітичні системи дихання. У розділі 5 «Кореневе живлення рослин» звертається увага на питання і методи вивчення кореневої системи, визначення складу золи рослин та встановлюється функціональне значення найважливіших макро- та мікроелементів. У розділі 6 «Стійкість рослин» увага зосереджена на основних типах резистентності рослин, а саме: посухо- та жаростійкості, холодо- та морозостійкості, солестійкості, газостійкості. Розділ 7 «Ріст і розвиток рослин» має у своєму складі теми для закріплення навичок по вивченню фітогормонів та їх участі

у ростових рухах рослин. У розділі 8 «Фітобіотехнологія» подаються основні відомості для засвоєння методу культури тканин, який дає можливість регенерувати рослини з окремої клітини чи групи клітин.

Описані заняття в основному реалізуються за одну пару, однак інколи дослід закладають на одному занятті, а спостереження проводять під час наступних. Це, зокрема, притаманне для розділів «Ріст і розвиток рослин», «Фітобіотехнологія». Більш трудомісткі завдання, на виконання яких необхідно багато часу, до цього практикуму не включені, оскільки їх виконують на великих практикумах кафедр, котрі готують студентів за фахом «фізіологія та біохімія рослин». Виконання складних завдань потребує використання додаткових спеціальних керівництв та довідників.

Для кожного заняття, наведеного в практикумі, подано перелік матеріалів та обладнання для його виконання, коротке теоретичне пояснення, описання ходу роботи, методичні рекомендації з оформлення результатів роботи (форми таблиць, формули для розрахунків), питання і завдання для формулювання висновків. Під час практичних занять кожному студенту або групі з двох-трьох студентів пропонується виконати свій варіант досліду: з рослинами різних екологічних груп або с рослинами, вирощеними в контрольованих умовах навколишнього середовища, а також з виявлення впливу певних факторів на життєдіяльність рослин. Кожний студент або група після виконання завдання оформляє результати проведеної роботи у вигляді протоколу, який складається з назви та мети заняття, методики його проведення, містить перелік дій експерименту, результати спостереження та висновки. Якісні та кількісні результати роботи подають у вигляді словесного описання, таблиць, графіків, гістограм, діаграм тощо. Контрольні запитання та завдання, наведені у кінці кожної роботи практикуму, допоможуть студентам закріпити матеріал, вивчений під час практичних занять. Практикум містить додатки, в яких наведені рецепти приготування реактивів і довідкові матеріали.

Автори мають надію, що запропонований практикум з фізіології рослин спонукає читача замислитися над розробкою і створенням нових оригінальних методик для вивчення рослинного світу.

Розділ 1.

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИННОЇ КЛІТИНИ

Клітина – елементарна структурно-функціональна одиниця рослинного організму. Вона здатна до самовідтворення і характеризується специфічними особливостями, які відрізняють її від клітин тваринного походження (наявністю добре розвинутої целюлозної оболонки, пластид, вакуолярної системи, специфічним ростом розтягненням).

Різноманітні функції клітин здійснюються спеціалізованими внутрішньоклітинними структурами – органелами. У зв'язку з їх мікроскопічними й субмікроскопічними розмірами, надзвичайною чутливістю до впливів навколишнього середовища, збереженням нативних властивостей лише у цілій життєдіяльній клітині дослідження фізіології органел і функціонального стану самої клітини є надзвичайно складними в методичному й технічному відношеннях і такі роботи в практикумі не розглядатимуться.

Важлива характерна ознака рослинної клітини – наявність *вакуолі*, яка відмежована від цитоплазми одношаровою мембраною – тонопластом. Це компартмент, у якому міститься водний розчин мінеральних речовин, цукрів, органічних кислот, амінокислот тощо. Саме концентрацією розчинених речовин і відповідно осмотичним потенціалом вакуолярного соку, оточеного напівпроникною мембраною, визначається здатність клітин поглинати воду з навколишнього середовища. Крім того, вакуоля притискає цитоплазму клітини з розташованими в ній пластидами до клітинної стінки, сприяючи тим самим успішнішому перебігу процесу фотосинтезу. Вакуоля сприяє також створенню тургорного стану клітини, за якого її вміст насичений водою тисне на клітинну стінку. В стані повного насичення клітини водою тургорний протитиск повністю зрівноважує осмотичний, і клітина припиняє поглинати воду. Найбільшу сисну силу клітина має якщо повністю відсутній тургор. У цей момент здатність клітини поглинати воду визначається її осмотичним потенціалом. Рушійною силою надходження води в клітину є різниця хімічних потенціалів води в клітині та навколишньому середовищі. Хімічний потенціал чистої води завжди більший за її хімічний потенціал в розчині (клітині). Чим вища концентрація сполук усередині

клітини, тим менший хімічний потенціал внутрішньоклітинної води і тим швидше вода надходить в клітину.

Осмотичний рух води в клітину відбувається пасивно, без енергетичних затрат. Мінеральні ж елементи здебільшого надходять крізь клітинні мембрани проти електрохімічного градієнта активно, за допомогою специфічних білків-переносників і з затратою енергії АТФ. Завдяки добре розвиненій системі внутрішніх мембран і плазмалемі в клітинах підтримується відповідний йонний склад вакуолярного розчину і цитоплазми, що визначає статус клітини як колоїдно-осмотичної системи. Мембранний принцип будови протопласта реалізується в різноманітних проявах осмотичних властивостей нативних клітин. Зокрема, на цьому базуються принципи практичних робіт вивчення явищ плазмолізу й деплазмолізу, визначення осмотичного тиску клітинного соку, проникності живих і ушкоджених мембран тощо. Більшість із цих робіт мають діагностичне й прикладне значення, зокрема для первинної оцінки фізіологічного стану рослин в умовах відкритого та закритого ґрунту.

Частину робіт присвячено вивченню структурно-функціональних властивостей живого вмісту клітини. Так, встановлення порівняльної здатності до проникності плазмалемі й тонопласту, впливу деяких йонів на в'язкість цитоплазми, тестування ступеня ушкодження тканин за зміною проникності мембран використовують для лабораторно-польових методів діагностики стану рослинних організмів за умов дії на них несприятливих факторів середовища. Досить інформативними й показовими є роботи щодо вивчення процесів і явищ, зумовлених властивостями й результатами сумісної діяльності вакуолей і цитоплазматичного вмісту рослинних клітин. Практичні аспекти цих робіт теж не викликають сумніву.

У процесі еволюції у клітинах усіх живих організмів вироблений механізм типового неспецифічного реагування – загальна неспецифічна реакція на ушкоджуючу дію, проявом якої є однотипні зміни: зменшення дисперсності колоїдів цитоплазми, збільшення спорідненості цитоплазми і ядра до низки барвників, зміна клітинної проникності, підвищення кислотності цитоплазми, зміна здатності до гранулоутворення. Згідно денатураційної теорії всі ці прояви неспецифічної реакції зумовлені зворотною денатурацією протеїнів, які є складовою протоплазми клітин.

Сьогодні більшість положень денатураційної теорії уточнені

та конкретизовані з позицій сучасних досягнень біології. З'ясовано, що неспецифічна відповідь клітин на пошкоджуючий агент зумовлена загальними для них особливостями структурно-функціональної організації.

По-перше, нерівномірність просторового розподілу низькомолекулярних органічних сполук: цукрів, амінокислот, нуклеотидів, жирних кислот по всій клітині (компарменталізація). По-друге – неспецифічне інгібування біологічної активності макромолекул низькомолекулярними клітинними субстратами. Зсув рівноваги між активним транспортуванням низькомолекулярних сполук та їхньою дифузією, який спричинює декомпарменталізацію клітинних субстратів та інгібування ними метаболізму – основні фактори, які зумовлюють неспецифічну реакцію клітини.

У відповідь на дію модельного токсиканту в клітині відбувається комплекс змін, які характеризують її загальну неспецифічну реакцію. Деякі з них можна вимірювати і, завдяки цьому, використовувати як маркери на дію токсичних речовин. Це, насамперед, зміни в'язкості цитоплазми та проникності мембран, зсув йонного балансу, бубнявіння хлоропластів, зменшення дисперсності колоїдів цитоплазми, зміна форми клітини, збільшення спорідненості цитоплазми й ядра клітини до низки барвників, зміна процесу грануловідкладання вітальних барвників і дифузного забарвлення протоплазми.

За цими неспецифічними реакціями клітини, що легко речструються під мікроскопом, можна робити висновок про стан їхньої життєдіяльності та про пошкодження в його початковій оборотній фазі. Вони мають суттєве значення в цитоекологічних дослідженнях.

Встановлення характеру цих змін дає змогу зробити відповідні висновки про резистентність клітин, органів або організмів до несприятливих умов довкілля і вести цілеспрямований пошук умов або прийомів, які б сприяли підвищенню стійкості і продуктивності досліджуваних об'єктів.

Роботи цього розділу створюють теоретичну й практичну основу для ефективного виконання завдань і засвоєння матеріалу наступного розділу – вивчення водного режиму рослин.

Робота 1. ПРОНИКНІСТЬ НАТИВНИХ І ПОШКОДЖЕНИХ МЕМБРАН КЛІТИНИ ДЛЯ РЕЧОВИН КЛІТИННОГО СОКУ ЗАЛЕЖНО ВІД ТЕМПЕРАТУРИ

До основних цитоплазматичних мембран рослинної клітини відносять *плазмалему* та *тонопласт*. *Плазмалема* – мембрана, що відокремлює весь живий вміст клітини (протопласт) від клітинної стінки, *тонопласт* – вакуолярна мембрана. Розрізняють також мембрани ядра, мітохондрій, пластид, субодиноць апарату Гольджі, ендоплазматичного ретикулуму тощо.

Основними хімічними складовими мембран є ліпіди та білки. Згідно сучасних уявлень мембрани мають рідинно-мозаїчну будову, за якою молекули білків у біліпідному шарі утворюють щось подібне до мозаїки.

Ліпіди в мембранах представлені фосфоліпідами, гліколіпідами та стеролами. Полярні групи або молекули мають заряд і проявляють спорідненість до води (гідрофільні), тоді як неполярні з водою не змішуються (гідрофобні). Тому за складом ліпідів біологічні мембрани асиметричні.

Ненасичені жирні кислоти та полярні ліпіди забезпечують розріджений стан мембран в нормальних фізіологічних умовах. За низьких температур ліпідний шар перетворюється на тверде кристалоподібне тіло. Підвищення температури зумовлює відновлення розрідженого стану, причому ці зміни відбуваються в досить вузькому температурному інтервалі, що нагадує фазові переходи під час плавлення якогось тіла. Чим більше ненасичених жирних кислот входить до складу мембрани, тим нижчою є температура фазового переходу. Дане фізіологічне явище – *плинність мембран* – має надзвичайно важливе значення в процесах адаптації рослин до несприятливих факторів довкілля.

Білки мембран інкрустують біліпідний шар: деякі з них частково занурені в мембрану, інші пронизують всю її товщину. Гідрофобні ділянки білків взаємодіють з ліпідами, гідрофільні – контактують з протопластом. Мембранні ліпіди створюють середовище, потрібне для функціонування білків. Білки мембран забезпечують різноманітні функції, наприклад, ферментів, йонних каналів і насосів, транспортних переносників, рецепторів, а також структурних білків.

Цитоплазматичні мембрани за своїми властивостями є напівпроникними, тобто легко пропускають воду і дуже повільно розчинені речовини. *Вибіркова проникність* мембран є важливою

властивістю живих непошкоджених клітин, що забезпечує збереження внутрішньоклітинного середовища (*гомеостазу*). У вакуолях клітин покривних і деяких типів паренхімних тканин часто концентруються водорозчинні пігменти – *антоціани*, *флавоноли*, *беталаніни* тощо, компартменталізація яких забезпечується тонопластом. У разі пошкодження мембран різними стресовими чинниками розмежування речовин зникає і вони вільно дифундують по клітині та за її межами.

Мета роботи. Дослідити залежність проникності клітинних мембран від температурного фактору.

Матеріали, реактиви, обладнання. Столовий буряк; гаряча вода; порцелянові чашки, порцелянові стакани місткістю 200 мл, свердла діаметром 5 мм, пробірки, термометри, фотоелектроколориметр (ФЕК).

Хід роботи.

1. Вирізати з очищеного коренеплоду столового буряка чотири однакових брусочки завдовжки 2 і завтовшки 0,5 см. Кілька разів промити їх у порцеляновій чашці водогінною водою, поки на поверхні бруска не припиниться виділення забарвлених пігментів із пошкоджених клітин.

2. Брусочки помістити у 5 пробірок, у які налити по 10 мл води. Одну з пробірок залишити у штативі (контроль) за кімнатної температури, а інші витримати по 10 хв у посудинах з водою, нагрітою до різних температур згідно схеми досліду (табл. 1.1).

Примітка. Вміст пробірок періодично збовтувати.

3. Виміряти оптичну густину розчинів у пробірках за допомогою ФЕК при зеленому світлофільтрі ($\lambda=540\div550$ нм.)

4. Результати спостережень записати у таблицю 1.1.

Таблиця 1.1. Вплив температури на проникність мембран клітин для речовин клітинного соку

Схема досліду	Оптична густина розчину
Контроль	
Водяна баня 40° С	
50° С	
60° С	
70° С	

5. Побудувати графік залежності інтенсивності забарвлення рідини в пробірках від температури.
6. Зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Яка модель рослинної мембрани визнана універсальною?
2. Яка роль ненасичених жирних кислот та полярних ліпідів у складі мембран?
3. Що таке плинність мембран, яке її значення в процесах адаптації рослин до дії низьких температур?
4. Чому за дії високих температур спостерігається інтенсивна дифузія антоціанів з тканин червоного буряка?
5. Вплив яких факторів може зумовити вихід вакуолярних пігментів у середовище?
6. Яке значення напівпроникності мембран у житті рослини?
7. Поясніть зміну кольору листків і пелюсток квіток жоржин, шавлії садової та інших рослин після осіннього приморозку.

Робота 2. ДІАГНОСТИКА ПОШКОДЖЕННЯ РОСЛИННИХ ТКАНИН ЗА ЗМІНОЮ ПРОНИКНОСТІ МЕМБРАН ЦИТОПЛАЗМИ

До основних функцій, які виконують мембрани належать: *бар'єрна, транспортна, осмотична, електрична, структурна, енергетична, біосинтетична, секреторна, рецепторно-регуляторна*. Кожна органела теж має власні функції, що здійснюються в унікальному внутрішньому середовищі. Створюється це середовище завдяки вибіркової проникності та іншим специфічним властивостям мембрани, що оточують органелу та відокремлюють її від решти компартментів протопласта. Таким чином, у живій клітині завдяки наявності цитоплазматичних мембран зберігається внутрішньоклітинний *гомеостаз*. У разі їх пошкодження ця властивість втрачається і речовини, що містяться в клітинному соку, дифундують у середовище. Ступінь пошкодження корелює з кількістю виділених назовні речовин. Отже, інтенсивність виходу сполук із клітини є критерієм пошкодження мембран.

Мета роботи. Дослідити дію різних факторів на проникність мембран рослинної клітини.

Матеріали, реактиви, обладнання. Коренеплоди червоного буряка; хлороформ, 50 %-й розчин оцтової кислоти, 40 %-й розчин спирту, 1 М розчин KNO_3 , гаряча вода; свердла діаметром 7÷8 мм, пробірки, мірні пробірки місткістю 10 мл, лінійки, мікроскопи, предметні стекла та накривні скельця, ФЕК.

Хід роботи.

1. Із коренеплоду червоного буряка свердлом діаметром 7÷8 мм вирізати п'ять циліндричних брусків завдовжки 3 см, старанно промити їх у водогінній воді та внести по одному в п'ять пробірок, які містять по 5 мл різних розчинів відповідно до схеми досліду (табл. 1.2).

Таблиця 1.2. Вплив різних факторів на проникність мембран рослинної клітини

Номер пробірки	Схема досліду	Оптична густина розчинів, ум. од.
1	Контроль (водогінна вода кімнатної температури)	
2	Кипляча водогінна вода (див. примітку)	
3	Водогінна вода + 5 краплин хлороформу	
4	30%-й розчин оцтової кислоти	
5	40%-й розчин спирту	

Примітка. Варіант 2 реалізують так. Витримати 2 хв. у киплячій воді один із брусків буряка, потім його вийняти, охолодити й опустити в пробірку з 5 мл водогінної води кімнатної температури.

2. За 30 хв. після початку досліду вміст всіх пробірок ретельно перемішати, бруски буряка вийняти.

3. Виміряти оптичну густина розчинів у пробірках за допомогою ФЕК при зеленому світлофільтрі ($\lambda=540\div550$ нм.). Результати записати у таблицю 1.2.

4. Зробити висновки щодо рівня ушкодження рослинних тканин за дії досліджуваних факторів.

Контрольні запитання та завдання

1. Які функції рослинних мембран Вам відомі?
2. Що таке гомеостаз?
3. Чому інтенсивність виходу сполук із клітини може бути критерієм їх ушкодження?
4. Який із факторів зумовив найбільше пошкодження мембран і чому?
5. Які фактори доквілля впливають на проникність клітинних мембран у природних умовах?
6. Чи пропускає жива протоплазма речовини клітинного соку?
7. Чим пояснюється неоднакова швидкість забарвлення рідини у різних варіантах досліду?
8. Чим зумовлена напівпроникність живої цитоплазми?

Робота 3. ПОРІВНЯЛЬНА ЗДАТНІСТЬ ПРОНИКНОСТІ ПЛАЗМАЛЕМИ І ТОНОПЛАСТА

Транспортування йонів крізь мембрану може бути *пасивним* і *активним*. *Пасивне транспортування* (неспецифічна дифузія CO_2 та O_2 , пори, канали, везикулярне транспортування) відбувається без витрат метаболічної енергії за градієнтом даної речовини. Рушійною силою пасивного транспортування йонів крізь мембрану є *електрохімічний потенціал*. *Активне транспортування* – це процес перенесення молекул або йонів крізь мембрану проти електрохімічного градієнта поєднаний з використанням енергії.

Транспорт заряджених гідратованих йонів полегшують спеціальні транспортні білки: *канали*, *білки-переносники (портери)* і *насоси (помпи)*.

Канали – це трансмембранні білки, здатні відкриватися і закриватися внаслідок конформаційних змін білка. Видовжені молекули білків каналів мають заряд і заповнені водою. Канали пропускають йони вибірково, залежно від їхнього заряду і розміру гідратної оболонки. Через канали здійснюється, головним чином, пасивний транспорт. Швидкість дифузії через відкритий канал дуже велика – 10^6 йонів за секунду. Зараз встановлена наявність каналів для K^+ , Ca^{2+} , Cl^- та води (*аквапоріни*).

Білки-переносники спочатку приєднують до себе на певне міс-

це речовину, яку вони переносять, а потім, дифундують разом із нею крізь мембрану. Процес транспортування закінчується, коли перенесена речовина від'єднується від переносника і він повертається у початкове положення. Білки-переносники переносять $10^4 \div 10^5$ йонів за секунду, тобто вони працюють значно повільніше, ніж канали. Транспортування за допомогою переносників може бути пасивним і активним. *Пасивне транспортування* за допомогою білків-переносників називають *полегшеною дифузією*. При полегшеній дифузії, як і при простій дифузії, напрямок руху залежить від концентраційного градієнта (для незаряджених молекул) або від електрохімічного градієнта (для йонів).

Мембранні білки, пов'язані з активним транспортуванням, називаються *насосами*, тому що за їх роботи йони рухаються з одного боку мембрани на протилежний проти електрохімічного градієнту. Насоси переносять Na^+ , Ca^{2+} , K^+ та H^+ . Активне транспортування чутливе до кисню та метаболічних отрут і слугує для накопичення речовин, концентрація яких назовні незначна, або для видалення речовин, якщо в клітині вони знаходяться у незначній концентрації. Активне транспортування здійснюється за рахунок енергії АТФ, або енергії окисно-відновних реакцій, яка виділяється у ланцюгу перенесення електронів у мітохондріях та хлоропластах. На сьогодні досить детально вивчені такі насоси як H^+ -АТФази і Ca^{2+} -АТФази.

Щоб охарактеризувати функціональний стан клітини і її осмотичні властивості, використовують порівняльну здатність до проникності клітинних мембран – плазмалеми і тонопласта.

Зовнішня цитоплазматична мембрана – плазмалема має вищу проникність, ніж тонопласт. У цьому можна переконатися, спостерігаючи набрякання цитоплазми під впливом йонів калію, що в ній накопичуються.

Мета роботи. Виявлення плазмалеми і тонопласта в рослинній клітині та вивчення їхньої проникності.

Матеріали, реактиви, обладнання. Цибуля ріпчаста; 1 М розчин KNO_3 , розчин еозину (50 мг в 100 мл); мікроскопи, предметні стекла та накривні скельця.

Хід роботи.

1. Нанести на предметне скло велику краплину 1 М розчину

KNO_3 з розчином еозину і помістити в неї 2÷3 шматочки епідерми внутрішньої (угнутої) сторони луски цибулі. Накрити скельцем і спостерігати в клітинах розвиток ковпачкового плазмолізу.

Примітка. Спочатку цитоплазма оточує вакуолю тонким шаром. Пізніше цитоплазматичний шар набрякає, істотно потовщується (особливо з протилежних боків вакуолі) у вигляді ковпачків і забарвлюється еозином в оранжевий колір. Згодом цитоплазма відмирає від надлишку прониклих у неї йонів калію, внаслідок чого крізь плазмалему легко проникає еозин.

На препараті видно, що забарвлюється лише цитоплазма. Вакуоля залишається безбарвною, що свідчить про різну проникну здатність плазмалеми і тонопласта. Тонoplast зберігає свої напівпроникні властивості.

2. Описати досліджувані реакції і зарисувати клітини до і після досліду.

3. Зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Які особливості транспортування йонів крізь напівпроникні мембрани?

2. Схарактеризуйте транспортні білки локалізовані у мембрані.

3. Що є рушійною силою активного і пасивного транспортування йонів?

4. Що таке полегшена дифузія?

5. Що є джерелом енергії для активного транспортування йонів?

6. Що свідчить про різну проникність йонів калію крізь плазмалему і тонопласт?

7. Поясніть, що зумовлює набрякання цитоплазми.

8. Який фізіологічний сенс різної проникності плазмалеми і тонопласта?

Робота 4. ВИЗНАЧЕННЯ ІЗОЕЛЕКТРИЧНОЇ ТОЧКИ (ІЕТ) РОСЛИННИХ ТКАНИН

Амінокислоти і білки цитоплазми – це так звані амфотерні сполуки. В розчині вони можуть дисоціювати як кислоти та осно-

ви. За високої концентрації H^+ кислотна дисоціація пригнічена і білок (амінокислота) набуває позитивного заряду і, навпаки, за підвищеної концентрації OH^- білок (амінокислота) набуває негативного заряду.

За відповідної величини рН середовища дисоціація пригнічена однаково, і амфоліт стає електронейтральним. Таке значення рН середовища називають *ізоелектричною точкою (ІЕТ)*. Значення її у кожного білка різне та залежить від співвідношення вільних карбоксильних і амінних груп. Так, наприклад, для казеїну, желатину, альбуміну величина рН ІЕТ 4,6÷4,7; для протаміну – 10÷12. Якщо ІЕТ білків відома, можна зробити висновок про співвідношення в їх складі кислих і основних амінокислот.

Якщо дисоціація амфоліту відбувається за типом основи (в середовищах із рН нижче ІЕТ), то позитивний заряд зв'яже аніони, а якщо за типом кислоти (в середовищах із рН вище ІЕТ), то від'ємний заряд зв'яже катіони.

Для визначення ІЕТ використовують барвник еозин, аніон якого має рожеве забарвлення, та метиленовий синій, колір якого зумовлений катіоном.

Амфоліти клітини зв'язують еозин або метиленовий синій залежно від їхнього заряду і набувають рожевого або синього забарвлення, а у разі перебування амфоліту в ІЕТ забарвлення його буде проміжним – фіолетовим. Залежність адсорбції йонів барвника від рН середовища можна визначити також графічно, якщо на горизонтальній вісі відкладати величину рН зовнішнього розчину, а по вертикалі – кількість адсорбованого барвника.

Мета роботи. Визначити ІЕТ у рослинах кореня гороху або кукурудзи залежно від вмісту в них води.

Матеріали, реактиви, обладнання. Дослідні рослини; 70 %-й етиловий спирт, 0,1 %-й розчин еозину, 0,002 %-й розчин метиленового синього, 0,1 М розчин лимонної кислоти, 0,2 М розчин Na_2HPO_4 ; піпетки, мікроскопи, предметні стекла та накривні скельця, чашки Петрі.

Хід роботи.

1. Приготувати по 10 мл буферних розчинів (табл. 1.3).

Таблиця 1.3. Схема приготування буферних розчинів з рН 2,2÷8,0

Номер пробірки	рН	0,2 М Na ₂ HPO ₄	0,1 М лимонна кислота
1	2,2	0,2	9,8
2	3,0	2,1	7,9
3	3,6	3,2	6,8
4	5,0	5,1	4,8
5	5,4	5,6	4,4
6	6,0	6,3	3,7
7	7,0	8,2	1,8
8	8,0	9,7	0,3

2. На відстані 0,5 см від кінчика кореня з рослин, що вирощувались за різної вологості субстрату, лезом зробити поперечні зрізи і занурити їх на 5 хв. у 70 %-й спирт.

3. В одну чашку Петрі налити 2÷3 мл 0,1 %-го розчину еозину, а в іншу – 2÷3 мл 0,002 %-го метиленового синього.

4. Зі спирту зрізи спочатку перенести в еозин на 10 хв., а потім (не промиваючи) на 10 хв. у метиленовий синій.

5. Зафарбовані у синій колір зрізи перенести у розчини з різним рН і експонувати їх впродовж 60÷120 хв.

6. Зрізи вийняти з розчинів, розкласти на предметному склі та розглянути під мікроскопом за малого збільшення.

Примітка. У розчинах з рН нижче ІЕТ забарвлення тканин буде рожевим, за рН вище ІЕТ – синім. Перехідне забарвлення розчину (фіолетове) вказує на те, що рН зовнішнього розчину відповідає ІЕТ тканини. ІЕТ кори та провідної тканини буде різною, що свідчить про неоднорідний склад цитоплазми в клітинах тканин.

7. Зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке ІЕТ рослинної тканини?
2. З якою метою вивчають ІЕТ тканин?
3. Чи може величина ІЕТ свідчити про направленість процесів життєдіяльності?
4. Якого забарвлення набувають флоемні елементи кореня?
5. Чи забарвлюватимуться ксилемні елементи кореня?
6. Чи потрібна фіксація рослинної клітини при визначенні ІЕТ?

Робота 5. ПЛАЗМОЛІЗ І ДЕПЛАЗМОЛІЗ У РОСЛИННИХ КЛІТИНАХ

Наочним проявом осмотичних і життєздатних властивостей рослинних клітин є притаманне їм явище плазмолізу та деплазмолізу. *Плазмоліз* – це явище відокремлення протопласта від клітинної стінки внаслідок втрати ним води за рахунок осмосу. Плазмоліз можна спричинити, помістивши клітини в гіпертонічний розчин, тобто розчин, концентрація якого більша, ніж вакуолярного соку. Внаслідок цього більш концентрований зовнішній розчин відбирає воду від вакуолі, об'єм якої зменшується, і шар цитоплазми, що притиснутий вакуолею до оболонки, відокремлюється від неї. Через деякий час, у зв'язку з тим, що цитоплазматичні мембрани пропускають не тільки воду, а й деякі речовини, у вакуолях підвищується концентрація клітинного соку. Тоді клітина починає осмотично поглинати воду. Об'єм плазмолізованого протопласта поступово збільшується, цитоплазма наближається до клітинної стінки – відбувається *деплазмоліз*. За швидкості деплазмолізу роблять висновок про швидкість проникнення у вакуолі різних речовин. Деплазмоліз істотно прискорюється у разі заміни плазмолітика на воду.

Плазмоліз найкраще спостерігати у рослин із забарвленим клітинним соком, оскільки сама цитоплазма безбарвна. Тому для роботи краще використовувати епідерму синьозабарвлених лусок цибулі, червоної капусти, традесканції, листки елодеї та валіснерії.

За певних умов освітлення препарату та стану цитоплазми на початковій фазі плазмолізу можна спостерігати її тоненькі тяжі, що тягнуться від поверхні протопласта до пор в оболонці. Це так звані *плазмодесмові нитки* (нитки Хехта), які свідчать про в'язкість та еластичність цитоплазми. Залежно від цього виникають різні форми плазмолізу: кутовий, увігнутий, опуклий, судомний, опуклий, судомний, ковпачковий (рис. 1.1).

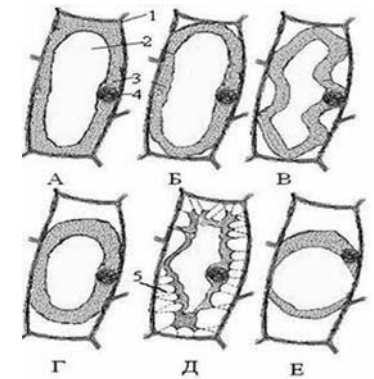


Рис. 1.1. Різні форми плазмолізу в клітинах епідерми цибулі: А – плазмоліз відсутній; Б – кутовий; В – увігнутий; Г – опуклий; Д – судомний; Е – ковпачковий; 1 – клітинна стінка; 2 – вакуоля; 3 – цитоплазма; 4 – ядро.

На форму плазмолізу впливають також йони плазмолітика. Так, йони калію зменшують, а йони кальцію підвищують в'язкість цитоплазми. Інколи навіть у суміжних клітинах спостерігаються різні форми плазмолізу, що свідчить про їхню неоднорідність.

Важливо, що здатність клітини до плазмолізу є достовірним показником її життєздатності та структурно-функціональної цілісності. За повільного плазмолізу клітини тривалий час залишаються живими. За наявності доступної для клітини води вони легко відновлюють стан тургору. Тривалий плазмоліз зумовлює загибель клітин. Явище плазмолізу використовують для визначення осмотичного потенціалу, в'язкості цитоплазми, проникності клітинних мембран тощо.

Мета роботи. Ознайомитися з явищем плазмолізу та деплазмолізу, визначити потрібні для цього умови, а також значення цих явищ у процесах життєдіяльності рослинних клітин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Цибуля синя або листки інших рослинних об'єктів; 1 М розчини плазмолітиків (NaCl або сахарози) у крапельницях; скальпелі, препарувальні голки, мікроскопи, предметні стекла та накривні скельця, скляні палички, стаканчики з водою, фільтрувальний папір, пінцети.

Хід роботи.

1. З опуклої частини луски цибулі або листка традесканції зняти пінцетом шматочки забарвленої епідерми і швидко покласти у краплину відстояної водогінної води нанесену на предметне скло та накрити накривним скельцем.

2. На малому збільшенні знайти ділянки препарату, де клітини найкраще забарвлені і не деформовані. Зарисувати форму і стан кількох типових клітин.

3. З одного боку накривного скельця нанести краплину 1 М розчину сахарози або NaCl, а з протилежного боку смужкою фільтрувального паперу відтягнути з-під накривного скельця воду.

Примітка. За кілька хвилин видно, як у забарвлених клітинах протопласт починає відокремлюватися від клітинної стінки (насамперед у кутах клітини). Поступово об'єм протопласта зменшується, поки він не перетвориться на кулясте утворення в центрі клітини, або поблизу однієї з клітинних стінок. За-

барвлення вакуолі стає значно яскравіше за рахунок зменшення її об'єму.

4. Розчин сахарози з-під накривного скельця відтягнути смужкою фільтрувального паперу та замінити на воду, при цьому спостерігають деплазмоліз рослинної клітини.

5. Зарисувати різні форми плазмолізу та деплазмолізу кількох клітин.

6. Зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Що міститься між плазмалемою і тонопластом?
2. Що таке нитки Хехта, коли вони виникають?
3. Чому плазмоліз спостерігається лише в живих клітинах?
4. Чи життєздатна плазмолізована клітина? Як це можна перевірити?
5. Чи можна спостерігати плазмоліз у безбарвних клітинах?
6. Чим плазмоліз відрізняється від циторізу?
7. Які осмотично активні речовини містить вакуолярний сік?
8. Які умови сприяють збереженню в клітинах ниток Хехта?

Робота 6. КОВПАЧКОВИЙ ПЛАЗМОЛІЗ

Рослинна клітина проявляє властивості осмотичної системи. Функцію напівпроникної оболонки виконують цитоплазматичні мембрани (*плазмалема* і *тонопласт*), а осмотично активного розчину – клітинний сік.

Якщо живі рослинні клітини експонувати у розчинах осмотично активних речовин різної концентрації (кожен з яких має певну величину осмотичного тиску), то їх реакція буде неоднаковою. Розчини, осмотичний тиск яких менший за осмотичний тиск клітинного соку, називають *гіпотонічними*. Якщо осмотичний тиск розчину більший за осмотичний тиск клітинного соку, то він *гіпертонічний*. Коли осмотичний тиск розчину дорівнюватиме осмотичному тиску клітинного соку, то його називають *ізотонічним*.

У разі занурення клітин у гіпертонічний розчин, з клітинного соку в середовище надходитиме вода до вирівнювання осмотичних тисків розчину і клітинного соку. Внаслідок втрати води

об'єм протопласта зменшується, він перестає тиснути на клітинну стінку, втрачається тургор, цитоплазма скорочується, ущільнюється – спостерігається явище плазмолізу.

Коли протопласт починає відділятися від клітинної стінки по кутах клітини спостерігається *початковий* або *кутовий* плазмоліз, коли в багатьох місцях – *увігнутий*, коли протопласт повністю відділяється від клітинної стінки – *опуклий* плазмоліз. Форма плазмолізу залежить також від в'язкості протоплазми та проникності її шарів.

Ковпачковий плазмоліз відбувається під дією катіонів і аніонів солей, які проникають крізь плазмалему в мезоплазму. Крізь тонопласт ці солі майже не проникають, або проникають дуже повільно. Накопичуючись у мезоплазмі, катіони солей зумовлюють її набухання, в результаті чого утворюються ковпачки на кінцях плазмолізованої цитоплазми (ковпачковий плазмоліз).

Мета роботи. З'ясувати причини виникнення ковпачкового плазмолізу.

Матеріали, реактиви, обладнання. Синя цибуля; 1 н. розчини KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 ; мікроскопи, предметні стекла та накривні скельця, пінцети, препарувальні голки, скляні бюкси або годинникові стекла, піпетки.

Хід роботи.

1. Шматочки забарвленої епідерми синьої цибулі покласти на 30÷60 хв. у скляні бюкси з 1 н. розчином KNO_3 .

2. Розглянути препарат під мікроскопом у краплині цього самого розчину.

Примітка. У багатьох клітинах спостерігають ковпачковий плазмоліз. На обох полюсах видно набряклу цитоплазму, що нагадує ковпачки. Ядро також істотно збільшується в об'ємі. Це явище зумовлене проникненням йонів K^+ , NO_3^- крізь плазмалему в мезоплазму. На препараті видно, що плазмалема і тонопласт відрізняються чіткими рівними контурами.

3. Відповідно до п.1 дослід провести і з розчином $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

Примітка. Плазмоліз не відбувається, бо йони кальцію діють на клітину протилежно йонам калію.

4. Клітини з ковпачковим плазмолізом перенести до 1 н. розчину CaCl_2 .

Примітка. Спостерігають перетворення ковпачкового плазмолізу на звичайний опуклий плазмоліз.

5. Зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Чому в плазмолізованому протопласті утворюються ковпачки?

2. Яка з мембран більш проникна – плазмалема чи тонопласт?

3. Що таке плазмоліз, чому він виникає?

4. Чи здатні до плазмолізу мертві клітини?

5. Які розчини називають гіпер-, гіпо- та ізотонічними?

6. Які типи плазмолізу Вам відомі?

Робота 7. ВИЗНАЧЕННЯ СТРУКТУРНОЇ В'ЯЗКОСТІ ПРОТОПЛАЗМИ ПЛАЗМОЛІТИЧНИМ МЕТОДОМ

В'язкістю називають властиву для рідин здатність чинити опір переміщенню одних її часток щодо інших. Вона зумовлена тертям між молекулами під час їхнього руху. На відміну від звичайних рідин, протоплазмі властива структурна в'язкість, тобто існування певної внутрішньої структури і взаємної орієнтації складових компонентів. Згідно даних А. Фрей-Вісслінга, протоплазма одночасно має ознаки рідини (текучість) і твердого тіла (еластичність), що проявляється в безперервній зміні сил зчеплення між біоколоїдами. Відповідно протоплазма періодично стає або рідшою (*золь*), або густішою (*гель*). Ця властивість тісно пов'язана з процесами життєдіяльності клітини та її біохімічною активністю.

Про в'язкість протоплазми роблять висновок за часом, який пройшов із моменту занурення клітин у гіпертонічний розчин до появи опуклої форми плазмолізу. Чим більший цей час, тим вища в'язкість протоплазми. Незважаючи на недосконалість методу його широко використовують для первинної оцінки різних впливів на структуру протоплазми.

Мета роботи. Виявити мінливість в'язкості протоплазми залежно від типу та віку клітин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Гілочки елодеї; 0,6 М розчин сахарози; мікроскоп, предметні стекла та накривні скельця, леза бритви, препарувальні голки, пінцети.

Хід роботи.

Примітка. Роботу зручно проводити з молодими листочками елодеї, оскільки у них чітко розрізняються чотири зони: в основі міститься зона поділу клітин (слабко забарвлена), вище зони поділу розташована зона розтягнення, ще вище – зона диференціації, а зелена верхівка листка складається зі старих клітин, які закінчили ріст.

1. Із верхівкової частини гілочки елодеї відібрати кілька листочків, що мають світло-зелену основу й інтенсивне зелене забарвлення у верхній частині. Занурити їх у краплину розчину сахарози на предметному склі і накрити накривним скельцем. Записати час початку досліду.

2. Кожні п'ять хвилин відмічати зміни, які відбуваються в клітинах. Визначити час плазмолізу, звертаючи увагу на швидкість процесу у різновікових клітинах елодеї.

3. Результати спостережень записати у таблицю 1.4.

Таблиця 1.4. Виявлення мінливості в'язкості протоплазми залежно від типу та віку клітин

Об'єкт дослідження	Плазмоліз (час експозиції/форма плазмолізу)							
	5 хв.		10 хв.		15 хв.		20 хв.	
	увігнутий	опуклий	увігн.	опукл.	увігн.	опукл.	увігн.	опукл.
Основа листка								
Зона розтягнення								
Зона диференціації								
Верхівка листка								

4. Зробити висновки про залежність в'язкості протоплазми від віку клітин.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке в'язкість рідини?
2. Який вид в'язкості характерний для цитоплазми?
3. Яке значення має в'язкість цитоплазми в житті клітини?
4. Від чого залежить в'язкість цитоплазми?

Робота 8. ВИЗНАЧЕННЯ В'ЯЗКОСТІ ЦИТОПЛАЗМИ РОСЛИН МЕТОДОМ ЦЕНТРИФУГУВАННЯ

Однією з важливих фізико-хімічних властивостей цитоплазми є в'язкість. На відміну від в'язкості звичайних рідин в'язкість цитоплазми зумовлена внутрішньою організацією всіх її складових частин, її ультраструктурою. Опір, який чинять рухові частинки лабільні елементи структури рідини, називають *структурною в'язкістю*. В'язкість цитоплазми легко змінюється під впливом зовнішніх факторів: температури, вологості, мінерального живлення тощо. За нею можна робити висновок про ступінь стійкості колоїдів цитоплазми. Йони кальцію й алюмінію підвищують в'язкість цитоплазми, а йони калію, навпаки, збільшуючи дисперсність колоїдів цитоплазми, зменшують її в'язкість.

В'язкість цитоплазми має велике значення для виживання рослин в умовах високих температур і дефіциту вологи у довкіллі. Особливого значення вона набуває для гідрофітів під час тимчасового пересихання водойм.

В'язкість цитоплазми залежить від зовнішніх і внутрішніх факторів, віку, фази онтогенезу, характеру екоотопу тощо. Її визначають різними способами. Одним із них є метод *центрифугування*. В основу цього методу покладено рівняння Стокса. За цим рівнянням швидкість падіння кульки (за сталого радіуса) обернено пропорційна в'язкості рідини. Мірою структурної в'язкості цитоплазми може бути та мінімальна величина відцентрового прискорення в одиницях g , за якою центрифугування протягом 10÷20 хв. зумовлює зміщення хлоропластів у 50 % клітин.

Відцентрове прискорення визначають за відношенням відцентрової сили до сили тяжіння:

$$C = \frac{(2\pi N)^2 r}{g},$$

де N – кількість обертів центрифуги за секунду;
 r – радіус центрифуги;
 g – прискорення сили тяжіння (981 см/с²).

Для порівняння дослідів визначають відносну в'язкість цитоплазми. Мірою її може бути кількість обертів центрифуги, яка потрібна для однакового зміщення хлоропластів. У навчальних лабораторіях для цього зручно використовувати малогабаритні центрифуги ЦУМ-1 або ЦЛН-2.

Мета роботи. Визначити в'язкість цитоплазми в листках водних рослин за дії різних температур методом центрифугування.

Матеріали, реактиви, обладнання. Водні рослини – елодея, наяда, валіснерія; етиловий спирт з кількома краплями концентрованої оцтової кислоти, ефір; склянки з водою, мікроскопи, предметні стекла та накривні скельця, леза, пінцети, препарувальні голки, піпетки, пробірки, малогабаритна центрифуга, центрифужні пробірки.

Хід роботи.

1. Декілька листочків елодеї, наяди і валіснерії покласти на 30 хв. у склянки з водою і помістити: перші – в холодильник за температури 2°C, другі – в термостат за температури 30°C, а треті залишити за кімнатної температури.

2. У центрифужні пробірки налити воду, покласти по 4÷5 листочків і центрифугувати протягом 10 хв. за різних швидкостей: 1000, 2000 і 3000 об/хв.

3. Після центрифугування листочки швидко перенести у фіксуючу рідину (як фіксатор можна використовувати етиловий спирт з кількома краплями концентрованої оцтової кислоти), промити водою і розглянути під мікроскопом.

4. У листочках, де в результаті центрифугування в полі зору мікроскопа відбувається зміщення хлоропластів у 50 % клітин, обчислити структурну в'язкість цитоплазми.

5. Листочки знову помістити на 10 хв. у пробірки з водним розчином ефіру, і ще раз центрифугувати протягом 15 хв.

Примітка. Під дією ефіру цитоплазма відмирає, при цьому її в'язкість різко знижується, що виявляється у дуже швидкому переміщенні хлоропластів.

6. З отриманих результатів обчислити середні показники та записати їх у таблицю 1.5.

Таблиця 1.5. Визначення структурної в'язкості цитоплазми в листках водних рослин за дії різних температур

Варіант дослідів	Час плазмолізу, хв.	Зміщення хлоропластів після 10-хвилинного центрифугування, %			Структурна в'язкість
		1000 об./хв.	2000 об./хв.	3000 об./хв.	
Температура, °C: 2 кімнатна 30					

7. Зробити висновки про вплив температури на структурну в'язкість цитоплазми різних видів водних рослин.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке структурна в'язкість?
2. Як пояснити неоднакову в'язкість протоплазми у молодих і старих клітинах листків рослин?
3. Як змінюється в'язкість цитоплазми в онтогенезі рослин?
4. Які фактори доводять впливають на в'язкість цитоплазми клітин?

Робота 9. ВПЛИВ ЙОНІВ K⁺ НА В'ЯЗКІСТЬ ЦИТОПЛАЗМИ

В'язкість, або внутрішнє тертя – це сила, необхідна для переміщення одного шару рідини відносно іншого. В'язкість зумовлена зчепленням молекул рідини між собою й опором структурних компонентів клітини. Відомо, що зміна функціональної активності клітини корелює зі зміною в'язкості цитоплазми.

Одно- і двовалентні йони металів і різні аніони неоднаково впливають на в'язкість цитоплазми. Одновалентні йони металів підвищують ступінь гідратації колоїдів і тому зменшують в'язкість цитоплазми. Двовалентні катіони зумовлюють коагулюючу

дію та дегідратацію білків і підвищення в'язкості цитоплазми.

Про зміну в'язкості цитоплазми свідчить форма і час плазмолізу, що зумовлений гіпертонічними розчинами нітратів калію та кальцію.

Мета роботи. Визначити залежність між в'язкістю цитоплазми та концентрацією йонів калію в листках елодеї або валіснерії, в лусках цибулі. Встановити характер дії йонів K^+ та Ca^{2+} на в'язкість цитоплазми.

Матеріали, реактиви, обладнання. Синя цибуля, елодея, валіснерія; 1 М розчин KNO_3 , 0,7 М розчин $Ca(NO_3)_2$, етиловий спирт; центрифуга, центрифужні пробірки, чашки Петрі, скляні пробірки, мікроскопи, предметні стекла та накривні скельця, леза, пінцети, препарувальні голки, піпетки.

Хід роботи:

Дослід 1.

1. Приготувати 0,2; 0,1; 0,05 М розчини KNO_3 .
2. У чотири пробірки (чашки Петрі) налити по 5 мл приготовлених розчинів KNO_3 та 5 мл води (контроль) і експонувати в них по три листка елодеї впродовж 40 хв.
3. По два листки елодеї з кожного розчину верхівкою листка помістити у центрифужні пробірки і центрифугувати за 1000 об./хв. протягом 10 хв. Для фіксації положення хлоропластів листочки перенести в етиловий спирт.
4. Під мікроскопом відмітити ступінь зміщення хлоропластів у клітинах основи і верхівок листків, витриманих у різних розчинах і у воді.
5. Зробити висновки про вплив розчинів KNO_3 на в'язкість цитоплазми.

Дослід 2. Характеристика зміни в'язкості цитоплазми за часом плазмолізу.

Початковою формою плазмолізу є увігнутий плазмоліз. В подальшому ця форма або зберігається, або з відповідною швидкістю переходить в опуклу форму. Проміжок часу, який проходить з часу занурення об'єкта в розчин плазмолітика до досягнення опуклого плазмолізу, значною мірою залежить від в'язкості цитоплазми. Чим менша в'язкість, тим швидше настає опуклий плазмоліз.

Об'єктом досліду є епідерма зовнішньої сторони забарвленої луски цибулі, оброблена плазмолітиками – 1 М розчином KNO_3 та 0,7 М розчином $Ca(NO_3)_2$.

1. На предметному склі провести плазмоліз (Робота 5).
2. Визначити час, за який відбувається плазмоліз у клітинах епідерми цибулі, занурених у KNO_3 та $Ca(NO_3)_2$.
3. Зробити висновки про в'язкість цитоплазми та вплив на неї різних йонів.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке плазмоліз і які форми він має?
2. За яких умов клітина плазмолізує та деплазмолізує?
3. Як можна пояснити різну дію K^+ та Ca^{2+} на в'язкість цитоплазми?
4. Як пояснити той факт, що в'язкість цитоплазми в клітинах цибулі вища, ніж у елодеї?
5. Яка в'язкість цитоплазми у жаростійких рослин?
6. Як змінюватиметься в'язкість цитоплазми у разі посилення гідролітичних процесів?

Робота 10. ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ КЛІТИННОГО СОКУ І ОСМОТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ РЕФРАКТОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

Здатність клітини поглинати воду визначається концентрацією органічних і мінеральних сполук у вакуолі. Концентрація цих сполук, а також ступінь дисоціації їх у вакуолярному соку визначають осмотичний потенціал клітини.

Показник концентрації клітинного соку і величину осмотичного потенціалу останнім часом використовують для діагностики потреби рослин у поливі. Величину концентрації клітинного соку визначають *рефрактометричним методом*, який ґрунтується на зміні показника заломлення поляризованого світла розчинами.

Рефрактометр – це оптичний прилад, за допомогою якого визначають показник заломлення світла під час проходження його крізь призму з нанесеним на неї дослідним розчином. Показник заломлення залежить від концентрації розчину та температури.

Основною частиною рефрактометра є дві скляні призми, з яких нижня закріплена нерухомо, а верхня вільно підіймається й опускається. На нижню призму рефрактометра наносять дослідний розчин. Дивлячись в окуляр, знаходять точку перехрестя темного і світлого полів зору і суміщають їх з лініями хреста, далі за шкалою з лівого боку знаходять коефіцієнт заломлення.

У зв'язку з технічною простотою реалізації цей метод діагностики часу поливу рослин є одним із основних у польових умовах.

Мета роботи. Визначити концентрацію клітинного соку у різних видів дослідних рослин залежно від ярусності розміщення листків на рослинах. Визначити вміст вільної води в дослідних рослинах, яка дифундувала у 25 %-й розчин сахарози.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки, стебла, коренеплоди дослідних рослин; 25 %-й розчин сахарози; рефрактометри, преси, ножиці, марля, промивалка з дистильованою водою, аналітичні терези, бюкси, фільтрувальний папір.

Хід роботи.

Дослід 1.

1. За допомогою ручного преса віджати сік із рослинної тканини, попередньо загорнутої в шматок марлі.

Примітка. Якщо прес відсутній, то рослинну масу розтерти у ступці, перенести на подвійний шар марлі та віджати сік.

2. Сік нанести на нижню поверхню призми рефрактометра, закрити камеру і повернути гвинт на приладі, домагаючись чіткого зображення шкали (%) в окулярі. Поділка шкали, крізь яку проходить горизонтальна лінія (точка перехрестя ліній) між світлим і темним полями, відповідає концентрації цукру в клітинному соку дослідної рослини.

Примітка. Для кожного рослинного об'єкта провести не менше трьох визначень і обчислити середнє значення. У разі зміни об'єкта досліджень (видів рослин, тканин) призму протирають спочатку вологим, а потім сухим фільтрувальним папером, щоб змити попередній розчин.

3. Порівняти результати досліджень, зробити висновки.

Дослід 2.

1. Приготувати 25 %-й розчин сахарози. Точну концентрацію вихідного розчину сахарози визначити за допомогою рефрактометра.

2. У скляні бюкси налити по 5 мл 25 %-го розчину сахарози, занурити по 2 г дослідних рослин (яблуко, картоплю, бегонію тощо), бюкси закрити притертими кришечками. Рослинні об'єкти експонувати впродовж 24 год.

Примітка. За час експозиції вільна вода дифундує з рослинних тканин у гіпертонічний розчин сахарози, наразі концентрація сахарози у бюксах зменшується.

3. За допомогою рефрактометра визначити концентрацію сахарози (%) в бюксах з об'єктами досліджень.

4. Визначити вміст вільної води в рослинних тканинах (X) за формулою:

$$X = \frac{100 - (A - B) \cdot B}{B \cdot M} 100\%,$$

де X – вміст вільної води (%);

A – початкова концентрація сахарози, %;

B – концентрація сахарози в бюксах з об'єктом досліджень;

B – маса 5 мл розчину сахарози (5,25 г);

M – маса наважки (2 г).

5. Зробити висновки щодо вмісту вільної води у різних тканинах рослин.

Контрольні запитання та завдання

1. Чи існує залежність між концентрацією клітинного соку й осмотичним потенціалом клітин?

2. Чи залежатиме величина концентрації клітинного соку від сили віджимання його з тканин?

3. Які речовини клітинного соку можуть змінювати показник його заломлення?

4. Що таке вільна та зв'язана вода?

5. Від чого залежить вміст вільної води у тканинах рослин?

Робота 11. ВИЗНАЧЕННЯ ОСМОТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ КЛІТИННОГО СОКУ ПЛАЗМОЛІТИЧНИМ МЕТОДОМ

Концентрацію клітинного соку, який є розчином різноманітних органічних і неорганічних сполук, можна визначити за його осмотичним потенціалом. *Плазмолітичний метод* визначення цього важливого цитофізіологічного показника полягає в тому, що зрізи рослинних тканин занурюють у розчини осмолітика різної концентрації і згодом досліджують їх під мікроскопом для визначення концентрації ізотонічного розчину.

Оскільки плазмоліз відбувається лише в гіпертонічних розчинах, знаходять таку концентрацію, за якої початкова стадія плазмолізу спостерігається не менше ніж у 50 % клітин досліджуваної тканини. Концентрація ізотонічного розчину обчислюється як середнє арифметичне між концентрацією гіпер- та гіпотонічного розчинів.

Мета роботи. Визначення величини осмотичного тиску у рослин різних екологічних груп.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки елодеї, традесканції, луски синьої цибулі, капусти; 1 М розчин NaCl або сахарози, дистильована вода; піпетки, пробірки, олівці по склу, леза, фільтрувальний папір, мікроскопи, предметні стекла та накривні скельця, препарувальні голки.

Хід роботи.

1. Приготувати по 5 мл розчинів NaCl або сахарози різних концентрацій від 0,1 до 0,7 моль/л змішуванням відповідних об'ємів вихідного 1 М розчину і води (табл. 1.6).

Примітка. Розчини зберігають у пронумерованих маленьких баночках, пробірках, інших зручних посудинах.

2. Безпечним лезом виготовити 14 тонких зрізів із опуклої сторони луски синьої цибулі, з листків червоноголової капусти або інших об'єктів досліджень.

3. Зрізи пензликом перенести на 1÷2 хв. в охолоджену кип'ячену воду для видалення бульбашок повітря і поступово, з інтервалом 2÷3 хв., занурити у розчини плазмолітика різної концентрації та експонувати їх протягом 20÷30 хв.

Таблиця 1.6. Визначення ізотонічної концентрації розчину плазмолітичним методом

Концентрація плазмолітика, моль/л	Ступінь плазмолізу	Для приготування 5 мл розчину	
		1 М сахароза, мл	вода, мл
0,1		0,5	4,5
0,2		1,0	4,0
0,3		1,5	3,5
0,4		2,0	3,0
0,5		2,5	2,5
0,6		3,0	2,0
0,7		3,5	1,5

Примітка. Зрізи, які виймають з кип'яченої води доцільно промокнути клаптиком фільтрувального паперу.

4. Роздивитися зрізи під мікроскопом.

Примітка. На предметне скло замість води наностити краплину розчину відповідного плазмолітика, в якому експонувався препарат.

5. Послідовно роздивитися препарати з усіх розчинів, встановити, за якої концентрації помітно початкову стадію плазмолізу (гіпертонічний розчин плазмолітика), а за якої – не помітно (гіпотонічний розчин плазмолітика). Результати записати у таблицю 1.6 значками «+» та «-».

6. Визначити величину ізотонічної концентрації розчину (середнє між гіпо- та гіпертонічною концентрацією), обчислити осмотичний тиск клітинного соку за рівнянням Вант-Гоффа:

$$P = RTCi,$$

де P – осмотичний тиск, в мегапаскалях, МПа; R – універсальна газова стала, $8,317 \cdot 10^{-3}$ Дж/(кМоль·К); T – абсолютна температура, $273^\circ + t$ °С (К); C – концентрація розчину, моль/л; i – ізотонічний коефіцієнт. Для неелектролітів (сахарози) $i = 1$, а для розчинів електролітів (наприклад, NaCl) він має такі значення (табл. 1.7).

Таблиця 1.7. Значення ізотонічного коефіцієнта (i) для розчину NaCl

Концентрація NaCl, моль/л	1,0	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2
Ізотонічний коефіцієнт	1,62	1,64	1,66	1,68	1,70	1,75	1,78	1,83

7. Зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Чому осмотичний тиск розчинів електролітів більший ніж розчинів неелектролітів?
2. Чи можна визначити концентрацію клітинного соку плазмолітичним методом?
3. Чи можна відібрати воду від плазмолізованої клітини?
4. На чому ґрунтується плазмолітичний метод визначення осмотичного потенціалу?

Робота 12. ВИЗНАЧЕННЯ СИСНОЇ СИЛИ ТКАНИН ЗА ЗМІНОЮ КОНЦЕНТРАЦІЇ РОЗЧИНУ (за методом Шардакова)

Сисна сила – це сила з якою вода надходить у клітину. Сисна сила (S) обчислюється як різниця між осмотичним (P) і тургорним (T) тиском ($S = P - T$). Якщо осмотичний тиск більший ніж тургорний, клітина поглинати́ме воду. За умов повного насичення клітини водою її тургорний тиск дорівнює осмотичному і тому сисна сила дорівнює нулю. Це спостерігається за високої вологості ґрунту і повітря. Сисна сила за абсолютною величиною дорівнює величині водного потенціалу клітини, але протилежна за знаком.

Якщо рослинну тканину занурити у розчин, осмотичний тиск якого менше сисної сили тканини, то клітини її поглинатимуть воду з розчину. В результаті цього концентрація розчину зростає. Навпаки, коли тканину помістити у гіпертонічний розчин,

то він відбиратиме воду з клітин і буде менш концентрованим.

Відомо, що густина і показник заломлення розчинів залежать від їхньої концентрації. Використовуючи цю властивість розчинів, легко визначити найменші зміни їх концентрацій. Отже, можна зробити висновок щодо величини сисної сили тканин порівняно із сисною силою розчинів відомої концентрації, куди були занурені шматочки тканин.

Мета роботи. Ознайомитися зі станом клітин у гіпо- та гіпертонічному розчинах і визначити величину сисної сили досліджуваних рослинних тканин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки кімнатних рослин, бульби, коренеплоди, вирощені за різних умов; 0,5 М розчин CaCl_2 або 1 М розчин сахарози, метиленовий синій; дворядні штативи з пробірками, свердла, препарувальні голки, мікропіпетки або піпетки Пастера.

Хід роботи.

1. З вихідного 0,5 М розчину CaCl_2 приготувати серію розчинів менших концентрацій: 0,01; 0,03; 0,05; 0,07; 0,09; 0,11; 0,13; 0,15 М (по 10 мл у кожній пробірці).

Примітка. При використанні розчину сахарози концентрації розчинів мають бути приблизно вдвічі більші.

2. Пробірки з розчинами CaCl_2 поставити у перший ряд штатива. З кожної із них набрати по 0,5 мл розчину і перенести у менші пробірки другого ряду штатива, закрити корками для запобігання випаровування.

3. Свердлом (діаметром 0,8÷1,0 см) вирізати диски з досліджуваних об'єктів (листки пеларгонії, примули, бегонії, пластинки коренеплодів тощо). У кожну пробірку другого ряду занурити по два диски тканини на 30 хв.

Примітка. Вміст пробірок впродовж експонування рослинних тканин періодично струшують.

4. Диски вийняти з розчинів (препарувальними голками), розчини підфарбувати метиленовим синім (мокрый кінчик голки занурити в порошок барвника і розбавити в пробірці).

5. Мікропіпеткою об'ємом 0,5 мл або тонкою скляною трубкою з відтягнутим кінцем набрати забарвлений розчин із першої пробірки другого ряду і опустити її до середини прозорого

розчину відповідної пробірки першого ряду і повільно випустити забарвлену рідину, поступово піднімаючи піпетку.

Примітка. На білому фоні спостерігають, в якому напрямку у безбарвному розчині рухається струмок забарвленої рідини.

Якщо концентрація i , отже, питома густина розчину після перебування в ньому тканини виявиться більшою, ніж у відповідного безбарвного розчину у вищій пробірці, то струмок буде опускатися вниз у вигляді блакитного згустку.

Якщо ж забарвлений розчин матиме меншу концентрацію i меншу питому густина, то блакитний струмок буде підніматися вгору.

Таку маніпуляцію виконують з усіма парами розчинів у відповідних пробірках, позначаючи напрямок руху струмків. У зв'язку з тим, що кожна пара пробірок першого і другого ряду містила спочатку розчини однакової концентрації, тому за зміною концентрації розчинів у пробірках другого ряду можна визначити, з яких розчинів тканина поглинала воду, а в які віддавала її.

6. Визначити концентрацію ізотонічного розчину, тобто розчин концентрація якого не змінилась після перебування в ньому досліджуваного об'єкта.

7. Дані записати у таблицю 1.8 і розрахувати величину осмотичної сили в атмосферах.

Таблиця 1.8. Визначення ізотонічної концентрації за напрямом руху струменя забарвленої рідини.

Концентрація розчину, М	0,01	0,03	0,05	0,07	0,09	0,11	0,13	0,15
Напрямок руху струменя								

Примітка. Величина осмотичного потенціалу визначеного ізотонічного розчину для досліджуваної тканини у цьому разі збігається з величиною осмотичної сили.

$$S = P$$

Величину P визначають за формулою:

$$P = RTCi,$$

де P – осмотичний тиск, МПа; R – універсальна газова стала, $8,317 \cdot 10^{-3}$ Дж/(кМоль·К); T – абсолютна температура, $273^\circ + t$ °С (К); C – концентрація розчину, моль/л; i – ізотонічний коефіцієнт,

який визначають за формулою $i = 1 + a(n-1)$, де a – ступінь дисоціації речовини (табл.1.9); n – кількість йонів, на які дисоціює молекула (для CaCl_2 – це 3, для неелектролітів $n = 1$).

Таблиця 1.9. Значення ступеня дисоціації (a) для розчинів CaCl_2 різної концентрації

Концентрація розчину CaCl_2 (М)	0,01	0,03	0,05	0,07	0,09	0,11	0,13	0,15
Ступінь дисоціації (a)	0,90	0,86	0,82	0,79	0,76	0,73	0,72	0,71

8. Зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке осмотична сила клітин? Від яких факторів залежить її величина?
2. За якою формулою i в яких одиницях визначають осмотичну силу клітин?
3. Чому під час використання розчинів сахарози замість CaCl_2 концентрації їх мають бути вдвічі більші?
4. Для чого розчини зафарбовують у малих пробірках другого ряду?
5. На якому фізичному явищі базується можливість спостереження напрямку руху струмків?
6. Які фактори впливають на точність досліджу?

Робота 13. ВПЛИВ ДЕЯКИХ ФАКТОРІВ НА ШВИДКІСТЬ РУХУ ЦИТОПЛАЗМИ В КЛІТИНАХ

Рух цитоплазми – поширене і цікаве явище, яке легко виявити в життєдіяльних клітинах. Біологічне значення цього явища полягає в тому, що здійснюється перенесення речовин з однієї частини клітини до іншої, забезпечується їх поглинання й виділення, відбувається внутрішньоклітинне переміщення органел тощо. При цьому топографія органел і їх просторове положення у клітинах, яке зумовлене рухом цитоплазми, визначають і

створюють найоптимальніші умови їхнього функціонування.

Швидкість та характер руху цитоплазми залежать від впливу багатьох зовнішніх і внутрішніх факторів. Доведено, зокрема, що 10 різних хімічних речовин у фізіологічно діючих концентраціях прискорюють або пригнічують рух цитоплазми. Цей процес залежить від температури, рН, ступеня обводненості клітин тощо.

Джерелом енергії для руху цитоплазми є, як і для більшості інших фізіологічних процесів, аденозинтрифосфат (АТФ). Оскільки рушійна сила виникає в основній масі цитоплазми, де відбувається *гліколіз*, то цей процес є постачальником хімічної енергії, яка перетворюється на механічну.

Різні інгібітори і роз'єднувачі дихання (олігоміцин, 2,4-динітрофенол) гальмують швидкість руху цитоплазми, що свідчить про енергозалежність цього процесу. Рух цитоплазми – найдостовірніший показник життєдіяльності рослинної клітини.

Мета роботи. Виявити рух цитоплазми в живих рослинних клітинах, визначити його швидкість і встановити вплив на цей процес деяких факторів. Переконатися, що швидкість руху залежить від рівня життєдіяльності клітини і забезпечення її енергією.

Матеріали, реактиви, обладнання. Гілочки елодеї або листки валіснерії; $5 \cdot 10^{-3}$ М розчин АТФ, $5 \cdot 10^{-4}$ М розчин 2,4-динітрофенолу; мікроскопи з окуляр-мікрометрами, предметні стекла й накривні скельця, термостат, хімічні склянки місткістю 100 мл.

Хід роботи.

Дослід 1.

1. З верхівки пагону елодеї пінцетом відірвати листочок або відрізати частину молодого листка валіснерії та перенести у краплину акваріумної води на предметному склі.

2. За $5 \div 10$ хв., коли встановиться стаціонарний рівень руху цитоплазми, об'єкти розглянути за середнього збільшення та вибрати ділянку препарату, де найкраще спостерігати за її рухом (за зміною положення в клітинах хлоропластів).

Примітка. У елодеї такою зоною є видовжені клітини поблизу центральної жилки або клітини зубчиків по краю листка. Розміщують препарат на столику так, щоб довга вісь клітини була паралельна шкалі окуляр-мікрометра.

3. Поставити об'єкти $\times 40$ і визначити швидкість руху хлоропластів, вимірюючи шлях, на який переміщується органела за одиницю часу в полі зору мікроскопа.

Примітка. Для більшої точності вимірів бажано взяти довший відрізок шляху (наприклад, $10 \div 15$ поділок окулярмікрометра). Швидкість руху визначити для n яти пластид у n яти клітинах (для статистичної обробки).

Дослід 2.

1. З одного боку накривного скельця нанести краплину $5 \cdot 10^{-4}$ М розчину АТФ і одночасно відтягнути фільтрувальним папером воду з-під нього з другого боку. За $3 \div 5$ хв. після заміщення води на розчин АТФ повторити визначення швидкості руху хлоропластів.

2. Розчин АТФ під накривним скельцем замінити на $5 \cdot 10^{-4}$ М розчин 2,4-динітрофенолу (ДНФ) і через $3 \div 5$ хв. знову визначити швидкість руху хлоропластів.

Примітка. У цьому варіанті дослідів будуть вже інші результати.

3. Дані, отримані при визначенні швидкості руху цитоплазми за швидкістю переміщення в ній хлоропластів, записати у таблицю 1.10.

Таблиця 1.10. Вплив АТФ та 2,4-динітрофенолу (ДНФ) на швидкість руху цитоплазми клітин елодеї

Варіант дослідів	Швидкість руху, мкм/с
H_2O , 20 °C $5 \cdot 10^{-3}$ М АТФ $5 \cdot 10^{-4}$ М ДНФ	

Примітка. За бажанням можна збільшити кількість варіантів дослідів, використовуючи розчини солей важких металів або токсичних для гідробіонтів органічних сполук (детергентів, пестицидів, поверхнево-активних речовин та ін.).

Контрольні запитання та завдання

1. Як визначити швидкість руху цитоплазми в клітинах, що не мають хлоропластів?

2. Як зміниться рух цитоплазми у разі підвищення температури навколишнього середовища до 30 °С?

3. Яка залежність між швидкістю руху та в'язкістю цитоплазми?

Робота 14. ВИЗНАЧЕННЯ ШВИДКОСТІ РУХУ ХЛОРОПЛАСТІВ (ЗА СМІРНОВОЮ, СІРЕНКО)

Одним із показників, що характеризує забезпеченість клітини енергією (АТФ), є наявність руху цитоплазми. За сприятливих умов цитоплазма рослинних клітин постійно рухається. На зовнішні та внутрішні впливи клітина відповідає змінами цього руху, його швидкості. Зміни рухливості цитоплазми пов'язують зі зміною проникності поверхневої мембрани до йонів, або інших токсичних сполук, які можуть бути активаторами або інгібіторами АТФ-ази і впливати на рівень АТФ у клітині. Вважається, що зміни внутрішньоклітинної концентрації АТФ, зумовлені дією ушкоджуючих агентів, впливають на організацію актиноподібних феламентів цитоплазми, що своєю чергою спричинює зміни в'язкості цитоплазми та швидкості її руху.

Для спостереження за рухом цитоплазми краще використовувати водні рослини (валіснерію, елодею, наяду), які на препараті залишаються у своєму природному середовищі. Найпоказовішим цитофізіологічним показником є ротаційний рух протоплазми, який здійснюється уздовж клітинних стінок. Рухаючись, цитоплазма захоплює з собою великі органели – хлоропласти, а іноді й ядро, завдяки яким полегшується спостереження за змінами швидкості цього руху. Характерною особливістю *ротаційного руху* є те, що цитоплазма рухається в одному напрямку, ніби обертається навколо центра клітини. Швидкість цього руху, як у нормі, так і під впливом токсичних речовин легко визначити за допомогою секундоміра та окулярмікрометра. Лінійна швидкість руху під час ротації в нормі незначна: у валіснерії за температури 18÷23 °С вона становить 10÷20 мкм/с, елодеї – 10÷15 мкм/с, наяди – 15÷20 мкм/с.

Рух у непошкоджених клітинах розпочинається не відразу після препарування, а розпочавшись, на препараті триває днями, зберігаючи початкову швидкість до відмирання клітини.

Для спостереження за рухом цитоплазми в клітинах гідрофі-

тів не потрібно виготовляти зрізи, оскільки тканини цих рослин складаються лише з кількох шарів клітин, кожний з яких можна мікроскопіювати.

Метод можна застосовувати неодноразово на тих самих клітинах, а це важливо у ході вивчення змін пошкодженої клітини в часі, тоді як багаторазове використання деяких інших методів неможливе, або може призвести до небажаного викривлення результатів (наприклад, багаторазовий плазмоліз).

Визначення наявності та швидкості руху цитоплазми не потребує довготривалості експерименту, його можна використати для вивчення первинної чутливості клітин.

Метод має кількісний вираз за п'ятибальною шкалою визначення ступеня токсичності водного середовища (від нетоксичного до летального), який дає змогу градуювати токсичність водного середовища в межах п'яти груп стосовно біологічної складової водойми.

Мета роботи. Оцінити вплив різних концентрацій модельного токсиканта (біхромату калію) на швидкість руху хлоропластів у клітинах водних рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Водні рослини (валіснерія, елодея та наяда); біхромат калію; мікрометр, секундомір, світловий мікроскоп, предметні стекла й накривні скельця, склянки місткістю 100 мл, піпетки місткістю 10 мл, мірні колби місткістю 100 мл.

Хід роботи.

1. Дослідні рослини (валіснерія, елодея, наяда) експонувати у розчинах модельного токсиканту ($K_2Cr_2O_7$) різної концентрації (0,01; 0,1; 1,0 мг/л) на світлі протягом 1 год.

2. Після закінчення експозиції з листків рослин виготовити тимчасові препарати і під світловим мікроскопом провести спостереження.

Примітка. У рослин елодеї та наяди використовують верхівкові пагони, у валіснерії – частину рослини біля основи, де розташовані молоді клітини, що зберігають рух цитоплазми.

3. Швидкість руху визначити за допомогою окулярмікрометра, фіксуючи час проходження хлоропластом однієї, або кількох поділок за допомогою секундоміра.

4. Швидкість руху хлоропластів обчислити за формулою:

$$V = S / t,$$

де V – швидкість руху хлоропластів, ум. од./с,

S – відстань, яку проходить хлоропласт, ум. од.,

t – час, за який хлоропласт проходить певну відстань, с.

5. Зробити висновки про токсичну дію різних концентрацій модельного токсиканта.

Прояв токсичної дії визначають п'ятьма групами:

Перша – немає токсичності (80÷120 %),

Друга – слабка токсичність (59÷80, 120÷150 %),

Третя – середня токсичність (20÷50, 150÷180 %),

Четверта – висока токсичність (10÷20, 180÷250 %),

П'ята – летальна токсичність (0÷10, більше 250 %).

6. Дані записати у таблицю 1.11.

Таблиця 1.11. Вплив біхромату калію на швидкість руху хлоропластів у клітинах водних рослин

Об'єкт дослідження	Концентрація $K_2Cr_2O_7$, мг/л	Час руху хлоропластів, с	Швидкість руху цитоплазми, ум.од./с	Швидкість руху цитоплазми, % до контролю	Відхилення від контролю, %	Ступінь токсичності	Група токсичності

7. Зробити висновки щодо ступеня токсичності різних концентрацій біхромату калію для водних рослин.

Контрольні запитання та завдання

1. Про що свідчить наявність руху цитоплазми у клітинах?
2. В яких об'єктах найкраще спостерігати ротаційний рух цитоплазми?
3. Від чого залежить швидкість руху цитоплазми?
4. Назвіть переваги водних рослин під час дослідження ротаційного руху цитоплазми.

Робота 15. ВИЗНАЧЕННЯ ПЕРІОДУ ФОТОВИЦВІТАННЯ ХЛОРОПЛАСТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ЛЮМІНЕСЦЕНТНОГО МІКРОСКОПА

Метод люмінесцентного мікроскопіювання відображає ураженість клітин рослин у разі дії токсичних речовин, а також специфічність процесів розвитку та розпадання клітин рослин у природних умовах. Ранні зміни в перебудові пігментного апарату рослинної клітини можна встановити, спостерігаючи за змінами флуоресценції хлорофілу.

Флуоресценція – один із шляхів розсіювання енергії, яка поглинається пігментом хлорофілом під час опромінення. Поглинувши квант світла молекула пігменту хлорофілу переходить з основного синглетного енергетичного стану в збуджений синглетний, який характеризується більшою енергією. У збудженому стані молекула перебуває незначний проміжок часу, а за умови повернення в основний стан може випромінювати енергію у вигляді кванта світла – *флуоресценції*. Оскільки за час існування у збудженому стані молекула втрачає частину енергії на коливання, то величина випромінюваного кванта флуоресценції менша, ніж енергія поглинутого, в результаті довжина хвилі флуоресценції більша за довжину хвилі поглинутого світла (закон Стокса).

Основним пігментом, що флуоресціює є хлорофіл *a*. Інші пігменти починають флуоресціювати лише тоді, коли не можуть передати енергію збудження хлорофілу *a*. Функціонування пігментного комплексу, зокрема хлорофілів, що флуоресціюють (та інших пігментів потенційно здатних до цього), залежить від токсикантів різної природи. Різке зниження фотохімічної активності хлорофілу є наслідком пригнічення фотосинтетичної діяльності рослини.

Спектр флуоресценції хлорофілу міститься у червоній та ближній інфрачервоній областях (від 660 до 820 нм) і складається з кількох дискретних максимумів. Хлоропласти з хлорофілом, що флуоресціює мають вигляд яскравих червоних тілець на зеленому тлі клітини. Під дією синьо-фіолетового концентрованого збуджувального світла відбувається зникнення червоної флуоресценції пластид. Швидкість затухання червоної флуоресценції залежить від умісту та стану хлорофілів, а період фотовицвітання хлорофілу може бути цитофізіологічним показником токсичного впливу, оскільки за наявності токсикантів зменшується

період фотостійкості хлоропластів, який легко виміряти за допомогою секундоміра. Зміни рівня флуоресценції клітин дають змогу встановити первинну реакцію фотосинтетичного апарату клітини вже через 5÷10 хв. після контакту рослини з токсикантом. Оскільки занурені вищі водні рослини характеризуються постійним кількісним вмістом хлорофілів незалежно від умов середовища, метод визначення періоду фотостійкості хлоропластів можна рекомендувати як показник фізіологічного стану як самої рослини, так і якості водного середовища, яке оточує цю рослину. Особливо зручно використовувати цей метод для виявлення екстремальних або одноразових випадків забруднення водойм. Якщо токсичні речовини швидко деградують у воді, то за відновленням рівня флуоресценції хлорофілу можна робити висновок щодо адаптаційних можливостей фотосинтетичного апарату клітин водних рослин.

Мета роботи. Визначити період фотовицвітання хлоропластів у клітинах водних рослин за дії модельного токсиканта – $K_2Cr_2O_7$.

Матеріали, реактиви, обладнання. Занурені водні рослини (валіснерія, елодея та наяда); $K_2Cr_2O_7$; люмінесцентний мікроскоп, секундомір, склянки місткістю 100 мл, предметні стекла та накривні скельця, піпетки місткістю 10 мл, мірні колби місткістю 100 мл.

Хід роботи.

1. Дослідні рослини (валіснерія, елодея, наяда) експонувати в розчинах модельного токсиканта ($K_2Cr_2O_7$) різної концентрації (0,01; 0,1; 1,0 мг/л) на світлі протягом 1 год.

Примітка. Як контроль використовують відстояну водогінну воду, або воду з акваріума, в якій вирощені дослідні рослини.

2. Після закінчення експозиції з листків рослин приготувати тимчасові препарати і під люмінесцентним мікроскопом провести спостереження.

Примітка. У рослин елодеї та наяди використовують верхівкові пагони, у валіснерії – частину рослини поблизу основи, де розташовані молоді клітини.

3. Виміряти за допомогою секундоміра період фотовицвітання хлоропластів під дією люмінесцентного світла, який супроводжується зникненням червоної флуоресценції пластид.

4. Результати досліджень записати у таблицю 1.12.

Таблиця 1.12. Вплив $K_2Cr_2O_7$ на період фотовицвітання хлоропластів у клітинах водних рослин

Об'єкт дослідження	Концентрація $K_2Cr_2O_7$, мг/л	Період фотовицвітання хлоропластів, с
Елодея Наяда Валіснерія		

5. Визначити концентрації модельного токсиканта, що зумовили токсичний вплив, а також відмітити чутливість видів водних рослин за досліджуваним показником.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке флуоресценція?
2. Як методом флуоресцентної мікроскопії відрізнити живі клітини від неживих?
3. Які пігменти здатні до флуоресценції?
4. Які збуджені стани молекули хлорофілу Вам відомі?
5. Як змінюється колір хлоропластів під дією синьо-фіолетового концентрованого збуджувального світла?

Робота 16. ОЦІНКА ЗМІН У ПРИЖИТТЄВОМУ ЗАБАРВЛЕННІ КЛІТИН У ВІДПОВІДЬ НА ТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ

Більшість клітин позбавлені зручних функцій, що легко реєструються під мікроскопом, за якими можна робити висновок про стан їхньої життєдіяльності на початковій фазі пошкодження. Однією з таких функцій є здатність непошкоджених живих клітин концентрувати у вигляді гранул речовини, що синтезуються у самій клітині, або проникають до неї ззовні. До таких речовин належать прижиттєві барвники, такі як нейтральний червоний, малахітовий зелений, метиленовий синій та ін. Серед них особливою універсальністю і зручністю застосування характеризується нейтральний червоний, що належить до слабких

основ. Барвники, що проникли у цитоплазму клітини, спочатку розташовані в ній дифузно, а потім клітина конденсує їх в області апарату Гольджі у вигляді гранул. Такі барвники називають *гранулярними*. Гранули нейтрального червоного та дифузний розподіл його добре видно під звичайним світловим мікроскопом. З накопиченням барвника кількість і розміри гранул збільшуються, і вони, виходячи за межі зони апарату Гольджі, поширюються по всій цитоплазмі.

Відкладати гранули здатні лише здорові, повноцінні клітини. Наростання негативної дії будь-якої природи пригнічує цю функцію, аж до повного її припинення. Замість гранулярного відкладання у пошкодженій клітині барвник дифузно забарвлює цитоплазму і ядро. Повне пригнічення гранулоутворення та інтенсивне дифузне забарвлення протоплазми у разі дії деяких агентів виявляють ще на оберненій фазі пошкодження, і, після усунення діючого агента, у клітині відновлюється нормальне грануловідкладання, а дифузно забарвлена протоплазма знебарвлюється. Здатність до гранулоутворення може паралізувати токсична дія самих барвників, якщо їх використовують у дуже високих концентраціях.

Основні барвники при рН близькому до нейтрального, як правило, містяться у клітинній вакуолі. Залежно від складу вакуолярного соку, вакуоля забарвлюється дифузно, або відбувається концентрування барвника й утворення в ній інтенсивно забарвлених краплин коацервату або грон гранул різної форми і калібру, а іноді утворюються кристали барвника. Очевидно, що в рослинних клітинах сегрегація речовин у вакуолі захищає протоплазму від їхньої токсичної дії, бо при зв'язуванні в гранули знижується концентрація речовин, що можуть завдати шкоди клітині.

Механізми взаємодії вітальних барвників і клітини сьогодні інтенсивно вивчаються. Значним успіхом досліджень у цьому напрямку стала ідентифікація цитоплазматичних органел, які відповідають за процеси накопичення вітального барвника в гранулах. Останнім часом доведено, що гранули, які спостерігають під мікроскопом, є не чим іншим, як лізосомами, що акумулювали барвник. Відомо, що значення лізосом у розвитку будь-якої клітинної патології вагоме і різноманітне, що, навіть, важко відшукати патологічний процес, в якому б лізосомальний апарат не брав би активної участі. Встановлено також універсальний характер участі лізосом під час деструкції будь-якої речовини, що

проникає до клітини. Ця властивість лізосом підсилює неспецифічність методу вітального забарвлення, який по-суті є методом візуалізації лізосом.

Не зважаючи на те, що метод мікроскопії прижиттєво забарвлених клітин не має простого кількісного вираження результатів спостереження і це перешкоджає його використанню як самостійного маркера під час моніторингових досліджень, його доречно використовувати як додатковий з іншими цитоекологічними методами.

Мета роботи. Оцінити ступінь пошкодження вищих водних рослин методом прижиттєвого забарвлення клітин за дії модельного токсиканта ($K_2Cr_2O_7$).

Матеріали, реактиви, обладнання. Водні рослини (валіснерія, елодея та наяда); $K_2Cr_2O_7$, вітальний барвник – 0,01 %-й нейтральний червоний; світловий мікроскоп, предметні стекла й накривні скельця, склянки місткістю 100 мл, піпетки місткістю 10 мл, мірні колби місткістю 100 мл.

Хід роботи.

1. Приготувати різні концентрації модельного токсиканта – $K_2Cr_2O_7$ (0,01; 0,1; 1,0 мг/л).

2. Дослідні рослини (валіснерію, елодею та наяду) занурити у склянки місткістю 100 мл і експонувати їх у розчинах модельних токсикантів протягом 1 год.

3. Після закінчення експозиції листки із дослідних рослин перенести у розчин барвника (0,1 %-й розчин нейтрального червоного) і експонувати впродовж 1 год.

4. Із забарвлених рослин приготувати тимчасові препарати і під світловим мікроскопом провести спостереження.

Примітка. У рослин елодеї та наяди використовують верхівкові пагони, у валіснерії – частину рослини поблизу основи, де розміщені молоді клітини.

5. Іншу частину рослин перенести у ємкості з чистою водою і експонувати їх ще 1 год для з'ясування концентрацій токсиканта за яких можливе відновлення здатності клітин до гранулоутворення. Після експозиції так само приготувати тимчасові препарати.

6. Оцінити ступінь концентрування барвника у клітинах досліджуваних рослин:

відсутність гранулоутворення (дифузне забарвлення) – (–);
слабке (поодинокі гранули) – (+);
середнє (невеликі грона на фоні поодиноких гранул) – (++);
інтенсивне (великі грона гранул) – (+++).

7. Оцінити ступінь забарвлення:

відсутність забарвлення – 0;
слабке (світло-рожеве) – 1;
середнє (інтенсивно-рожеве) – 2;
інтенсивне (яскраво малинове) – 3.

8. Результати спостережень записати у таблицю 1.13.

Таблиця 1.13. Оцінка змін у прижиттєвому забарвленні клітин за дії $K_2Cr_2O_7$

Вид рослини / концентрація токсиканта, мг/л	Забарвлення клітин після експозиції в розчинах токсиканта		Забарвлення клітин після експозиції в розчинах токсиканта і чистій воді	
	гранулярне	дифузне	гранулярне	дифузне

9. Зробити висновки щодо зворотного і незворотного пошкодження клітин різними концентраціями модельного токсиканта.

Контрольні запитання та завдання

1. Наведіть приклади вітальних барвників.
2. Чому вітальні барвники безперешкодно проникають у цитоплазму?
3. В яких органоїдах рослинної клітини відбувається акумуляція вітальних барвників і токсичних речовин?
4. Чому прижиттєвий барвник нейтральний червоний неоднаково накопичується в різних ділянках клітини?

Контрольні запитання та завдання до розділу «Фізіологія рослинної клітини»

1. Які експериментальні методи застосовують для вивчення структури і функції клітин?

2. Як хімічний склад цитоплазми позначається на фізіологічній діяльності клітини?

3. Як визначити початок плазмолізу?

4. Чи здійснюється міжклітинне транспортування під час плазмолізу?

5. Яка функція клітинної стінки в осмотичних процесах рослинних клітин?

6. Назвіть механізми внутрішньоклітинних рухів.

7. Чи можна використовувати колхіцин для припинення руху цитоплазми?

8. Перерахуйте загальні особливості будови та властивості всіх мембран клітини.

9. Як зумовити плазмоліз клітин, що мають осмотичний потенціал клітинного соку 5 атм.?

10. У яких рослин більший осмотичний тиск клітинного соку: у рослин засолених чи незасолених ґрунтів; гідрофітів чи ксерофітів?

11. Клітина з осмотичним тиском клітинного соку 1 МПа занурена в розчин KCl , осмотичний тиск якого 2 МПа. Що відбувається з клітиною?

12. Шматочки однієї і тієї самої рослинної тканини занурені у розчин 1М сахарози і 1М $NaCl$. У якому з цих розчинів плазмоліз більш виражений?

13. Як пояснити відсутність зворотної дифузії поглинутих клітинами барвників (метиленовий синій, нейтральний червоний).

14. Чому плазмолізовані в розчині сечовини клітини досить швидко деплазмолізуються?

15. Клітина занурена в дистильовану воду. Опишіть можливі варіанти переміщення води в цій системі.

16. Чому під час тривалих дощів соковиті плоди (вишні, черешні, абрикоси) розтріскуються?

17. Молярні розчини KCl і $CaCl_2$ розділені напівпроникною мембраною. Об'єм якого розчину збільшуватиметься?

18. Що відбуватиметься з клітиною, що має осмотичний потенціал клітинного соку 10 атм, якщо її занурити в ізотонічний розчин, а в гіпотонічний?

19. За допомогою яких цитофізіологічних реакцій можна діагностувати живі та мертві клітини?

Розділ 2.

ВОДНИЙ РЕЖИМ РОСЛИН

Серед хімічних сполук, що містяться в живих організмах, вода в кількісному відношенні відіграє домінуючу роль. Вміст її в клітинах з активними процесами життєдіяльності може досягати 70÷95 %. Зневоднення насіння, спор, лишайників супроводжується переходом їх від активної життєдіяльності в анабіотичний стан. Пояснюється це тим, що вода є не лише розчинником, а й активним структурним та функціональним компонентом клітини. Вона є субстратом для фотосинтезу, бере участь у метаболічних перетвореннях, диханні, численних гідролітичних і синтетичних процесах.

Клітина містить завжди мінімальну кількість води, нижче якої рослина вже не в змозі підтримувати нормальний перебіг біохімічних та фізіологічних функцій. Таку воду називають *гомеостатичною*. Вміст гомеостатичної води неоднаковий у рослин різних екологічних груп: у гідрофітів – 65÷70%; мезофітів – 45÷60%; ксерофітів – 25÷27% сирої маси. Значна кількість води в клітинах потрібна насамперед тому, що вона утворює внутрішнє середовище, в якому можливий перебіг життєвих процесів, адже лише у водному середовищі функціонально важливі біохімічні та структурні компоненти клітини здатні підтримувати свою нативність та функціональність.

Вода відіграє суттєву роль у створенні і підтриманні внутрішнього гідростатичного (тургорного) тиску, від якого залежить характерна форма рослинних клітин, тканин, органів та зовнішній вигляд рослин в цілому. У разі втрати тургору рослини в'януть.

З потоком води від кореневої системи в надземні органи надходять мінеральні речовини і деякі метаболіти, зокрема синтезовані в коренях амінокислоти й цитокініни.

Завдяки високій теплоємності та питомій теплоті пароутворення вода захищає організми від різких коливань температури і є запобіжним фактором від перегрівання.

Слід пам'ятати також і про таку важливу властивість води, як здатність різко збільшувати об'єм (на 11 %) під час замерзання і, так само різко, зменшувати його під час танення льоду, адже з цією властивістю води тісно пов'язана морозостійкість рослин.

Навіть короткотривала нестача води в рослині несприятливо впливає на біохімічні та фізіологічні процеси. Після відновлення оптимальних умов водозабезпечення фотосинтез стабілізується лише через п'ять-шість днів, ріст – через три-чотири тижні, що призводить до значних втрат врожаю. Тому оптимізація водопостачання рослини у змінних умовах навколишнього середовища має бути одним із головних завдань рослинництва.

Вода надходить в рослину в результаті дії законів *масового потоку, дифузії та осмосу*. Масовий потік, по суті є різницею потенціальної енергії води (водним потенціалом) у системі ґрунт–рослина–повітря. Пересування води по рослині, крім того, зумовлене дією сил *адгезії, когезії, капілярними силами* та метаболічними процесами. Саме завдяки перебігу метаболічних процесів формується *кореневий тиск* (його ще називають *нижнім кінцевим двигуном*), завдяки якому вода нагнітається догори по судинах ксилеми. Величина кореневого тиску становить 50÷150 кПа.

Робота *верхнього кінцевого двигуна* зумовлена випаровуванням води листками. Чим інтенсивніше транспірують рослини, тим більший створюється гідродинамічний натяг у судинах і капілярах, які зв'язують листок через стебло з кореневою системою.

Основну роль у випаровуванні води відіграють продиhi (*продихова транспірація*). Крім того, вода може випаровуватися крізь кутикулу (*кутикулярна транспірація*) та крізь перидерму (*ленікулярна транспірація*).

Водний баланс рослини складається з надходження та витрачання води. У разі перевищення витрат води над надходженням виникає *водний дефіцит*, який може бути ліквідований у нічний період. Якщо ж протягом ночі дефіцит води повністю не усунений, то говорять про *залишковий водний дефіцит*.

Показником ефективності використання води рослинами є *транспіраційний коефіцієнт* – кількість води, що витрачається рослиною на створення одиниці сухої речовини.

Величину, обернену транспіраційному коефіцієнту, називають *продуктивністю транспірації*. Створюючи оптимальні умови вегетації, можна значно підвищити продуктивність рослин та ефективність використання ними поливної води.

Робота 17. ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ВОДИ ТА СУХОЇ РЕЧОВИНИ У РОСЛИНАХ РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ ГРУП

Вміст води у рослинах змінюється в широких межах і залежить від віку, фізіологічного стану, хімічного складу рослин та впливу на них різноманітних факторів середовища. Саме тому, визначення загального вмісту води є, як правило, обов'язковим в різноманітних дослідженнях. Вміст води у рослинних тканинах вираховують в процентах від сирої маси.

Мета роботи. Визначити вміст води та сухої речовини у рослинах різних екологічних груп.

Матеріали, реактиви, обладнання. Дослідні рослини, сухе і проросле насіння різних видів; аналітичні ваги, бюкси, сушильні шафи, ексікатор, щипці, свердла (діаметр 5÷8 мм), шматочки гуми 5х5 см.

Хід роботи.

1. Вимити бюкси і висушити їх до постійної маси. Для цього відкриті бюкси витримати 60÷90 хв. в шафі за 100÷105 °С, потім охолодити їх в ексікаторі, закрити кришками і зважити на аналітичних терезах. Висушування і зважування бюксів повторюють доти, доки їх маса не стане сталою.

2. Рослинний матеріал відібрати за варіантами. Висічки з листків, зроблені свердлом у трикратній повторності, вмістити в бюкси і зважити на аналітичних терезах. Потім поставити відкритими в нагріту до 105 °С сушильну шафу на 5 год., охолодити в ексікаторі і знову зважити. Висушування і зважування матеріалу повторювати до досягнення постійної маси бюксів.

Примітка. Під час роботи слід дотримуватися таких правил. Сирий матеріал повинен лежати в бюксах пухко. Не можна витримувати його в шафі без перерви понад 5 год. Бажано розмістити бюкси на одному рівні з кулькою термометра і не впритул до стінок шафи. Брати бюкси слід щипцями, а не руками, тому що в останньому випадку маса буде змінюватись.

3. Розрахувати масу води в наважці, яка дорівнює різниці мас сирого і висушеного матеріалів. Потім розрахувати вміст води в процентах відносно до сирої та сухої мас рослинного матеріалу.

4. Результати записати у таблицю 2.1.

Таблиця 2.1. Визначення вмісту води та сухої речовини у рослин різних екологічних груп

Назва рослин, ярус, варіант	Номер бюкса	Маса бюкса, г	Маса бюкса з сирою наважкою, г	Маса сирої наважки, г	Маса бюкса з сухою наважкою, г	Маса сухої наважки, г	Вміст води в пробі, г	Вміст води, %
-----------------------------	-------------	---------------	--------------------------------	-----------------------	--------------------------------	-----------------------	-----------------------	---------------

4. Зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Про що свідчать результати ваших досліджень?
2. Які пристосування виробились у рослин до умов недостатнього водозабезпечення?
3. Які пристосування виробились у рослин до умов надмірного зволоження?
4. Що таке плач рослин й чому він відбувається?
5. Як відрізняються між собою за особливостями водного режиму рослини закритого й відкритого ґрунтів?

Робота 18. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ТРАНСPIPAЦІЇ ТА ВІДНОСНОЇ ТРАНСPIPAЦІЇ ВАГОВИМ МЕТОДОМ

Транспірація (випаровування води рослинами) вимірюється кількістю випарованої води одиницею листової поверхні за одиницю часу. Величина транспірації залежить від багатьох факторів (температури, освітлення, водопостачання тощо), а також змінюється впродовж доби в межах 10÷300 г·м⁻² год⁻¹.

Одним із методів визначення інтенсивності транспірації є ваговий, який базується на обліку кількості випарованої води. Цим методом можна визначити транспірацію цілої рослини або її частини.

Відносна транспірація – відношення інтенсивності транспірації до інтенсивності випаровування з вільної водної поверхні за тих самих умов. Цей показник характеризує здатність рослин регулювати транспірацію і становить 0,1÷0,5, піднімаючись до 1, а у добре захищених від втрати води рослин дорівнює 0,01 і менше.

Мета роботи. Визначити інтенсивність транспірації та відносну транспірацію залежно від впливу деяких факторів (температури, вітру тощо).

Матеріали, реактиви, обладнання. Дослідні рослини; олія; технічні ваги з наважками, чашки Петрі, звичайний і міліметровий папір, лінійки, вентилятор, ножиці.

Хід роботи.

1. В пробірку налити воду, в яку занурити черешок листка (гілку). Попередньо зрізи поновити з метою видалення з трахей і трахеїд повітря.

2. На поверхню води в пробірці нанести 1÷2 краплини рослинної олії і ретельно зважити її з точністю до третього знаку. За одну годину повторно зважити і визначити кількість випаруваної води.

3. Отримати величину інтенсивності транспірації, поділивши кількість випаруваної води в грамах на площу поверхні листкової пластинки (см²).

4. Визначити площу поверхні листка. Для цього вирізати з паперу квадрат площею 100 см² (10х10 см) і зважити. Папір повинен бути рівномірним за щільністю. На цей квадрат накласти листок, який був у досліді, і гострим олівцем обвести контур його. Вирізати контур листка, встановити масу його і вирахувати площу за пропорцією. Поверхню листка ще простіше визначити після нанесення його контуру на міліметровий папір.

5. Обчислити інтенсивність транспірації T (в г м⁻² год⁻¹) за формулою:

$$T = \frac{10000 \cdot C}{S \cdot t}$$

де C – кількість випаруваної листком води за 1 год, г; t – тривалість досліді, год; S – площа листка, см².

6. Паралельно, за тих самих умов, визначити інтенсивність випаровування води з вільної водної поверхні (E). Для цього встановити кількість випаруваної води за 1 год з поверхні чашки Петрі. Площу поверхні чашки Петрі підрахувати за формулою:

$$S = \pi r^2.$$

7. Розрахувати E за раніше наведеною формулою інтенсивності транспірації і обчислити величину відносної транспірації (ВТ):
 $ВТ = T/E$.

Примітка. У досліді вивчити, як умови (освітленість, швидкість вітру та ін.) впливають на інтенсивність транспірації.

8. Порівняти різні види рослин і зробити висновки про здатність їх регулювати транспірацію.

9. Результати дослідів записати в таблиці 2.2. та 2.3.

Таблиця. 2.2. Визначення інтенсивності транспірації ваговим методом

Варіант досліді	Транспірація				Інтенсивність транспірації (T), г м ⁻² год ⁻¹
	маса пробірки з листком, г		випарувалось води, г	площа листка, см ²	
	на початку досліді	в кінці досліді			

Таблиця.2.3. Визначення інтенсивності випаровування води з вільної поверхні

Варіант досліді	Випаровування				Інтенсивність випаровування (E), г м ⁻² год ⁻¹	Т/Е
	маса чашки Петрі з водою, г		втрата води, г	площа поверхні, см ²		
	на початку досліді	в кінці досліді				

10. Зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке транспірація рослин?
2. Яке значення транспірації для рослин?
3. Що таке відносна транспірація?
4. Від яких факторів середовища залежить інтенсивність транспірації?
5. Якими методами можна обчислити площу поверхні листка?
6. Для чого в пробірку з листком наливають краплину олії?

7. Поясніть чому інтенсивність освітлення (вологість повітря, концентрація CO_2 тощо) впливають на інтенсивність транспірації.

8. Який вплив транспірації на продуктивність рослин?

Робота 19. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ТРАНСПІРАЦІЇ У РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ ГРУП РОСЛИН (за Івановим)

Метод базується на визначенні зміни маси зрізаного листка за короткий (до 5 хв.) проміжок часу, що дає змогу спостерігати транспірацію при тому стані насичення листка водою, в якому він перебував на інтактній рослині. За більш тривалої експозиції вміст води в листку зменшується, що відповідно зумовлює зменшення інтенсивності транспірації.

Мета роботи. Встановити інтенсивність транспірації у представників груп гігро-, мезо- і ксерофітних рослин в кімнатних умовах і за дії вітру.

Матеріали, реактиви, обладнання. Двотижневі проростки пшениці або кукурудзи; листки рослин різних екологічних груп, торсійні ваги, вентилятор, ножиці.

Хід роботи.

1. На торсійних терезах швидко зважити листки одного ярусу з 5 рослин.
2. За 5 хв. після зважування першого листка, вдруге зважити всі листки в тій самій послідовності.
3. Результати записати в таблицю 2.4.

Таблиця 2.4. Визначення інтенсивності транспірації у листках різних рослин

Варіант досліджу	Маса листка, г	Повторність			Сумарна маса 10 листків, г	Втрата води 10 листками, г	$T, \text{г м}^{-2} \text{год}^{-1}$
		1	2	3			
1.	Початкова Через 5 хв.						
2.							

3. Виконати розрахунки за сумарною масою 5 листків кожного варіанту.

4. Визначити інтенсивність транспірації за кімнатних умов (контроль) і сухого теплого вітру (з вентилятором).

Примітка. Можна дослідити інтенсивність транспірації на представниках гігро-, мезо- та ксерофітів у природних умовах зростання.

Контрольні запитання та завдання

1. Поясніть, чому вимірювання інтенсивності транспірації обмежують 5-хвилинним інтервалом.
2. Які існують пристосування у рослин для регуляції транспірації?
3. Чому під час транспірації води тіло рослини охолоджується?
4. Чи відомі вам інші механізми тепловідведення крім транспірації?
5. Проведіть порівняльний аналіз механізмів регуляції транспірації у гідро-, мезо- та ксерофітних груп рослин.

Робота 20. СПОСТЕРЕЖЕННЯ ЗА ДИНАМІКОЮ ТРАНСПІРАЦІЇ НА ГІЛКАХ ДЕРЕВНИХ РОСЛИН ВПРОДОВЖ ДНЯ

Інтенсивність транспірації змінюється під впливом факторів навколишнього середовища (температури, освітлення, спектрального складу, вологості повітря тощо). Переконалися в цьому можна провівши досліди зі зрізаними гілками різних деревних порід.

Мета роботи. Провести спостереження за інтенсивністю транспірації у різних видів рослин під впливом факторів навколишнього середовища.

Матеріали, реактиви, обладнання. Гілки деревних рослин (ялини, дуба, липи, бузку та ін.); бюретки місткістю 50 мл, гумові трубки з затискачами, кристалізатор, гумові пробки, свердла, гострий ніж, ваги з наважками, парафін, міліметровий папір, вентилятори.

Хід роботи.

1. Бюретки місткістю 50 мл з гумовою трубкою та затискачем заповнити водою і закрити гумовою пробкою з отвором. Воду для цього взяти відстояну в кристалізаторі впродовж доби з метою видалення розчинених в ній газів.

2. Підрізати під водою дослідні гілки і щільно вставити в отвори пробок (нижні кінці гілок попередньо очистити від кори на 10÷12 мм).

Примітка. Бюретки з гілками перевернути донизу і перевірити герметичність приладу (вода не повинна витікати з бюретки).

3. Відкрити затискач і встановити рівень води в бюретці на верхній поділці.

4. Штативи з приладами виставити в умовах досліду і відмічати рівень води в бюретці з інтервалом 2 год.

5. Результати записати в таблицю 2.5.

Таблиця 2.5. Визначення інтенсивності транспірації рослин

Вид рослин	Випаровування води, мл								Інтенсивність транспірації, г м ⁻² год ⁻¹
	години	8	10	12	14	16	18	20	

6. У польових умовах одночасно провести метеорологічні спостереження.

7. Після досліду визначити площу листків. Щоб визначити поверхню випаровування у хвойних порід (сосни, модрина) обірвати хвою, зважити її і обчислити площу, враховуючи, що 1 г сирої хвої сосни відповідає 33 см², а 1 г сирої хвої модрина відповідає площі 150 см².

8. Розрахувати інтенсивність транспірації для кожного виду рослин і побудувати діаграми.

Контрольні запитання та завдання

1. Яке значення має процес транспірації у життєдіяльності рослин?

2. Чому змінюється інтенсивність транспірації впродовж дня? Який характер цих змін?

3. Як довго можуть функціонувати гілки в такому пристрої?

4. Які пристосування для регуляції транспірації у хвойних порід?

5. Чому градієнт водного потенціалу є рушійною силою надходження та пересування води в рослині?

Робота 21. ВИЗНАЧЕННЯ ВІДНОСНОЇ АКТИВНОСТІ ВОДИ В РОСЛИНІ

Для фізіологічного стану клітини важливе значення має термодинамічний стан води, показником якого є *активність води*, тобто здатність до пересування, випаровування та участі в біохімічних реакціях тощо.

За міру активності води приймають відносний тиск водяної пари, з якою система в даних умовах перебуває в рівновазі: P/P_0 , де P – тиск пари над системою; P_0 – тиск насиченої пари над чистою водою за тих самих умов. У живій клітині активність води знижена в результаті процесів гідратації та іммобілізації. Метод визначення активності води в рослині базується на врахуванні втрати води рослиною в камері з сухим повітрям. Одночасно обчислюють випаровування з вільної водної поверхні за тих самих умов.

Мета роботи. Визначити відносну активність води в рослинах залежно від забезпечення їх водою.

Матеріали та обладнання. Тургесцентні та зів'ялі листки рослин; ексікатор з CaCl₂; аналітичні або технічні ваги, фольга, картон, ножиці, лінійки.

Хід роботи.

1. З фольги виготовити кювету площею 4 см², для цього взяти шматочок фольги розміром 5х5 см, накласти на нього вирізаний з картону квадрат 2х2 см, краї фольги загнути, а картон витягнути.

2. В кювету налити дистильовану воду так, щоб було повністю вкрите дно її. Кювету зважити і поставити в герметичний ексікатор з CaCl₂, відмітити час.

3. Зрізати листок, зважити його і вмістити в той самий ексікатор.

4. За 2 год повторно зважити листок і кювету з водою.
5. Визначити площу листка ваговим методом. Розрахувати інтенсивність втрати води листком (I) та випаровування води з кювети (I_0).
6. Відносну активність води (a) в листку обчислити за формулою:

$$a = I/I_0.$$

7. Дослідити тургесцентні та зів'ялі листки різних рослин.
8. Результати записати в таблицю 2.6.

Таблиця 2.6. Визначення відносної активності води в листках різних рослин

Варіант досліджу	Час зважування		Маса, г		Втрата води, мг	Площа, см ²	Інтенсивність втрати води, мг·см ⁻² ·год ⁻¹	Відносна активність води, а
	1	2	1	2				

9. У висновках порівняти відносну активність води різних рослин.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке активність води?
2. Чому втрату води рослинами визначають в ексикаторі, а не в термостаті?
3. Що розуміють під поняттям “гомеостатична вода”?
4. Які фактори впливають на втрату води рослиною?
5. Як пристовується рослина до зменшення втрат води?
6. Які рослини втрачають (випаровують) води більше: хвойні чи листяні і чим можна пояснити різницю, якщо вона є?

Робота 22. ВИЗНАЧЕННЯ ВОДОУТРИМНОЇ ЗДАТНОСТІ РОСЛИН (за Арландом)

Водоутримна здатність це спроможність рослин (клітин) утримувати воду за дії різноманітних сил (високої температури,

низького парціального тиску води в атмосфері, оточуючому розчині тощо). Водоутримні сили зумовлені дією осмотично-активних сполук в клітині, проникністю клітинних мембран та станом внутрішньоклітинної води. Зменшення проникності плазмалем, посилення набрякання мітохондрій, хлоропластів, збільшення кількості зв'язаної води (гідратної та іммобілізованої) в клітинах спричиняють збільшення їхньої водоутримної здатності, а зворотні зміни – зменшення.

Величину водоутримної здатності характеризують кількістю води, яка залишається в клітинах після дії відповідного фактора (низького тиску водяної пари, осмотичного потенціалу розчину). Визначення цього показника за А. Арландом базується на врахуванні втрат води рослинами при підсиханні їх.

Мета роботи. Визначити водоутримну здатність рослин, вирощених за різних умов.

Матеріали, реактиви, обладнання. Рослини квасолі, пшениці та ін., які вирощували на піску без добрив (контрольні) і на піску з внесенням добрив (дослідні); розплавлений парафін; водяна баня, ножиці, технічні ваги, штативи.

Хід роботи.

1. Зрізати по 10 рослин кожного з двох варіантів і негайно занурити місцем зрізу в розплавлений парафін, щоб запобігти втратам води зрізом.
2. Зважити кожну рослину окремо і закріпити їх в штативах. Повторити зважування кожної рослини за 30, 60 та 90 хв. Зменшення маси рослин свідчить про втрату води у процесі випаровування за кожні 30 хв.
3. Дані записати в таблицю 2.7.

Таблиця 2.7. Визначення водоутримної здатності рослин

№ п/п	Маса рослин, г			Кількість випаруваної води за кожні 30 хв, г			Випаро- вуюча маса, г			Втрата води за 30 хв, г			Випару- ваної води,		
	за час, хв														
	30	60	90	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3

4. Обчислити кількість випаруваної води у відсотках від початкової маси рослини за послідовні інтервали в 30 хв.

5. Одержані дані зобразити графічно і зробити висновки щодо водоутримної здатності рослин, вирощених за різних умов живлення.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке водоутримна здатність та від чого вона залежить?
2. Дати критичний аналіз цього методу.
3. Чим можна замінити парафін у досліді?
4. Як залежить водоутримна здатність тканин від кількості в них іонів азоту, калію і кальцію?
5. Чи впливає на водоутримну здатність вік листка, його положення на рослині?
6. Як впливають на водоутримну здатність листків умови навколишнього середовища?

Робота 23. ВИЗНАЧЕННЯ ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ РОСЛИН

Водний дефіцит – це нестача води, виражена у відсотках від загальної кількості її при повному насиченні тканин водою. Він може виникати у разі порушення водопостачання рослин і спричинювати тимчасові або тривалі зміни в інтенсивності біохімічних та фізіологічних процесів, що відбивається на продуктивності рослин. Тому цей показник використовують для оцінки рівня водозабезпеченості та діагностики поливу рослин.

Мета роботи. Визначити водний дефіцит у рослин за різних умов їх водозабезпечення.

Матеріали, реактиви, обладнання. Дослідні рослини в різних умовах водопостачання; дистильована вода; сушильна шафа, аналітичні ваги, бюкси, ексікатори, свердла 8 мм діаметром, фільтрувальний папір, щипці, фанерні або гумові пластинки, чашки Петрі або пробірки в штативах, піпетки.

Хід роботи.

Примітка. В роботі досліджують рослини, вирощені за різних умов водозабезпеченості.

1. Свердлом з діаметром 8 мм зробити 10 висічок з листка, намагаючись обминути товсті жилки.

2. Висічки зважити і вмістити у воду (в чашках Петрі або пробірках) на 2 год для насичення тканин водою.

3. Тургесцентні висічки просушити фільтрувальним папером і зважити.

4. Для контролю диски знову занурити у воду і за 30 хв. зважити повторно.

Примітка. У разі повного насичення тканин водою їхня маса залишається такою самою, як і в попередньому зважуванні.

5. Визначити масу сухої речовини в тканині (порядок визначення описано в роботі №17).

6. На основі одержаних даних обчислити показники водного дефіциту (ВД) у рослин:

$$ВД = \frac{a - b}{a} \cdot 100\%,$$

де a – кількість води у висічках за їх водонасичення, г; b – початковий вміст води у висічках, г; 100 – коефіцієнт для перерахунку ВД, %.

7. Обчислити відносну тургесцентність (ВТ), яка показує, яку частку у відсотках становить початкова кількість води в листках від вмісту її в стані насичення:

$$ВТ = \frac{b - z}{d - z} \cdot 100\%,$$

де b – маса сирої тканини до занурення її у воду, г; z – маса сухої тканини до занурення її у воду, г; d – маса тургесцентної тканини після насичення її водою, г.

8. Розрахувати дефіцит відносної тургесцентності (ДВТ) – кількість води, яка потрібна для досягнення листками рослин тургесцентного стану:

$$ДВТ = 100\% - ВТ.$$

9. Результати досліджень записати в таблицю 2.8.

Таблиця 2.8. Визначення водного дефіциту та тургесцентності рослин

Варіант досліду	Маса бюкса, г	Сира маса, г	Суха маса, г	Початковий вміст води, г	Кількість води в стані тургесцентності, г	Показники водозабезпечення, %		
						ВД	ВТ	ДВТ

10. Зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Що називають водним дефіцитом?
2. Якими показниками характеризують водний дефіцит рослин?
3. Який вплив водного дефіциту на фотосинтез?
4. Поясніть наступні терміни: польова вологосмість, мертвий запас води в ґрунті, вологість в'янення.
5. Чи є різниця у водовіддачі різних рослин і в чому вона полягає?
6. Як відрізняються за водовіддачею листки рослин з різних місць зростання (затінені й освітлені), з різним шаром кутикули та жилкуванням?
7. Яке значення товщини кутикули листка в його водовіддачі?

Робота 24. ВИЗНАЧЕННЯ ПОЛУДЕННОГО ТА ЗАЛИШКОВОГО ВОДНИХ ДЕФІЦИТІВ

Водний дефіцит в рослинах виникає тоді, коли кількість води, яка витрачається листками в атмосферу перевищує кількість води, яка поглинається коренями. Під цим терміном розуміють кількість води, якої не вистачає для повного насичення рослинних клітин. Її виражають у відсотках до загальної кількості води за повного насичення тканин. За умов значного зниження запасів вологи в ґрунті, вночі не відбувається відновлення денних втрат води, внаслідок чого виникає залишковий водний дефіцит, який

спричинює подальше зниження обводнення тканин рослинного організму.

Полуденний та залишковий водні дефіцити є важливими характеристиками водного обміну рослин. Водний дефіцит рослин визначають за двома основними параметрами – вмістом води та її енергетичним статусом, який виражають як загальний водний потенціал.

Методи визначення водного дефіциту рослин умовно поділяють на 4 групи: визначення загального водного потенціалу, осмотичного потенціалу як компонента загального водного потенціалу, вмісту води та водного дефіциту. Метод визначення водного дефіциту дозволяє встановити ступінь стійкості рослин до дії несприятливих зовнішніх факторів не лише окремих культур, а й сортів, форм та ліній в межах однієї культури.

Мета роботи. Визначити полуденний та залишковий водний дефіцит у різних рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Дослідні рослини, що відрізняються рівнем стійкості до дії несприятливих факторів довкілля; дистильована вода; аналітичні ваги, сушильна шафа, ексикатор з водою, пробірки в штативах, піпетки, фільтрувальний папір.

Хід роботи.

1. Для визначення полуденного водного дефіциту листків зразки відібрати впродовж дня, залежно від завдань досліджень, а залишкового – за 0,5 год. до сходу сонця. Перед початком досліду відмітити однаково розвинені листки певного ярусу.

2. Листок пшениці, жита, або злакових трав зрізати біля основи листової пластинки, зважити на аналітичних терезах і вмістити в пробірки (висотою 12÷14 см) з 2÷3 мл дистильованої води.

3. Пробірки із зразками вмістити в ексикатор, на дні якого міститься вода, закрити кришкою і залишити на 10÷12 год. до повного насичення листків водою. Повторність дослідів –10-ти кратна.

4. Після насичення водою, листки вийняти з пробірок, обтерти фільтрувальним папером, зважити, висушити до постійної маси і знову зважити.

5. Розрахувати залишковий та денний водні дефіцити за формулою:

$$X = \frac{100 \cdot (a - b)}{b - в},$$

де X – водний дефіцит листка, % від маси води в насиченому водою листку; a – маса листка до насичення водою, г; b – маса листка після насичення водою, г; $в$ – маса сухої речовини в наважці, г.

6. Результати записати в таблицю 2.9.

Таблиця 2.9. Визначення полуденного та залишкового водного дефіциту листка

Вид рослини	Маса листка до насичення, г	Маса листка після насичення, г	Маса сухої речовини, г	Водний дефіцит, %
-------------	-----------------------------	--------------------------------	------------------------	-------------------

7. Зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке полуденний та залишковий водні дефіцити? Для чого застосовують визначення цих показників?
2. Які переваги даного методу визначення водного дефіциту перед іншими?
3. Яку роль відіграють продири та їхній стан у формуванні водного режиму рослин?
4. Чи відіграє роль у водовіддачі колір листків і чи може ця особливість рослини впливати на її водний режим рослини й чому?
5. Як краще доглядати рослину, щоб уникнути виникнення водного дефіциту?
6. Яку роль у формуванні водного дефіциту відіграють колоїди рослини?

Робота 25. ВИЗНАЧЕННЯ ШВИДКОСТІ ВТРАТИ ВОДИ ПІД ЧАС В'ЯНЕННЯ РОСЛИН З РІЗНИМИ МОРФО-ФІЗІОЛОГІЧНИМИ ОЗНАКАМИ

Показник швидкості втрати води, на відміну від транспірації, визначають за тривалих експозицій (10÷12 год., доба, а інколи й

більше). Він дає уявлення про здатність рослин утримувати воду в процесі в'янення за значного дефіциту її.

Мета роботи. Визначити водоутримну здатність рослин різних видів та її взаємозв'язок з морфо-фізіологічними особливостями органів.

Матеріали, реактиви, обладнання. Рослини різних видів, торсійні ваги, лінійки, міліметровий папір, бюкси для визначення маси сухої речовини, термостат.

Хід роботи.

Примітка. В досліді можна вивчити швидкість втрати води листками або підземними органами таких дібровних видів, як розхідник (*Glechoma hederacea*), купина (*Polygonatum multiflorum*), копитняк (*Asarum europaeum*), фіалка (*Viola odorata*), мокрець (*Stellaria holostea*), проліска сибірська (*Scilla sibirica*), прясн (*Coridalis halleri*), анемона жовтецева (*Anemona ranunculoides*) та ін.

1. Зважити по три листки кожного виду на торсійних вагах з інтервалом в 1 год.
2. Відібрати середні проби, визначити в них кількість сухої речовини і прийняти її сталою протягом усього досліді.
3. Побудувати графіки, на яких на осі абсцис відкласти час, а на осі ординат – вміст води у відсотках від початкового.
4. Зробити висновки щодо водоутримної здатності різних видів і взаємозв'язок її з морфолого-фізіологічними особливостями рослин.

Контрольні запитання та завдання

1. Що розуміють під водоутримною здатністю рослин?
2. Яке пристосувальне значення має ця властивість рослин?
3. Які екологічні групи рослини ви знаєте?
4. Які морфолого-анатомічні ознаки впливають на швидкість водовіддачі рослин?
5. Чи можна впливати на водоутримну здатність рослин зміною умов мінерального живлення.
6. Як впливає на водоутримну здатність рослин вітер, дощ, поливання ґрунту, наявність солей у ґрунті?

Робота 26. СПОСТЕРЕЖЕННЯ ЗА ПЕРЕРОЗПОДІЛОМ КАЛІЮ В ЗВ'ЯЗКУ З РУХОМ ПРОДИХІВ

Рух продихів зумовлений особливостями анатомічної будови їх. Продихи побудовані двома замикаючими клітинами бобовидної форми, внутрішні стінки яких потовщені, а зовнішні

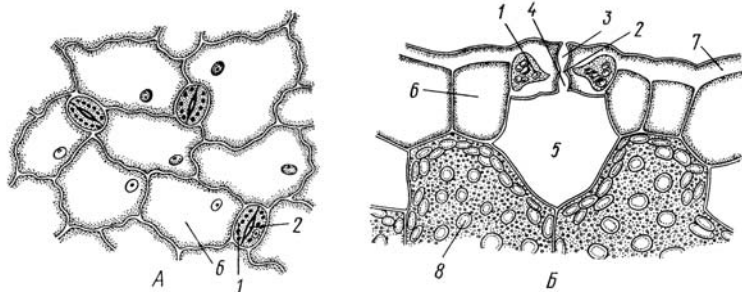


Рис. 2.1. Будова продихів: 1 – замикаюча клітина;

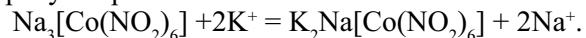
2 – продихова щілина;

3 – передній дворик; 4 – задній дворик; 6 – клітина епідермісу;

7 – шар кутикули; 8 – клітина мезофілу листка.

– тонкі. Якщо замикаючі клітини насичені водою, то зовнішні стінки сильно розтягуються і продихова щілина розширюється. Коли вода втрачається, замикаючі клітини випрямляються і продихові щілини закриваються. В основі динаміки тургору замикаючих клітин лежить зміна їхнього осмотичного потенціалу.

Згідно з „крохмальною” теорією продихової регуляції, осмотичний потенціал створюється за рахунок зворотних перетворень в системі крохмаль – цукор. Однак в останні роки досить переконливо доведено, що ведучу роль в цьому процесі відіграє робота калієвих та кальцієвих іонних насосів, які забезпечують перерозподіл іонів між замикаючими клітинами продихів і сусідніх епідермальних клітин. Збільшення осмотичного потенціалу в замикаючих клітинах під час відкривання продихів пов’язане з нагнітанням в них калію, продихи закриваються у разі виходу калію з замикаючих клітин. Тому при відкритих продихах замикаючі клітини містять значно більше іонів калію, ніж при закритих. Ці відмінності можна виявити гістохімічно за допомогою кобальтнітритного методу. Метод ґрунтується на взаємодії кобальтнітритну натрію з іонами калію в тканині:



Наразі утворюється жовтий кристалічний осад солі $\text{K}_2\text{Na}[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$. Для більш чіткого виявлення препарат обробляють сульфідом амонію, що призводить до утворення в місцях локалізації калію коричневого осаду сульфиду кобальту.

Мета роботи. Дослідити перерозподіл іонів калію в продихових клітинах при закриванні і відкриванні їх, вивчити вплив освітлення на цей процес.

Матеріали, реактиви, обладнання. Рослини традесканції або 2-тижневі проростки вівса, бобів та інші рослини; середовище інкубації, бідистильована вода, насичений розчин сульфиду амонію, 50%-й розчин гліцерину; мікроскопи, предметні стекла та накривні скельця, кристалізатори з снігом або льодом, леза, чашки Петрі, бюкси, скляні палички.

Примітка. Виготовлення середовища інкубації. Розчинити 20 г нітрату кобальту та 35 г нітриту натрію в 75 мл підкисленої бідистильованої води (10 мл льодяної оцтової кислоти довести до 75 мл бідистильатом). Суміш профільтрувати і довести до 100 мл бідистильатом.

Працювати краще зі свіжевиготовленою сумішшю. У разі потреби її можна зберігати впродовж місяця.

Хід роботи.

В досліді використовують традесканцію, кукурудзу, боби, овес та інші рослини. Для роботи слід мати рослини з широко відкритими та закритими продихами.

1. Перед початком досліді одну частину рослин полити і витримати 1,5÷2 год. на яскравому світлі, а другу – в темряві до повного закривання продихів. Повністю відкриті продихи можна також одержати на листових сегментах. Для цього за годину до досліді нарізати смужки листка і вмістити їх в освітлені настільною лампою чашки Петрі з водопровідною водою, розміщені на різній відстані від джерела світла. На нижній стороні підготовлених до досліді листків або сегментів гострою бритвою під прямим кутом до центральної жилки зробити поверхневі надрізи через 2÷3 мм і зрізати в цьому ж напрямі невеликі ділянки епідерми.

2. Підготовлені епідермальні смужки вмістити на 1÷2 хв. в чашки Петрі з охолодженою бідистильованою водою з метою усунення позаклітинного калію.

3. Епідермальні смужки перенести на 5 хв. в бюкс з охолодженим інкубаційним середовищем і промити у чашці Петрі охолодженим бідистилятом 2÷3 хв. У зв'язку з тим, що кристали натрієво-калієвої солі кобальтазотистої кислоти за кімнатної температури частково розчиняються, то необхідно чашки Петрі з водою і бюкси з інкубаційним середовищем помістити в посудину зі снігом або льодом.

4. Виготовлені препарати розглянути під мікроскопом у суміші 50%-го гліцерину і насиченого розчину сульфиду амонію (1:1). Гістохімічне дослідження провести в 5-кратній повторності. На кожному препараті проглянути по 3÷5 полів зору.

5. Зарисувати локалізацію калію в замикаючих та сусідніх клітинах за закритих і відкритих продихах.

6. Зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Як побудовані продихи?
2. В чому полягає роль іонів калію та кальцію для руху продихів?
3. Який механізм руху продихів?
4. Від дії яких факторів середовища залежить рух продихів?
5. Як можна штучно відкрити продихи?
6. В якому разі замикаючі клітини містять більше іонів калію: коли продихи відкриті, чи закриті?

Робота 27. ВИЗНАЧЕННЯ СИСНОЇ СИЛИ ҐРУНТУ КАПІЛЯРНИМ МЕТОДОМ (за Уршпрунгом)

Рослини можуть поглинати воду з ґрунту лише в тому випадку, коли сисна сила корневих волосків перевищує сисну силу ґрунту.

Мета роботи. Визначити сисну силу ґрунту.

Матеріали, реактиви, обладнання. Проби ґрунту; розчини сахарози (або NaCl, KNO₃) – 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 М); вазелін, пластилін; капіляри, чашки Петрі, фільтрувальний папір, бюкси об'ємом 50 мл для відбору ґрунтових зразків.

Хід роботи.

1. Дослідний зразок ґрунту (50 г) або рідину, сисна сила якої має бути визначена, помістити в скляний посуд.

2. На внутрішню поверхню кришки гумовою смужкою (або пластиром, пластиліном) прикріпити капілярні трубки з розчинами різної концентрації (наприклад, сахарози, KNO₃, NaCl тощо).

3. Трубки обсушити фільтрувальним папером таким чином, щоб рідина заповнювала капіляри не до країв. Шліф кришки змазати вазеліном.

4. На початку досліду і через 24 год. виміряти положення рівнів менісків.

Примітка. Якщо розчини в капілярах мають меншу сисну силу, ніж ґрунтова проба, то рівень менісків знижується; якщо ж у них більша сисна сила, то рівень підвищується. Та концентрація, за якої немає будь-якої зміни довжини, відповідає сисній силі проби.

5. Зробити висновки щодо величини сисної сили дослідних зразків ґрунту.

Контрольні запитання та завдання

1. Дайте визначення поняття “сисна сила”. Від яких факторів залежить сисна сила ґрунту?
2. Яка залежність між сисною силою ґрунту і механічним складом його?
3. Чому для досліду використовують капіляри?
4. Як результати дослідів залежать від хімічної природи розчину в капілярах?
5. В чому сутність методу визначення сисної сили ґрунту за методом Уршпрунга?

Робота 28. ВИЗНАЧЕННЯ ПОВНОЇ ВОЛОГОЄМКОСТІ СУБСТРАТУ

Повна вологоємкість субстрату (піску, ґрунту тощо) – це максимальна кількість води, яку він здатний утримувати. Опти-мальною вологістю для рослин середніх широт є 60-70 % повної вологоємності його.

Мета роботи. Визначити повну вологоємкість ґрунту.

Матеріали, реактиви, обладнання. Металеві циліндри 15÷18 см заввишки, 4÷5 см діаметром з сітчастим дном, фільтрувальний папір, технічні ваги з різновагами, кристалізатор.

Хід роботи.

1. На сітчасте дно покласти 2 кружечки зволоженого фільтрувального паперу і зважити циліндр з точністю до 0,01 г.

2. Циліндр заповнити на 3/4 повітряно-сухим піском або ґрунтом, злегка ущільнюючи його постукуванням по стінці і знову зважити на технічних вагах.

3. Циліндр вмістити в кристалізатор, на дно якого налити воду. Для зменшення випарування води всю установку накрити склянкою.

4. Після того, як вода в циліндрі підніметься до поверхні субстрату, циліндр витягнути з води і дати стекти зайвій воді, обсушити зовні фільтрувальним папером і зважити.

5. Циліндр знову на 1÷2 год. вмістити в кристалізатор з водою і зважити. Цю операцію повторювати доти, доки маса циліндра з субстратом, насиченим водою, не стане сталою. Масу визначити у 2-кратній повторності.

6. Розрахувати повну вологоємкість субстрату за формулою:

$$ПВ \% = \frac{в - б}{б - а},$$

де a – маса циліндра, г; $б$ – маса циліндра з повітряно-сухим субстратом, г; $в$ – маса циліндра з субстратом, насиченим вологою, г.

7. Визначивши повну вологоємкість субстрату, розрахувати кількість води, яку слід заливати у вегетаційну посудину під час вирощування рослин з відповідним рівнем вологості.

Примітка. Рослини вирощують у спеціальних вегетаційних посудинах, в яких коренева система повинна бути захищена від дії світла, тому на них одягають чохла з темного паперу або фарбують у чорний, а потім білий кольори. Посудини тарують до однакової маси. Для цього в них вміщують трубку для поливу 1,5÷2 см діаметром, 16÷18 см заввишки, (бите скло або гравій) до загальної маси 0,65 кг, круг марлі 15 см діаметром.

Завдання. В посудину входить 1,3 кг субстрату (піску). Тоді масу, до якої потрібно поливати посудини при 60 % ПВ, розраховують так.

Припустимо, що повна вологоємкість піску (ПВ) становить 25 %, тоді вологість піску, до якої слід поливати, становитиме 15 %:

$$x = \frac{25 \cdot 60}{100} = 15 \%.$$

Маса піску на одну посудину 1,3 кг, маса води – 0,195 кг (1,3 кг x 15 %). Посудину слід поливати до маси 2,145 кг (0,65+1,3+0,195=2,145 кг).

Примітка. За такою ж схемою розрахувати масу, до якої слід поливати посудини у варіантах з іншим рівнем вологості (40, 30 % ПВ).

Контрольні запитання та завдання

1. Якому терміну відповідає поняття НВ?
2. Розрахувати масу води, яку слід влити в посудину з піском для поливів до 40 та 30% ПВ, якщо маса тарованих посудин 650 г, маса піску, яку вносять, 1300 г, ПВ піску 25 %.

Контрольні запитання до розділу „Водний режим рослин”

- 1.Що зумовлює поглинання води коренями у разі слабкої та сильної транспірації? Як вода рухається від корневих волосків до ксилеми центрального циліндра?
2. Чому під час посухи не можна підживлювати рослини?
3. Посуха і засолення ґрунтів аналогічно впливають на поглинання води рослинами. Як це можна пояснити?
4. У рослини, корені якої занурені у воду, при додаванні солей настає в'янення. Через деякий час тургор може відновитися. Як це можна пояснити?
5. Поясніть, чому вода у деревних рослин піднімається на висоту, значно більшу ніж 10 м (максимально на таку висоту можна підняти воду механічним насосом).
6. Як можна виміряти швидкість пересування води в стовбурах дерев, не порушуючи їхньої цілісності?
7. Що запобігає розриву водних тяжів у ксилемі?
8. При хлорозі кукурудзи дуже сильно знижуються фотосинтез і поглинання іонів калію. Опишіть, який зв'язок між фотосинтезом і надходженням калію в рослину?

9. Як пояснити в'янення теплолюбних рослин за низьких позитивних температур?

10. По якій тканині стебла йде висхідний потік?

11. Маса листка клена в стані повного насичення 1,53 г, а після в'янення – 1,26 г. Якою буде величина водного дефіциту листка (у відсотках), якщо маса сухої речовини дослідного листка 0,67 г?

12. Як пояснити механізм закривання та відкривання продихів?

13. Які шляхи випаровування води рослиною, крім продихів?

14. Які існують механізми відведення тепла від рослини, крім транспірації?

15. Що таке водний баланс рослини і які його складові частини?

16. Що таке водний дефіцит і які види його ви знаєте?

17. Яка інтенсивність транспірації листків липи площею 780 см², коли відомо, що за 20 хв. їхня маса зменшилася з 21,7 до 12,7 г?

18. Що таке відносна транспірація і про що вона свідчить?

19. Що розуміють під транспіраційним коефіцієнтом? Рослина кукурудзи за вегетаційний період випаровує 600 кг води і нагромаджує 3 кг сухої речовини. Який у неї транспіраційний коефіцієнт?

20. Що таке продуктивність транспірації? Підрахуйте продуктивність транспірації, якщо відомо, що за вегетаційний період рослини пшениці випарували 525 кг води і утворили 2,5 кг органічної маси.

21. Що таке водний потенціал і які його складові?

22. Які анатомо-морфологічні пристосування рослин сприяють посиленню їхньої водоутримної здатності?

23. Які структурні та функціональні показники можна використовувати для діагностики стану водозабезпечення рослин?

24. Чому тріскаються зрілі плоди томатів, черешень, вишень після інтенсивних тривалих дощів?

Розділ 3.

ФОТОСИНТЕЗ

Фотосинтез – унікальний в фізико-хімічному відношенні процес, який збільшує вільну енергію біосфери за рахунок зовнішнього джерела – Сонця і забезпечує існування як рослин, так і усіх гетеротрофних організмів, у тому числі й людини. Зараз важко, а то і зовсім неможливо знайти будь-які природні явища, які не поєднані з фотосинтезом. Із накопиченням знань про механізми даного процесу фотосинтез визначають як фототрофну функцію деяких бактерій, водоростей та вищих рослин.

Фототрофна функція – це сукупність процесів поглинання, перетворення та використання в багатьох ендергонічних реакціях світлових квантів, у яких відбувається первинне становлення пластичних та енергетичних ресурсів життя на нашій планеті.

Особливістю рослинної клітини є наявність у ній хлоропластів, у яких утворюється органічна речовина із CO₂ і H₂O за рахунок енергії Сонця.

Фотосинтез – це окисно-відновний процес. За участю хлорофілу й енергії сонячних квантів вода фотоокиснюється, в результаті чого виділяються кисень та водень, останній і відновлює вуглекислий газ до рівня вуглеводів. Ці реакції відбуваються відповідно в світлову та темнову фази фотосинтезу.

У *тилакоїдах* хлоропласта відбуваються світлові реакції фотосинтезу: уловлювання квантів світла пігментами – хлорофілом, каротиноїдами, фікобілінами, фотоокиснення води, транспортування електронів за участю електронно-транспортного ланцюга з утворенням відновленої форми нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (НАДФ•H₂) і макроергічних сполук аденозинтрифосфату (АТФ).

Певна частина синтезованих у світлових реакціях НАДФ•H₂ і АТФ у подальшому використовується в процесі синтезу органічних сполук із вуглекислого газу та води. Ці реакції відбуваються у стромі хлоропласта і їх називають *темновими реакціями фотосинтезу*, бо кванти світла в них безпосередньо не беруть участі. *Стромою* називають внутрішній вміст хлоропластів, де локалізовані ферменти, які фіксують та відновлюють вуглекислий газ до вуглеводів.

Засвоєння вуглекислого газу в хлоропласті, тобто асиміляція його вуглецю до складу органічних сполук, відбувається в складному циклі реакцій Кальвіна–Бенсона–Бассема. Найголовнішим ферментом темного циклу є рибулозобісфосфат-карбоксилаза (оксигеназа) – РУБІСКО, яка забезпечує приєднання вуглекислоти до п'ятивуглецевої сполуки – вуглеводу рибулозобісфосфату. Утворений унаслідок такої реакції короткоіснуючий шестивуглецевий продукт розпадається з формуванням двох тривуглецевих молекул фосфогліцеринової кислоти (ФГК). Відновлення молекули ФГК до фосфогліцеринового альдегіду і є власне відновлювальною реакцією на шляху перетворення вуглекислого газу в молекулу вуглеводу.

Наступні складні перетворення сполук у циклі Кальвіна–Бенсона–Бассема забезпечують регенерацію молекул рибулозобісфосфату для приєднання нової молекули CO_2 , а також зумовлюють утворення стабільного продукту фотосинтезу – шестивуглецевого вуглеводу – глюкози.

Усі фотосинтезуючі організми містять пігменти, які запускають фотофізичні та фотохімічні реакції фотосинтезу. Найважливіші з них хлорофіли (рис. 3.1) та каротиноїди (рис. 3.2), тому розділ «Фотосинтез» розпочинається з практичних занять, що розкривають хімічні та фізичні властивості фотосинтезуючих пігментів.

Пігменти локалізовані в тилакоїдах хлоропластів, де пов'язані з мембранними білками і ліпідами. Для екстракції пігментів з рослинного матеріалу використовують полярні розчинники – етиловий спирт або ацетон, які денатурують білки і руйнують пігментліпопротеїновий комплекс.

Для характеристики

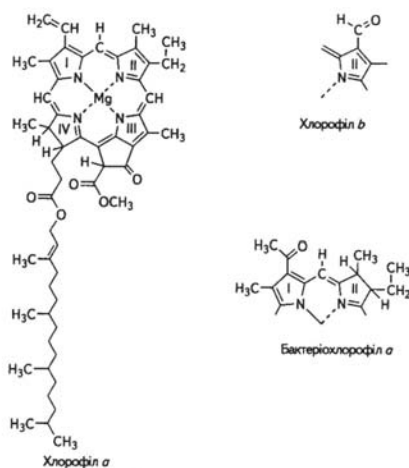


Рис. 3.1. Структура молекули хлорофілу: I, II, III, IV – пірольні кільця, V – циклопентанове кільце, 1 – 10 нумерація вуглецевих атомів, $\text{C}_{20}\text{H}_{39}$ – залишок спирту фітолу

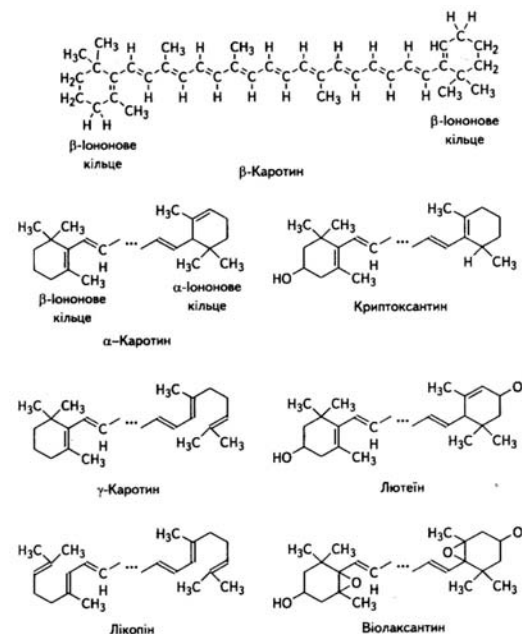


Рис. 3.2. Структура молекули β -каротину.

Важливою характеристикою фотосинтезуючих пігментів є спектри поглинання світлової енергії та флуоресценції, активність ферменту хлорофілази, яка бере участь у біосинтезі хлорофілів.

Різні види пігментів розпізнають за допомогою їхніх спектральних характеристик. Наприклад, спектри поглинання у різних груп хлорофілів залежать від характеру бічних груп пірольних кілець порфіринового ядра молекули і типу органічного розчинника. Потім виконують роботи, в яких визначають активність функціонування різних ферментів, інтенсивність фотосинтезу за накопиченням органічних сполук у тканинах і зміною концентрації вуглекислого газу або кисню в навколишньому середовищі (газометричні методи) на одиницю фотосинтезуючої поверхні за одиницю часу.

фотосинтетичного апарату рослинних організмів використовують такі параметри, як кількісний вміст окремих пігментів, їх співвідношення і фракційний склад, міцність зв'язку хлорофілів із білком, фотохімічну активність, залежність вмісту пігментів від умов освітлення, живлення, етапів онтогенезу тощо. Досліджують також хімічне перетворення хлорофілів у хлорофілід і феофітин.

Робота 29. ЕКСТРАКЦІЯ ПЛАСТИДНИХ ПІГМЕНТІВ

Пігменти з фотосинтезуючих тканин рослини екстрагують полярними розчинниками (етиловим спиртом, ацетоном), які руйнують їхній зв'язок із мембранами хлоропластів і тим самим забезпечують повне екстрагування пігментів. Під час розтирання матеріалу з неполярними розчинниками, які не здатні денатурувати білки, в екстракт переходить незначна кількість пігментів. Розтертий матеріал у спирті залишається зеленим і тоді, коли в ньому спостерігається висока активність ферменту хлорофілази, яка відщеплює спирт *фітол* від хлорофілу. Тоді утворюється *хлорофілід* зеленого кольору з такими самими спектральними характеристиками, що і хлорофіли, але з гідрофільними властивостями. Тому хлорофілід не розчиняється в полярних розчинниках, а осад на фільтрі після екстракції фотосинтетичних пігментів залишається зеленим.

Для отримання витяжки пігментів можна використовувати як сирий, так і сухий матеріал. В останньому випадку висушені листки попередньо обробляють гарячою водою, щоб спростити процедуру вилучення пігментів з них.

Мета роботи. Отримати екстракт пластидних пігментів із рослин різних систематичних груп, проаналізувати повноту екстракції пігментів використовуючи воду, полярні та неполярні розчинники.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки пеларгонії, персика, проростки гороху, кукурудзи, пшениці; ацетон, етиловий спирт, петролейний ефір або гексан, карбонат кальцію; порцелянові ступки, скляні пластинки для подрібнення матеріалу, скляні палички, фільтри Шотта N 3 або N 4, колби Бунзена, центрифужні та мірні пробірки, ножиці, свердла, вакуумні насоси, ваги з різноважками.

Хід роботи.

1. Листки різних рослин подрібнити ножицями або скальпелем.
2. Подрібнену наважку ($0,2 \div 0,5$ г) розтерти у ступці, додаючи на кінчику скальпеля CaCO_3 для нейтралізації кислот клітинного соку.
3. Зволожити матеріал незначною кількістю розчинника, розтерти до гомогенної маси і кількісно перенести на фільтр Шот-

та, змиваючи багаторазово ступку невеликими порціями ацетону (варіант перший), спирту (варіант другий), петролейного ефіру (варіант третій) і водою (варіант четвертий).

4. Фільтр Шотта вставити в пробірку, що міститься в колбі Бунзена, яку з'єднати із насосом.

5. Розчини відфільтрувати, змиваючи стінки фільтра невеликими порціями розчинника доти, поки відфільтрована рідина настане безбарвною.

6. Об'єм розчину довести відповідними розчинниками до 10 мл.

7. Вміст у пробірці збовтати. Порівняти забарвлення розчинів візуально.

8. Визначити екстинцію отриманих екстрактів на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 660 нм.

Примітка. У контрольну кювету наливають розчинник, а в іншу – досліджуваній розчин.

9. Результати спостережень записати до таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Ефективність використання різних органічних розчинників для екстракції пластидних пігментів

Рослина	Варіант дослід, використаний екстрагент	Оптична густина розчину, ум. од.
	Ацетон	
	Спирт	
	Петролейний ефір	
	Вода	

10. За величиною екстинції розчинів зробити висновок про розчинність пластидних пігментів у різних розчинниках. Пояснити одержані дані, враховуючи стан пігментів у хлоропластах і їхню хімічну природу.

Контрольні запитання та завдання

1. Чому вода не екстрагує пігменти хлоропластів?
2. Чим можна пояснити наявність каламуті в водно-ацетонових розчинах пластидних пігментів?
3. Чим можна пояснити той факт, що після промивання 80 %-им ацетоном або 96 %-им етиловим спиртом осад із листків персика і борщівника залишається зеленим?

4. Які пігменти залишаються в осаді у разі використання таких розчинників як петролейний ефір або гексан?

5. Що входить до складу екстрактів пігментного комплексу різних рослин?

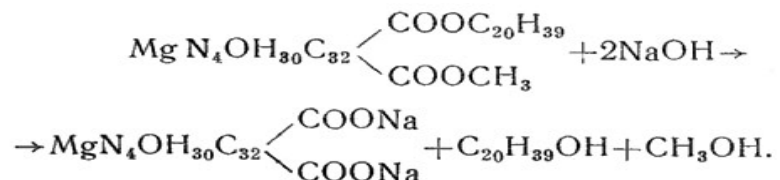
6. Як змінюється колір пігментних екстрактів за дії світла, що проходить крізь розчин або відбивається від нього?

7. Який колір має розчин пігментів, що флуоресціюють?

Робота 30. ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПІГМЕНТІВ ЛИСТКА: РОЗПОДІЛ ПІГМЕНТІВ ЗА МЕТОДОМ К. КРАУСА, ОДЕРЖАННЯ ХЛОРОФІЛІНІВ

У розчинах, одержаних шляхом екстракції розтертих зелених тканин рослин полярними розчинниками, міститься суміш пластидних пігментів, які беруть участь у фотосинтезі. Хлорофіли, яких у листках значно більше, маскують при цьому каротиноїди. Отриманий екстракт пігментів можна розділити за методом Крауса, який оснований на різній розчинності пігментів у спирті та бензині. Ці розчинники у разі зливання не змішуються й утворюють дві фази – верхню бензинову та нижню спиртову, завдяки чому й відбувається розподіл компонентів суміші. Спорідненість пігментів до полярних (спирт, ацетон) і неполярних (бензин) розчинників визначається рівнем їхньої полярності. Ксантофіли містять дві або більше полярних груп, добре розчинні у спирті, тоді як каротин відрізняється вищою спорідненістю до бензину. Фітольний залишок у молекулі хлорофілу гідрофобний, тому зумовлює можливість взаємодії молекули пігменту з бензином. Відщеплення фітолу під час омилення хлорофілу збільшує спорідненість пігменту до полярних розчинників.

У разі обробки хлорофілу лугами, відбувається реакція омилення в результаті чого відщеплюються спиртові залишки і утворюються метиловий спирт, фітол та хлорофілінова сіль. Реакція омилення відбувається за рівнянням:



Унаслідок реакції утворюється сіль хлорофілінової кислоти, яка зберігає зелене забарвлення й оптичні властивості хлорофілу, але відрізняється більшою гідрофільністю порівняно з незмінним пігментом.

Мета роботи. Дослідити різну розчинність пластидних пігментів у спирті та бензині, провести реакцію омилення хлорофілу.

Матеріали, реактиви, обладнання. Спиртовий екстракт пігментів із листків різних рослин; бензин, 20 %-ий розчин гідроксиду калію або натрію; пробірки в штативах, вода, водяна баня.

Хід роботи.

Завдання 1.

1. У пробірку налити 3 мл концентрованого екстракту пігментів, додати 6 мл бензину і 2÷3 краплини води.

2. Пробірку закрити скляною пробкою і вміст добре збовтати.

Примітка. За 2÷3 хв. Спостерігають розшарування розчину на зелений (верхній) і жовтий (нижній) шари. У верхньому бензиновому шарі розчинені хлорофіли і каротин (гідрофобні речовини), у нижньому водно-спиртовому – ксантофіл. У нижньому шарі можна визначити спектр поглинання ксантофілу. Показником чистоти отриманого ксантофілу від зелених пігментів є відсутність поглинання в червоній ділянці спектру.

3. Замалювати розподіл пластидних пігментів і зробити висновки щодо їхньої розчинності в спирті та бензині.

Завдання 2.

1. У пробірку налити 3 мл концентрованого екстракту пігментів, додати 1 мл 20 %-го розчину NaOH, вміст перемішати.

2. Пробірку поставити на киплячу водяну баню.

3. Щойно розчин закипить, пробірку вийняти й вміст охолодити.

4. До охолодженого розчину додати рівний об'єм бензину та декілька краплин води для кращого розподілу суміші.

5. Вміст пробірки різко струсити і залишити для відстоювання.

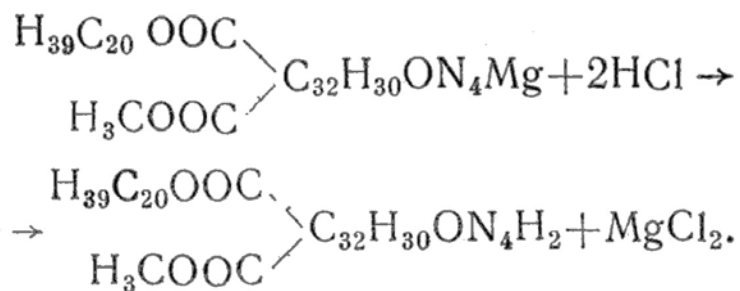
Примітка. Спостерігають утворення двох шарів: нижній

(спиртовий) – суміш солі хлорофілінової кислоти (продукт омилення хлорофілу) та ксантофілу; верхній (бензиновий) – розчин каротинів. Солі хлорофілінової кислоти, як і хлорофіл, зелені, але характеризуються гідрофільністю і тому перерозподіляються в нижній водноспиртовий шар. У верхньому шарі можна визначити спектр поглинання каротину.

6. Замалювати розподіл пігментів в пробірці та зробити висновки.

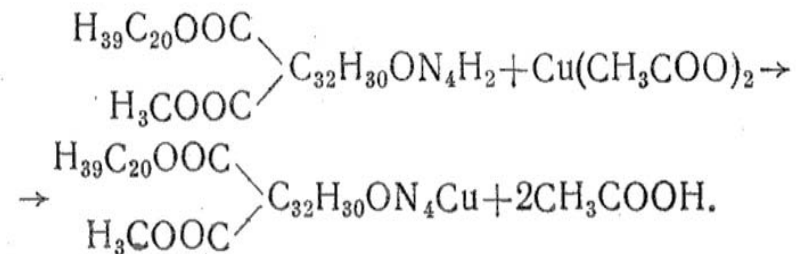
Контрольні запитання та завдання

1. Які зміни структури, складу та властивостей молекули хлорофілу відбуваються під час омилення?
2. Чим хлорофілінова кислота відрізняється від її солей?
3. Що обумовлює гідрофобність молекули хлорофілу?
4. Чим каротини відрізняються від ксантофілів? Про що свідчать їхні спектри поглинання?
5. Чому ксантофіли порівняно з каротинами гідрофільніші?
6. Звідки походить назва «каротин»?
7. Назвіть відомі Вам каротини і ксантофіли.



У природних умовах побуріння раніше зелених рослин свідчить про утворення в клітинах феофітину під впливом стресових умов. Разом із тим ця сполука утворюється і в процесі фотосинтезу.

Якщо на феофітин подіяти солями міді, цинку або ртуті, то атом відповідного металу витіснить протони з порфіри нового ядра і зелене забарвлення знову відновлюється. Однак воно дещо відрізняється від забарвлення хлорофілу:



Тому слід зазначити що колір хлорофілів залежить від наявності металоорганічного зв'язку в їхній молекулі. Обернене введення магнію в склад феофітину відбувається з певними труднощами.

Мета роботи. Одержати феофітин і пересвідчитися, що дія стресових факторів (висока температура, проморожування тканин) призводить до феофітинізації зелених пігментів.

Матеріали, реактиви, обладнання. Свіжі та проморожені листки примули і бегонії, спиртовий екстракт пігментів; 20 %-ий розчин соляної кислоти в крапельниці, ацетат цинку, ацетат міді; електроплитка, водяна баня, штатив із пробірками, порцелянові ступки, ножиці.

Хід роботи.

Завдання 1.

1. У дві пробірки налити по 3 мл спиртового екстракту пігментів.

2. В першу пробірку додати краплину 20 %-го розчину соляної кислоти

Примітка. Розчин в пробірці набуває бурого забарвлення внаслідок утворення феофітину.

3. В другу пробірку (контроль) додати краплину води.

Примітка. Колір екстракту в пробірці не змінюється.

4. Дані спостережень занотувати, зробити висновки щодо отриманих результатів.

Завдання 2

1. У пробірку з бурим розчином на кінчику скальпеля внести кілька кристалів ацетату цинку або ацетату міді.

2. Розчин довести до кипіння.

Примітка. Пробірки нагрівають на плитці з закритими спіралями у витяжній шафі, тримаючи їх отвором від себе. Якщо забарвлення не змінюється, в пробірки вносять ще трохи реактивів і продовжують її нагрівати.

3. Дані спостереження занотувати, записати хімічну реакцію, яка відбулася.

Завдання 3.

1. Листки пеларгонії та бегонії занурити у водяну баню за температури 70÷80°C.

2. Відмітити зміни, які відбуваються з листками за дії високої температури.

3. Порівняти дослідні та заморожені листки, зробити висновки.

Завдання 4.

1. Дрібно нарізані листки пеларгонії та бегонії розтерти у ступках без CaCO₃ з сухим ацетоном або 96 %-им спиртом.

2. Відмітити колір екстрактів із листків пеларгонії та бегонії, пояснити результати дослідів.

Контрольні запитання та завдання

1. Чому клітини асиміляційної тканини зелені, якщо вакулярний сік їх містить кислоти?

2. Чим нативний хлорофіл відрізняється від зеленого продукту, який утворився після дії на феофітин оцтовокислих металів? Напишіть формули продуктів цих реакцій.

3. Чому після суворої зими озимина виходить із-під снігу бруною?

4. Які структурні зміни відбуваються в молекулі хлорофілу у разі її феофітінзації?

5. Чи флуоресціюють розчини феофітину?

6. Який елемент займає центральне положення в молекулі хлорофілу?

7. Які форми хлорофілів у рослин Вам відомі?

Робота 32. ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ХЛОРОФІЛІВ ТА КАРОТИНОЇДІВ У ЛИСТКАХ ВИЩИХ РОСЛИН

Важливою характеристикою фотосинтезу є вміст хлорофілу та каротиноїдів у асимілюючих органах. Так, у багатьох дослідках показано, що існує пряма кореляція між кількістю пігменту в листках, інтенсивністю фотосинтезу, ростом і розвитком рослин та їх продуктивністю. Вміст хлорофілу в хлоропластах також залежить від виду рослин, етапу онтогенезу, екологічних умов тощо. Значний вплив на біосинтез хлорофілу мають також такі фактори, як освітлення, температура, мінеральне живлення, обробка рослин фізіологічно активними речовинами, вік листків.

Уміст хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів можна визначити в загальному екстракті пігментів без попереднього їх розділення. Визначення точної концентрації хлорофілів *a* і *b* у розчині без їх розділення складне, оскільки спектри обох хлорофілів перекривають один одного, й неможливо знайти дві довжини хвилі, в яких поглинання зумовлювалося б повністю лише одним пігментом. Однак існуючі відмінності в спектрах поглинання хлорофілів *a* та *b* дають змогу вибрати точки, де поглинання одного пігменту суттєво перевищує поглинання іншого. Цю обставину й використовують під час проведення кількісного визначення обох хлорофілів без їх розподілу. Однак із двох пігментів точніше визначається хлорофіл *a*.

Залежно від природи розчинника, що використовують для екстрагування пігментів, їх концентрації розраховують за відповідними рівняннями. Останні одержані на основі експериментально отриманих питомих коефіцієнтів поглинання (*C* – концентрація, *D* – оптична густина).

1. Для 100 %-го ацетону:

за Хольм-Веттштейном:

$$\begin{aligned}C_{\text{хл. } a, \text{ мг/л}} &= 9,784 \cdot D_{662} - 0,990 \cdot D_{644}, \\C_{\text{хл. } a, \text{ мг/л}} &= 21,426 \cdot D_{644} - 4,650 \cdot D_{662}, \\C_{\text{хл. } a + \text{хл. } b, \text{ мг/л}} &= 5,134 \cdot D_{662} + 20,436 \cdot D_{644}, \\C_{\text{кар., мг/л}} &= 4,695 \cdot D_{440,5} - 0,268 \cdot (C_{\text{хл. } a} + C_{\text{хл. } b}).\end{aligned}$$

за Шликом:

$$\begin{aligned}C_{\text{хл. } a, \text{ мг/л}} &= 11,70 \cdot D_{662} - 2,09 \cdot D_{644}, \\C_{\text{хл. } b, \text{ мг/л}} &= 21,19 \cdot D_{644} - 4,56 \cdot D_{662}, \\C_{\text{хл. } a + \text{хл. } b, \text{ мг/л}} &= 7,14 \cdot D_{662} + 19,10 \cdot D_{644}.\end{aligned}$$

2. Для 80 %-го ацетону:

за Верноном:

$$\begin{aligned}C_{\text{хл. а, мг/л}} &= 11,63 \cdot D_{665} - 2,39 \cdot D_{649}, \\C_{\text{хл. б, мг/л}} &= 20,11 \cdot D_{649} - 5,18 \cdot D_{665}, \\C_{\text{хл. а + хл. б, мг/л}} &= 6,45 \cdot D_{665} + 17,72 \cdot D_{649}.\end{aligned}$$

за Ліхтенгалером:

$$\begin{aligned}C_{\text{хл. а, мг/л}} &= 12,21 \cdot D_{663} - 2,81 \cdot D_{646}, \\C_{\text{хл. б, мг/л}} &= 20,13 \cdot D_{646} - 5,03 \cdot D_{663}, \\1000 \cdot D_{470} &- 3,27 \cdot C_{\text{хл. а}} - 100 \cdot C_{\text{хл. б}} \\C_{\text{кар., мг/л}} &= 229\end{aligned}$$

3. Для 96%-го розчину спирту (за Вінтерманс де Мотс):

$$\begin{aligned}C_{\text{хл. а, мг/л}} &= 13,70 \cdot D_{665} - 5,76 \cdot D_{649}, \\C_{\text{хл. б, мг/л}} &= 25,80 \cdot D_{649} - 7,60 \cdot D_{665}.\end{aligned}$$

4. Для етилового ефіру:

$$\begin{aligned}C_{\text{хл. а, мг/л}} &= 9,93 \cdot D_{660} - 0,777 \cdot D_{642,5}, \\C_{\text{хл. б, мг/л}} &= 17,6 \cdot D_{642,5} - 2,81 \cdot D_{660}, \\C_{\text{хл. а + хл. б, мг/л}} &= 7,12 \cdot D_{660} + 16,8 \cdot D_{642,5}, \\1000 \cdot D_{480} &- 0,52 \cdot C_{\text{хл. а}} - 7,25 \cdot C_{\text{хл. б}} \\C_{\text{кар., мг/л}} &= 226\end{aligned}$$

За наявності в екстракті феофітину використовують рівняння для етилового ефіру:

$$\begin{aligned}C_{\text{хл. а, мг/л}} &= 12,3 \cdot D_{660} - 67,5 \cdot D_{535} - 3,2 \cdot D_{642}, \\C_{\text{хл. б, мг/л}} &= 18,8 \cdot D_{642} - 26,8 \cdot D_{535} - 1,51 \cdot D_{660}, \\C_{\text{феофітину, мг/л}} &= 109 \cdot D_{535} - 6,7 \cdot D_{642} - 3,4 \cdot D_{660}.\end{aligned}$$

Мета роботи. Ознайомити студентів із методом визначення кількості пігментів у екстрактах без попереднього фракціонування їх, дослідити, що вміст зелених пігментів у листках значно більший, ніж жовтих, визначити величину співвідношення між ними та хлорофілом *a* і *b*.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки рослин різних світлових екотипів, листки однієї й тієї самої рослини, які зростають за різного світлового режиму (наприклад, листки всередині крони, на верхівці пагонів), листки різного віку, проростки, вирощені в умовах норми та дефіциту світла і азоту тощо; 96

%-ий розчин етилового спирту, 80 %-ий ацетон або інший розчинник, MgCO_3 (CaCO_3), кварцовий пісок, порцелянові ступки із товкачиками, скальпель, ножиці, пінцет, скляні палички, колби Бунзена зі скляним фільтром Шотта № 3 або № 4, мірні колби місткістю 25 мл, мірний циліндр місткістю 25 мл, скляні лійки, мірні конічні пробірки, піпетки об'ємом 2 і 5 мл, фольга, ваги торсійні, вакуумний насос або інший, фотоелектрокалориметр (ФЕК), спектрофотометр.

Хід роботи.

1. Отримати екстракт пігментів із листків різних рослин (робота 30).

Увага! Визначення кількості, тому не можна втрачати жодної краплі екстракту пігментів.

Студенти різних підгруп проводять досліди за такими варіантами:

Варіант 1. Листки пеларгонії, примули (світлолюбні рослини) й аспідістри, плюща (тіньовитривалі).

Варіант 2. Молоді й старіючі листки.

Варіант 3. Проростки пшениці, кукурудзи, гороху тощо, вирощені за оптимальних умов живлення і нестачі світла.

Варіант 4. Проростки рослин, вирощені на повних і неповних живильних розчинах, зокрема з вилученням азоту.

2. Визначити оптичну густину (*D*) отриманих екстрактів за довжин хвиль, які відповідають максимумам поглинання хлорофілів *a* і *b*, для 80 %-го ацетону – 663 і 646 нм. Для визначення суми каротиноїдів *D* екстракту вимірюють за $\lambda = 470$ нм.

3. Обчислити концентрацію хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів за відповідними формулами, наведеними вище.

4. Обчислити вміст пігментів (*A*) у рослинному матеріалі, мг/г маси сухої чи сирої речовини:

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

де *C* – концентрація пігментів, мг/л; *V* – об'єм екстракту, мл (25 мл); *H* – наважка рослинного матеріалу, г (0,1÷0,2 г).

Контрольні запитання та завдання

1. Які розчинники бажано використовувати для екстракції пігментів?

2. Наскільки точно можна визначити кількість пігментів в сумарному екстракті?
3. Які максимуми типові для різних пігментів?
4. Що таке феофітинізація і як їй запобігти?
5. Чи змінюються максимуми поглинання пігментів залежно від розчинника?

Робота 33. РОЗДІЛЕННЯ ПІГМЕНТІВ ХЛОРОПЛАСТІВ ХРОМАТОГРАФІЧНИМ МЕТОДОМ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ КІЛЬКОСТІ У ЛИСТКАХ

Уперше швидкий розподіл окремих компонентів із суміші фотосинтетичних пігментів методом адсорбційної хроматографії на колонках здійснив у 1904 р. М. С. Цвет. Пізніше виявилось, що ефективнішою є розподільна паперова та тонкошарова хроматографія. Основи її становить неоднаковий розподіл компонентів суміші між двома рідкими фазами, що не змішуються між собою. Одна з них рухома, інша, наприклад, хроматографічний папір, силікагель, силуфол – нерухома. Твердий носій утримує на своїй поверхні нерухома фазу розчинника (полярний розчинник). Функцію рухомої фази виконує неполярний розчинник. Досліджувану суміш сполук наносять на папір або на тонкошарову хроматографічну пластинку. Потім через хроматограму пропускають роздільну суміш розчинників. Унаслідок різниці в розчинності у певному розчиннику та різної адсорбції пігменти рухаються сорбентом з різною швидкістю й розташовуються на сорбенті окремими зонами. Чим більша розчинність пігменту в розчиннику і чим слабше він сорбується даним сорбентом, тим швидше буде він рухатися і тим далі від старту розташовуватиметься на носії його зона.

Мета роботи. Відокремити каротиноїди від хлорофілів і визначити їхній уміст у зелених листках.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки вищих рослин (пеларгонії, примули, плюща), суспензії водоростей; 100 %-ий ацетон, 96 %-ий розчин етилового спирту, петролейний ефір, етиловий ефір, гексан, бензин, MgCO_3 або CaCO_3 , Na_2SO_4 зневоднений, кварцовий пісок; порцелянові ступки з товчачика-

ми, скальпель, ножиці, пінцет, скляні палички, колба Бунзена, скляний фільтр № 3, мірні пробірки місткістю 10 мл, мірний циліндр місткістю 25 мл, конічні пробірки, центрифужні пробірки, піпетки об'ємом 2 і 5 мл, капіляри, хроматографічна камера з притертою кришкою, силуфольні пластинки, хроматографічний папір, фольга, ваги торсійні та центрифужні, центрифуга, канцелярські скріпки, лінійки, графітні олівці, насос Камовського або компресор, фен для підсушування хроматограм.

Хід роботи.

Отримання екстракту пігментів.

1. Наважку рослинного матеріалу (100÷200 мг) подрібнити ножицями, перенести у порцелянову ступку, на кінчику скальпеля додати CaCO_3 , долити 4÷5 мл спирту або ацетону та ретельно розтерти.

2. Отриманий екстракт перенести на скляний фільтр, вставлений у колбу Бунзена.

3. За допомогою насоса розчин відфільтрувати.

4. Рослинний матеріал повторно залити розчинником, розтерти та перенести на фільтр. Розчин відфільтрувати.

Примітка. Цю операцію повторюють доти, доки розчин, який стікає з фільтра, не буде абсолютно безбарвним.

5. Спиртовий екстракт пігментів перенести до мірної колби чи пробірки, колбу Бунзена промити декілька разів невеликими порціями суміші і довести сумішню об'єм екстракту в мірній колбі до позначки.

Увага! Робота кількісна, не можна втрачати жодної краплі.

Отриманий екстракт містить суміш зелених і жовтих пігментів.

Хроматографічне розділення пігментів.

Розділення виконують на хроматографічному папері або силуфолових пластинках розміром 15 x 15 см.

1. Пігменти нанести капіляром по всій ширині пластинки, відступаючи на 2 см від її нижнього краю та 1 см від бічних країв. Об'єм нанесеного екстракту – 0,5÷0,8 мл (рис. 3.3 а).

2. Хроматографічний папір або пластинку ретельно підсушити у струмені повітря, помістити у хроматографічну камеру, попередньо насичену сумішню розчинників (наприклад, бензин,

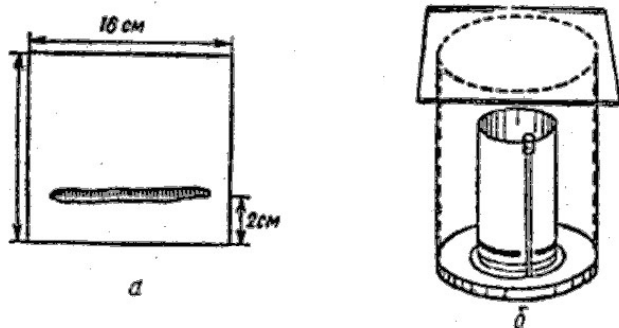


Рис. 3.3. Схема нанесення стартової плями на хроматограму та хроматографічна камера:

- а) хроматографічний папір або силуфольна пластинка з нанесеною смужкою пігментів;
б) хроматографічна камера з розчином і папером або пластинкою

ацетон, петролейний ефір, гексан в об'ємних співвідношеннях 10:10:3:10; або бензин, петролейний ефір, ацетон в об'ємних співвідношеннях 8,5:3,5:3,5).

Примітка. Для кожного рослинного об'єкта суміш розчинників та їх об'ємне співвідношення добирається експериментально.

Розгонку проводять у затемнених чорним папером хроматографічних камерах зі щільно зачищеною кришкою (рис. 3.3 б).

3. Після того, як рівень розчинника підніметься майже до верхнього краю пластинки, хроматограму вийняти та висушити під струменем повітря.

4. Проаналізувати хроматограму: визначити пігментні зони.

Примітка. Порядок розташування окремих зон пігментів подано на **рис. 3.4**. На хроматограмі стартова пляма може бути зеленою або рожевою за наявності хлорофілу й антоціанів, хлорофіл *b* – жовто-зеленого кольору, хлорофіл *a* – синьо-зелений, жовті ксантофіли і червоно-жовтий каротин (рухається разом із фронтом розчинника). Крім того, на хроматограмі часом виявляється бурий феофітин.

5. Для розділення лише каротиноїдів поставити другу хроматограму в іншу систему розчинників – суміш бензолу і петролейного ефіру (3:1).

Примітка. Пігменти розподіляються так: знизу старт-

ва пляма, далі віолаксантин, лютеїн-епоксид, лютеїн, каротин. Між стартовою плямою і жовтими пігментами нерозділеними залишаються хлорофіли.

6. Для виявлення неоксантину поставити ще одну хроматограму в роздільну суміш етиловий спирт – петролейний ефір (1:20).

Примітка. Пігменти на хроматограмі розміщуються в такому порядку: зверху каротин, нижче хлорофіл *a*, суміш ксантофілів, хлорофіл *b*, неоксантин (рис. 3.4).

7. Хроматограми розшифрувати, в протоколі відмітити розташування та колір розподілених пігментів.

Визначення концентрації хлорофілів і каротиноїдів.

1. Забарвлені зони на хроматограмах, що відповідають каротину та ксантофілам (неоксантин, віолаксантин, антероксантин, лютеїн + зеаксантин), зняти скальпелем із 2÷3 хроматограм. Зони однойменних пігментів об'єднати і помістити у пробірки з притертими пробками.

2. Проводять елюцію пігментів такими розчинниками: каротин – петролейним ефіром, ксантофіли – етанолом.

Примітка. Елюцію виконують під час струшування проб.

3. Елюат відфільтрувати через паперовий фільтр у мірні пробірки з притертою пробкою, фільтр кілька разів промити відповідним розчинником і довести об'єм до 3 мл.

3. Оптичну густину вимірюють на спектрофотометрі: каротин – за 452 нм, лютеїн – за 445, віолаксантин – за 442, неоксантин – за 438, хлорофіли *a* і *b* – у сірчаному ефірі за довжини хвилі відповідно 662 та 642 нм.

Примітка. Ці дані співставленні з питомими коефіцієнтами екстинкції (табл. 3.2).

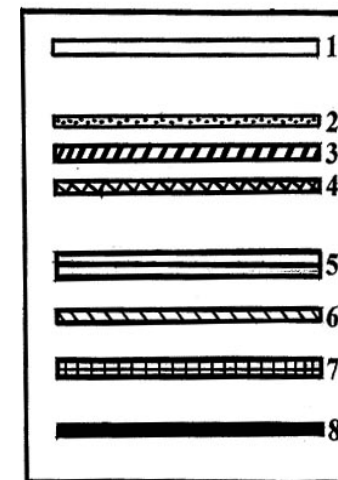


Рис. 3.4. Розподіл пігментів на хроматограмі:

1. – β -каротин; 2. – феофітин;
3. – хлорофіл *a*; 4. – хлорофіл *b*
5. – лютеїн + зеаксантин;
6. – віолаксантин;
7. – неоксантин;
8. – хроматографічна суміш

Таблиця 3.2. Питомі коефіцієнти екстинкції для основних пігментів фотосинтезу

Пігмент	Максимум поглинання, нм	Розчинник	Питомий коефіцієнт екстинкції
β-Каротин	464	Хлороформ	220
Каротини	452	Петролейний ефір	260
α-Каротин	456	Хлороформ або гексан	242
Лютеїн	445	Етанол	258
Віолаксантин	442	- “ -	225
Зеаксантин	451	- “ -	248
Неоксантин	438	- “ -	227
Антераксантин	446	- “ -	235
Хлорофіл <i>a</i>	662	Сірчаний ефір	9,81
Хлорофіл <i>b</i>	642	- “ -	17,6

4. Концентрацію пігментів (C , г/л) обчислити за формулою:

$$C = \frac{D}{A \cdot L},$$

де D – оптична густина за відповідної довжини хвилі, ум.од.; A – питомий коефіцієнт погашення, л/(г·см) (для каротину – 260, лютеїну – 258, віолаксантину – 225, неоксантину – 227), L – товщина шару розчину, см.

5. Вміст каротиноїдів в 1 г маси сирової речовини (A , мг/г) обчислити за формулою:

$$A = \frac{C \cdot V \cdot K}{H},$$

де C – концентрація пігментів, г/л; V – об'єм екстракту, мл; K – відношення об'єму елюату до загального об'єму екстракту, нанесеного на хроматограмі; H – наважка рослинного матеріалу, г.

Контрольні запитання та завдання

1. Назвіть види хроматографічного аналізу. В чому полягає його суть?

2. Назвіть основні правила нанесення екстракту пігментів на хроматограму.

3. Якщо стартова пляма залишається зеленою, які пігменти містяться в ній?

4. Які пігменти забарвлюють стартову пляму в рожевий колір? Чому вони залишаються в ній, а не рухаються разом із розчинником?

6. Які пігментів беруть участь у фотосинтезі?

7. Які промені сонячного спектра поглинають хлорофіли a , b , каротини та ксантофіли?

8. Яка функція каротиноїдів у рослинах?

9. Чим відрізняються каротиноїди вищих і нижчих рослин?

10. Які розчинники застосовують для екстрагування пігментів?

11. За яких умов у спиртовому або ацетоновому розчині може міститися феофітин?

Робота 34. СПОСТЕРЕЖЕННЯ ЗА ФЛУОРЕСЦЕНЦІЄЮ ХЛОРОФІЛУ

Флуоресценція – явище світіння речовин у разі поглинання ними світла. Перехід збудженої молекули пігменту до основного стану супроводжується випромінюванням поглинутої енергії у вигляді світла флуоресценції. Поглинаючи світло молекула хлорофілу переходить у синглетний електроннозбуджений стан (S_2^* або S_1^*). У полярних розчинниках вона віддає частину поглинутої енергії у вигляді тепла, а частину випромінює у вигляді флуоресценції. Квант її має меншу енергію та більшу довжину хвилі, ніж збуджуюче світло. *In vivo* внаслідок флуоресценції розсіюється дуже мало енергії (3÷5%), тоді як у розчинах – близько 30 %. Із синглетного стану молекула може перейти в триплетний, а з останнього – в основний. У цьому разі випромінюється ще більш довгохвильовий, ніж при флуоресценції квант світла. Таке порівняно слабше випромінювання називають *фосфоресценцією*. Для збудження молекул хлорофілу часто застосовують синє світло, оскільки його легко відділити від піка флуоресценції.

У листках випромінювання хлорофілу слабкіше, ніж у розчині, бо частина поглинутої енергії використовується на сенсibiliзування фотохімічних реакцій. Зростання інтенсивності фотосинтезу, як правило, зумовлює ослаблення флуоресценції. Для хлорофілу характерна червона флуоресценція.

Мета роботи. Констатувати інтенсивну флуоресценцію розчинів пігменту і видиму відсутність її у живих листках. Спостерігаючи за флуоресценцією, переконатися у фотохімічній активності хлорофілу. Пояснити, чому в живих листках без застосування високочутливих приладів не можна виявити флуоресценцію.

Матеріали, реактиви, обладнання. Спиртові екстракти пігментів різних рослин, живі листки; пробірки, ультрафіолетовий освітлювач із синім світлофільтром.

Хід роботи.

1. Ультрафіолетовий освітлювач із синім світлофільтром вмикнути в електричну мережу.

2. До випромінюваного світла піднести пробірку з екстрактом пігментів і живі листки.

Примітка. У відбитому світлі зелений екстракт пігментів стає малиново-рожевим. У живих листків за таких умов флуоресценція не спостерігається.

3. Перевірити наявність флуоресценції у розчинах каротину, ксантофілу, хлорофілу (отриманих під час проведення реакції Крауса) і феофітину.

4. Зробити висновки.

Примітка. Флуоресценцію можна спостерігати й у живому листку. Для цього беруть водяний мох *Fontinalis* або елодею, поміщають об'єкт на предметне скло мікроскопа та освітлюють синьофіолетовими променями, під дією яких зелені пластиди починають світитися червоним світлом.

Контрольні запитання та завдання

1. Чим флуоресценція відрізняється від фосфоресценції? Як це можна відобразити на схемі?

2. За яких умов молекула хлорофілу переходить на синглетний і триплетний енергетичні рівні?

3. Чи можна спостерігати флуоресценцію хлорофілу під час освітлення його розчину сонячними променями?

4. З якими особливостями структури молекули пов'язані фотохімічні властивості хлорофілу?

5. Як живі фотосинтезуючі листки використовують флуоресценцію?

6. Як відрізняються за кольором хлорофіли та феофітин?

7. Що розуміють під терміном «фотоциклізація» й чим воно обумовлене?

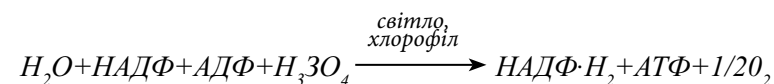
Робота 35. ВИЗНАЧЕННЯ ФОТОСЕНСИБІЛІЗУЮЧОЇ ДІЇ ХЛОРОФІЛУ (ЗА МЕТОДОМ О.А. КРАСНОВСЬКОГО)

Сутність світлової фази фотосинтезу полягає в окисненні води до молекулярного кисню за допомогою світлової енергії, поглинутої хлорофілом. Звільнені в такому разі електрони передаються ланцюгом з проміжних переносників до НАДФ, з відновленням його до НАДФ·Н₂. Крім того, під час перенесу електронів частина енергії витрачається на утворення АТФ, або на фотосинтетичне фосфорилування.

Вважають, що в переносі електронів води до НАДФ беруть участь дві пігментні системи, які містять різні форми хлорофілу *a*, що відрізняються максимумами поглинання у довгохвильовій частині спектра. До першої системи належать також каротиноїди, до другої – хлорофіл *b*, та інші допоміжні пігменти.

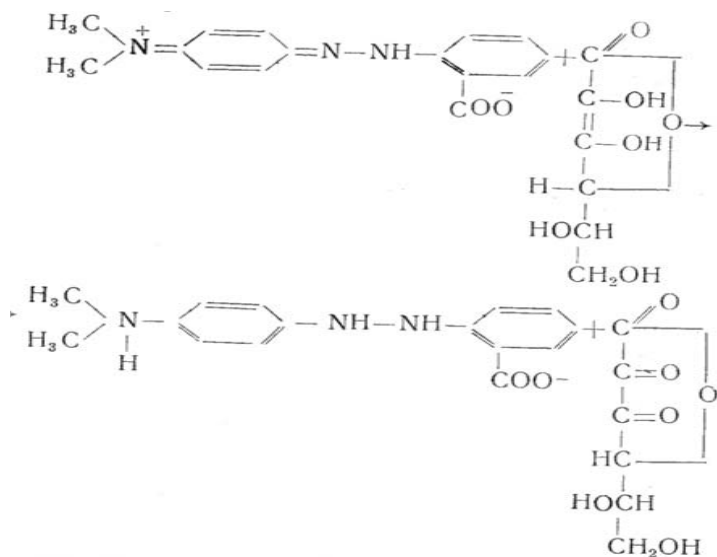
Кінцевим результатом фотоокиснення води є виділення молекулярного кисню й утворення збагачених енергією відновлених сполук – АТФ та НАДФ·Н₂, необхідних для наступного відновлення вуглекислого газу.

Спрощено фотоліз води можна записати так:

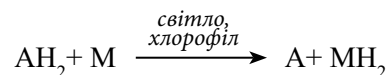


Як видно з рівняння, хлорофіл виконує функцію фотосенсибілізатора, допомагаючи переносити електрони (водню) до НАДФ. Фотосенсибілізуюча дія хлорофілу полягає в перенесенні протона й електрона від донора на акцептор. У фотосинтезуючих тканинах це приводить до відновлення вуглекислоти та синтезу органічних сполук. Екстрагований із зелених листків хлорофіл може бути сенсибілізатором окисно-відновних реакцій в модельних системах, у яких є донори й акцептори електронів. Так, під дією світла, розчин хлорофілу фотосенсибілізує перенесення електрона від аскорбінової кислоти (донора) до метилового червоного (акцептора). Наразі аскорбінова кислота окиснюється в

дегідроаскорбінову, а метиловий червоний відновлюється в лейкоформу. Відбувається реакція:



Схематично її можна записати так:



де *A* – дегідроаскорбінова кислота, AH_2 – аскорбінова кислота відновлена, *M* – метиловий червоний.

Цю реакцію легко спостерігати, оскільки вона зв'язана із знебарвленням метилового червоного. Забарвлення хлорофілу залишається без змін.

Мета роботи. Дослідити значення хлорофілу як фотосенсибілізатора у фотосинтезі, а також визначити залежність фотосенсибілізуючої дії хлорофілу від інтенсивності освітлення.

Матеріали, реактиви, обладнання. Спиртовий розчин пігментів листків; кристалічна аскорбінова кислота, 0,04 %-ий спиртовий розчин метилового червоного; штатив із пробірками,

освітлювальна електролампа (250 Вт), кювета з водою (фільтр), піпетки місткістю 1 і 5 мл, люксметр.

Хід роботи.

1. У чотири пробірки налити по 5 мл спиртового екстракту пігментів із зелених листків.
2. Додати аскорбінову кислоту до насичення (на дні залишаються кристали нерозчиненої кислоти).
3. У кожну пробірку долити по 1 мл 0,04 %-го спиртового розчину метилового червоного, який змінює зелене забарвлення екстракту на червоне.
4. Суміш в пробірках перемішати.
5. Одну пробірку поставити в темряву (контроль), а три – на світло на різну відстань від лампи. За допомогою люксметра у місцях розташування пробірок виміряти інтенсивність освітлення.
6. Між лампою і пробірками встановити водяний фільтр для поглинання теплового випромінювання.
7. На світло виставити також пробірку, в яку замість розчину пігментів наливо 5 мл спирту (світловий контроль).
8. Відмітити час, упродовж якого метиловий червоний у пробірках відновиться до лейкоформи.

Примітка. Реакція фотосенсибілізації відбувається на світлі за наявності хлорофілу. У пробірках, де відбулася реакція фотосенсибілізації зелений колір розчину відновлюється.

9. Отримані дані записати до таблиці 3.3.

Таблиця 3.3. Визначення фотосенсибілізуючої дії хлорофілу

Номер варіанта	Склад суміші в пробірках				Умови дослідів	Висновки
	Хлорофіл, мл	Етиловий спирт, мл	Кристалічна аскорбінова кислота, мг	Розчин метилового червоного		
1	5	-	50	5 краплин	Світло	
2	5	-	50	5 краплин	Темрява	
3	5	-	-	5 краплин	Світло	
4	-	5	50	5 краплин	Світло	

10. Зробити висновки щодо фотосенсибілізуючої дії хлорофілу в світлових реакціях та залежність її від інтенсивності

освітлення. Відмітити забарвлення розчину в контрольних пробірках.

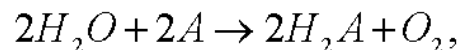
Контрольні запитання та завдання

1. Які особливості в структурі молекул зумовлюють здатність їх до фотосенсибілізації?
2. Які сполуки є донорами і акцепторами електронів у процесі фотосинтезу?
3. Які процеси відбуваються під час циклічного й нециклічного фотофосфорилювання?
4. Чому в проведених дослідах не змінюється забарвлення розчинів у контрольних пробірках?
5. Яку роль в процесах фотосенсибілізації відіграють каротиноїди?
6. Чим по суті відрізняються назви «каротин» й «каротиноїди»?

Робота 36. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ РЕАКЦІЇ ХІЛЛА В ХЛОРОПЛАСТАХ ЗА ШВИДКІСТЮ ВІДНОВЛЕННЯ АКЦЕПТОРА ЕЛЕКТРОНІВ

Одним із показників фотохімічної активності хлоропластів є реакція Хілла. Вона являє собою комплекс початкових стадій фотосинтезу, пов'язаних із фотоокисненням води, в яких мобілізовані з води за участю ФС II електрони направляються на відновлення введених у реакційну суміш акцепторів електронів.

Фотовідновлення акцептора супроводжується виділенням кисню:



де A – акцептор електронів.

Ця реакція відкрита у 1937 р. Р. Хіллом та названа його ім'ям. Він виявив, що ізольовані хлоропласти під час освітлення можуть відновлювати залізо ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$), виділяючи одночасно кисень. У подальшому було встановлено, що ізольовані хлоропласти можуть відновлювати на світлі не лише залізо, а й низки інших сполук: окисно-відновних індикаторів, бензохінон, а також

природний акцептор електронів – НАДФ⁺. Акцептором електронів у реакції Хілла можуть бути також солі тривалентного заліза, наприклад $K_3Fe(CN)_6$ (окисно-відновний потенціал $E' = 0,36$ В), окисно-відновні індикатори, наприклад 2,6-дихлор-феноліндофенол ($E' = 0,22$ В), фізіологічні акцептори електронів – хінони, цитохроми, НАДФ⁺. Місце включення акцептора електронів у електрон-транспортний ланцюг (ЕТЛ) залежить від величини його окисно-відновного потенціалу.

Таким чином, реакція Хілла, в якій хлоропласти розкладають воду та відновлюють будь-які окисники, додані ззовні, є найпростішою моделлю первинних процесів фотосинтезу.

Відносно спектра дії, чутливості до специфічних інгібіторів, різних фізичних і хімічних факторів реакція Хілла досить подібна на природні процеси фотосинтезу в цілому. Тому її часто використовують як фізіологічну характеристику стану рослин.

Для визначення швидкості реакції Хілла використовують полярографічний метод, який дає можливість реєструвати кількість виділеного кисню, спектрофотометричний метод визначення швидкості відновлення акцепторів електронів.

Визначення фотохімічної активності хлоропластів (незалежно від методу) включає такі стадії:

- виділення хлоропластів;
- проведення реакції;
- визначення вмісту хлорофілу в суспензії хлоропластів;
- розрахунок фотохімічної активності.

Визначення активності реакції Хілла хлоропластів ґрунтується на різниці спектрів поглинання окисної та відновної форм акцептора електронів. Відновну активність хлоропластів оцінюють спектрофотометрично за різницею оптичної густини освітлених і темнових проб за певної довжини хвилі. Швидкість реакції змінюють унесенням в реакційну суміш фосфат-акцепторної системи (АДФ) або роз'єднувача (NH_4Cl).

Мета роботи. Дослідити можливість відтворення ізольованими хлоропластами первинних фотохімічних реакцій, визначити за різних умов експерименту швидкість потоку електронів в електрон-транспортному ланцюгу фотосинтезу за швидкістю відновлення фериціаніду калію – $K_3Fe(CN)_6$. Переконалися в залежності початкових фотосинтетичних реакцій від факторів навколишнього середовища, зокрема температури та освітлення.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки або проростки рослин із порівняно високою активністю реакції Хілла (гороху, шпинату, традесканції, капусти, кукурудзи); середовище виділення (0,3 М NaCl у 0,6 М фосфатному буфері, pH 6,9); 0,1 М $MgCl_2$; 7,5 мМ $K_3Fe(CN)_6$; 30 мМ АДФ pH 7,8; 20 %-ий розчин трихлороцтової кислоти (ТХО); 1 М CH_3COONa ; 100 %-ий та 80 %-ий розчини ацетону; порцелянові ступки з товкачиками, центрифужні пробірки, мірні циліндри місткістю 25 і 50 мл, мірна пробірка місткістю 10 мл, конічна пробірка місткістю 10 мл, пробірки, конічні колби місткістю 10÷20 мл, піпетки об'ємом 1, 2, 5 і 10 мл, скляні лійки, колба Бунзена зі скляним фільтром № 3, скляні палички, темна банка, лід, паперові фільтри, тefлоновий гомогенізатор, полотно, центрифуга, центрифужні ваги, центрифужні пробірки, технічні ваги, ФЕК або спектрофотометр, кювети.

Хід роботи.

Виділення хлоропластів.

Хлоропласти виділяють у водному середовищі методом диференціального центрифугування. Всі процедури виділення хлоропластів проводять на холоді за температури 0÷4 °С.

Виготовлення гомогенату.

1. Наважку листків (2 г) попередньо помістити у поліетиленовий пакет або у вологий фільтрувальний папір і охолодити впродовж 10÷15 хв. у холодильнику або ступці на льоду, подрібнити ножицями.

2. Рослинний матеріал розтерти у порцеляновій ступці на льоду 1÷2 хв. з 15 мл середовища виділення.

Примітка. У разі зміни об'єкта дослідження підбирають відповідне середовище для виділення хлоропластів. Можливі варіанти середовища виділення хлоропластів:

- 0,3 М NaCl у 0,06 М фосфатному буфері, pH 8,04;
- 0,4 М сахароза та 0,01 М NaCl у 0,06 М фосфатному буфері, pH 6,9;
- 0,4 М сахароза та 0,01 М NaCl у 0,06 М фосфатному буфері, pH 8,04.

3. Одержаний гомогенат відфільтрувати крізь полотно у порцелянову чашку та перенести в центрифужну пробірку.

Одержання суспензії хлоропластів методом диференціального центрифугування.

1. Фільтрат у центрифужній пробірці зрівноважити водою з іншою центрифужною пробіркою.

2. Розчини центрифугувати упродовж 5 хв. за 800 об./хв. Осад, який містить залишки тканин, ядра, зруйновані клітинні стінки та інші фрагменти клітин відкидають.

3. Супернатант центрифугувати повторно впродовж 10 хв. за 3000 об./хв.

4. Одержаний осад (містить хлоропласти) гомогенізувати скляною паличкою у 5 мл середовища виділення в центрифужній пробірці для промивання хлоропластів.

5. Провести третє центрифугування впродовж 10 хв. за 3000 об./хв.

6. Супернатант відкинути, а осад перемішати з 2÷3 мл середовища виділення та перенести в гомогенізатор, гомогенізувати до одержання однорідної суміші, а потім помістити у мірний циліндр.

7. Центрифужну пробірку та гомогенізатор сполоснути невеликими порціями середовища виділення для повного перенесення хлоропластів у циліндр.

Примітка. Кінцевий об'єм суспензії у циліндрі – 12÷15 мл. Суспензію хлоропластів зберігають на льоду в темряві.

Проведення реакції Хілла в різних умовах експерименту.

Дослід проводять у конічних колбах невеликого об'єму. Приклад можливої схеми одного із дослідів такий:

Номер колби	Варіант
1	Світло + АДФ
2	– " –
3	Темрява + АДФ
4	– " –
5	Світло – АДФ
6	– " –
7	Темрява – АДФ
8	– " –

Присутність або відсутність АДФ позначено відповідно знаками + або –.

1. У кожен колбу налити реакційну суміш. Склади реакційних сумішей наведено в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4. Склад реакційних сумішей для різних варіантів досліду

Складові частини реакційної суміші	Варіант на одну колбу, мл	
	+ АДФ	– АДФ
Середовище виділення	2,7	2,85
MgCl ₂	0,15	0,15
K ₃ Fe(CN) ₆	1,0	1,0
АДФ	0,15	–
Хлоропласти	1,0	1,0

Примітка. Сумарний об'єм реакційної суміші 5 мл.

2. «Темнові» варіанти помістити у темряву, а «світлові» інкубувати на світлі впродовж 5 хв. на спеціальній установці (рис. 3.5).

3. Після вимкнення світла в світлові проби відразу додати 1 мл ТХО та 2 мл CH₃COONa, потім ті самі реактиви долити і в «темнові» варіанти.

4. Проби відфільтрувати крізь подвійні паперові фільтри.

5. Визначити оптичну густину одержаних фільтратів на спектрофотометрі за 420 нм. В якості контролю використовується дистильована вода.

Визначення хлорофілу в суспензії хлоропластів.

1. У мірну пробірку внести 1 мл суспензії, 1 мл дистильованої води.

2. Довести об'єм суміші в пробірці до 10 мл 100 %-им розчином ацетону.

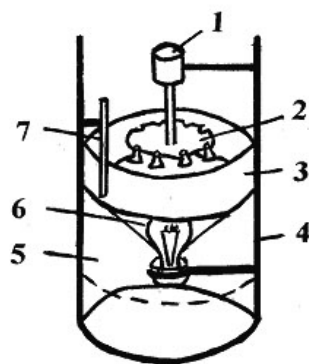


Рис. 3.5. Установка для визначення фотосинтетичного фотофосфорилювання:

- 1 – мотор;
2 – обертовий диск із колбами;
3 – кристалізатор з водою;
4 – штатив;
5 – захисний кожух для лампи;
6 – лампа розжарювання (500 Вт);
7 – термометр

3. Розчин добре перемішати і відфільтрувати у конічну пробірку крізь скляний фільтр № 2 або № 3.

4. Визначити оптичну густину розчину на спектрофотометрі за 652 нм.

Примітка. В якості контролю використовується 80 %-ий розчин ацетону. Вимірювану оптичну густину розчину D_{652} використовують для розрахунку вмісту хлорофілу в суспензії хлоропластів. У суспензії хлоропластів (об'ємом 1 мл) міститься $0,29 D_{652}$ мг хлорофілу (розрахунок коефіцієнта 0,29 одержують експериментально).

5. Активність переносу електронів в ЕТЛ фотосинтезу виразити у мікромолях K₃Fe(CN)₆/(мг хлорофілу·год).

6. Обчислити фотохімічну активність хлоропластів (ΦA) за формулою:

$$\Phi A = \frac{(D_{420 \text{ темр.}} - D_{420 \text{ світло.}}) \cdot 60 \cdot 8}{1,04 \cdot 5 \cdot 0,29 \cdot D_{652}}$$

7. Одержані результати записати у таблицю 3.5.

Таблиця 3.5. Визначення активності реакції Хілла у хлоропластах

Номер колби	Варіант досліду	Оптична густина фільтратів D_{420}	$D_{420 \text{ темр.}} - D_{420 \text{ світ.}}$	Активність реакції Хілла, мкмоль K ₃ Fe(CN) ₆ /(мг хлорофілу·год.)

Контрольні запитання та завдання

1. У чому суть реакції Хілла?
2. Назвіть електрокінетичні властивості ізолюваних хлоропластів.
3. Які обов'язкові стадії включають різні методи визначення фотохімічної активності хлоропластів?
4. Які сполуки виконують функцію акцепторів електронів у реакції Хілла?
5. Які відновлені сполуки формуються на перших етапах фо-

тосинтезу під час переносу енергії світла в електроно-транспортному ланцюзі фотосинтезу?

6. Що являє собою фотоліз води і як він відбувається?

7. Чим пояснити зниження фотохімічної активності хлоропластів за підвищеної температури?

8. Як відбувається циклічне та нециклічне фотофосфорилювання? Яке значення цих процесів у фотосинтезі?

Робота 37. ВИЗНАЧЕННЯ МІЦНОСТІ ЗВ'ЯЗКУ ХЛОРОФІЛУ З БІЛОК-ЛІПІДНИМ КОМПЛЕКСОМ (ХБЛК) ЗА М.М. ОКУНЦОВИМ

Хлорофіл та інші пігменти хлоропластів зв'язані з ліпопротеїдним комплексом мембран. Відомо, що неполярні розчинники (бензин, петролейний ефір і гексан) не видаляють хлорофіл із білок-ліпідних комплексів, але навіть незначні домішки полярних розчинників до неполярних, наприклад спирту до петролейного ефіру, призводять до часткового видалення хлорофілу. Повного видалення хлорофілу з комплексів можна досягнути лише за двократною концентрації спирту в петролейному ефірі.

Після денатурації природного ХБЛК (високою температурою, ультразвуком, ультрафіолетовим опроміненням) хлорофіл частково екстрагується й неполярними розчинниками. Це відбувається внаслідок порушення зв'язку хлорофілу з білками та розчиненні пігменту в ліпідній частині комплексу, який екстрагується неполярними розчинниками. Таким чином, за кількістю хлорофілу, що екстрагується неполярними розчинниками, можна визначити міцність зв'язку хлорофілу з ХБЛК. Незначні домішки неполярного розчинника, наприклад спирту, до полярного збільшують кількість екстрагованого хлорофілу. Зі збільшенням концентрації спирту в петролейному ефірі кількість екстрагованого хлорофілу збільшується. Характер кривих екстрагування хлорофілу сумішшю полярних і неполярних розчинників вказує, що в мембранах можливе існування різних форм ХБЛК. З одних форм (слабкозв'язаних) хлорофіл вилучають меншими концентраціями спирту у петролейному ефірі, з інших – більш міцно зв'язаних хлорофіл екстрагують більш високими концентраціями спирту. За ступенем екстрагування хлорофілу 0,4 %-им розчином спирту в петролейному ефірі або бензині роблять висновок про кількість

слабкозв'язаних комплексів, а за ступенем екстрагування 0,8 %-им розчином - про кількість міцно зв'язаних комплексів. Для зневоднення тканин використовують сульфат натрію.

Мета роботи. Дослідити лабільність зв'язку хлорофілу з ліпопротеїдним комплексом пластид і вплив на нього умов навколишнього середовища.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки рослин; сульфат натрію безводний, вуглекислий магній, бензин, етиловий спирт; порцелянові ступки з товкачиками, мірні пробірки, фільтри Шотта №3, ваги, вакуумні насоси, ФЕК.

Хід роботи.

1. Із середньої проби досліджуваного матеріалу для аналізу взяти чотири наважки по 0,2 г, помістити в ступки, додати по 0,4 г безводного сульфату натрію та 0,05 г вуглекислого магнію. Проби розтерти до повного висушування.

2. До першої наважки додати 10 мл бензину (температура кипіння 40÷100°C), що містить 0,2 % етилового спирту; другої – 10 мл бензину, що містить 0,4 % етилового спирту; третьої – 10 мл бензину, що містить 0,8 % етилового спирту; четвертої – 10 мл бензину, що містить 1,2 % етилового спирту. Знову розтерти.

3. Вміст ступок перенести на скляні фільтри Шотта, розчинити відфільтрувати, а залишки промити відповідними розчинами (порціями по 3 мл), щоразу відсмоктуючи промивну рідину, доки не одержимо 10 мл фільтрату.

4. Виміряти оптичну густину одержаних розчинів за 640÷660 нм на ФЕК (товщина кювети 10 мм).

5. Обчислити кількість вивільненого хлорофілу за формулою:

$$M = C \cdot A,$$

де M – кількість хлорофілу, екстрагованого з даної наважки, мкг; C – концентрація хлорофілу в досліджуваному розчині, мкг/мл (за калібрувальним графіком); A – об'єм досліджуваного розчину хлорофілу, мл.

6. Для одержання нерозчиненого хлорофілу, що залишився на фільтрі, додати 10 мл 90 %-го етилового спирту

Примітка. Спирт додавати невеликими порціями до повного екстрагування пігменту.

7. Об'єм екстракту довести спиртом до 10 мл і виміряти оптичну густину розчину за 640÷660 нм на ФЕК.

8. Обчислити кількість неекстрагованого хлорофілу (мкг).

9. Обчислити міцність ХБЛК у ході екстрагування різними сумішами розчинників за формулою:

$$V = \frac{X \cdot 100}{M + X},$$

де V – міцність зв'язку ХБЛК відносно сумішей розчинників (% неекстрагованого хлорофілу); M – кількість хлорофілу, екстрагованого сумішшю полярного та неполярного розчинників, мкг; X – кількість хлорофілу, що залишився після екстрагування сумішшю розчинників, мкг.

Примітка. Для побудови калібрувального графіку необхідно мати кристалічний хлорофіл. Препаративне виділення такого хлорофілу найдетальніше описано у методичному керівництві (Сапожников Д.И., 1964). Калібрувальний графік будують за допомогою серії розчинів, концентрації яких вимірюють на спектрофотометрі. За відсутності кристалічного хлорофілу використовують розчин Гетрі, приготування якого детально описано у методичному керівництві (Мусієнко М.М., Паршикова Т.В., Славний П.С., 2001).

Студенти різних підгруп виконують такі варіанти дослідів: молоді листки різних рослин; старіючі листки; проморожені листки пеларгонії або проростків злаків; непроморожені листки цих самих рослин тощо.

10. Результати дослідів записати у таблицю.

11. Зробити висновки щодо залежності досліджуваного показника у різних варіантах дослідів.

Контрольні запитання та завдання

1. Що розуміють під міцністю зв'язку хлорофіл–білок–ліпідного комплексу?

2. Як саме вимірюють міцність зв'язку ХБЛК?

3. Назвіть полярні та неполярні розчинники.

4. Коли міцність ХБЛК вища: за більшого чи меншого вилучення хлорофілу?

5. Чому восени листки рослин жовтіють?

6. Як змінюється міцність зв'язку хлорофілів в хлоропластах різних рослин, що зростали в різних умовах?

Робота 38. ВИЗНАЧЕННЯ МІЦНОСТІ ХЛОРОФІЛ–ЛІПО–ПРОТЕЇДНОГО КОМПЛЕКСУ МЕТОДОМ О.Г. СУДЬІНОЇ І М.І. ГОЛОД

Найважливішою умовою кількісного визначення пігментів є повне екстрагування їх із рослинних тканин. Пігменти можуть бути екстраговані як зі свіжого, так і фіксованого матеріалу. Вибір екстрагуючих речовин здійснюють з врахуванням розчинності пігментів і можливості їхнього видалення певним розчинником із пігмент–ліпопротеїдного комплексу.

Залежно від хімічної будови розрізняють розчинники *полярні* (ацетон, спирти) і *неполярні* (петролейний ефір, бензин, гексан тощо). Ступінь полярності розчинника визначається дипольним моментом його молекули в одиницях Дебая (Д).

Хлорофіли і каротиноїди – в основному ліпофільні сполуки, які добре розчиняються в усіх розчинниках ліпідів (спирт, ацетон, сірчаний ефір, бензин, петролейний ефір). Проте повна екстракція пігментів із рослинного матеріалу досягається лише за умови використання полярних органічних розчинників або суміші полярних і неполярних. Полярні органічні розчинники, спричинюючи денатурацію білка і руйнуючи зв'язок пігментів з ліпопротеїдним комплексом, забезпечують швидку екстракцію всіх пігментів. Чисті неполярні розчинники не порушують зв'язок пігментів із білком, тому бензин та інші неполярні рідини екстрагують у нормальних умовах тільки каротин, частину ксантофілів і дуже незначну кількість (1÷5 %) хлорофілів.

Визначення міцності зв'язку хлорофіл–білково–ліпідного комплексу за методом О.Г. Судьїної і М.І. Голод визначають за кількістю хлорофілу, екстрагованого бензином стосовно його загальної кількості, що екстрагується ацетоном або спиртом.

Мета роботи. Дослідити міцність зв'язку хлорофіл–білково–ліпідного комплексу за кількістю хлорофілу у вищих рослин за дії різних стресових факторів.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки кімнатних рос-

лин; ацетон, етиловий спирт, бензин, CaCO_3 або MgCO_3 , NH_4OH , Na_2SO_4 ; порцелянові ступки з товкачиками, фільтр Шотта, колба Бунзена, мірні пробірки, ваги, вакуумний чи водоструменевий насоси, ФЕК, кювети.

Хід роботи.

1. Наважку листків масою 1 г розтерти у ступці, екстрагувати пігменти ацетоном чи спиртом.

Примітка. Під час розтирання рослинного матеріалу з розчинником необхідно додавати незначну кількість CaCO_3 , MgCO_3 або 1 М розчину NH_4OH для запобігання феофітінзації пігментів.

2. Іншу наважку листків масою 1 г розтерти у ступці з незначною кількістю CaCO_3 , MgCO_3 або 1 М розчину NH_4OH та безводного Na_2SO_4 до повного висушування, додати 4÷5 мл бензину, знову розтерти (приблизно 5 хв.), відфільтрувати крізь скляний пористий фільтр у колбу Бунзена без перенесення розтертого матеріалу на фільтр.

3. Залишок у ступці знову залити бензином (4÷5 мл), розтерти і профільтрувати. Повторити зазначені дії двічі-тричі.

Примітка. Розтирати рослинний матеріал і фільтрувати слід не більше 20 хв.

4. Виміряти об'єми отриманих ацетонової і бензинової витяжок.

5. Екстракти колориметрувати на ФЕК за червоного світлофільтра.

6. Обчислити вміст хлорофілів (у мг/г маси сирової речовини) рослинного матеріалу за формулою:

$$X = \frac{E \cdot k \cdot V}{1000 \cdot d \cdot p},$$

де E – показник ФЕК; k – коефіцієнт суми хлорофілів, що дорівнює 72,5; V – об'єм екстракту з наважки, мл; d – діаметр кювети, см; p – наважка, г.

Примітка. Про міцність зв'язку хлорофілу з ліпопротеїдним комплексом пластид роблять висновки на основі величини співвідношення кількості хлорофілу, екстрагованого бензином, до кількості хлорофілу, екстрагованого ацетоном, яку виражають у відсотках. Чим менший відсоток, тим більша міцність хлорофіл-ліпопротеїдного комплексу.

Увага! Всю підготовчу роботу з пігментами бажано проводити в затемненому приміщенні на холоді.

Студенти підгруп виконують наступні варіанти дослідів: молоді листки; старіючі листки; проморожені листки пеларгонії або злаків; непроморожені листки цих самих рослин.

7. Одержані результати записати у таблицю, попередньо обробивши їх статистично.

8. Зробити висновки щодо одержаних результатів і лабільності досліджуваного показника у різних варіантах дослідів.

Контрольні запитання та завдання

1. Які існують групи органічних розчинників пігментів?

2. Поясніть, чим зумовлена ступінь полярності органічних розчинників.

3. Використання яких органічних розчинників забезпечує повне видалення пігментів із рослинного матеріалу?

4. Поясніть, в якому стані перебувають пігменти в пластидах рослин.

5. Як екстрагують пігменти з листків й з мікроскопічних організмів, що містять хлорофіли?

6. Як посилюють руйнування клітин для екстракції хлорофілів та інших пігментів?

7. Проведіть порівняльний аналіз методів визначення міцності ХБЛК за М.М. Окунцовим та О.Г. Судьїною, М.І. Голод.

Робота 39. ВИДІЛЕННЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ПРОТОХЛОРОФІЛІДУ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛЯРНИХ І НЕПОЛЯРНИХ РОЗЧИННИКІВ

Пул попередників хлорофілів являє досить складну гетерогенну структуру, складену з моновініл- і дивінілпохідних протохлорофіліду і протохлорофілу, які у разі освітлення відновлюються до відповідних моно- і дивінілформ хлорофіліду та хлорофілу. Під час дослідження процесів біосинтезу хлорофілів важливим показником є вивчення умісту в листках протохлорофіліду – безфітольної форми пігменту. Протохлорофілід, а в деяких випадках його етерифікована форма – протохлорофіл є безпосереднім попередником хлорофілу. Протохлорофілід син-

тезується в результаті серії ферментативних реакцій в темряві, а на світлі відновлюється до хлорофіліду в результаті гідрування подвійного зв'язку між сьомим і восьмим атомами вуглецю четвертого пірального кільця. Реакція фотовідновлення відбувається за участю ферменту НАДФ–протохлорофілід–оксидоредуктази, яка активується світлом. Перетворення хлорофіліду в хлорофіл відбувається його етерифікацією фітолом або приєднанням геранілгеранілпірофосфату до макроциклу поліізопреноїдної структури (C_{20}) з чотирма подвійними зв'язками. В подальшому відбувається гідрування трьох із них, в результаті чого утворюється фітольна структура.

Для характеристики пігментного фонду попередників використовують методи хроматографії, розділення фітольних і безфітольних форм пігментів з використанням полярних і неполярних розчинників, низькотемпературний флуоресцентний аналіз. Більшість пігментів групи протохлорофілів і хлорофілів мають характерні спектри поглинання та флуоресценції. Але фітольні та безфітольні форми пігментів ідентифікувати спектрально неможливо, оскільки їхні спектри поглинання і флуоресценції ідентичні. Проте вони відрізняються за полярністю і можуть бути розділені за допомогою різних розчинників. Безфітольні форми, тобто протохлорофілід і хлорофілід більш полярні, вони міцно утримуються адсорбентом і у відповідних системах розчинників менш рухливіші за фітольні, найменш полярні форми пігментів (протохлорофіл і хлорофіл). Фітольні форми більш ліпофільні та розчинні в петролейному ефірі, тоді як безфітольні форми нерозчинні у ньому, однак добре розчинні в розбавлених розчинах лугу. На таких властивостях засновані методи виділення та кількісного визначення окремих форм пігментів групи протохлорофілів і хлорофілів.

Мета роботи. Визначити кількість протохлорофіліду, використовуючи органічні розчинники різної хімічної природи.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки кімнатних рослин; 0,1 н. та 0,02 н. розчин NH_4OH , $NaCl$, ацетон, петролейний ефір, сірчаний ефір, дистильована вода; технічні ваги, фільтрувальний папір, порцелянові ступки з товчачиками, фільтри Шотта, мірні пробірки, колба Бунзена, вакуумний насос, рН-метр, ділильні лійки, ФЕК, спектрофотометр, кювети.

Хід роботи.

Листки кімнатних рослин витримати упродовж 1÷2 діб в темряві.

Екстракція пігментів.

Увага! Перші етапи роботи проводити у затемненому приміщенні!

1. Наважку листків 1÷5 г помістити у ексікатор, зафіксувати їх гарячою парою або водою за температури 95 °С впродовж 2 хв.

2. Листки підсушити фільтрувальним папером.

3. Рослинний матеріал перенести у порцелянову ступку, змочити незначною кількістю 0,1 н. NH_4OH для нейтралізації органічних кислот та дезактивації хлорофілази, ретельно розтерти, додавши 4÷5 мл 80 %-го ацетону.

Увага! Наступні етапи роботи проводити за умов звичайного освітлення.

4. Екстракцію пігментів повторити 3÷4 рази, фільтруючи ацетонові витяжки крізь скляний фільтр.

5. Фільтрати зібрати, довести до об'єму 25 мл.

6. Для переведення протохлорофіліду у водорозчинну форму додати 2÷3 мл 0,02 н. NH_4OH (з розрахунку 1 мл NH_4OH на 10 мл водно–ацетонового екстракту).

Розділення фітольних і безфітольних форм пігментів.

1. Для розділення фітольних і безфітольних пігментів одержану суміш перенести у ділильну лійку.

2. Додати 0,2 мл насиченого розчину $NaCl$ і 5÷7 мл легкого петролейного ефіру (температура кипіння 40÷60°C) або етилового ефіру.

3. Вміст ділильної лійки енергійно струсити декілька разів.

Примітка. У результаті проведених реакцій у петролейний ефір екстрагуються ліпофільні форми пігментів – протохлорофіл, хлорофіл, що містять фітол, а також каротиноїди. У лужній водно–ацетоновій фазі залишаються гідрофільні, безфітольні пігменти – протохлорофілід, хлорофіліди а і b.

4. Після розділення шарів, нижній водно–ацетоновий і верхній, петролейно–ефірний зібрати в окремі колби.

5. Екстракцію петролейним ефіром повторити 4÷5 рази до повного вилучення ліпофільних пігментів.

Примітка. Наразі частково вилучаються протохлорофілід і хлорофіліди. Вони вимиваються із петролейно–ефірних витя-

жок 2÷3 мл 0,02 н. NH_4OH , а одержаний екстракт додають до первинної водно-ацетонової витяжки.

6. Екстракт підкислити 0,5÷1,0 мл насиченого розчину однозаміщеного фосфату натрію NaH_2PO_4 (або додаванням декількох кристаликів сухої солі) до рН 4,5÷5,0.

Примітка. Протохлорофілід і хлорофілід переходять із водорозчинної сольової форми у кислоту (вільні COOH групи), яка більш розчинна в сірчаному ефірі.

7. Безфітольні пігменти (протохлорофілід, хлорофілід), що залишилися у водно-ацетоновому екстракті, виділити сірчанним ефіром (20 мл водного ацетону і 30÷40 мл ефіру).

Примітка. Після 3÷4-разової обробки розчином сірчаного ефіру відбувається практично повне виділення протохлорофіліду в суміші з хлорофілідом.

8. Одержаний ефірний екстракт довести до певного об'єму і використати для спектрофотометричного аналізу з максимумами поглинання для протохлорофіліду (623÷625 нм), хлорофіліду *a* (663 нм) і хлорофіліду *b* (644 нм).

9. Кількість протохлорофіліду в присутності хлорофілідів (мг/г сирої маси) обчислити за формулою В. Коскі, використовуючи для розрахунку концентрації безфітольних форм коефіцієнт 0,69:

$$\text{Протохлорофіл} = \frac{V \cdot (-0,16 \cdot A_{663} - 0,1619 \cdot A_{644} + 1,0057 \cdot A_{624})}{0,0399 \cdot 1000 \cdot W \cdot d}$$

$$\text{Хлорофыл } a = \frac{V \cdot (1,0152 \cdot A_{663} - 0,0896 \cdot A_{644} - 1,0037 \cdot A_{624})}{0,095 \cdot 1000 \cdot W \cdot d}$$

$$\text{Хлорофыл } b = \frac{V \cdot (-0,1610 \cdot A_{663} + 1,0195 \cdot A_{644} - 0,0301 \cdot A_{624})}{0,0575 \cdot 1000 \cdot W \cdot d}$$

де V – об'єм розчину, мл; A – поглинання за відповідної довжини хвилі, ум. од.; W – маса листків, г; d – товщина кювети, см.

Примітка. Протохлорофіл і протохлорофілід мають одні й ті самі молярні коефіцієнти поглинання, їхні спектри ідентичні, тому в 80 %-му водному ацетоні обидва пігменти поглинають світло за 626 нм. Однак, оскільки молекулярна маса протохлорофілу (891,5) більша за молекулярну масу протохлорофіліду (61-

3,0), його питомий коефіцієнт поглинання нижчий, ніж у протохлорофіліду. Тому для розрахунку концентрації безфітольних форм пігментів використовують коефіцієнт 0,69.

Контрольні запитання та завдання

1. Охарактеризуйте завершальні етапи біосинтезу хлорофілів у рослинній клітині.
2. Яка сполука є попередником хлорофілу в ланцюгу біосинтезу зелених пігментів?
3. Яким чином відбувається перетворення хлорофіліду в хлорофіл?
4. На яких властивостях засновані методи виділення та визначення кількості окремих форм пігментів групи протохлорофілів і хлорофілів?
5. Чому фітольні форми пігментів розчинні в петролейному ефірі, тоді як безфітольні – в розбавлених розчинах лугу?

Робота 40. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФІКОБІЛІНІВ

Пігменти водоростей є основними елементами, що поглинають та перетворюють світло, тому знання про їхній вміст, склад і структурний стан важливі для розв'язання багатьох проблем фотосинтезу, біологічної різноманітності, хемосистематики. Унікальною особливістю пігментного апарату водоростей вважають саме наявність фікобіліпротейдів, які входять до складу світлозбирального комплексу хлоропластів. Вони містяться у переважної більшості представників *Cyanophyta* (*Cyanobacteria*), *Rhodophyta* та деяких *Cryptophyta*. Кількість фікобіліпротейдів складає до 24 % сухої маси клітини у синьозелених водоростей. За сучасною класифікацією розрізняють: «С» (отримані з синьозелених водоростей) та «R» (з червоних) фікобіліні. Доведено (Zhou et al, 1992), що фікобіліні виконують важливі функції під час поглинання та транспортування енергії за короткохвильової (фікоеритрин) та довгохвильової абсорбції пігментбілковим комплексом (алофікоціанін) (рис. 3.6).

Поглинена енергія переноситься молекулами пігментів, і розподіляється між фотосистемами ФС II та ФС I.

Сучасний рівень науки дав змогу розшифрувати структуру фі-

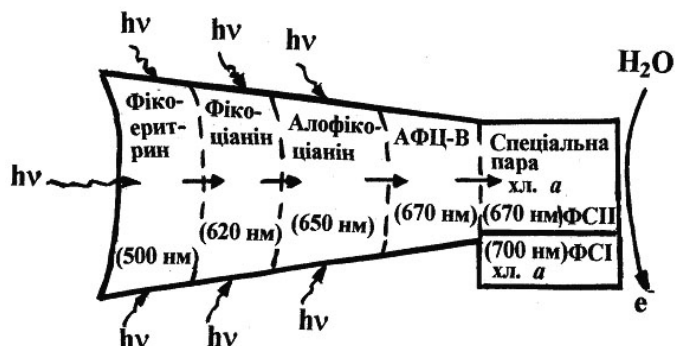


Рис. 3.6. Потік енергії у фікобілісомах синьозелених і червоних водоростей

кобілінів із різноманітних водоростей на молекулярному рівні. Наприклад, фікоціанін є лінійним поліпептидним ланцюгом із 84 амінокислотних залишків. Чимало інформації відомо також щодо спектрів поглинання фікобілінів, виділених із багатьох рослинних джерел (рис. 3.7).

Враховуючи великий науковий та практичний інтерес до вивчення фікобілінів, цей напрям досліджень досить інтенсивно розвивається і майже щорічно в літературі з'являються нові мо-

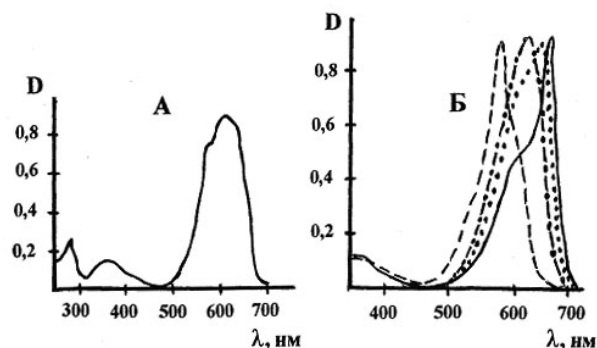


Рис. 3.7. Спектри поглинання фікобілісом та фікобіліпротеїдів *Mastigocladus laminosus*:

- а) розчин фікобілісом у 900 мМ калій-фосфатному буфері;
б) основні фракції розчинних фікобілісом після йонообмінної хроматографії на DEAE целюлозі, виміряні в 5...200 мМ калій-фосфатному буфері: 1. – фікоеритрин; 2. – С-фікоціанін (620 нм); 3 – С-фікоціанін (635 нм); 4. – алофікоціанін/

дифікації методик для одержання й аналізу цих пігментів. Розглянемо лише деякі з них.

Мета роботи. Визначити кількість фікоеритрину, фікоціаніну й алофікоціаніну, дослідити їхню зміну під дією різних факторів (наприклад, спектральний склад світла, зміна інтенсивності освітлення).

Матеріали, обладнання. Синьозелені водорості *Nostoc punctiforme* (Kutz.) Hariot., *N. muscorum* Ag, *Synechocystis minuscula* Woronich.; червоні – *Porphyridium cruentum*, *Ceramium ciliatum* (Ell.) Luel., *Laurencia obtusa* (Huds.) Lamour. або інші види; колби місткістю 500 мл, 1 л для вирощування водоростей, порцелянові ступки з товчачиками, кварцовий пісок, центрифуга з охолодженням, центрифужні пробірки, центрифужні ваги, аналітичні ваги, автоклав.

Реактиви. Необхідні компоненти живильного середовища для вирощування певного виду водоростей. Наприклад, для синьозелених це частіше за все мінеральне середовище Дж. П. Фітджеральда в модифікації А.А. Цендера та П.Р. Горема, яке містить (г/л води): NaNO_3 – 0,496; K_2HPO_4 – 0,039; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,075; CaCl_2 – 0,036; Na_2CO_3 – 0,020; NaSiO_3 – 0,058; залізо лимоннокисле (готують окремо за нагрівання та вносять після стерилізації середовища) – 0,006; лимонну кислоту (вносять після стерилізації) – 0,006; трилон Б (ЕДТА – вносять після стерилізації) – 0,001 і розчин мікроелементів (додають після стерилізації) – 0,08 мл/л. Вихідний розчин мікроелементів містить: H_3BO_3 – 3,1; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 2,23; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,287; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,088; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,146; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,033; KBr – 0,119; KI – 0,083; $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,154; $\text{NiSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,198; $\text{VSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,020; $\text{Al}_2\text{SO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ – 0,474; $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,037 г/л води. Натрій-фосфатний буфер (0,05 М Na_2HPO_4 з pH 7,0) (за С.І. Лось, 1998) або 0,1 М з pH 6,8 (Е. Gantt, С. Lipschultz, 1974).

Хід роботи.

1. Водорості відділити від живильного середовища центрифугуванням або фільтруванням.
2. Промити дистильованою водою.
3. Зруйнувати клітини розтиранням із кварцовим піском, по-

рошком із синтетичних алмазів або заморожуванням упродовж 12÷48 год. з подальшим розморожуванням.

4. Білки екстрагувати натрій-фосфатним буфером (0,05 М з рН 7,0) впродовж доби за 4°C або дистильованою водою, доведеною розчином луку до рН 7÷7,5.

Примітка. Попередньо видаляти жиророзчинні пігменти сірчанним ефіром або ацетоном не слід, бо в такому разі частково денатурують білки і зменшується їхній вихід.

5. Розтерту біомасу водоростей центрифугувати 15 хв. за 4500 об./хв.

6. Концентрацію фікобілінових пігментів визначити спектрофотометрично на СФ-46 вимірюванням оптичної густини екстрактів у максимумах поглинання фікоеритрину – 545 нм (для червоних) та 560 нм (для синьозелених), фікоціаніну – 620 нм (для червоних та синьозелених), алофікоціаніну – 650 нм (для червоних та синьозелених).

7. Вміст індивідуальних пігментів (мг/мл білка) обчислити за формулами (Е. Gantt, С. Lipschultz, 1974) для червоних водоростей:

$$\text{Фікоеретрин} = \frac{D_{545} - 0,572 \cdot D_{620} + 0,246 \cdot D_{650}}{5,26};$$

$$\text{R- фікоціанін} = \frac{D_{620} - 0,666 \cdot D_{650}}{3,86};$$

$$\text{Алофікоціанін} = \frac{D_{650} - 0,105 \cdot D_{620}}{4,65}.$$

Примітка. Для розрахунку пігментів із синьозелених водоростей (С.И. Лось, 1998) можна використовувати ті самі формули, але для фікоеритрину максимум становить 560 нм. Вміст фікобілінових пігментів розраховують у мг/г маси сухої речовини.

Контрольні запитання та завдання

1. Яка функція фікобіліпротейдів у клітинах водоростей?
2. Що являє собою хромофорна група фікобілінів?
3. Які рослини містять у своєму складі фікобіліни?
4. Що означають терміни: ламела, строма, грана, тилакоїд?

5. Назвіть основні риси бактеріального фотосинтезу.

6. Що означають літери R та C, наведені в назвах фікобілінів?

Робота 41. ВИЗНАЧЕННЯ ФІКОЦІАНІНУ ЗА МЕТОДОМ Р.М. РОТФАРЬ, Т.Н.ГОДНЕВА, В.Н.ГВАРДІЯН

Відомо, що фікобіліни присутні в клітинах водоростей в більшій концентрації порівняно з хлорофілами, тому саме вони зумовлюють їхнє забарвлення. Фікоціаніни, фікоеритрини і алофікоціаніни трапляються в різних співвідношеннях, причому залежно від умов освітлення переважно формується набір пігментів, що найкраще використовує відповідний світловий спектр. Слід зазначити, що на відміну від хлорофілів і каротиноїдів, локалізованих у ламелах, фікобіліни концентруються або в стромі, або формують особливі впорядковані ансамблі на поверхні мембран – фікобілісоми. Фікобіліни зумовлюють явище філогенетичної хроматичної адаптації водоростей у вертикальній зональності їх.

Мета роботи. Досліди кількісний вміст фікобілінових пігментів за різної відстані суспензії водоростей від джерела світла.

Матеріали, реактиви, обладнання. Суспензія водоростей; ацетон, трикальцієвий фосфат, 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,075 М розчин Na_2HPO_4 , реактив Шлезінгера (0,5 %-ий розчин оцтовокислого цинку в 90 %-му етиловому спирті); центрифуга з охолодженням, холодильник, водяна баня, ділильні лійки, електролампа потужністю 200÷300 Вт.

Хід роботи.

1. Водорості відділити від живильного середовища або води центрифугуванням за 1360 об./хв.
2. Відділену масу клітин заморозити, а потім розтерти з піском.
3. Зруйновані клітини екстрагувати ацетоном до появи безбарвних порцій фільтрату.
4. Після видалення всіх пігментів, розчинних в ацетоні (фі-

коціанін ацетоном не видаляється), до залишку, забарвленого в яскраво-блакитний колір, додати дистильовану воду.

Примітка. Після кількох хвилин настоювання синій пігмент легко переходить у воду.

5. Екстракцію повторити 2÷3 рази. Одержати водний розчин пігменту синього кольору з яскраво-червоною флуоресценцією.

6. Для розподілу суміші біліхромпротеїдів розчин хроматографувати на колонці з тризаміщеним фосфатом кальцію. Колонку попередньо змочити дистильованою водою.

7. Після пропускання розчину пігментів хроматограми проявити спочатку 0,04 М розчином Na_2HPO_4 , а потім розчином цього самого фосфату зі збільшенням концентрації до 0,075 М.

Примітка. Після проявлення на колонці утворюються три зони. У верхній частині колонки міститься вузьке світло-блакитне кільце пігменту, нерухоме навіть за додавання 0,15 М фосфату. Нижче розташовується основна широка синя зона пігментів і ще нижче – вузька блакитна. Дві останні зони єлюють 0,075 М розчином Na_2HPO_4 . Адсорбційний максимум синьої зони – 620 нм, що відповідає фікоціаніну. Максимум нижньої блакитної зони – 622 нм. Ця зона, можливо, утворюється за рахунок розкладання основного пігменту. Реєструється пряма залежність розміру цієї зони від інтервалу часу між зберіганням розчину та його хроматографічним розподілом на колонці: чим менший цей інтервал, тим вужча утворена зона.

8. Біліхромопротеїд осадити додаванням сірчанокислого амонію.

9. Після центрифугування білок промити ацетоном та ефіром.

10. Для видалення простетичної хромофорної групи фікоціанін гідролізувати концентрованою HCl упродовж 5 хв. на водяній бані.

Примітка. Воду у водяній бані попередньо доводять до кипіння, а потім нагрівання припиняють.

11. Після закінчення гідролізу додати хлороформ і воду.

Примітка. У разі струшування синій пігмент переходить у хлороформний шар. Хлороформний розчин пігменту має два адсорбційні максимуми: за 663÷666 і 607 нм. У разі додавання реактиву Шлезінгера до хлороформного розчину пігменту спостерігається утворення комплексу, який має червону флуоресценцію в УФ –діапазоні. Зникнення максимуму за 607 та 666÷668 нм і поява його за 630 нм характерні для мезобілівіоліну.

12. Вміст пігменту обчислити за результатами спектрофотометричного вимірювання (D) C -фікоціаніну й алофікоціаніну в суміші:

$$C_{620} = 1,177 \cdot D_{620} - 0,7377 \cdot D_{654},$$

де C_{620} – концентрація фікоціаніну; D_{620} і D_{654} – оптична густина суміші пігментів за 620 (фікоціаніну) та 654 нм (алофікоціаніну).

Примітка. На початку дослідження інтенсивність освітлення варіюють розміщенням дослідних пробірок на різній відстані від джерела світла.

13. Зробити висновки щодо залежності вмісту фікобілінів від інтенсивності та тривалості освітлення.

Контрольні запитання та завдання

1. Які основні принципи використовуються для визначення кількості фікобілінів?

2. Які максимуми поглинання властиві C -фікоціаніну та C -фікоеритрини?

3. Назвіть методи виділення фікобіліпротеїдів. Чим вони відрізняються між собою?

4. Яку кількість білкових субодиниць визначено в складі фікоеритрину та фікоціаніну?

5. Чим зумовлене явище філогенетичної хроматичної адаптації водоростей?

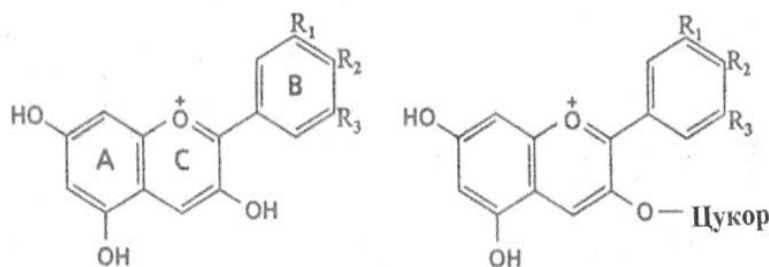
6. Назвіть особливості будови алофікоціаніну.

7. В якій країні працювали фахівці розробки методу? Що Ви про них знаєте?

Робота 42. НЕПЛАСТИДНІ ПІГМЕНТИ РОСЛИН. ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ АНТОЦΙΑНІВ

Крім пластидних, у рослинах є непластидні водорозчинні вакуолярні пігменти. До них належать антоціани та флавоноли (флавоноїдні сполуки). Рослинні клітини набувають голубого, фіолетового, темно-червоного кольорів за рахунок саме антоціанів, які добре розчиняються у воді. Вони ж визначають черво-

не та голубе забарвлення багатьох плодів, коренеплодів, квіток. Будову антоціанів встановлено у 1916 році німецьким біохіміком Р. Вільштеттером. Усі антоціани містять у гетероциклічному кільці чотиривалентний кисень (оксоній) завдяки якому здатні утворювати різноманітні солі. Аглікони антоціанів називають *антоціанідинами*:



Антоціанідин

Будова антоціанів

Встановлено, що колір антоціанів залежить від властивостей груп-замісників і рН. У разі комплексування антоціанів із іонами металів (наприклад, калієм) утворені солі надають клітинам пурпурного забарвлення, з Са або Mg - синього. Метилування антоціанів спричинює забарвлення червоного кольору. Часто антоціани з'являються в тканинах вегетативних органів рослин під впливом несприятливих факторів довкілля: високих і низьких температур, ураженні фітопатогенами, за дефіциту мінеральних елементів тощо. Вважають, що антоціани захищають хлорофіл від руйнування.

Мета роботи. Ознайомитися з методом виділення антоціанів із тканин, визначити кількість їх у пелюстках квіток і листках, дослідити зміну вмісту непластидних пігментів під дією несприятливих факторів довкілля (наприклад, підвищення та зниження температури тощо).

Матеріали, реактиви, обладнання. Пелюстки квіток, листки герані, традесканції, коренеплоди столового буряка; 1 %-ий розчин HCl у метанолі або етанолі; порцелянові ступки з товчачиками, фільтри Шотта № 3, колба Бунзена, скальпелі, скляні

пластинки для подрібнення матеріалу, скляні палички, мірні пробірки, вакуумний або водоструйний насос, технічні або центрифужні ваги, аналітичні ваги, ФЕК, кювети.

Хід роботи.

1. Наважку свіжого подрібненого матеріалу (0,5 г) розтерти у ступці з 1 %-им розчином HCl у метанолі або етанолі.
2. Кількісно перенести рослинний матеріал на фільтр Шотта № 3, змиваючи ступку невеликими порціями розчинника.
3. Екстракт відфільтрувати від осаду під вакуумом, промиваючи спиртом з HCl, об'єм довести до 10 мл.
4. Кількість антоціанів (*A*) у розчинах визначити фотоколориметрично за довжини хвилі 520 нм.
5. Обчислити вміст антоціанів за формулою:

$$A = \frac{a \cdot V}{P},$$

де *a* – кількість антоціанів в 1 мл розчину визначена за величиною екстинкції на калібрувальному графіку (студенти використовують готовий калібрувальний графік, який будують за даними густини розчинів антоціанів відомих концентрацій); *V* – об'єм розчину, мл; *P* – наважка, г.

5. Одержані результати записати у таблицю і обробити статистично.

Примітка. В таблицю, крім власних, записати результати визначення антоціанів у різних об'єктах, з якими працювали студенти всіх підгруп.

6. Зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Як забарвлення антоціанів залежить від рН середовища?
2. Які промені сонячного спектра фотосинтетично активні? Чи поглинають їх антоціани?
3. Чи можуть антоціани впливати на фотосинтез? Обґрунтуйте відповідь.
4. Чи залежить забарвлення рослин антоціанами від наявності в клітинах інших флавоноїдних пігментів?
5. В яких розчинниках краще розчиняються антоціани?
6. Назвіть функції антоціанів у рослин.

Робота 43. СПЕКТРИ ПОГЛИНАННЯ ПІГМЕНТІВ

Фотосинтетичні пігменти, поглинаючи сонячне світло беруть безпосередню участь у світловій фазі фотосинтезу. Пластидні пігменти поглинають світло в межах видимої частини спектра (400÷700 нм), завдяки чому ця область випромінювання називається *фотосинтетично-активною радіацією* або *ФАР*. Однак не всі промені спектра поглинаються пігментами однаково інтенсивно. Важливою особливістю спектра поглинання хлорофілів *a* і *b* є наявність у них двох яскраво виражених максимумів: у червоній області відповідно 660 і 640 нм та в синьо-фіолетовій – 430 і 450 нм. Мінімум поглинання міститься в зоні зелених променів. Цим і пояснюється зелене забарвлення пігментів.

У живому листку у хлорофілів більш широкий та вирівняний спектр поглинання. Так, червоний максимум хлорофілу *a* в хлоропласті має декілька піків: 670, 683 і 700 нм; у хлорофілу *b* він припадає на довжину хвилі 650÷655 нм. Аналогічне зміщення у бік довгохвильової частини спектра зазнає й синій максимум. Вказані різниці між спектрами поглинання хлорофілів у розчині та листку зумовлені ступенем агрегації молекул пігменту та міцністю зв'язку з ліпопротеїновим комплексом у ламелах. Каротини та ксантофіли поглинають світло лише в області синьо-фіолетових променів. Наприклад, для каротиноїдів характерне поглинання світлової енергії – лише до 540 нм. Детальна характеристика окремих ділянок спектра наведена в таблиці 3.6.

Таблиця 3.6. Характеристика окремих ділянок спектра

Колір	Інтервал довжини хвиль, нм	Типова довжина хвиль, нм
Ультрафіолетовий	Менше 400	254
Фіолетовий	400÷424	410
Синій	424÷491	460
Зелений	491÷550	520
Жовтий	550÷585	580
Оранжевий	585÷647	620
Червоний	647÷740	680
Інфрачервоний	Понад 740	1400

Мета роботи. Визначити максимуми поглинання основних фотосинтетичних пігментів у видимій частині спектра; переко-

натися, що у хлорофілів і каротиноїдів є спільний максимум поглинання світлової енергії в синьо-фіолетовій частині спектра.

Матеріали, реактиви, обладнання. Хвоя або листки пеларгонії, коренеплоди моркви та столового буряка, суспензія синьо-зелених або червоних водоростей; безводний сірчистий натрій, вуглекислий кальцій, етиловий спирт або ацетон, оцтова або соляна кислоти, дистильована вода; шпатель, ножиці, технічні та аналітичні ваги, порцелянові ступки з товкачиком, фільтри Шотта, мірні пробірки, колба Бунзена, насос Камовського чи водоструйний, електрична плитка, міліметровий папір, ФЕК.

Хід роботи.

Варіант 1 (хлорофіли).

Для досліду беруть два об'єкти (хвою та листя пеларгонії).

1. Рослинний матеріал подрібнити (не торкаючись великих жилок для листків).

2. Наважки хвої (500 мг) та пеларгонії (1 г) перенести у порцелянові ступки, додати по 2÷4 г безводного сірчистого натрію та на кінчику шпателя вуглекислого кальцію (для нейтралізації кислот клітинного соку).

3. Рослинний матеріал ретельно розтерти до порошкоподібної маси і перенести на скляний фільтр Шотта, який помістити у колбу Бунзена з мірною пробірною місткістю 10 мл.

4. Для виділення хлорофілу до порошку, що міститься на фільтрі, додати 3÷5 мл етилового спирту, перемішати та відфільтрувати у пробірку.

Примітка. Рослинний матеріал на фільтрі промивають наступною порцією етилового спирту до повного знебарвлення.

5. Загальний об'єм екстракту пігментів довести етиловим спиртом до 10 мл.

6. Визначити оптичну густину екстрактів на ФЕК за різних довжин хвиль: 340, 410, 460, 520, 580, 620, 680, 750 і 870 нм.

7. Побудувати графік залежності екстинкції спиртового (або ацетонового) розчину хлорофілу від довжини хвилі. Зазначити спектри та максимуми поглинання.

Варіант 2 (каротиноїди).

1. Наважку коренеплоду моркви (1 г) ретельно розтерти у порцеляновій ступці, перенести на скляний фільтр.

2. До суміші, що міститься на фільтрі, додати 3÷5 мл етилового спирту, перемішати і відфільтрувати у мірну пробірку.

3. Визначити оптичну густину екстрактів на ФЕК за різних довжин хвиль: 340, 410, 460, 520, 580, 620, 680, 750 і 870 нм.

4. Побудувати графік залежності екстинкції спиртового екстракту картоїноїдів від довжини хвилі.

Варіант 3 (антоціани).

1. Наважку столового буряка (1 г) подрібнити у порцеляновій ступці, промити дистильованою водою, що містить одну краплину кислоти (наприклад, оцтової, соляної).

2. Об'єм екстракту довести до 10 мл.

3. Визначити оптичну густину екстрактів на ФЕК за різних довжин хвиль: 340, 410, 460, 520, 580, 620, 680, 750 і 870 нм.

4. Побудувати графік залежності екстинкції водного екстракту антоціанів від довжини хвилі, відмітити максимуми поглинання.

Варіант 4 (фікобіліни).

1. Наважку синьо-зелених або червоних водоростей (1÷2 г) промити етиловим спиртом, додати 2÷5 мл соляної кислоти.

2. Розчин прокип'ятити впродовж 3÷4 хв. на електричній плитці та охолодити. За необхідності відфільтрувати.

3. Визначити оптичну густину екстрактів на ФЕК за різних довжин хвиль: 340, 410, 460, 520, 580, 620, 680, 750 і 870 нм.

4. Побудувати графік залежності екстинкції розчину фікобілінів від довжини хвилі, відмітити максимуми поглинання.

Примітка. Результати досліджень можна також представити у вигляді таблиці 3.7, де поглинуті ділянки замальовують чорним олівцем, а видимі – кольоровими олівцями. Наразі доцільно досліджувати деякі з наведених вище варіантів (наприклад, варіанти 1 або 2), використовуючи різні розведення витяжки із зелених листків у різних відношеннях 1:1, 1:3, 1:15 тощо.

5. За наявності в лабораторії реєструвального спектрофотометра, записати спектри поглинання хлорофілів *a* і *b*, каротинів і ксантофілів, антоціанів, фікобілінів.

Таблиця 3.7. Визначення максимумів поглинання фотосинтетичних пігментів рослин

Розчин хлорофілу, розведення	Діапазони дослідження						
	фіолетовий	синій	зелений	жовтий	оранжевий	червоний	інфрачервоний
1:15							
1:5							
1:3							
1:1							
Початковий розчин							

Контрольні запитання та завдання

1. Як відрізняються спектри поглинання хлорофілів *a* і *b*?
2. Який максимум поглинання специфічний лише для хлорофілів і не властивий для картоїноїдів?
3. Які структурні особливості будови молекул зумовлюють фотохімічні властивості пігментів?
4. Чому при спектрофотометричному визначенні вмісту зелених пігментів у розчинах використовують максимум поглинання їх у червоних, а не у синіх променях світла?
5. Чи змінюються максимум хлорофілу у разі фотовицвітання пігментів і як саме?
6. Як змінюється максимум поглинання у разі феофітинізації пігментів?
7. Чому відрізняються спектри поглинання пігментів для живого листка та екстрактів?

Робота 44. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ХЛОРОФІЛАЗИ МЕТОДОМ РОЗДІЛЕННЯ ФІТОЛЬНИХ І БЕЗФІТОЛЬНИХ ПІГМЕНТІВ

Фермент хлорофілаза *in vitro* каталізує зворотну реакцію відщеплення (синтезу) фітолу від хлорофілу з утворенням хлорофіліду:

Хлорофіл \leftrightarrow хлорофілід + $C_{20}H_{39}OH$

Його активність визначають у багатьох дослідженнях, поєднаних із вивченням метаболізму пігментів у вищих рослин і водоростей. Гідролітична функція ферменту посилюється за умови високої концентрації органічних розчинників. Максимальна активність *in vitro* спостерігається в гомогенаті, що містить 45 %-ий ацетон. Для визначення активності хлорофілази зазвичай використовують гомогенат, який містить 50÷60 % ацетону. Підвищення концентрації ацетону до 80 % припиняє дію ферменту. Субстратом для хлорофілази є хлорофіли, феофітин, а також інші пігменти, які містять ефірний зв'язок із фітолом. Активність ферменту визначають за температури 21÷23 °C і рН 7,0; тривалість інкубації фермента із субстратом 30÷60 хв.

Методи визначення активності хлорофілази ґрунтовані на розрахунку кількості хлорофіліду в пробі до і після дії ферменту. Про активність ферменту судять за збільшенням кількості хлорофіліду в пробі за певний період інкубації пігменту з ферментом. Утворений під час реакції хлорофілід відокремлюють від хлорофілу розділенням фітольних і безфітольних форм пігментів між полярними і неполярними розчинниками. В такому разі використовують здатність фітольних форм пігментів вилучатися повністю із суміші неполярними розчинниками. Найчастіше це петролейний ефір (температура кипіння 40÷60°C). Хлорофіліди залишаються в лужному водно-ацетоновому розчині. Активність хлорофілази можна визначати також за зменшенням вмісту хлорофілу в петролейно-естерній фракції.

Зазначимо, що різні види рослин суттєво відрізняються за активністю хлорофілази. Наприклад, у листках цукрових буряків її активність дуже висока (до 45 % хлорофілу перетворюється в хлорофілід), тоді як листки примули характеризуються низьким рівнем її активності (всього 1÷4 %).

Роботу проводять за етапами:

- активація хлорофілази в гомогенаті листків та одержання ацетонового екстракту пігментів;
- визначення кількості хлорофіліду відокремленням фітольних пігментів від безфітольних із використанням органічних розчинників;
- спектрофотометричний аналіз пігментів в одержаних пробах.

Мета роботи. Визначити кількість хлорофіліду в листках рослин і дослідити вплив на його зміну стресових факторів навколишнього середовища (наприклад, температури, підкислення).

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки гороху або пеларгонії; ацетон, $CaCO_3$ або $MgCO_3$, 0,02 н. NH_4OH , $NaCl$, петролейний етер; технічні та аналітичні ваги, порцелянові ступки з товкачиками, фільтр Шотта, колба Бунзена, мірні пробірки, мірні циліндри, ділильні лійки, паперові фільтри, ФЕК або спектрофотометр, кювети.

Хід роботи.

1. Взяти дві наважки листків одного ярусу (наприклад, гороху) по 0,5 г (середня проба). В першій (контрольній) визначити суму зелених пігментів і початковий вміст хлорофіліду. Для цього наважку листків розтерти у 80 %-му ацетоні в присутності $CaCO_3$ або $MgCO_3$.

2. Екстракт відфільтрувати крізь скляний фільтр.

3. Довести об'єм отриманого фільтрату до 50 мл.

4. У другій наважці листків (дослідній) визначити вміст хлорофіліду після дії хлорофілази. Наважку листків розтерти з 60 %-им ацетоном і $CaCO_3$ або $MgCO_3$.

5. Довести у мірному циліндрі до об'єму 25 мл.

6. Інкубувати екстракт за кімнатної температури (23°C) впродовж однієї години у темряві.

7. Реакцію припинити за концентрації ацетону 80 %. Для цього до гомогенату додати рівний об'єм (25 мл) 100 %-го ацетону.

8. Одержаний гомогенат відфільтрувати крізь скляний фільтр.

9. Екстракт довести у мірній колбі до об'єму 50 мл.

10. Екстракти контрольного і дослідного варіантів поділити на дві рівні частини. Першу частину кожного із розчинів залишити у темряві для визначення сумарного вмісту зелених пігментів.

11. У другій частині екстрактів визначити кількість хлорофіліду. Для цього до другої частини (25 мл) додати 2,5 мл 0,02 н. NH_4OH (із розрахунку 1 мл на 10 мл водно-ацетонового екстракту).

12. Суміш перенести у ділильну лійку.

13. Додають 0,2 мл насиченого розчину $NaCl$ і 5 мл петролейного ефіру (температура кипіння 40÷60 °C).

14. Одержану суміш енергійно струсити кілька разів.
Примітка. В петролейний ефір екстрагуються ліпофільні форми пігментів, що містять фітол – хлорофіли, а також каротиноїди. Безфітольні пігменти – хлорофіліди залишаються в нижньому водно–ацетоновому шарі.

15. Після розділення цих шарів нижній водно–ацетоновий зібрати в окрему колбу.

16. Одержану суміш перенести у ділильну лійку і повторити екстракцію 3÷4 рази до повного вилучення хлорофілів.

Примітка. До екстракту кожного разу додають ацетон відновлюючи попередній об'єм.

17. Після кінцевої екстракції водно–ацетоновий шар злити у мірну колбу місткістю 25 мл і довести чистим ацетоном об'єм до мітки.

Примітка. Так само готують і другу частину дослідної проби.

18. Для визначення вмісту хлорофілу спектрофотометрувати обидва ацетонові екстракти контрольної та дослідної проб відповідно за 663 і 645 нм.

19. Концентрацію суми хлорофілів обчислити за формулою:

$$\text{хлорофіли } (a + b) = 8,02 A_{663} + 20,2 A_{645} = \text{мг/л};$$

де A – величина поглинання сумарної витяжки пігментів за двох довжин хвиль, відповідно максимумам поглинання пігментів у 80 %-му ацетоні.

20. Поглинання обох ацетонових екстрактів (необробленого й обробленого петролейним ефіром) контрольної і дослідної проб визначити на спектрофотометрі.

Примітка. Для розрахунку концентрації хлорофілідів використовують коефіцієнт 0,69 (дивись роботу 40). Про активність хлорофілази судять за кількістю хлорофіліду в дослідній пробі і виражають у відсотках до загального вмісту зелених пігментів у контрольній пробі.

21. Одержані дані спектрофотометричного визначення пігментів і розраховані результати ((варіанти: 1 – контроль (сума пігментів хлорофілід + хлорофіли); 2 – контроль (хлорофілід); 3 – дослід (сума пігментів хлорофілід + хлорофіли); 4 – дослід (хлорофілід) записати у таблицю 3.8.

22. Обчислити зміни активності хлорофілази у відсотках.

Таблиця 3.8. Визначення активності хлорофілази в рослинному матеріалі

Варіант	Оптична густина	Вміст пігментів у пробі		Активність хлорофілази
		мг	%	

Контрольні запитання та завдання

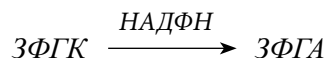
1. Яку реакцію каталізує фермент хлорофілаза?
2. Яку концентрацію органічних розчинників необхідно використовувати для прояву різних рівнів активності хлорофілази?
3. На чому засновані методи визначення активності хлорофілази?
4. Як відрізняються за активністю хлорофілази окремі види рослин?
5. Хто з киян-науковців в максимальній мірі працював з хлорофілазою й відкрив її світу?
6. Назвіть наукові центри України, відомих по роботах з пігментами рослин.
7. Що розуміють під контактним й дистанційним контролем пігментів?

Робота 45. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТУ РИБУЛОЗОБІСФОСФАТ-КАРБОКСИЛАЗИ (РУБІСКО)

Найважливішим ферментом темнових реакцій фіксації вуглекислого газу є рибулозобісфосфат-карбоксилаза (РБФ–карбоксилаза, РУБІСКО). Цей фермент здійснює фіксацію CO_2 на рибулозобісфосфаті (РБФ). Реакція карбоксилювання забезпечує синтез двох молекул трифосфогліцеринової кислоти (3-ФГК), які в наступних реакціях відновлюються до трифосфогліцеринового альдегіду (3-ФГА) з використанням енергетичних продуктів світлової стадії фотосинтезу АТФ і НАДФ·Н.

Зазвичай для визначення активності даного ферменту використовують радіометричний метод з використанням мітки $^{14}\text{CO}_2$, що потребує спеціального обладнання. Проте є й інший, спек-

трофотометричний метод із використанням АТФ і НАДФ·Н, як кофактора реакції:



Цей метод непрямий, однак дуже часто використовується у серійних дослідженнях.

Мета роботи. Дослідити активність ферменту РУБІСКО в листках рослин за дії різних факторів.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки вищих рослин; 0,05 М трис–НСІ буфер (рН 8,0) та (рН 8,2), 1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ ЕДТА, 5 мМ дитіотрейтол (ДДТ) або 5 мМ меркаптоетанол, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ ДДТ, 50 мМ NaHCO₃, НАДФ·Н 0,15 мМ, 30 %-ва оцтова кислота; ваги, порцелянові ступки з товчачиками, центрифуга, центрифужні пробірки, центрифужні ваги, термостат, спектрофотометр, кювети, паперові фільтри.

Хід роботи.

1. Наважку листків (5 г) розтерти у ступці або швидко (впродовж 1÷3 хв) гомогенізувати з 5 мл середовища, що містить 0,05 М трис–НСІ буфер (рН 8,0), 1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ ЕДТА, 5 мМ дитіотрейтолу (ДДТ) або 5 мМ меркаптоетанолу.

2. Одержані зразки відфільтрувати крізь капрон.

3. Розчини центрифугувати впродовж 20 хв. за 18000 об./хв.

4. До осаду додати 2 мл вихідного середовища і знову центрифугувати за тих самих умов.

5. Об'єднати обидва супернатанти.

6. Довести їх об'єм до 8 мл і використовувати цей супернатант для визначення активності РУБІСКО.

7. Для визначення активності РУБІСКО у дві пробірки (перша – контроль, друга – дослід) внести інкубаційне середовище, що містить 0,05 М трис–НСІ буфер (рН 8,2), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ ДДТ, 50 мМ NaHCO₃; НАДФ·Н 0,15 мМ, 0,3 мл екстракту.

8. Пробірки з інкубаційним середовищем інкубувати у термостаті за 30 °С упродовж 2 хв.

Примітка. Реакцію запускають додаванням в кожну пробірку 0,2 мл суміші АТФ і рибозо-5-фосфату (Р-5-Ф). Кінцева концен-

трація компонентів у реакційному середовищі має бути 1 мМ.

9. У контрольну пробу одразу внести рівний об'єм 30 %-ї оцтової кислоти.

10. Дослідну пробу інкубувати 4 хв, після чого реакцію зупинити додаванням рівного об'єму 30 %-ї оцтової кислоти.

11. Виміряти на спектрофотометрі оптичну густину дослідного зразка за 340 нм (область поглинання НАДФ·Н).

Примітка. За контроль слугують проби, зафіксовані 30 %-ю оцтовою кислотою, одночасно з внесенням туди Р-5-Ф і АТФ.

Дослід проводять в трикратній повторності. За одиницю активності ферменту (А) приймається зміна оптичної густини (D) на 0,01 за 1 хв. Для перерахунку активності з одиниць оптичної густини в мікромолі НАДФ·Н використовують коефіцієнт поглинання кофакторів, який дорівнює 6,22 мМ⁻¹·см⁻¹ за 340 нм.

Приклад розрахунку.

Нехай за 5 хв. зміна оптичної густини ΔD = 0,25. Тоді за 1 хвилину ΔD = 0,05. Приймавши за одиницю активності ферменту зміну густини 0,01 за хв., одержуємо активність ферменту А = 5.

Зауважимо, що для визначення активності очищеного ферменту як субстрат використовують рибубозобісфосфат, однак за використання гомогенату можна використовувати рибозо-5-фосфат і АТФ, оскільки в екстрактах завжди є фермент рибозоізомераза (5.3.1.6.) і рибонуклеаза (2.7.1.19), які забезпечують синтез РБФ. Для розрахунку активності ферменту на білок, уміст білка в пробі визначають за методом О. Лоурі.

12. Результати вимірювання оптичної густини і розрахунки активності ферменту записати у таблицю 3.9.

Таблиця 3.9. Визначення активності ферменту РУБІСКО

Варіант досліджу	Концентрація білка мг/г сирої або сухої речовини	Оптична густина, ум.од.	Активність РУБІСКО

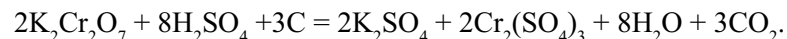
Контрольні запитання та завдання

1. Назвіть ключові ферменти темної стадії фотосинтезу.
2. Схарактеризуйте найважливіший фермент циклу Кальвіна – рибулозобісфосфаткарбоксилазу/оксигеназу.
3. Що є субстратом для фіксації вуглекислого газу в реакціях карбоксилювання?
4. Назвіть методи які використовують для визначення активності ферменту рибулозобісфосфаткарбоксилази.
5. Яка функція енергетичних еквівалентів АТФ і НАДФ·Н під час фіксації вуглекислого газу?

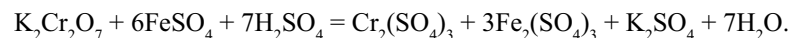
Робота 46. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ФОТОСИНТЕЗУ ЗА НАКОПИЧЕННЯМ В ЛИСТКАХ ОРГАНІЧНОГО ВУГЛЕЦЮ (ЗА МЕТОДОМ Ф.З. БОРОДУЛІНОЇ)

У процесі фотосинтезу вуглець (CO_2), що поглинається рослиною, включається в молекули синтезованих органічних сполук. Оскільки між кількістю синтезованих і фотосинтетичною активністю листка існує пряма залежність, то за змінами вмісту вуглецю органічних речовин можна оцінити інтенсивність їх утворення внаслідок фотосинтезу.

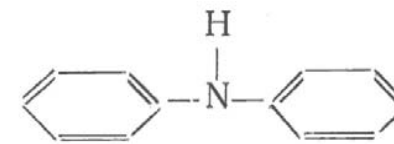
Кількість органічного вуглецю визначають за методом І. В. Тюрина, який базується на принципі мокрого спалювання рослинного матеріалу в суміші сірчаної кислоти з біхроматом калію. Реакція відбувається за рівнянням:



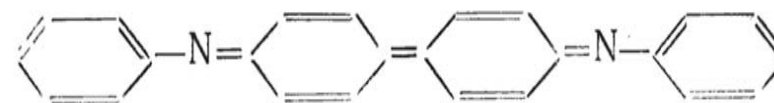
Невикористаний для окиснення органічного вуглецю залишок біхромату калію визначається титруванням 0,2 М розчином солі Мора:



Індикатором проходження реакції є дифеніламін, який у відновленій формі безбарвний, у разі окиснення переходить у дифенілбензидинвіолет синьо-фіолетового кольору.



Дифеніламін



Дифенілбензидинвіолет

Біхромат калію окиснює дифеніламін. Унаслідок цього його розчин набуває червоно-бурого забарвлення. Під час титрування сіллю Мора шестивалентний хром відновлюється до тривалентного, внаслідок чого його розчин поступово набуває синього забарвлення, а до кінця титрування синьо-фіолетового. Коли весь хром прореагує, наступне додавання солі Мора зумовлює перехід окисненої форми індикатора у відновну (безбарвну). Внаслідок цього з'являється зелене забарвлення, яке надають розчину йони тривалентного хрому. Чіткому переходу синьо-фіолетового забарвлення в зелений заважають йони тривалентного заліза, що утворюються в процесі реакції. Отже, чим більше біхромату калію використовується на спалювання органічного вуглецю, тим інтенсивніший фотосинтез. За різницею кількості вуглецю в рослинному матеріалі до початку фотосинтезу й після нього на світлі визначають інтенсивність фотосинтезу.

Мета роботи. Дослідити інтенсивність фотосинтезу залежно від умов навколишнього середовища (інтенсивності світла, температури, кількості CO_2 в повітрі), а також переконатися в наявності процесів синтезу органічних речовин під час асиміляції вуглекислого газу.

Матеріали, реактиви, обладнання. Пеларгонія або інші кімнатні чи оранжерейні рослини, витримані напередодні досліді впродовж двох діб у темряві; 0,4 н. розчин біхромату калію в розбавленій H_2SO_4 (1:1); 0,2 н. розчин солі Мора (блакитно-зелені кристали без бурого нальоту розчиняють у 1 л води з 20 мл кон-

центрованої H_2SO_4); 0,5 %-ий розчин дифеніламіну у 80 %-ій сірчаній кислоті; колби місткістю 200 мл, скляні лійки, піпетки місткістю 10 мл, бюретки місткістю 25 мл, свердло, лійки, електроплитка, кристалізатори з холодною водою.

Хід роботи.

1. З кількох половинок листків рослин свердлом вирізати 3÷6 дисків площею поверхні (0,5÷1,0 см).

2. Диски опустити у конічну колбу місткістю 200 мл з 10 мл розчину біхромату калію в сірчаній кислоті.

3. Вміст колб перемішати, накрити скляними лійками, які використовують як обернені холодильники (рис. 3.8).

4. Розчини прокип'ятити впродовж 5 хв. на електроплитці.

Примітка. Якщо розчин у колбі набуває зеленого забарвлення, дослід повторюють з меншою кількістю рослинних дисків, оскільки хромової суміші виявилось недостатньо для озолення рослинного матеріалу.

5. Після кип'ятіння колби охолодити, долити 20 мл води і додають 5 краплин індикатору дифеніламіну або фенілантранілової кислоти.

Примітка. Внаслідок окиснення дифеніламіну розчин біхромату калію набуває бурого забарвлення.

6. Розчини титрують сіллю Мора з відомим титром до світло-зеленого кольору. Одержані дані дають змогу визначити вміст органічного вуглецю в листках до початку фотосинтезу.

7. Дослідні рослини виставити на світло різної інтенсивності.

8. За годину з другої половинки дослідних листків вирізати нові диски, які теж спалюють.

9. Визначити вміст органічного вуглецю в зразках за наведеною вище методикою.

10. Паралельно провести контрольне визначення (без рослинного матеріалу), повторюючи всі описані вище операції.

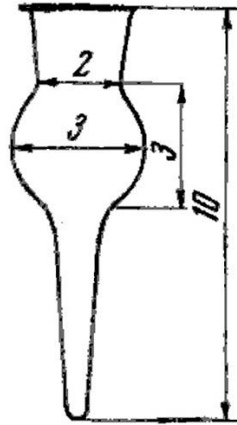


Рис. 3.8. Холодильник із водою (розміри у сантиметрах)

11. Кількість вуглецю (X) на 1 dm^2 поверхні листків до і після освітлення рослин за 1 год обчислити за формулою:

$$X = \frac{(A - B) \cdot k \cdot 0,6 \cdot 100}{S},$$

де A – кількість солі Мора, що використана на титрування контрольної колби (без рослинного матеріалу), мл; B – кількість солі Мора, що використана на титрування дослідної колби, мл; k – поправка до титру солі Мора ($k=1$); S – площа дисків (у cm^2), взятих для аналізу; 0,6 – коефіцієнт для перерахунку мілілітрів солі Мора у міліграми вуглецю.

10. Результати дослідів записати у таблицю 3.10.

Таблиця 3.10. Інтенсивність фотосинтезу у листках різних рослин

Рослина	Час визначення	Використано				Площа дисків, cm^2	Кількість вуглецю (мг / m^2)	Інтенсивність фотосинтезу (мг вуглецю / ($m^2 \cdot$ год))
		$K_2Cr_2O_7$, мл		солі Мора, мл				
		Конт роль (А)	Дослід (В)	Контроль (А)	Дослід (В)			
	Вміст органічних речовин на початку дослідів							
	Після фотосинтезу на світлі							

Контрольні запитання та завдання

1. Назвіть основні принципи методів, за якими визначають інтенсивність фотосинтезу.

2. Які показники фотосинтезу враховано у методі Ф.З. Бородуліної для визначення інтенсивності процесу?

3. Під час якої фази фотосинтезу CO_2 асимілюється до органічних сполук?

4. На утворення яких сполук витрачається вуглець CO_2 у процесі фотосинтезу?

5. Які сполуки є акцепторами CO_2 у C_4 -типу рослин?

6. Які недоліки має метод, що зумовлює варіабельність одержаних результатів?

7. Яка функція листка рослини у виникненні розбіжностей?

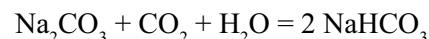
8. Як впливає на точність визначення органічного вуглецю товщина листка?

9. Назвіть основні правила техніки безпеки під час проведення аналізу?

Робота 47. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ФОТОСИНТЕЗУ ВОДЯНИХ РОСЛИН ЗА КІЛЬКІСТЮ CO_2 , РОЗЧИНЕНОГО У ВОДІ

Вода та водні живильні розчини відрізняються від повітря тим, що вміст CO_2 в них коливається в широких межах. Наявність у природних водах карбонатних (CO_3^{2-}) і гідрокарбонатних (HCO_3^-) іонів істотно впливає на кількість у них вільного CO_2 . У воді і розчинах із лужною реакцією ($\text{pH} > 8$) вільного CO_2 немає.

У зв'язку з цим фотосинтетична активність водяних рослин цілком залежить від доступного CO_2 , який значною мірою зумовлює продукційний процес фототрофних організмів. Принцип методу базується на реакції заміщення вільного CO_2 розчином Na_2CO_3 або NaOH відомих концентрацій згідно з реакцією:



За наявності індикатору визначають перехід кислої реакції розчину в слабколужну.

Мета роботи. Встановити залежність між кількістю вільного CO_2 в середовищі і використанням його для фотосинтезу зеленими водяними рослинами.

Матеріали, реактиви, обладнання. Водяні рослини – гілочки елодеї, листки валіснерії; 0,01 н. розчин Na_2CO_3 , спиртовий

0,1 %-й розчин фенолфталеїну; конічні колби місткістю 250 мл, гумові трубки, піпетки, бюретки місткістю 10÷25 мл, мірні циліндри, магнітні перемішувачі.

Хід роботи.

1. У дві конічні колби місткістю 250 мл налити майже доверху відстояну воду, в яку перед дослідом видихають через піпетку повітря.

2. У кожну із колб внести по однаковій (за масою) гілочці елодеї. Колби закрити пробками.

3. Одну колбу виставити на світло, іншу (контрольну) – у темряву. Контролем слугує чиста відстояна вода, яку використовували для наповнення дослідних колб.

4. За 1÷1,5 год. з усіх колб послідовно відбирають по 50÷100 мл води (сифоном або мірним циліндром) в колби для титрування.

5. Додати 3÷5 краплин розчину фенолфталеїну та титрувати із бюретки 0,01 н. розчином Na_2CO_3 за постійного перемішування до слабо рожевого забарвлення, яке не зникає впродовж 1 хв.

Примітка. Іноді під час додавання індикатору до досліджуваної води в колбі рідина відразу забарвлюється в рожевий колір. Пояснить, чим це зумовлено і чи варто далі продовжувати титрування.

6. Об'єм використаного для титрування розчину записати і обчислити вміст вільного CO_2 у воді за формулою:

$$X = \frac{2,2 \cdot V \cdot 1000}{V_1} \quad (\text{мг/л}),$$

де V – об'єм розчину, використаний на титрування води, мл; V_1 – об'єм води, взятої для титрування, мл; 2,2 – кількість мг CO_2 , яка еквівалентна 1 мл 0,01 н розчину Na_2CO_3 .

7. Інтенсивність фотосинтезу (I_ϕ , мг $\text{CO}_2/(\text{м}^2 \cdot \text{год})$) обчислити за формулою:

$$I_\phi = \frac{A - B}{t \cdot p},$$

де A – вміст вільного CO_2 у воді в колбі, яка перебуває в темряві; B – вміст вільного CO_2 у воді в колбі на світлі; t – час дослід, год.; p – маса рослини, г.

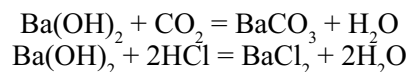
Контрольні запитання та завдання

1. У якій формі водяні рослини асимілюють CO_2 із води?
2. Чи варто добавляти в акваріум газовану воду столового призначення?
3. Чи можна використати для вищенаведеної роботи інші індикатори?
4. Чому під час стояння відтитрованих проб рожеве забарвлення виникає знову?
5. Як можна збільшити вміст CO_2 у дослідній воді?
6. Які переваги та недоліки має цей метод?
7. Як впливають на вміст CO_2 у воді зміни pH?
8. Чому під час визначення фотосинтезу за змінами CO_2 використовують ^{14}C мічені за вуглецем сполуки?

Робота 48. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ФОТОСИНТЕЗУ ЗА ПОГЛИНАННЯМ CO_2 У ЗАМКНУТОМУ ПРОСТОРІ (ЗА МЕТОДОМ Л.А. ІВАНОВА І Н.Л. КОССОВИЧА)

Цей метод визначення фотосинтезу належить до газометричних. Використовуючи його, враховують зменшення в повітрі концентрації вуглекислого газу, який знаходиться в замкнутому просторі (в колбі) внаслідок асиміляції CO_2 фотосинтезуючим листком. Цей метод рекомендується використовувати в природних умовах на листках, не відокремлених від пагона, на окремих гілках і цілих рослинах.

Метод базується на тому, що після експонування рослини в колбі зв'язують не поглинуту листками вуглекислоту, додаючи надлишок розчину лугу. Після чого луг, що залишився, титрують соляною або щавлевою кислотою. Реакція відбувається за наступними рівняннями:



Із наведених рівнянь видно, що 1 молю HCl відповідає 0,5 моля CO_2 , відповідно це складає 22 г CO_2 . За концентрації соляної кислоти 0,025 н. в 1 мл цього розчину міститься 0,00002-

5 моля соляної кислоти, що еквівалентно $22 \cdot 0,000025 = 0,00055$ г, або 0,55 мг CO_2 .

Даний метод дає точні результати якщо під час відкриття та закриття колб руки людини не торкаються до скла, оскільки повітря розширюючись при нагріванні частково виходитиме з колб. У цьому разі треба ставити 3÷5 повторностей одного варіанта досліду.

Мета роботи. Дослідити, що під час фотосинтезу відбувається поглинання вуглекислого газу, а сам процес залежить від інтенсивності освітлення.

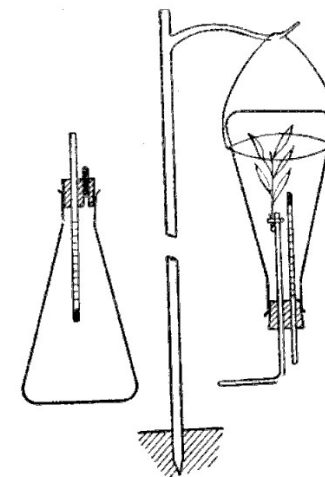


Рис. 3.9. Асиміляційна проба

Матеріали, реактиви, обладнання. Кімнатні рослини (наприклад, пеларгонія), листки яких мають черешки; 0,025 н. розчин $\text{Ba}(\text{OH})_2$, 0,025 н. розчин HCl , 0,1 %-й спиртовий розчин фенолфталеїну; асиміляційні колби місткістю 1÷2 л, гумові пробки з отворами (№ 1), що закриваються скляними паличками, гумові пробки, що складаються з двох половинок і мають посередині виїмку (№ 2), люксметр, електролампа потужністю 200÷300 Вт, міліметровий папір, вата, ваги.

Хід роботи.

1. Підібрати дві однакові колби (дослідну й контроль). Витримати їх протягом 30 хв. відкритими для заповнення повітрям.
2. Визначити площу дослідного листка.
 - Визначити вагу міліметрового паперу площею 100 cm^2 .
 - На міліметровий папір накласти дослідний листок, обвести його, контури листка вирізати.
 - Зважити паперову копію дослідного листка.
 - Обчислити площу дослідного листка за пропорцією:

$$\frac{A}{B} = \frac{C}{X}, \text{ звідки } X = \frac{B \cdot C}{A},$$

де A – вага міліметрового паперу, г; B – вага паперової копії дослідного листка, г; C – площа міліметрового паперу, см²; X – площа листка, см².

3. Черешок дослідного листка обгорнути ватою і затиснути між двома половинками пробки № 2 (рис. 3.9).

4. Листок ввести в асиміляційну колбу, а її горло закрити пробкою.

5. Колбу експонувати на світлі впродовж 10 хв. Інтенсивність освітлення виміряти люксметром.

6. Поруч поставити контрольну колбу без листка, яку закривають пробкою № 1 (рис. 3.9).

7. За 10 хв. з дослідної колби листок вийняти, обидві колби закрити пробками №1.

8. Палички із пробок вийняти і крізь отвори в дослідну і контрольну колби налити по 20 мл розчину бариту і по 2 краплини індикатора фенолфталеїну.

9. Колби знову щільно закрити, вставляючи в пробки скляні палички, а вміст у них періодично збовтувати впродовж 10 хв.

10. Крізь отвори в пробках розчини титрувати 0,025 н. НСІ із бюретки до повного їх знебарвлення.

11. Інтенсивність фотосинтезу (I_{ϕ} , мг СО₂ / (м²·год)) обчислити за формулою:

$$I_{\phi} = \frac{(A - B) \cdot 0,55}{S \cdot t},$$

де A – кількість НСІ, використана на титрування бариту в дослідній колбі, мл; B – кількість НСІ, використана на титрування бариту в контрольній колбі, мл; 0,55 – кількість СО₂, яка еквівалентна 1 мл 0,025 н НСІ, мг; S – площа листків, м²; t – експозиція досліду, год.

12. Результати записати у таблицю 3.11.

13. Зробити висновки.

Примітка. Під час проведення роботи інтенсивність освітлення варіюють розміщенням фотосинтезуючих листків на різній відстані від джерела світла. На основі даних, одержаних у різних підгрупах, роблять висновок про залежність інтенсивності фотосинтезу від інтенсивності освітлення рослин. Якщо варіантів освітлення багато, результати зображують графічно.

Таблиця 3.11. Визначення інтенсивності фотосинтезу за поглинанням СО₂ у різних рослин

Об'єкт дослідження	Інтенсивність освітлення	Площа листків	Об'єм бариту в колбах, мл	Кількість НСІ, використана на титрування бариту, мл		Інтенсивність фотосинтезу, мг СО ₂ / (м ² · год.)
				дослід	контроль	

Контрольні запитання та завдання

1. Назвіть недоліки визначення інтенсивності фотосинтезу в замкнутому просторі.
2. Які речовини є акцепторами вуглекислоти у рослин?
3. Як відбувається регенерація рибулозо-1,5-бісфосфату в процесі фотосинтезу?
4. Чому відбувається обезбарвлення кольорового розчину?
5. Чи може зазначений метод працювати в автоматичному режимі з реєстрацією показників?
6. Які переваги має розглянутий метод перед іншими, що використовуються для визначення інтенсивності фотосинтезу?

Робота 49. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ФОТОСИНТЕЗУ ГАЗОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ У ТЕЧІЇ ПОВІТРЯ (ЗА МЕТОДОМ Й.О. ЧАТСЬКОГО І.Б. СЛАВІКА)

Метод оснований на властивості розчину бікарбонату натрію (NaHCO₃) приходити в рівновагу з СО₂ повітря. У разі поглинання або віддачі розчином, що містить індикатор крезол, вуглекислого газу змінюється його рН і відповідно забарвлення, яке порівнюють зі спеціально виготовленою за таблицею 3.12 з буферною шкалою. Встановлюють величину рН розчину бікарбонату, а потім за графіком (рис. 3.10) визначають кількість вуглекислоти в повітрі. Ці дані дають змогу розрахувати інтенсивність фотосинтезу рослин.

метр. Як камеру використовують поліетиленовий мішечок, в який вставляють Т-подібну скляну трубку та листок; вільні краї мішечка загинають і закріплюють канцелярськими скріпками. Зручнішими є камери-прищепки, виготовлені з плексигласу. Повітря з камери гумовою трубкою надходить до приладу з індикаторним розчином.

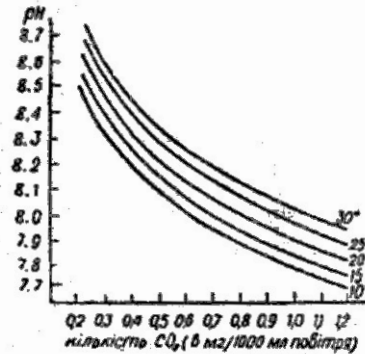


Рис. 3.10. Залежність pH розчину 0,001 н. NaHCO_3 + 0,099 н. KCl від кількості CO_2 в повітрі

Хід роботи.

1. Перед дослідом у приладу налити по 10 мл індикаторного розчину (0,001 н. NaHCO_3 + 0,099 н. KCl , в який додано чотири краплини крезолового червоного).

2. Включити насос і обережно відкрити краники приладів, випускаючи повітря.

Примітка. Пухирці повітря проходять крізь індикаторні розчини, встановлені через 5÷7 хв.

3. Визначити рівновагу між вмістом CO_2 в повітрі та індикаторному розчині. Це відбувається тоді, коли pH розчину перестає змінюватися.

4. Визначити pH розчинів, за графіком (рис. 3.10), знайти вміст вуглекислого газу в 1 л повітря, беручи до уваги температуру.

5. До дослідного приладу приєднати камеру з листком. Через 10÷20 хв. дослід закінчити.

6. Закривають обидва краники та відключити мотор.

7. Визначити температуру в приладах і за допомогою буферної шкали встановити величину pH у контрольному й дослідному розчинах.

8. Визначити вміст CO_2 в повітрі, яке пройшло крізь контрольні та дослідні розчини.

9. Інтенсивність фотосинтезу (I_ϕ) $\text{мг CO}_2 / (\text{м}^2 \cdot \text{год})$ обчислити за формулою:

$$I_\phi = \frac{(a - b) \cdot v \cdot 100}{S},$$

де a – кількість CO_2 в 1 л повітря, що пройшло через контрольний прилад; b – кількість CO_2 в 1 л повітря, що пройшло через дослідний прилад (після поглинання частини CO_2 в процесі фотосинтезу); v – швидкість руху повітря крізь індикаторний розчин, л/год.; S – площа листка, м^2 (визначають за допомогою міліметрового паперу).

Різні групи студентів виконують такі варіанти дослідів:

1. Визначення інтенсивності фотосинтезу залежно від інтенсивності освітлення.

2. Визначення інтенсивності фотосинтезу залежно від спектрального складу світла (на камери з листком надівають футляри, які пропускають лише сині, червоні або жовті промені).

3. Визначення інтенсивності фотосинтезу залежно від віку листків (у досліді досліджують молоді й старіючі листки).

4. Визначення інтенсивності фотосинтезу в етиолованих і зелених листках.

Отримані дані записати у таблицю (самостійно складену студентами), статистично обробити їх і зробити висновки щодо залежності інтенсивності фотосинтезу від дії різних факторів.

Контрольні запитання та завдання

1. Які переваги методу визначення інтенсивності фотосинтезу в течії повітря порівняно із замкнутим простором?

2. Які переваги методу визначення фотосинтезу за Чатським і Славіком?

3. Якими методами можна визначити площу листків?

4. Чи впливає дихання рослин на величини фотосинтезу?

5. Назвіть апаратуру, що потрібна для використання даного методу.

6. Чи має зазначений метод переваги над інфрачервоним аналізатором, який використовується під час вимірювання інтенсивності фотосинтезу?

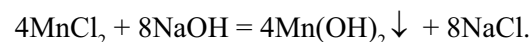
Робота 50. ЙОДОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КИСНЮ У ВОДІ ЯК ПРОДУКТУ ФОТОСИНТЕЗУ (ЗА МЕТОДОМ Л.В.ВІНКЛЕРА)

Для оцінки кисневого режиму водойм і фотосинтетичної продуктивності водоростей (первинної продукції) з хімічних розро-

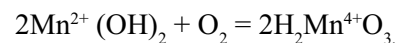
бок найчастіше використовують визначення кількості кисню в рідині за методом Л.В.Вінклера. Цей метод застосовують також під час роботи з вищими водними рослинами. За змінами вмісту кисню у воді порівняно з контролем можна зробити висновки про характер дії відповідного фактора (наприклад, різноманітних токсикантів, умов живлення, світлового режиму, температури) на життєдіяльність рослини перш за все на фотосинтетичну активність.

Метод Вінклера ґрунтується на здатності гідрату закису марганцю зв'язувати в лужному середовищі розчинений у воді кисень, окиснюючись при цьому в сполуку вищої валентності. В кислому середовищі марганець відновлюється, окиснюючи еквівалентну кількість йоду. Кількість видаленого йоду визначається титруванням розчину гіпосульфітом. Підраховано, що одна грам-молекула гіпосульфіту відповідає 8 г кисню. Процес, що в цей час відбувається, можна розділити на два етапи.

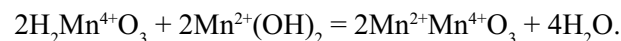
На першому етапі в дослідному (лужному) середовищі фіксується кисень. При цьому хлористий марганець реагує з їдким натром, і утворюється білий осад гідрату закису марганцю:



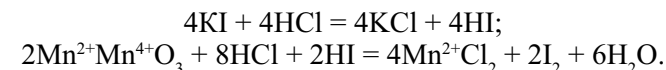
Гідрат закису марганцю повністю зв'язує розчинений у воді кисень, окиснюючись у марганцеватисту кислоту бурого кольору, в складі якої марганець набуває валентність, що дорівнює чотирьом:



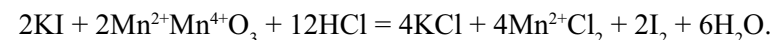
Надлишок гідрату закису марганцю реагує з цією кислотою, утворюючи сіль двовалентного марганцю та марганцевистої кислоти:



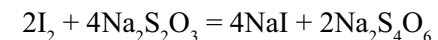
Другий етап пов'язаний з відновленням чотиривалентного марганцю та виділенням йоду в кислому середовищі. При цьому чотиривалентний марганець відновлюється до двовалентного, окиснюючи відповідну кількість йоду (з йодистого калію – KI):



Сумарно це рівняння має такий вигляд:



Кількість виділеного йоду встановлюють титруванням дослідного розчину гіпосульфітом:



За методом Вінклера враховується лише кисень, який розчинений у воді. Слід пам'ятати, що більшість вищих водяних рослин має значні міжклітинники з котрих видаляються пухирці газів (кисню), які за методом Вінклера не враховуються. Для того щоб із рослин пухирці газу не видалялись під час експерименту, їх бажано підготувати, підрізавши за 1÷2 доби до дослідної експозиції і цей зріз не відновлювати. Вода протягом досліді не повинна пересичуватися киснем і не утворювати пухирці.

Мета роботи. Ознайомитися із кисневим методом визначення інтенсивності фотосинтезу або дихання за кількістю виділеного або поглинутого кисню, а також дослідити залежність фотосинтезу у водному середовищі від температури, інтенсивності світла, вмісту CO_2 тощо.

Матеріали, реактиви, обладнання. Водорості або листки вищих водяних рослин (наприклад, елодеї, валіснерії); 0,1 н. розчин гіпосульфіту, з розведення якого свіжою дистильованою водою готують розчин 0,02 н.; 0,01 н. розчин $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; 0,5 %-й розчин крохмалю; розчин хлористого марганцю (для його виготовлення 50 г $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 100 мл води. Стежать за тим, щоб сіль хлористого марганцю не містила заліза); розчин $\text{NaOH} + \text{KI}$ (для цього 33 г лугу розчиняють в дистильованій воді, а потім додають 20 г KI й доводять об'єм дистильованою водою до 100 мл, розчин зберігають у темному місці); концентрована HCl або H_2SO_4 ; калібровані склянки місткістю 150 і 300 мл; сифони для наповнення склянок водою та взяття проб; піпетки

місткістю 1 і 2 мл з довгими кінцями, піпетки місткістю 5 та 50 мл, колби Ерленмейера, термометри, бюретки.

Хід роботи.

1. Склянки с притертими скляними пробками (місткістю 100, 150, 300 мл) заповнити природною водою або суспензією водоростей на живильному середовищі, в які поміщають попередньо зважені рослини елодеї, валіснерії чи іншої водяної рослини.

Примітка. Важливе значення має кількість водоростей в колбах для експонування. Не слід використовувати щільні суспензії, бо це може призвести до спотворення результатів через зв'язування йоду органічними частинками, затіненню світла під час експонування, поглинання кисню клітинами тощо.

2. Під час роботи з природними популяціями водоростей у більшості випадків визначають початковий вміст кисню в середовищі до експонування склянок на світлі. Для цього сифоном, кінець якого опущено на дно, склянки наповнити водою, уникаючи їх контакту з повітрям. Воді, яка наповнює склянку дають можливість витікати з склянки через сифон протягом 30÷60 с.

3. Після наповнення склянки закрити пробками так, щоб у них не залишалося бульбашок повітря.

4. Дослідні (з рослинами) і контрольні (без рослин) склянки виставити на світло. Експозиція триває 30÷60 хв.

5. Після експозиції у кожному склянку додати 1 мл розчину $MnCl_2$ і 1 мл розчину $NaOH + KI$.

Примітка. Під час внесення розчинів піпетку слід опускати до дна склянки та швидко виймати з таким розрахунком, щоб протягом часу підняття піпетки 1 мл розчину був внесений у склянку.

6. Склянки знову закрити пробками так, щоб не було бульбашок повітря та поставити в темряву на 1÷2 год для випадання осаду.

7. Після формування осаду зафіксований кисень (осад у склянці) розчинити додаванням 3 мл концентрованої сірчаної кислоти.

Примітка. Після додавання кислоти закриті пробками склянки ретельно збовтують (перевертаючи їх).

8. Для наступного титрування взяти або весь вміст склянки (переносючи його в конічну колбу), або відібрати 50 мл рідини.

9. Йод, що виділяється, зразу ж титрувати 0,02 н. гіпосульфідом до появи слабо-жовтого забарвлення.

10. Додати 1 мл крохмалю та титрувати суміш до повного зникнення синього забарвлення.

11. Кількість виділеного кисню обчислити за різницею його вмісту за одиницю часу у дослідних (з рослинами) та контрольних (без рослин) склянках:

$$a = \frac{(x - x_1) \cdot k \cdot 0,16}{V} \text{ мг,}$$

де x – кількість 0,02 н. гіпосульфиту, яку використали на титрування проби дослідного варіанта, мл; x_1 – кількість 0,02 н. гіпосульфиту, яку використали на титрування контролю (якщо останній не ставився, його в формулі опускають (наприклад, за визначення вмісту кисню у воді); k – поправка до титру гіпосульфиту; 0,16 – кількість кисню, яка відповідає 1 мл 0,02 н. розчину гіпосульфиту, мг; V – кількість кисню, виділеного 1 мл суспензії за розрахунок на об'єм, мг. Це число може бути перераховано на суху речовину в певному об'ємі суспензії або на 1 млн. клітин.

Різні групи студентів виконують такі варіанти дослідів:

1. Визначення інтенсивності фотосинтезу за температури 15÷17 і 25÷27 °С. Для цього рослини під час дослідів ставлять в кристалізатори з водою, температуру якої піднімають або відбирають проби води з водойми в різні інтервали часу (наприклад, вранці, вдень та увечері).

2. Визначення інтенсивності фотосинтезу за різного освітлення (наприклад, Сонце, звичайні або кварцові лампи), різної відстані від джерела світла. Об'єктом дослідів можуть бути також зразки води, відібрані у природних водоймах.

3. Визначення інтенсивності фотосинтезу за різної концентрації CO_2 у воді (0,01; 0,04; 0,16 і 0,33% розчини $KHCO_3$). Розчини готують на водопровідній воді, яку протягом кількох діб витримують у широких відкритих посудинах.

Контрольні запитання та завдання

1. Які фактори зовнішнього середовища найсильніше посилюють або послаблюють інтенсивність фотосинтезу?

2. На чому оснований кисневий метод визначення продуктивності фотосинтезу (первинної продукції)?

3. Як інтенсивність фотосинтезу залежить від температури води?
4. Чи залежить продуктивність фотосинтезу від концентрації вуглекислоти в середовищі?
5. Як впливає на фотосинтез освітленість та його дефіцит?
6. Чи впливає на фотосинтез світло різного кольору, тобто різного спектрального складу ФАР?
7. Як впливають на кисневу продуктивність біогенні елементи (фосфор, азот та його сполуки, сірка та ін.)?
8. Чи може киснева продуктивність використовуватись під час визначення якості води і як саме?
9. Як впливає на фотосинтез щільність суспензії водоростей?
10. Чому треба уникати контакту досліджуваної води з повітрям?
11. Назвіть інструментальні методи визначення кисню у воді.
12. Які переваги мають інструментальні методи визначення вмісту кисню у воді?

Робота 51. ВИЯВЛЕННЯ ПЕРВИННОГО КРОХМАЛЮ, СИНТЕЗОВАНОГО В ПРОЦЕСІ ФОТОСИНТЕЗУ В ЛИСТКАХ РОСЛИН (проба Ю.Сакса).

Демонстраційний дослід

У процесі фотосинтезу утворюються різні органічні речовини, які рослини використовують у процесах життєдіяльності. Близько 30÷50% синтезованих сполук відкладаються у вигляді крохмальних зерен в фотосинтезуючих органах. Наочно це можна виявити за допомогою проби Сакса. Крохмаль, що синтезується в хлоропластах під час фотосинтезу, називають *первинним*, на відміну від того, що відкладається в запасуючих органах.

Дослід рекомендується проводити на зрізаних і поставлених у воду листках, оскільки у них накопичується крохмаль швидко, а відтік в інші органи перервано. Процес утворення первинного крохмалю чіткіше реєструється на попередньо знекрохмалених листках. Знекрохмалення останніх досягають витриманням рослини протягом декількох діб у темряві. За цей час увесь крохмаль, що міститься в листках, перетвориться в цукри. Останні витрачаються в процесі дихання листка або частково транспортуються до запасуючих органів.

Мета роботи. Пересвідчитися в тому, що у процесі фотосинтезу синтезуються вуглеводи, які відкладаються в листках у вигляді крохмальних зерен.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки пеларгонії (в зимовий період), примули, гортензії (навесні), кукурудзи, настурції (влітку), які перед дослідом протягом двох діб витримують в темряві; спирт, 1 %-й розчин йоду в йодиді калію (концентрований розчин, тричі розбавлений водою); спиртівки, пінцети, голки, скляні палички, чашки Петрі, трафарети різних фігур, вирізані з темного світлонепроникного паперу, канцелярські скріпки або булавки; порцелянові чашки, водяна баня, електроплитка.

Хід роботи.

1. На листки рослин, витриманих у темряві протягом двох діб, наколоти фігури, вирізані з темного світлонепроникного матеріалу.

Примітка. Для створення сприятливих умов й підвищення вмісту вуглекислоти під ковпаком можна поставити чашку з водою, а також подрібненим мармуром або вапном, які змочують 10 %-м розчином HCl або слабким розчином H_2SO_4 . Для підвищення вологості повітря під ковпаком ставлять 1÷2 чашки Петрі з водою (рис. 3.12).

2. Рослини виставити на яскраве сонце або освітлювати 1÷2 год. потужними лампами.

Примітка. Залежно від інтенсивності світла дослід може тривати від 40 хв. до 24 год.

3. По закінченні експозиції листки зрізати, фігурки з них зняти.

4. Зрізані листки помістити у колбу, залити водою та прокип'ятити впродовж 3÷5 хв. на водяній бані.

5. Воду злити, додати у колбу спирт й прокип'ятити знову до повного екстрагування хлорофілу.

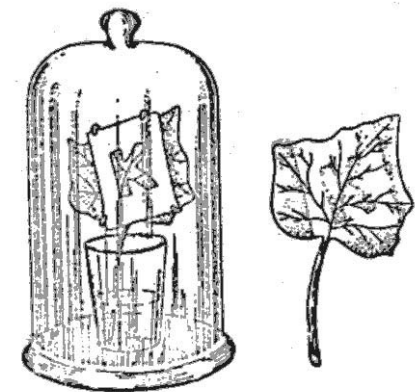


Рис. 3.12. Дослід з одержання фігур Ю. Сакса (крохмальних фігур)

Примітка. Після видалення останнього листок стає білим.

6. Знебарвлені листки перенести пінцетом у чашки Петрі з водою для охолодження.

7. За 10 хв. воду злити і розправлені на чашці листки обробити розчином йоду.

Примітка. Спостерігають, що там, де були фігури, залишилися світлі місця, а навколо них – темний фон унаслідок кольорової реакції синтезованого в процесі фотосинтезу крохмалю. Як відомо, крохмаль з йодом дає синє забарвлення.

Студенти підгруп можуть проводити цей дослід з рослинами, використовуючи як цілі рослини, так і зрізані з них листки. Влітку цей дослід можна проводити з рослинами з відкритого ґрунту.

Контрольні запитання та завдання

1. Чи можна одержати на листку крохмалеву фотографію з негатива?

2. Які процеси відбуваються в листках, коли рослини перед дослідом витримують у темряві?

3. Чому під час фотосинтезу в листках відкладається первинний крохмаль? Яке це має значення для процесів життєдіяльності рослин?

4. Назвіть цикл, в якому відбувається відновлення CO_2 до моносахаридів.

5. чого синтезується глюкоза, потрібна для синтезу крохмалю?

6. На листках яких рослин крохмалеві фігури формуються краще?

7. Чи можна здійснити пробу Сакса на листках цукрового буряку?

Робота 52. ВИДІЛЕННЯ КИСНЮ В ПРОЦЕСІ ФОТОСИНТЕЗУ

Демонстраційний дослід

Під час асиміляції вуглекислого газу зеленими рослинами в процесі фотосинтезу виділяється кисень, який можна виявити простими методами.

Мета роботи. Продемонструвати виділення кисню зеленими рослинами під час фотосинтезу. Показати залежність його від спектрального складу світла

Матеріали, реактиви, обладнання. Гілочки елодеї або інших рослин; 0,01 %-й розчин індигокарміну, 10 %-й розчин дитіоніту натрію, слабкий розчин пірогалолу, концентрований розчин гідроксиду калію; склянки, лійки, пробірки, сірники, лампа (200÷300 Вт), круглодонні колби місткістю 300÷500 мл.

Хід роботи.

Завдання 1.

1. Велику колбу заповнити 0,01 %-м синім розчином індигокарміну, до якого, безперервно перемішуючи, доливати 10 %-й розчин дитіоніту натрію до появи жовтого забарвлення.

2. В розчин занурити гілочку елодеї, колбу герметично закрити (щоб усунути попадання в неї повітря) виставити під лампу.

Примітка. Спостерігають, як внаслідок виділеного під час фотосинтезу кисню за кілька хвилин навколо зелених частин рослини з'являється блакитна зона.

Завдання 2.

1. Підрізані під водою гілочки елодеї однакового розміру або іншої водяної рослини розмістити на дні трьох склянок, пофарбованих ззовні нітролаками – червоним, зеленим і синім.

Примітка. Можна також обгорнути склянки відповідно забарвленими целофановими плівками. Склянки заповнюють водою, збагаченою вуглекислим газом.

2. Накрити рослини скляними лійками.

Примітка. Стежать, щоб зрізані кінчики їх були спрямовані до вузької частини лійок.

3. Заповнені водою пробірки закрити великим пальцем руки так, щоб туди не потрапили пухирці повітря, потім повернути їх отвором униз і обережно одягнути на трубки лійок, які розміщені нижче рівня води в склянках (рис. 3.13).

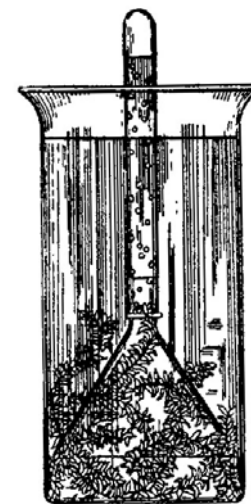


Рис. 3.13. Виділення кисню гілочками елодеї при фотосинтезі

4. Склянки експонувати на світлі. Відмітити швидкість заповнення пробірок газом залежно від спектрального складу світла.

5. Заповнену газом пробірку обережно зняти з трубки лійки, попередньо закривши отвір пальцем.

6. У пробірку внести тліючу скалку, яка спалахує за наявності в ній кисню.

Завдання 3.

1. У дві колби налити 1 %-й розчин бікарбонату калію, виготовленого на прокіп'яченій воді (без CO_2).

2. Помістити в колби однакові за розміром гілочки елодеї.

3. Одну колбу (контрольну) обгорнути темним папером, а іншу (дослідну) – виставити на яскраве світло.

4. За 1 год. у колби внести по 1 мл розчину КОН і пірогалолу.

Примітка. Внаслідок окиснення пірогалолу виділенням під час фотосинтезу киснем розчин набуває коричневого забарвлення. У контрольній колбі розчин залишається безбарвним.

Контрольні запитання та завдання

1. У чому проявляється залежність фотосинтезу від інтенсивності світла?

2. Який вигляд має крива залежності фотосинтезу від світла за графічного відображення?

3. У чому полягають особливості світлолюбних і тіневитривалих рослин?

4. Назвіть методи визначення інтенсивності фотосинтезу. Наведіть їх приклади.

5. Чому в умовах земної кулі переважна більшість рослин має зелений колір?

6. В якій частині спектра фотосинтез інтенсивніший і чому?

7. Як можна одержати світло певного спектрального складу?

8. Яке походження кисню, що виділяється під час фотосинтезу?

9. Що розуміють під терміном «фотовицвітання»?

10. Чим зумовлений зелений колір у рослин – вищих, нижчих?

Контрольні запитання та завдання до розділу «Фотосинтез»

1. У чому проявляється суть фотосинтезу як окисно-відновного процесу?

2. Що таке фотосинтетично активна радіація (ФАР) та яку частку вона займає щодо повного спектра сонячного випромінювання?

3. Назвіть експериментальні докази походження кисню в процесі фотосинтезу.

4. Чим можна пояснити підвищення ефективності фотосинтезу у разі використання імпульсного освітлення?

5. Поясніть, що таке квант та яким чином частота випромінювання пов'язана з енергією кванта?

6. В яких інтервалах сприймають сонячне випромінювання око людини та рослинний організм?

7. Чому квант ультрафіолетового випромінювання має більшу енергію, ніж квант синього світла?

8. Поясніть природу поглинання світла речовиною. Що таке фотозбудження молекули, основні закони поглинання світла?

9. Яким чином у процесі поглинання квантів сонячного світла формується синглетний та триплетний електронно-збуджений стани молекули? Наскільки довготривалий цей процес?

10. Поясніть взаємозв'язок між ультраструктурною організацією хлоропластів і функцією даної органели.

11. Чим зумовлені гідрофільні та гідрофобні властивості хлорофілу та яка роль їх у формуванні пігмент-ліпопротеїдних комплексів? Чому молекула хлорофілу електрично нейтральна?

12. У чому суть явища хроматичної адаптації?

13. Від чого залежать оптичні властивості пігментів?

14. Опишіть онтогенез розвитку хлоропласта, яка функція світла на різних етапах його?

15. Схарактеризуйте геном хлоропласта. В чому полягає різниця між хлоропластною та ядерною ДНК?

16. У чому полягає суть первинної фотофізичної стадії фотосинтезу?

17. Чому поглинаючим пігментом фотосинтезу вважають хлорофіл *a*, хоча хлоропласт містить різноманітний набір пігментів?

18. Що лежить в основі певної локалізації відповідного компонента електрон-транспортного ланцюга?

19. Назвіть акцепторні та донорні компоненти реакційних центрів двох фотосистем. Поясніть, як відбувається первинний розподіл заряду в реакційному центрі.

20. Схарактеризуйте світлозбиральні пігмент-білкові комплекси тилакоїдних мембран.

21. Як відбувається фотоокиснення хлорофілу та які його функції у первинних фотохімічних реакціях?

22. Схарактеризуйте АТФ-синтетазний комплекс.

23. Який взаємозв'язок між фізико-хімічними властивостями пластохінону та його функціями? Схарактеризуйте пул пластохінонів хлоропласта.

24. Чим можна пояснити зміну рН внутрішньотилакоїдного простору та зміщення рН між тилакоїдним компартментом і строною?

25. У процесі функціонування ЕТЛ різниця енергетичного рівня між P_{680} та P_{700} реакційних центрів обох фотосистем може досягати 50 кДж. Чи вистачить цієї кількості енергії для утворення макроергічного зв'язку АТФ?

26. Чому циклічне фотофосфорилювання можна розглядати як найдавнішу форму фіксації енергії?

27. Схарактеризуйте особливості структурної організації реакцій та компонентів, які беруть участь у синтезі АТФ. Яким чином відбуваються фотоіндуковані окисно-відновні перетворення компонентів електрон-транспортного ланцюга?

28. Чому відновлювальний пентозофосфатний цикл називають первинним, автокаталітичним? Хто і яким чином відкрив даний цикл?

29. Як пояснити припинення фотосинтезу у зрізаною та поставленого у воду листка рослини за найсприятливіших зовнішніх умов?

30. Назвіть сполуки, які утворюються в світлових реакціях фотосинтезу, а потім використовуються в наступній темновій фазі. На яких етапах циклу вони потрібні?

31. Які субстрати використовуються в циклі Кальвіна, на якій стадії відбувається включення їх в реакції, що є кінцевим продуктом циклу, звідки надходить енергія та на що вона витрачається?

32. Припустимо, що в суспензії хлорели активно відбувається фотосинтез, раптово виключається світло. Які зміни вмісту 3-фосфогліцеринової кислоти та рибулозобісфосфату можна спостерігати в наступну хвилину?

33. За яких умов рибулозобісфосфаткарбоксилаза функціонує як оксигеназа? Який механізм даної реакції?

34. Що таке фотодихання, чи впливає світло на інтенсивність дихання?

35. За яким принципом визначають різні групи з C_4 -типом метаболізму?

36. Чим фотосинтез у сукулентів відрізняється від фотосинтезу мезофітів C_3 та C_4 -типів?

37. Які екологічні переваги в умовах посухи та високої температури мають рослини з C_4 -типом фотосинтезу?

38. Що таке компенсаційна точка фотосинтезу?

39. Як впливає на фотосинтез впливає підвищення рівня концентрації CO_2 в атмосфері?

40. У чому полягає значення появи ФС II?

41. Яке значення каротиноїдів у фотосинтезі?

42. Які досліді слід поставити, щоб визначити, до якого типу (C_3 або C_4) належать рослини?

43. Чи існує пряма кореляція між кількістю хлорофілу в листах та інтенсивністю фотосинтезу?

44. Яка роль піридинових дегідрогеназ у фотосинтезі?

45. Що таке фоторедукція? Назвіть основні риси бактеріального фотосинтезу.

46. Чому в процесі еволюції рослини набули зеленого забарвлення?

47. Що являє собою хромофорна група хлорофілу і фікобілінів?

48. Інтенсивність фотосинтезу вівса в середньому в два рази вища, ніж у томатів за однакових умов, а врожай томатів з 1 га нерідко буває в 50 разів більше. В чому полягають можливі причини такої невідповідності?

49. За допомогою якої реакції можна довести, що в молекулі хлорофілу міститься атом магнію? Напишіть рівняння цієї реакції.

50. Назвіть пігменти, що не беруть участь в процесі фотосинтезу.

Розділ 4.

ДИХАННЯ РОСЛИН

Дихання є одним з основних проявів обміну речовин та енергії між рослинним організмом і навколишнім середовищем. Це – сукупність фізіологічних процесів, що забезпечують надходження кисню в організм та його використання для окиснення органічних речовин (вуглеводів, жирів, білків).

На дихання рослини витрачають 20÷25 % органічної речовини, утвореної під час фотосинтезу. Синтезовані рослинним організмом фотоасиміляти належать до неспецифічних запасних речовин. Тому синтез інших сполук на їхній основі для специфічних потреб організму можливий лише після низки складних біохімічних перетворень.

Хімічна енергія фотоасимілятів, як трансформована форма сонячної енергії, міститься в структурі хімічних зв'язків запасних сполук. У процесі розриву хімічних зв'язків органічних запасних речовин під час окиснення енергія вивільняється. Рослинний організм завдяки поступовому окисненню органічних сполук використовує цю енергію невеликими порціями. Вивільнена енергія витрачається на метаболічні процеси та на утворення нових, багатих на енергію хімічних зв'язків, наприклад АТФ.

Внутрішньоклітинне дихання – це окиснювальний розпад органічних сполук за участю кисню, який зумовлює генерацію трансмембранного електрохімічного градієнта йонів водню ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) і синтез хімічно активних метаболітів, що використовуються як джерела енергії (АТФ) або відновники ($\text{НАД}\cdot\text{H}_2$). Також утворюються проміжні продукти для різноманітних біосинтетичних реакцій організму.

На перших двох етапах дихання (гліколіз, цикл трикарбонових кислот) відбувається відновлення коферментів $\text{НАД}\cdot\text{H}$ та $\text{ФАД}\cdot\text{H}$, які на третьому етапі окиснюються в дихальному електронотранспортному ланцюзі мітохондрій.

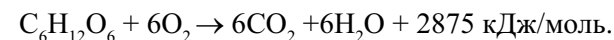
АТФ утворюється під час окиснення молекул глюкози, жирних кислот й амінокислот, що використовуються як джерело енергії. У більшості біосинтетичних реакцій продукти перебувають у більш відновленому стані, ніж їхні попередники, тому, крім АТФ, вони потребують відновлювальних еквівалентів. Донором

електронів у відновлювальних реакціях біосинтезу є $\text{НАДФ}\cdot\text{H}_2$, тоді як $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$ і $\text{ФАД}\cdot\text{H}_2$ – переносниками електронів під час окиснення молекул дихального субстрату.

Основним субстратом дихання є вуглеводи. Жири та білки використовуються під час дихання паростків рослин, які розвиваються з багатих на жири чи білки насінин. Розщепленню субстратів у процесі дихання передують гідроліз: полімерних вуглеводів – до сахаридів, жирів – до гліцерину та жирних кислот, білків – до амінокислот.

Окиснювально-відновлювальні перетворення субстратів дихання каталізують ферменти: дегідрогенази – активують водень; оксидази – активують кисень та ферменти, що виконують функцію проміжних переносників електронів (водню).

Загальне рівняння дихання, якщо вихідним субстратом є вуглеводи, таке:



Якщо вихідним субстратом для дихання є білки або жири, то енергетичний ефект буде іншим. Вважається, що під час спалювання 1 г вуглеводів у середньому виділяється 17 кДж енергії, 1 г білків – 17 кДж, а жирів – 39 кДж.

З наведеного сумарного рівняння слідує, що об'єми газів у разі окиснення вуглеводів однакові. Відношення об'ємів виділеного вуглекислого газу до поглинутого кисню називають *дихальним коефіцієнтом* (ДК). У разі окиснення вуглеводів ДК рівний одиниці.

Коефіцієнт дихання може значно відхилятися від одиниці, якщо субстратом дихання є білки або жири. Зокрема, якщо субстрат багатий на йони водню, тоді частина кисню повітря використовується на окиснення не лише вуглецю, а й надлишкового водню, що є в субстраті. Саме тому коефіцієнт дихання для жирів менший за одиницю. Чим нижча величина дихального коефіцієнта, тим більший тепловий ефект окиснення, і навпаки.

Загальним показником швидкості окиснення субстратів дихання є *інтенсивність дихання*. Різні тканини рослин різко відрізняються між собою за інтенсивністю дихання. Інтенсивність дихання є показником життєдіяльності рослин.

Функції дихання не обмежуються запасанням енергії у вигляді АТФ. Дихання має важливе значення у процесах терморегуля-

ції органів рослини, утворенні сполук вторинного метаболізму, знешкодженні шкідливих речовин.

Різноманітність типів обміну речовин у рослин різних систематичних груп, віку, фізіологічного стану та за різних умов довкілля зумовлена специфічними особливостями реакцій процесу дихання.

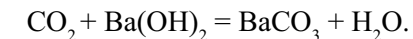
Робота 53. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ДИХАННЯ ЗА КІЛЬКІСТЮ ВИДІЛЕНОЇ ВУГЛЕКИСЛОТИ (за П. Бойсен-Йенсен)

Дихання – це складний фізіологічний процес, який є інтегральним показником метаболізму рослин. Окиснювальний апарат рослин має свої специфічні особливості. Насамперед, на відміну від тварин, для нього характерні:

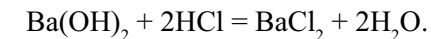
- делокалізація дихального апарата (мітохондрії, пероксисома, цитоплазма та ін.);
- поліфункціональність, тобто наявність каталізаторів, що характеризуються багатьма властивостями;
- принцип, коли в організмі є кілька ферментів, які каталізують однакові або близькі реакції.

Оскільки процес дихання супроводжується поглинанням кисню та виділенням вуглекислого газу, то інтенсивність дихання можна визначити або за кількістю поглинутого кисню, або за кількістю виділеного вуглекислого газу. Найкращим об'єктом для проведення цієї роботи є проросле насіння.

Для визначення *інтенсивності дихання* за кількістю виділеної вуглекислоти в колбу наливають певну кількість луку і закріплюють до корка наважку досліджуваного матеріалу у вузлику з марлі. Вуглекислота, яка виділяється під час дихання насіння, взаємодіятиме з лугом за рівнянням:



Надлишок бариту титрують розчином HCl до зникнення малинового забарвлення (індикатор фенолфталеїн). Реакція відбувається за рівнянням:



Тривалість досліду залежить від кількості взятого для дослідження пророслого насіння та інтенсивності дихання досліджуваного об'єкта.

Порівнюючи одержані величини в досліджуваній та контрольній колбах, визначають інтенсивність дихання, яка пропорційна кількості виділеної вуглекислоти.

Мета роботи. Оволодіти методом визначення інтенсивності дихання різних рослинних об'єктів за кількістю виділеної вуглекислоти.

Матеріали, реактиви, обладнання. Проросле насіння різних видів рослин; 0,025 н. розчин $\text{Ba}(\text{OH})_2$, 0,025 н. розчин HCl , фенолфталеїн; бюретка для титрування, конічні колби місткістю 250÷300 мл із гумовими корками, в які вставлено металеві гачки, ваги, шматочки марлі.

Хід роботи.

1. Наважку пророслого насіння (2÷3 г) помістити у марлевий мішечок.

2. Прикріпити мішечок до гачка, вмонтованого у гумовий корок (рис. 4.1).

3. У колбу налити 5 мл розчину $\text{Ba}(\text{OH})_2$ і додати 1÷2 краплі фенолфталеїну.

4. Щільно закрити колбу корком. Записати час початку досліду.

5. Паралельно взяти іншу колбу без насіння (контроль) і налити таку саму кількість бариту з фенолфталеїном.

Примітка. Періодично колби слід обережно коливати (барит не повинен торкатися мішечка з насінням), щоб порушувати плівку BaCO_3 на поверхні бариту для більш повного поглинання вуглекислоти. Впродовж досліду забарвлення бариту має бути яскраво-рожевим. Якщо ж забарвлення розчину стає блідим, а потім зникає, це свідчить про те, що увесь барит використався на зв'язування CO_2 . У цьому разі слід терміново долити з бюретки 5 мл розчину $\text{Ba}(\text{OH})_2$ у дослідну і контрольну колби.

6. За 1 год. мішечок з насінням швидко вийняти, а колбу знову закрити корком.

7. Надлишок лугу у дослідній колбі титрувати 0,025 н. розчином HCl до повного зникнення рожевого відтінку.

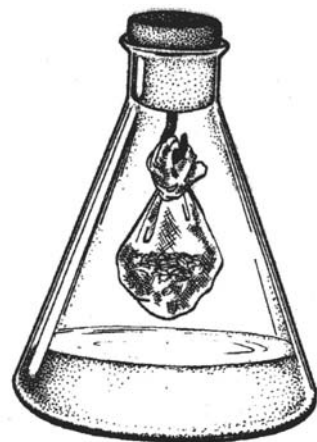


Рис. 4.1. Колба для визначення інтенсивності дихання за методом П.Бойсен-Йенсен

Примітка. Контрольну колбу можна титрувати через 30 хв. після того, як туди налили розчин бариту.

8. Результати записати у таблицю 4.1.

Таблиця 4.1. Визначення інтенсивності дихання різних рослин

Об'єкт	Наважка, г (P)	Кількість $\text{Ba}(\text{OH})_2$, мл	Час, хв			Кількість HCl , мл		Інтенсивність дихання, мг CO_2 / (г · год) (I)
			Початок	Кінець	Експозиція (t)	Контроль (a)	Дослід (b)	

9. Інтенсивність дихання обчислити за формулою:

$$I = \frac{(a - b) \cdot 0,55}{P \cdot t},$$

де a – результат титрування контрольної колби, мл; b – результат титрування дослідної колби, мл; 0,55 – кількість мг CO_2 , що еквівалентна 1 мл 0,025 н. HCl ; P – наважка, г; t – експозиція, год.

10. Після проведення розрахунків і зіставлення одержаних даних різних рослинних об'єктів зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

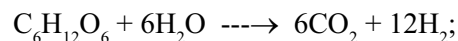
1. Як температура впливає на інтенсивність дихання?
2. Які ще фактори навколишнього середовища можуть впливати на інтенсивність дихання?
3. Які органи рослин дихають найінтенсивніше?
4. Чому зволожене насіння не може зберігатися тривалий час?
5. Про що свідчить низький або високий рівень дихання?

Робота 54. ВИЗНАЧЕННЯ ДИХАЛЬНОГО КОЕФІЦІЄНТА У РІЗНИХ РОСЛИН

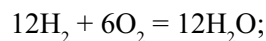
Рослини для дихання використовують вуглеводи, а також інші запасні поживні речовини (субстрати). Показником хімічної природи субстрату є дихальний коефіцієнт (ДК). *Дихальний коефіцієнт* – це відношення виділеного CO_2 до поглинутого O_2 внаслідок дихання.

Загальне рівняння дихання при використанні вуглеводів як субстрату, має такий вигляд:

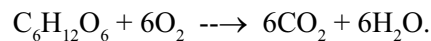
- для розщеплення субстрату



- для окиснення водню



- сумарне рівняння

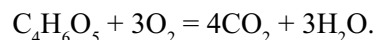
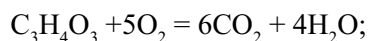


З наведеного сумарного рівняння випливає, що об'єми газів у разі окиснення вуглеводів однакові:

$$\frac{6\text{CO}_2}{6\text{O}_2} = 1.$$

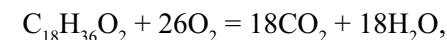
Тому *коефіцієнт дихання для вуглеводів* дорівнює одиниці.

Якщо матеріалом дихання є більш окиснені речовини, ніж вуглеводи (наприклад, $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$ – піровиноградна чи $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$ – яблучна кислоти), то коефіцієнт дихання буде більшим за одиницю, а саме - 1,20 або 1,33 відповідно:



І навпаки, якщо для повного окиснення дихального субстрату використовуються менш окиснені речовини, ніж вуглеводи (наприклад, білки, ліпіди), то потреба в кисні буде більшою, а отже, і ДК буде меншим одиниці.

Наприклад, якщо поживним субстратом є стеаринова кислота, то сумарне рівняння дихання буде



а дихальний коефіцієнт дорівнюватиме 0,69.

Зростання величини дихального коефіцієнта спостерігається завжди, коли дихання пов'язане з бродінням, бо тоді сам процес бродіння супроводжується виділенням CO_2 без поглинання кисню з повітря. Отже, чим нижчий дихальний коефіцієнт, тим більший тепловий ефект окиснення, і навпаки. Саме тому білки та жири характеризуються високим тепловим еквівалентом, а органічні кислоти – дуже низьким.

Принцип даного методу полягає у тому, що для визначення ДК досліджуваний матеріал переносять у пробірку, з'єднану з градуйованою трубкою, у яку введено краплину забарвленої рідини. Якщо об'єм O_2 , що поглинається, і об'єм CO_2 , що виділяється, буде однаковим, то краплина рідини в трубці не рухатиметься. Якщо ж величина ДК менша або більша за одиницю, то можна спостерігати різницю між об'ємами поглинутого O_2 і виділеного CO_2 .

Потім в цю саму пробірку з рослинним матеріалом вносять сильний розчин лугу, який поглинатиме CO_2 , що виділяється під час дихання. Рух краплини в цьому разі відповідатиме кількості O_2 , поглинутого рослинним матеріалом.

Мета роботи. Визначити дихальний коефіцієнт у різних видів рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Проросле насіння пшениці, соняшника та інших рослин; 20 %-й розчин КОН, вода, підфарбована метиленовим синім; пробірка з корком, в який вставлено вигнуту під прямим кутом градуйовану трубку, конічна колба місткістю 250 мл, пінцет, піпетка з відтягнутим кінцем, смужка розміром фільтрувального паперу 2÷6 см.

Хід роботи.

1. У пробірку (приблизно до половини її об'єму) насипати насіння, що наклюнулось.

2. Щільно закрити пробірку корком, в який вставлено вигнуту під прямим кутом градуйовану трубку.

3. Піпеткою з відтягнутим кінцем ввести у трубку краплину підфарбованої метиленовим синім води, створивши таким чином всередині приладу замкнений атмосферний простір.

Примітка. Прилад під час дослідів слід обов'язково тримати за постійної температури. Для цього трубку ставлять в штатив або колбу, запобігаючи їй нагріванню руками або диханням.

4. Коли краплина відірветься від краю трубки, відмітити положення внутрішнього меніску і записати час початку дослідів.

5. Після 5-хвилинної експозиції записати відстань, пройдену краплиною за 5 хв.

6. Повторити вимірювання тричі.

7. Після цього визначити середню відстань, пройдену краплиною за 5 хв. (*A*), що відповідає різниці об'ємів поглинутого кисню і виділеної вуглекислоти:

$$A = O_2 - CO_2.$$

8. Вийняти корок з пробірки, де було насіння і провітрити пробірку.

9. Вкласти пінцетом згорнуту в кільце смужку фільтрувального паперу, змоченого 20 %-м розчином луку, у верхню частину пробірки.

10. Закрити пробірку корком і знову ввести у трубку краплину підфарбованої води.

11. Відмітити положення меніска краплини і визначити рух краплини за два 5-хвилинних інтервали.

12. Вирахувати їхню середню величину (*B*), що відповідає об'єму поглинутого під час дихання кисню.

13. Якщо позначити об'єм поглинутого кисню через O_2 , а виділеної вуглекислоти – через CO_2 , то, знаючи величини *A* і *B*, легко знайти ДК:

$$\begin{aligned} A &= O_2 - CO_2 \\ B &= O_2 \\ CO_2 &= B - A, \end{aligned}$$

звідси:

$$ДК = \frac{CO_2}{O_2} = \frac{B - A}{B}.$$

14. Результати записати у таблицю 4.2.

Таблиця 4.2. Визначення дихального коефіцієнту у різних видів рослин

Варіант дослідів	Відстань, пройдена краплиною за 5 хв., мм				Дихальний коефіцієнт $\frac{CO_2}{O_2}$
	1	2	3	Середня	
Без луку (<i>A</i>)					
З лугом (<i>B</i>)					

15. Зробити висновки про залежність величин дихального коефіцієнта від виду окиснювальних речовин.

Контрольні запитання та завдання

1. Який зв'язок між величиною дихального коефіцієнта й енергетичною ефективністю дихання?

2. Як пояснити різну величину дихального коефіцієнта проростаючого насіння крохмальних та олійних рослин?

3. Чому вищі рослини не можуть тривалий час підтримувати своє життя в анаеробних умовах, хоча й не гинуть відразу за дефіциту O_2 ?

4. Як різняться між собою величини дихальних коефіцієнтів вищих та нижчих рослин?

5. Яке фізіологічне значення дихання у рослинних організмах?

6. Як змінюється інтенсивність дихання рослин в несприятливих умовах?

Робота 55. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ДИХАННЯ ТА ДИХАЛЬНОГО КОЕФІЦІЄНТА ЗА ДОПОМОГОЮ РЕСПІРАТОРНОГО ПРИЛАДУ І.М. ТОЛМАЧОВА

Інтенсивність дихання – це кількість поглинутого кисню або виділеної вуглекислоти одиницею біомаси за одиницю часу.

Респіраторний прилад І.М.Толмачова (рис. 4.2) складається з двох частин: камери для біооб'єкта та газової піпетки. В камеру вводять об'єкт дослідження, приливають титрований розчин Ва(ОН)₂, який поглинати вуглекислий газ, що виділяється.

Газова піпетка складається з двох скляних трубочок: широкої зовнішньої та вузької внутрішньої, верхні кінці якої спаяні між собою. Всередині широкої трубки проходить третя, середня трубка. У нижню частину широкої трубки вставляють корок з патрубком для зливання води. Нижню частину вузької трубки залишають відкритою. За таких умов залита у піпетку вода має два меніски: один більший, що межує з повітрям приладу, інший – менший, зв'язаний з атмосферою.

Водні меніски знаходитимуться на одному рівні, якщо тиск газів у приладі дорівнюватиме атмосферному. У разі зниження тиску в результаті дихання досліджуваного об'єкта рівні менісків змінюватимуться: менший (межує з атмосферою) – знижуватиметься, а периферійний (межує з повітрям приладу) – підвищуватиметься. Доливання води в кисневу піпетку з бюретки до вирівнювання менісків відповідатиме кількості кисню в 1 мл, поглинутого об'єктом у процесі дихання. Кількість поглинутого кисню слід вимірювати кілька разів залежно від інтенсивності дихання досліджуваного об'єкта. Одержані дані слід додавати.

Мета роботи. Ознайомитися з респіраторним методом визначення інтенсивності дихання та дихального коефіцієнта у різних видів рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Об'єкти дослідження (листки, проросле насіння різних видів рослин); 0,25 н. розчин

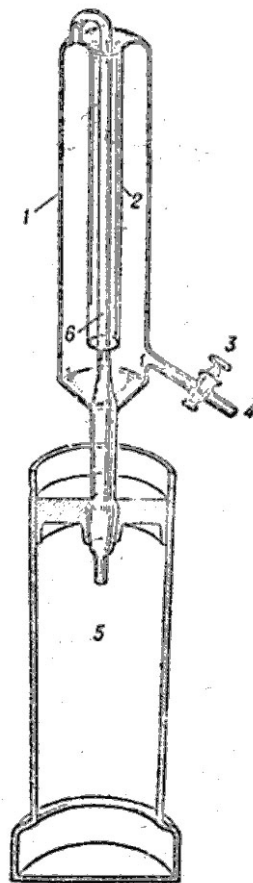


Рис. 4.2. Прилад І.М.Толмачова для визначення інтенсивності дихання рослин та дихального коефіцієнта:
А – скляна камера;
В – резервуар для кисню;
Н, Т, Ф – трубки;
С – кран

$\text{Ba}(\text{OH})_2$, 0,025 н. розчин щавлевої кислоти, фенолфталеїн; бюретка, прилад Толмачова.

Хід роботи.

1. Наважку пророслого насіння чи листків рослин (30÷40 г) у мішечку підвісити на гачку вузької трубки і опустити у банку, в яку налити 100 мл $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

2. Вирівняти меніски і відзначити час початку досліду, температуру та атмосферний тиск в лабораторії.

Примітка. Оскільки робота приладу пов'язана з урахуванням об'єму газу, який змінюється не лише внаслідок поглинання кисню об'єктом, що досліджують, а й залежно від температури та атмосферного тиску, паралельно ставлять контрольний прилад (без досліджуваних об'єктів). Впродовж тривалої експозиції (1÷2 год.) досліду прилад слід обережно погойдувати, руйнуючи плівку BaCO_3 на поверхні розчину, що заважає повному поглинанню вуглекислоти.

3. Перед закінченням досліду меніски потрібно вирівняти і записати кількість приливої води в дослідних і контрольних приладах.

Примітка. Якщо з контрольного приладу потрібно злити певну кількість води, то цей об'єм теж слід врахувати.

Якщо воду приливають як в дослідний, так у в контрольний прилади, то кількість поглинутого кисню дорівнюватиме різниці кількості води, приливої в дослідний та контрольний прилади.

Якщо виникне потреба злити воду як з дослідного, так і з контрольного приладів, то кількість поглинутого об'єктом кисню дорівнюватиме різниці кількості води, зливої з контрольного та дослідного приладів.

4. Після закінчення досліду барит (20 мл) титрують щавлевою кислотою в присутності фенолфталеїну до слабо-рожевого забарвлення.

5. Звести до нормальних умов кількість поглинутого біооб'єктом кисню. Для цього використовують рівняння:

$$V_0 = \frac{V_T}{1 + \alpha \cdot T} \cdot \frac{H}{760},$$

де V_0 – об'єм поглинутого кисню, приведеного до 0 °С і тиску 101,08 кПа; V_T – об'єм кисню, поглинутого за даної температури досліду; $1 + \alpha \cdot T$ – знаходимо за таблицею для даної температури

дослід; α – розширення об'єму газу за підвищення температури на 1 °C (1/273 об'єму газу); T – температура під час дослід, °C; H – атмосферний тиск під час проведення дослід, мм рт. ст.

6. Обчислити інтенсивність дихання за киснем O_2 , мл:

$$O_2 = \frac{V_0 \cdot 100 \cdot 60}{P \cdot t},$$

де O_2 – інтенсивність дихання за киснем, мл; V_0 – об'єм поглинутого кисню, приведенного до 0°C; 60 – перерахунок на годину; 100 – перерахунок на 100 г; P – наважка, г; t – час дослід, хв.

7. Обчислити інтенсивність дихання за вуглекислим газом CO_2 , мг:

$$CO_2 = \frac{(a - b) \cdot 1 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 60}{P \cdot t},$$

де CO_2 – інтенсивність дихання за вуглекислим газом, мг; a – кількість щавлевої кислоти, витраченої на титрування 20 мл $Ba(OH)_2$ у контрольній колбі; b – кількість щавлевої кислоти, витраченої на титрування 20 мл $Ba(OH)_2$ у дослідній колбі; 1 – коефіцієнт перерахунку (1 мл 0,25 н. $C_2H_2O_4$ еквівалентний 1 мг CO_2); 5 – коефіцієнт перерахунку якщо у камеру долито 100 мл $Ba(OH)_2$, а для титрування взято 20 мл; 60 – перерахунок на годину; 100 – перерахунок на 100 г; P – наважка, г; t – час дослід, хв.

8. Дихальний коефіцієнт обчислити за формулою:

$$ДК = \frac{V_{CO_2}}{V_{O_2}}.$$

Примітка. Для визначення кількості CO_2 в міліметрах, слід кількість міліграм CO_2 поділити на 1,9769, виходячи з того, що 1 мл CO_2 важить 1,9769 мг.

9. Після проведення розрахунків зробити відповідні висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке інтенсивність дихання?
2. Назвіть основні фактори, що впливають на інтенсивність дихання.

3. Від яких факторів залежить значення дихального коефіцієнта?

4. Які переваги методу І.М.Толмачова перед іншими методами?

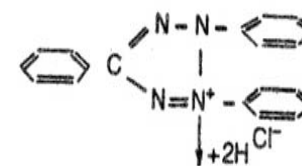
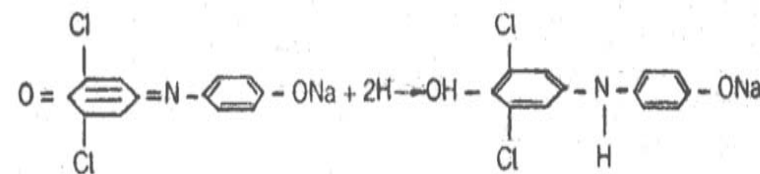
5. Для яких рослин з метою контролю дихання найчастіше використовують метод І.М.Толмачова?

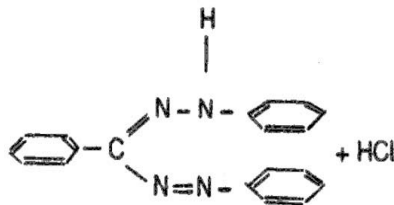
6. Чому інтенсивність дихання у більшості випадків вимірюють не для листків, а для коренеплідів (картоплі, буряка, моркви та ін.)?

7. Які існують зв'язки між інтенсивністю дихання та якістю рослинної продукції?

Робота 56. ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ ДЕГІДРОГЕНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ (за Т. Тунбергом)

Дегідрогенази клітини окиснюють різні субстрати шляхом відщеплення водню та передачі його на коферменти дегідрогеназ (піридинові або флавінові). Активність дегідрогеназ у рослинних тканинах оцінюють шляхом визначення швидкості відновлення штучних редокс-агентів, загальною властивістю яких є здатність приймати електрони від відновлених коферментів дегідрогеназ. В якості таких агентів можуть бути використані, наприклад, 2,6-дихлорфеноліндофенол, тетразолій блакитний, які змінюють колір під час відновлення. Швидкість відновлення барвників можна оцінити візуально або спектрофотометрично. Реакція відновлення 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію та наступного відновлення тетразолію хлористого відбувається за рівняннями:





Мета роботи. Ознайомитись із визначенням дегідрогеназної активності за методом Т.Тунберга.

Матеріали, реактиви, обладнання. Проросле насіння гороху; 50 мМ розчин K_2HPO_4 , $5 \cdot 10^{-4}$ М розчин 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію; ваги, різноважки, порцелянова ступка з товчачиком, трубка Тунберга, піпетки місткістю 2 та 5 мл, вазелін, вакуумна помпа, термостатна водяна баня на 37 °С; секундомір.

Хід роботи.

Примітка. Проросле насіння гороху (корінець не повинен перевищувати 0,5 см) очистити від оболонки і відокремити зародок від сім'ядолей.

1. Окрему наважку зародків (100÷200 мг) і сім'ядолей (300÷500 мг) розтерти у ступці з 1 мл розчину K_2HPO_4 .

2. Розтерту масу перенести у трубку Тунберга.

3. Пробу кількісно перенести у трубку, двічі ополіскуючи ступку, кожного разу приливаючи по 1 мл розчину K_2HPO_4 . Кінцевий об'єм гомогенату довести до 3 мл.

4. У розширену частину корка трубки Тунберга внести 1 мл розчину 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію концентрацією $5 \cdot 10^{-4}$ М.

5. Змастити шліф вакуумним мастилом, вставити у пробірку і добре притерти шліфи, повертаючи корок з невеликою амплітудою. Пришліфовані поверхні мають бути прозорими.

6. Сумістити отвір пробірки та кришки і за допомогою вакуумної помпи викачати повітря протягом 2÷3 хв.

7. Не відключаючи помпу, поворотом корка закрити пробірку.

8. Підготовлені таким чином пробірки помістити на водяну баню за температури 37°С.

9. Після 15-хвилинної експозиції фарбу із головки корка прилити до вмісту пробірки, акуратно струшуючи її для перемішування реакційної суміші. Відзначити час початку експерименту.

10. Пробірку залишити у термостатній бані та періодично струшувати, слідкуючи за знебарвленням реакційної суміші.

11. Відзначити час від моменту введення фарби до повного знебарвлення суміші, що відображає активність дегідрогеназ у пробі.

12. Загальну активність дегідрогеназ обчислити за формулою:

$$A = \frac{100}{P \cdot t},$$

де A – відносна активність (на 1 г маси сирової речовини за 1 хв.); t – час знебарвлення, хв.; P – наважка, г.

Примітка. Порівняльне визначення можна провести і так: 1÷2 г рослинної тканини розтирають у 5 мл розчину K_2HPO_4 і переносять у пробірку. Після термостатування доливають 1,0÷1,5 мл розчину фарби і розмішують. Для того, щоб кисень не впливав на результати дослідження, поверхню рідини в пробірці заливають вазеліном або рідкою олією. Про активність дегідрогеназ роблять висновок за швидкістю знебарвлення фарби.

13. Результати записати в таблицю 4.3, відмічаючи різницю в активності дегідрогеназ зародків і сім'ядолей.

Таблиця 4.3. Визначення дегідрогеназної активності у насінні за допомогою трубки Тунберга.

Варіант дослід	Наважка, г	Час знебарвлення, хв	Загальна активність дегідрогеназ, на г маси сирової речовини за хв

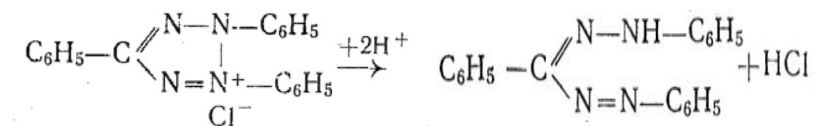
Контрольні запитання та завдання

1. Який механізм дії анаеробних і аеробних дегідрогеназ?
2. Як побудовані трубки Тунберга?
3. Яким основним вимогам вони повинні відповідати?
4. Де частіше всього застосовують трубки Тунберга?

5. Назвіть одиниці, в яких одержують інформацію під час користування трубками Тунберга.

Робота 57. МІКРОМЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ДЕГІДРОГЕНАЗ ЗА ДОПОМОГОЮ ВАКУУМ-ІНФІЛЬТРАЦІЇ (за В.В. Пильневим)

В основу метода покладено властивість дегідрогеназ відновлювати безбарвні солі тетразолію з утворенням забарвленого формазану. Безбарвний 2,3,5-трифенілтетразолій приєднує водень і відновлюється до формазану червоного кольору. Реакція відбувається за рівнянням:



сіль тетразолію

формазан

Формазан не розчиняється у воді, але добре розчиняється в ацетоні або ізопропіловому спирті. Мікрометодом можна визначити активність ферментів безпосередньо в живих рослинних тканинах. Він дає можливість виявити активність дегідрогеназ як у безбарвних, так і у забарвлених пігментами тканинах. Під час роботи треба відбирати однорідний матеріал і розрізати великі об'єкти на смужки завтовшки 1,5÷2 мм.

Мета роботи. Ознайомитись з мікрометодом визначення дегідрогеназної активності в різних тканинах одного й того самого рослинного об'єкта.

Матеріали, реактиви, обладнання. Проростки злаків, бульби картоплі, корінці пророслого насіння бобових; 1/15 М буферна суміш Серенсена III з рН 7,17 (для її виготовлення в 100 мл дистильованої води розчиняють 0,831 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ та 0,272 г KH_2PO_4), 2,3,5-трифенілтетразолій хлористий, 0,25÷0,5 %-й розчин, виготовлений на буферній суміші Серенсена III, ацетон

або ізопропіловий спирт; бюкси, мірні циліндри місткістю 10 мл, леза, порцелянові ступки, ваги торсійні або аналітичні, скляні корки, вакуум-ексикатор, насос Комовського, термостат, центрифуга, фотоелектроколориметр.

Хід роботи.

1. Три наважки (30÷100 мг) попередньо розрізаного на смужки рослинного матеріалу помістити в маленькі бюкси.

2. Дві наважки залити 10 мл розчину трифенілтетразолію, виготовленого на буферній суміші.

3. Третю (контрольну) занурити у 10 мл чистої буферної суміші.

4. Дослідний матеріал зверху обов'язково накрити, наприклад, скляним корком.

5. Бюкси помістити у вакуум-ексикатор, з якого попередньо викачати повітря.

6. Після припинення виділення пухирців протягом 1÷2 хв. знову запустити повітря, під тиском якого розчин почне проникати в тканини.

7. Бюкси закрити кришками та перенести на 30 хв. в термостат, температура якого +37 °С, де тканини набудуть червоного забарвлення, інтенсивність якого залежатиме від активності дегідрогеназ.

8. Потім кожну пробу вийняти з бюкса та розтерти у ступці з невеликою кількістю ацетону або ізопропілового спирту.

9. Уміст ступки перенести у мірний циліндр і довести об'єм до 5÷10 мл, залежно від інтенсивності забарвлення.

Примітка. Залишки подрібненої тканини мають повністю знебарвитися.

10. Після розтирання всі проби потрібно центрифугувати упродовж 10 хв. за 3000 об./хв.

11. Одержаний забарвлений формазаном екстракт слід одразу фотоколориметрувати за довжини хвилі 460 нм.

Примітка. Якщо контрольна витяжка зеленого кольору, то для зняття кольору хлорофілу фотоколориметрують за довжини хвилі 520 нм.

12. Активність дегідрогеназ розрахувати за різницею оптичної густини за показниками ФЕКу для дослідних і контрольних проб.

Примітка. Цю різницю, виражену в цілих числах, називають

«індексом активності» дегідрогеназ (її можна виражати в міліграмах формазану, якщо ввести розрахунки за калібрувальним графіком).

13. Результати досліду записати у таблицю 4.4.

Таблиця 4.4. Визначення «індексу активності» дегідрогеназ у рослинному матеріалі

Об'єкт	Наважка тканини, мг	Оптична густина		«Індекс активності» дегідрогеназ
		контроль	дослід	

14. Зробити висновки про активність дегідрогеназ у рослинних тканинах та об'єктах.

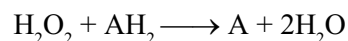
Контрольні запитання та завдання

1. Чому солі тетразолію є майже незамінними для визначення дегідрогеназної активності?
2. Які тканини рослини можуть характеризуватися високою дегідрогеназною активністю?
3. Чи можуть цитохроми бути акцепторами протона?
4. Назвіть механізм дії анаеробних та аеробних дегідрогеназ.
5. Де на практиці найчастіше використовують метод з трубками Тунберга?

Робота 58. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПЕРОКСИДАЗИ

Оксидази – це група аеробних ферментів здатних передавати електрони від окиснювального субстрату лише на кисень. Функцію кофермента в оксидаз виконують атоми металу (Fe, Mo, Cu).

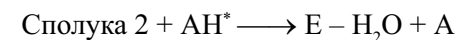
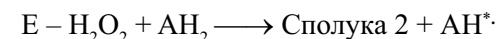
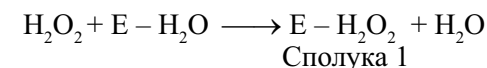
Пероксидази – це ферменти, які каталізують окиснення субстрату за допомогою пероксиду водню. Загальний вид реакції відповідає рівнянню:



де А і AH_2 – відповідно окиснений та відновлений субстрати.

Субстратами пероксидаз є поліфеноли або ароматичні сполуки, органічні гідропероксида з невеликими аліфатичними замісниками, НАД·Н (НАДФ·Н), нафтогідрокінон, індолілоцтова кислота тощо.

Пероксидази – залізовмісні ферменти, простетичною групою яких є гем– ферипротопорфірин IX. Субстрати окиснюються за одноелектронним механізмом. Перша стадія каталітичного процесу включає утворення комплексу між залізом ферменту та пероксидом водню. Таким чином, субстрат окиснюється пероксидом водню, активованим ферментом ($\text{E-H}_2\text{O}$):



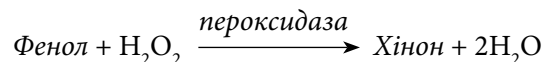
де сполука 1 – окиснена форма ферменту, залізо якого зв'язується з пероксидом (валентний стан атома заліза вищий, ніж Fe^{3+}); сполука 2 – продукт сполуки 1, що зазнав одноелектронного відновлення за рахунок субстрату AH_2 ; AH_2 – субстрат реакції; AH^* – вільнорадикальна форма окисненого субстрату; А – продукт повного окиснення субстрату.

Таким чином, пероксидаза утворює з пероксидом водню комплексну сполуку, внаслідок чого пероксид активується та набуває властивості акцептора водню.

У рослинних тканинах пероксидази широко розповсюджені, багато їх міститься в пероксисомах, знайдені вони також у клітинній стінці. Відомо більше 20 ізоформ пероксидази з різною каталітичною активністю. Доведено зміни ізоферментного складу пероксидаз та їхньої активності в онтогенезі рослин, патогенезі, в умовах стресу тощо. Активність пероксидаз та каталази перешкоджає накопиченню пероксиду водню в клітинах. Використовуючи для окиснення пероксид водню пероксидази можуть нейтралізувати продукти вторинного обміну (феноли), регулювати гормональний статус рослин завдяки окисненню індолілоцтової кислоти, забезпечують утворення

етилену, беруть участь в процесах синтезу лігніну в клітинній стінці.

Запропонований метод визначення активності пероксидази базується на утворенні забарвлених продуктів під час окиснення бензидину, гваяколу, гідрокінону, катехолу та інших фенолів. Загальна схема реакції така:



У даній роботі використовується найчутливіший та швидкий *гваяколовий метод*. За дії пероксидаз у присутності пероксиду водню гваякол окиснюється до тетрагваякохінону, що зумовлює розвиток червоно-коричневого забарвлення в реакційному середовищі та дає змогу провести фотокolorиметричне визначення швидкості реакції.

Мета роботи. Визначити активність пероксидази в різних органах рослин, а також активність ферменту з віком рослини.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки або корені проростків гороху різного віку; 1/15 М фосфатний буфер (рН 6,5÷6,7), 0,1 % -й розчин H_2O_2 , розчин гваяколу (0,183 г у 50 мл води); порцелянові ступки з товчачиками, мірні колби місткістю 50 мл, скляні стакани місткістю 100 мл, середні скляні лійки, піпетки на 2 та 5 мл, автоматичні піпетки, паперові фільтри, ФЕК, кювети до ФЕКу завтовшки 2 см.

Хід роботи.

1. Наважку рослинного матеріалу (50÷100 мг) розтерти у ступці з невеликою кількістю (10÷15 мл) фосфатного буфера.
2. Розтерту масу кількісно перенести в мірну колбу місткістю 50 мл, довести пробу буфером точно до мітки.
3. Добре перемішати та залишити на 10÷15 хв.
4. Розчин профільтрувати крізь подвійний паперовий фільтр або відцентрифугувати 10 хв за 3000 об./хв.
5. Фільтрат (або надосадову рідину) використати для визначення активності ферменту.
6. Активність ферменту виміряти на ФЕКу ($\lambda = 440\text{nm}$).

Примітка. Активність ферменту визначають за часом розвитку забарвлення до певного значення оптичної густини (зна-

чення D вибирають залежно від швидкості розвитку забарвлення в межах 0,25÷0,4).

7. Для аналізу кожної біологічної проби використовують три однакові кювети ФЕКу: одна – контрольна, дві – дослідні (дві аналітичні повторності з однієї біологічної проби). У всі кювети внести: 2 мл витяжки та 2 мл буферного розчину.

8. У контрольну кювету прилити 2 мл води та встановити її в дальнє кюветне відділення.

9. Закрити кюветну камеру і встановити нуль на шкалі оптичної густини за контрольним зразком.

10. Одну з дослідних кювет поставити у ближнє кюветне відділення й автоматичною піпеткою внести 2 мл розчину H_2O_2 одночасно ввімкнувши секундомір.

11. Пробу добре перемішують скляною паличкою.

12. Закрити кюветну камеру та за шкалою оптичної густини слідкувати за розвитком забарвлення.

13. Відзначити за секундоміром час досягнення необхідної оптичної густини.

14. Аналогічні вимірювання провести для двох дослідних кювет.

15. Активність ферменту розрахувати за формулою:

$$A = \frac{D \cdot \alpha \cdot \beta \cdot \gamma}{t \cdot d},$$

де A – активність фермента виражена у відносних одиницях на 1 г маси сирової речовини за 1 с; D – зареєстрована в досліді оптична густина; t – час, с; d – товщина шару рідини (товщина кювети), см; α , β , γ – фактори розведення: α – відносна кількість рідини, взята для виготовлення витяжки, мл, до маси наважки, г; β – ступінь додаткового розведення витяжки після центрифугування (якщо це було необхідно); γ – ступінь постійного розведення витяжки в кюветі (за даних умов дорівнює чотирьом).

16. Результати досліді записати у таблицю 4.5.

Таблиця 4.5. Визначення активності пероксидази різних рослинних тканин

Варіант досліді	Оптична густина, ум.од.	Активність пероксидази, ум.од./ (г·с)

17. Зробити висновки про активність пероксидази у різних тканинах та органах рослинних об'єктів.

Контрольні запитання та завдання

1. Як часто у рослин зустрічається фермент пероксидаза?
2. Чи має він відношення до пероксидного окиснення ліпідів?
4. Чому чорніє на повітрі очищена картопля?
5. Чому буріє на повітрі розрізане яблуко?
6. Назвіть залізовмісні ферменти, що функціонують в процесі дихання.

Робота 59. ВИЯВЛЕННЯ ПЕРОКСИДАЗНОЇ АКТИВНОСТІ В КАРТОПЛЯНОМУ СОКУ

Визначення пероксидази в даній роботі базується на зміні забарвлення



Мета роботи. Дослідити реакцію окиснення поліфенолів у хінони та зробити висновки щодо наявності пероксидази в картопляному соку.

Матеріали, реактиви, обладнання. Бульби картоплі; 1 %-й розчин гідрохінону, 3 %-й розчин пероксиду водню; скальпель, терка, марля, лійка, конічна колба місткістю 50 мл, штатив із пробірками, піпетки на 1 та 10 мл.

Хід роботи.

1. Натерти на терці невелику кількість очищеної бульби картоплі.

2. Віджати крізь марлю сік та зібрати його в колбу.
3. В чотири пробірки внести по 5 мл 1 %-го розчину гідрохінону.
4. У першу пробірку додати 1 мл 3 %-го розчину пероксиду водню та 1 мл картопляного соку.
5. У другу – 1 мл 3 %-го розчину пероксиду водню.
6. У третю – 1 мл картопляного соку.
7. У четверту додати 1 мл картопляного соку, попередньо прокип'яченого протягом хвилини та 1 мл H_2O_2 .
8. Спостерігати за зміною забарвлення розчинів у пробірках і занотувати результати в таблицю 4.6.

Таблиця 4.6. Визначення пероксидазної активності в картопляному соку

Варіант досліду	Склад суміші в пробірці			Забарвлення розчину в пробірках
	картопляний сік	H_2O_2	гідрохінон	
1	+	+	+	
2	–	+	+	
3	+	–	+	
4	+	–	+	

Примітка. Окиснений гідрохінон перетворюється в хінон, який спричинює побуріння розчину. Деяке побуріння картопляного соку без додавання гідрохінону та пероксиду водню пояснюється дією поліфенолоксидази, яка окиснює поліфеноли картоплі з участю молекулярного кисню.

9. Провести експеримент на інших рослинах (наприклад, сукулентах, плодах або листках деревних рослин) і порівняти між собою результати.

10. Зробити висновки про активність пероксидази у різних рослинних об'єктах.

Примітка. Якщо досліди проводяться навесні, то можна використовувати проростки картоплі.

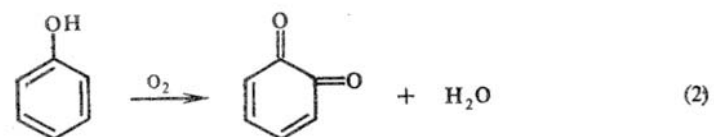
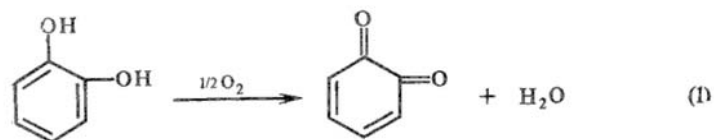
Контрольні запитання та завдання

1. За рахунок яких механізмів у масивні органи (наприклад, бульби, коренеплоди) надходить кисень з повітря?

2. З якими сполуками рослинного організму реагує кисень?
3. Як можна виділити фермент пероксидазу з рослинної тканини та що для цього потрібно?
4. Як реагує рослинна пероксидаза із пероксидом водню?
5. Чи беруть участь рослинні пероксидази в процесах бродіння?
6. Поясніть бактерицидний ефект пероксиду водню.

Робота 60. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПОЛІФЕНОЛОКСИДАЗИ В РОСЛИННИХ ТКАНИНАХ (за О.М. Бояркіним)

Поліфенолоксидаза (ПФО) відома також як *катехолоксидаза*, *фенолоксидаза* або *о*-дифенол: кисень оксидоредуктаза (КФ 1.10.3.1) каталізує окиснення *о*-дифенолів до *о*-дихінонів (дифенолоксидазна або катехолазна активність – рівняння 1), а також *о*-гідроксилювання монофенолів (монофенолгідролазна або креозолазна активність – рівняння 2)



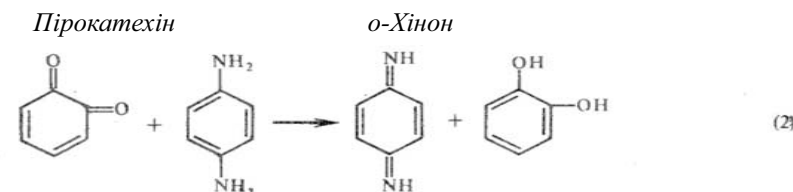
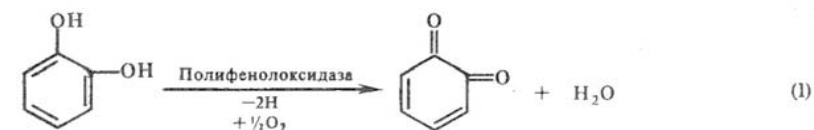
Тільки катехолоксидаза може здійснювати *о*-гідроксилювання фенолів. За нормальних умов дифенолоксидазна активність значно перевищує монофенолгідролазну активність. Гідроксилювання й окиснення – дві головні реакції синтезу та розпаду фенолів рослин.

Поліфенолоксидаза – мідьмісний фермент, субстратами якого можуть бути катехол, хлорогенова, галлова кислоти, пірокатехін та інші *о*-дифеноли. ПФО здійснює окиснення субстратів за

одноелектронним механізмом. Це спряжено з утворенням вільних радикалів, а також, можливо, з виникненням активних форм кисню. Оптимум активності знаходиться в межах pH 5,0÷7,0. Характерною особливістю ферменту є низька спорідненість до кисню, саме тому для виявлення його максимальної активності необхідна висока аерація субстратів.

Активність ПФО може бути визначена за зміною швидкості окиснення фенолів (в ультрафіолетовій ділянці спектра) або за утворенням забарвлених продуктів. Оскільки механізм реакції складний і пов'язаний з утворенням низки полімерних продуктів, визначення активності ферменту за швидкістю розвитку забарвлення в реакційній суміші можливе лише на досить короткому початковому етапі реакції.

Найзручніше визначати активність ПФО за розвитком забарвлення в окисно-відновних реакціях, спряжених з окисненням фенолів. Для цього використовують систему пірокатехін-*p*-фенілендіамін або пірокатехін-діетил-*p*-фенілендіамін.



о-Хінон *p*-Фенілендіамін Забарвлений Пірокатехін продукт

Мета роботи. Визначити активність поліфенолоксидази в різних частинах рослини та зміни її активності залежно від віку органів рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки або корені проростків гороху різного віку, двотижневі проростки квасолі, сояшника, бульби картоплі; 1/15 М фосфатний буфер, pH 7,0÷7,4;

1 %-й розчин пірокатехіну (свіжоприготовлений), 0,02 %-й розчин диметил-*p*-фенілендіаміну у воді (свіжоприготовлений); порцелянові ступки з товчачиками, мірні колби місткістю 25 мл, хімічні склянки місткістю 50 і 10 мл, скляні лійки, піпетки на 2 і 5 мл, автоматичні піпетки, скляні палички, паперові фільтри, торсійні або аналітичні ваги, різноважки, центрифуга, центрифужні пробірки, центрифужні ваги, секундомір, ФЕКу, кювети до ФЕКу завтовшки 2 см.

Хід роботи.

1. Наважку рослинного матеріалу (250÷500 мг) розтерти у ступці з невеликою кількістю (10÷15 мл) фосфатного буфера.

2. Розтерту масу кількісно перенести у мірну колбу та довести буфером до мітки.

3. Суміш добре перемішати та залишати на 10÷15 хв.

4. Розчин профільтрувати крізь подвійний паперовий фільтр або відцентрифугувати впродовж 10 хв. за 3000 об./хв. Фільтрат (або надосадову рідину) використати для визначення активності ферменту.

5. Активність ферменту дослідити на ФЕКу за довжини хвилі 590 нм.

Примітка. Для встановлення активності фермента відзначають час розвитку забарвлення до певної оптичної густини (значення оптичної густини D вибирають залежно від швидкості утворення забарвлення в межах 0,025÷0,4).

6. Для аналізу кожної біологічної проби потрібно використати три однакові кювети для ФЕКу: одну контрольну та дві дослідні (дві аналітичні повторності з однієї біологічної проби). В усі три кювети внести: 2 мл витяжки, 2 мл буферного розчину, 2 мл диметил-*p*-фенілендіаміну.

7. У контрольну кювету прилити 2 мл води, встановити її в дальнє кюветне відділення.

8. Закрити кюветну камеру та встановити нуль за контрольним зразком.

9. Помістити одну з дослідних кювет у ближнє кюветне відділення.

10. Автоматичною піпеткою додати у дослідну кювету 2 мл розчину пірокатехіну й одночасно включити секундомір. Пробу добре перемішати скляною паличкою.

11. Закрити кюветну камеру та слідкувати за утворенням забарвлення за зміною оптичної густини. Відзначити за секундоміром час досягнення необхідної оптичної густини.

12. Аналогічні вимірювання провести і для іншої дослідної кювети.

13. Активність ферменту обчислити за формулою:

$$A = \frac{D \cdot \alpha \cdot \beta \cdot \gamma}{t \cdot d},$$

де A – активність ферменту у відносних одиницях на 1 г маси сирової речовини за 1 с; D – зареєстрована в досліді оптична густина; t – час, с; d – товщина шару рідини (товщина кювети), см; α , β , γ – фактори розведення: α – відношення кількості рідини, взятої для приготування витяжки, мл, до маси наважки, г; β – ступінь додаткового розведення витяжки після центрифугування (якщо це було необхідно); γ – ступінь постійного розведення витяжки у кюветі (в наших умовах дорівнює чотирьом).

14. Результати досліді записати в таблицю 4.7.

Таблиця 4.7. Визначення активності поліфенолоксидази в різних рослинних тканинах

Варіант досліді	Оптична густина, ум. од.	Активність поліфенолоксидази, ум. од./г·с

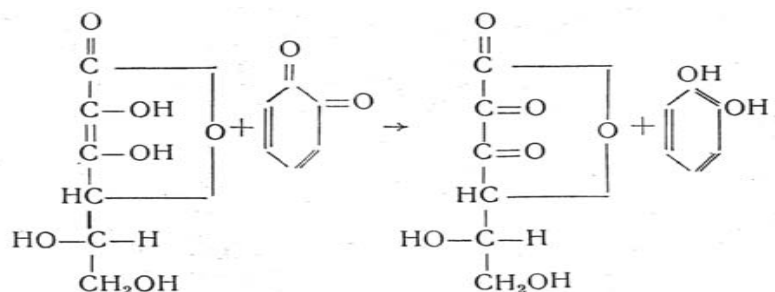
15. Зробити висновок про вплив факторів досліді на активність ПФО.

Контрольні запитання та завдання

1. Яка роль поліфенолоксидази в рослинному організмі?
2. Яка структура цього ферменту?
3. Чи виявляє рослинна поліфенолоксидаза активність до екзогенних поліфенолів?
4. Яке відношення до поліфенолоксидази мають хінони?
5. Назвіть інші мідьвмісні ферменти, що відіграють значну роль в метаболізмі рослинного організму.

Робота 61. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПОЛІФЕНОЛОКСИДАЗИ В ПРИСУТНОСТІ ПЕРОКСИДАЗИ (за Д. Міхліним та С. Броновицькою)

Як відомо, поліфенолоксидази каталізують аеробне окиснення поліфенолів та їхніх похідних у хінони. У ході дихання хінони відновлюються флавіновими дегідрогеназами. Принцип цього методу базується на властивості аскорбінової кислоти відновлювати хінони. Перебіг реакції відбувається за рівнянням:



Аскорбінова кислота

Дегідроаскорбінова кислота

Потім аскорбінову кислоту, що залишиться, відтитровують 0,01 н. розчином йоду.

Мета роботи. Ознайомитись з методом і порівняти активність поліфенолоксидази в присутності пероксидази, використовуючи різні рослинні об'єкти.

Матеріали, реактиви, обладнання. Пеларгонія, бульби картоплі тощо; ацетатний буфер рН 4,7, 0,01 %-й розчин аскорбінової кислоти, 10 %-й розчин мета- або ортофосфорної кислоти, 0,02 М розчин пірокатехіну, 0,01 н. розчин йоду, 1 %-й розчин крохмалю, дистильована вода; порцелянова ступка, конічні колби місткістю 50 мл, мірний циліндр, мірні пробірки, лійки, фільтри, секундомір, мікро бюретки, піпетки на 1 та 10 мл, технічні ваги, різноважки.

Хід роботи.

1. Наважку листків (1 г) помістити у порцелянову ступку.
2. Додати 20 мл ацетатного буфера. Відношення між

наважкою й об'ємом розчину буфера має бути 1 : 20.

3. Екстрагувати рослинний матеріал 30 хв за кімнатної температури.

4. Суміш відфільтрувати крізь паперовий фільтр в конічну колбу на 50 мл.

5. Перенести 1 мл фільтрату у суху конічну колбу.

6. До фільтрату прилити 3 мл дистильованої води, 2 мл розчину аскорбінової кислоти та 1 мл 0,02 М розчину пірокатехіну.

Примітка. Температуру всіх реактивів у дистильованій воді попередньо довести до 18÷20 °С.

7. Суміш струшувати рівномірно впродовж 2 хв.

8. Потім інактивувати фермент, додаючи 1 мл 10 %-го розчину фосфорної кислоти.

9. Титрувати 0,01 н. розчином йоду в присутності крохмалю (5 краплин) до появи слабо-синього забарвлення, що не зникатиме протягом хвилини.

10. Аналогічно провести контрольне визначення, використовуючи попередньо прокип'ячену витяжку.

Примітка. Різниця між кількістю розчину йоду, що була витрачена на титрування контрольної та дослідної проб є показником активності поліфенолоксидази в 1 мл фільтрату. Під час розрахунку на всю наважку отриману різницю домножують на 20.

11. Результати дослідів записати у таблицю 4.8.

Таблиця 4.8. Визначення активності поліфенолоксидази у різних рослин

Об'єкт	Наважка, г	Кількість мл 0,01 н. розчину йоду, витрачена на титрування 1 мл фільтрату		Активність поліфеноло- ксидази в 1 мл фільтрату (мл 0,01 н. йоду)	Активність поліфе- нолоксидази (мл 0,01 н. йоду на 1 г маси сирої речовини)
		контроль	дослід		

Контрольні запитання та завдання

1. Яка поширеність поліфенолоксидази у рослинних організмах?
2. У яких рослин (водних чи наземних) рівень активності ферменту вищий?

3. Які хімічні сполуки природного походження є субстратом для дії поліфенолоксидази?

4. Чи причетна поліфенолоксидаза до зміни забарвлення рослинних тканин у разі механічного ушкодження?

5. Як реагує рослинна пероксидаза на екзогенні поліфенольні сполуки?

Робота 62. ВПЛИВ ДИНІТРОФЕНОЛУ НА НАДХОДЖЕННЯ ВОДИ В ТКАННИНІ БУЛЬБИ КАРТОПЛІ

Динітрофенол (ДНФ) – це класична сполука, що припиняє окиснювальне фосфорилування, не змінюючи окиснення субстрату. В результаті енергетична ефективність дихання значно знижується та уповільнюються процеси, які відбуваються зі споживанням енергії АТФ. Тому ДНФ використовують як засіб встановлення залежності відповідного процесу від енергетичної ефективності дихання.

Мета роботи. Дослідити вплив динітрофенолу на надходження води в тканини бульби картоплі.

Матеріали, реактиви, обладнання. Бульби картоплі; розчин динітрофенолу (насичений); бюкси, скальпель, ваги з різноважками, скляні пластинки, фільтрувальний папір.

Хід роботи.

1. З бульби картоплі нарізати скальпелем 10 смужок завдовжки та завширшки приблизно 1,5 см та завтовшки 2÷3 мм.

2. Поділити їх на дві групи, зважити і помістити у бюкси.

3. Одну групу смужок залити 15 мл водогінної води, іншу – 15 мл насиченого розчину динітрофенолу.

4. Бюкси залишити відкритими за кімнатної температури на 1,5÷2,0 год.

5. Смужки вийняти, просушити фільтрувальним папером і знову зважити.

6. Розрахувати кількість води, яка надійшла в смужки у кожному варіанті дослідів.

7. Результати дослідів записати у таблицю 4.9.

Таблиця 4.9. Визначення впливу динітрофенолу на надходження води в тканини бульби картоплі

Умови дослідів	Вага картопляних смужок, г		Зміна ваги смужок	
	до дослідів	після дослідів	г	% від висхідної
Вода				
ДНФ				

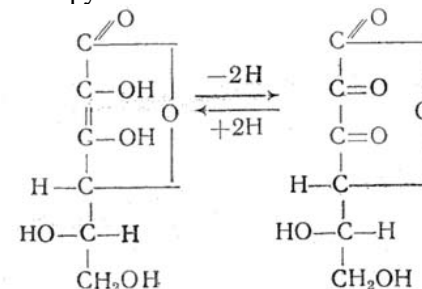
8. На основі одержаних результатів зробити висновки про вплив динітрофенолу на надходження води в бульби картоплі.

Контрольні запитання та завдання

1. Яку роль відіграють динітрофеноли у житті рослин?
2. Хто з провідних вчених сьогодення займається вивченням фенолів?
3. Чи пов'язані динітрофеноли з бактерицидною активністю рослин?
4. Яку роль відіграє кисень в метаболізмі фенольних сполук?
5. Як впливають ці сполуки на фотосинтез рослин?
6. Як пов'язані процеси дихання та водообміну клітин?

Робота 63. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ, ГЛЮТАТІОНУ ТА ЗАГАЛЬНОЇ РЕДУКУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ РОСЛИННОЇ ТКАННИНІ (за Петт в модифікації С.М.Прокошева)

Аскорбінова кислота (вітамін С) та глутатіон широко розповсюджені у рослинах. *Аскорбінова кислота* – це нестійка сполука, що може вільно окиснюватись та відновлюватись завдяки наявності ендольної групи:

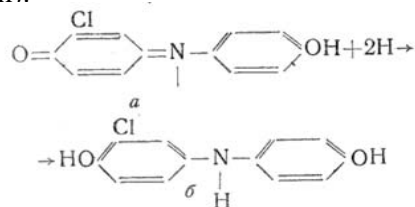


Аскорбінова кислота

Дегідроаскорбінова кислота

$$\text{HOOCCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{CH}(\text{CH}_2\text{SH})\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{CH}_2\text{COOH}$$
$$\begin{array}{ccc}
 & -2\text{H} & \\
 2\text{GS} + \text{H} & \xrightleftharpoons{+2\text{H}} & \text{GS} - \text{S} - \text{GS} \\
 \text{Відновлений} & & \text{Окиснений} \\
 \text{глутатіон} & & \text{глутатіон}
 \end{array}$$

2,6-Дихлорфеноліндофенол впливає на два види реакцій. Один зумовлений зміною рН середовища: в лужному середовищі виникає інтенсивно-синє забарвлення, в кислому – блідо-червоне. Інший вид реакції – це окіно-відновний перехід від темносинього забарвлення (окиснена форма) до знебарвлення (відновленої лейкоформи):



194

$$2\Gamma SH + J, \quad \Gamma S - S\Gamma + 2HJ.$$

195

5. Вміст колби перемішати і дати настоятися 5 хв.
6. Струшувати колбу 2÷3 хв. і профільтрувати вміст крізь паперовий складчастий фільтр у суху колбу.
7. Для визначення вмісту *аскорбінової кислоти* у два бюкси налити по 5 мл відібраного фільтрату.
8. Титрувати фільтрат 0,001 н. розчином 2,6 –дихлорфеноліндофенолом до появи слабо-рожевого забарвлення, яке зберігатиметься протягом 1 хв.
9. Для визначення кількості *глутатіону* та *загальної редукуючої активності* в два інших бюкси налити по 5 мл фільтрату.
10. Додати 2÷3 краплі 15 %-го КJ, потім 5 крапель 1 %-го розчину крохмалю.
11. Розчини титрувати з іншої бюретки 0,001 н. розчином KJO_3 до появи слабо-синього забарвлення, що зберігатиметься 1 хв.
12. Розрахунки провести за формулами:

$$\text{Вміст аскорбінової кислоти, мг \%} = \frac{(a \cdot k) \cdot 0,088 \cdot V \cdot 100}{m \cdot n} .$$

$$\text{Вміст глутатіону, мг \%} = \frac{(b - a \cdot k) \cdot 0,307 \cdot M \cdot 100}{m \cdot n} .$$

$$\text{Загальна редукуюча активність, мг \%} = \frac{b \cdot M \cdot 100}{m \cdot n} ,$$

де a – кількість мілілітрів 2,6-дихлорфеноліндофенолу, використаного для титрування; b – кількість мілілітрів йодату калію, використаного для титрування; k – співвідношення об'ємів; $\frac{\text{мл йодату калію}}{\text{мл 2,6 – дихлорфеноліндофенолу}}$ 0,088 – кількість міліграмів відновленої аскорбінової кислоти, еквівалентних 1 мл 0.001 н. розчину барвника; 0,307 – кількість міліграмів відновленого глутатіону, еквівалентних 1 мл 0.001 н. розчину йодату калію; n – наважка матеріалу, г; M – загальний об'єм екстракту, мл; m – об'єм екстракту, взятого для титрування, мл.

Примітка. Для визначення k готують розчин аскорбінової кислоти у 2 %-й метафосфорній кислоті. Для цього в мірну колбу місткістю 50 мл наливають 20 мл 5 %-ї HPO_3 , додають кристалик аскорбінової кислоти та доводять рідину в колбі до мітки дистильованою водою. Відтитровують 5 мл одержаного розчину в двократній повторності розчинами барвника та

йодату калію (як вказано вище) та розраховують співвідношення об'ємів.

13. Визначити вміст аскорбінової кислоти, глутатіону та загальну відновлюючу активність у листках верхнього та нижнього ярусів.

14. Результати досліду записати у таблицю 4.10.

Таблиця 4.10. Визначення вмісту аскорбінової кислоти, глутатіону та загальної редукуючої активності в листках рослин

Ярус листка		Наважка листків, г		Об'єм екстракту, мл	Пішло на титрування аскорбінової кислоти, мл		Відношення об'ємів КЮ ₃	Пішло на титрування фільтрату, мл		Вміст, мг% до ваги сухих листків	Загальна редуюча активність (мл 0,001 н КЮ ₃ на 100 г ваги сухих листків)
Верхній	Нижній	N	M	m	барвника	КЮ ₃	барвник	барвника	КЮ ₃	аскорбінової кислоти	
							k	a	b		

15. Зробити висновки про вміст аскорбінової кислоти, глутатіону та загальну відновлюючу активність у листках верхнього та нижнього ярусів різних видів рослин.

Контрольні запитання та завдання

1. Яку роль відіграє аскорбінова кислота в метаболізмі рослин?
2. Наскільки динамічно пов'язані між собою аскорбінова й дегідроаскорбінова кислоти?
3. Яке значення глутатіону в динаміці аскорбінової кислоти?
4. Які рослини мають максимальний та мінімальний вміст аскорбінової кислоти?
5. Назвіть фактори, що впливають на вміст аскорбінової кислоти в рослинах.

Контрольні запитання та завдання до розділу «Дихання рослин»

1. Яке значення мають процеси дихання та бродіння у житті рослин?
2. Назвіть спільні та відмінні риси процесів дихання та бродіння?
3. Що таке окиснення й відновлення? Доведіть, що дихання – це окисно-відновний процес.
4. Схарактеризуйте каталітичні системи дихання.
5. Назвіть основні шляхи дисиміляції вуглеводів.
6. В чому полягає функція гліколізу в обміні клітини?
7. На яких етапах гліколізу та за рахунок яких реакцій синтезується АТФ?
8. Що є кінцевим продуктом гліколізу?
9. Опишіть шляхи руху атомів вуглецю, кисню, водню під час розпаду піровиноградної кислоти в процесі дихання.
10. Назвіть основні стадії циклу Кребса та їх особливості.
11. Схарактеризуйте електрон-транспортний ланцюг мітохондрій, зокрема структурну організацію, основні компоненти, їх окисно-відновні потенціали.
12. Поясніть зв'язок між ультраструктурою клітини та функцією мітохондрій.
13. Що є джерелом енергії для функціонування дихального ланцюга?
14. Чому для функціонування електрон-транспортного ланцюга необхідний кисень?
15. Що таке окиснювальне фосфорилування?
16. Назвіть спільні та відмінні риси фотосинтетичного та окиснювального фосфорилування.
17. Яка кількість АТФ утворюється у разі розпаду однієї молекули глюкози в анаеробну й аеробну фази дихання?
18. Назвіть основні риси пентозофосфатного циклу.
19. Охарактеризуйте гліоксилатний цикл.
20. У чому полягає фізіологічне значення альтернативних шляхів дихання?
21. Які фактори впливають на інтенсивність процесу дихання?
22. Які реакції необхідні для одержання з молекули глюкози

фруктози, етилового спирту, однієї з жирних кислот, аспарагінової кислоти?

23. Який зв'язок дихання з фотосинтезом і азотним обміном клітини?
24. Яка залежність між субстратами дихання та дихальним коефіцієнтом?
25. Назвіть шляхи окиснення дихального субстрату.
26. Якими явищами супроводжується аеробне дихання?
27. У чому подібність і відмінність процесів фотосинтезу та дихання?
28. Чому аеробне дихання ефективніше за анаеробне?
29. Яка функція фосфору в процесі дихання?
30. З якого проміжного продукту дихання утворюються жирні кислоти?
31. Дихальний коефіцієнт проростків пшениці за вмісту O_2 в повітрі 21 % складає 0,98, за 5 % – 0,93, за 3 % – 3,34. Як пояснити різке зростання дихального коефіцієнта?
32. Чи можливе транспортування фосфатних груп на АДФ від таких субстратів: глюкозо-1-фосфату, фруктозо-1,6-дифосфату, 1,3-дифосфогліцеринової кислоти, фосфоенолпірувату?
33. 15 г бруньок за 30 хв виділили 3 мг CO_2 . Розрахуйте інтенсивність дихання на 1 г маси сухої речовини за 1 год, якщо відомо, що вміст води в бруньках становить 60%.
34. Чому не можна зберігати насіння вологим?
35. Зелений листок на світлі за температури 25 °C інтенсивно поглинав CO_2 , а за підвищеної температури до 40 °C почав виділяти вуглекислий газ. Як пояснити зазначені зміни газообміну листка?
36. Назвіть методи визначення інтенсивності дихання.

Розділ 5.

КОРЕНЕВЕ ЖИВЛЕННЯ РОСЛИН

Кореневе живлення – розділ фізіології рослин, який присвячений вивченню метаболізму поживних елементів. Основні питання, які досліджуються в даному розділі є: надходження елементів живлення в рослинний організм, їх перетворення, фізіолого-біохімічне значення, механізм дії тощо.

Рослина засвоює поживні елементи з ґрунту, повітря і води. Основну частину елементів рослина засвоює з ґрунту у вигляді мінеральних сполук; CO_2 та кисень – з повітря; джерелом водню є вода. Обидва способи живлення рослин – повітряний і кореневий – взаємопов’язані. Наразі у рослин чітко проявляється вибіркова здатність поглинати відповідні хімічні елементи.

Усі елементи живлення рослин за їхнім умістом у клітинах поділяють на елементи-органогени, макро-, мікро- та ультрамікроелементи. У більшості рослин близько 95 % сухої речовини складають елементи-органогени (C, H, O, N), приблизно 4% – макроелементи (P, K, Ca, Mg, S, Cl, Na, Si, Al, Fe) і лише 1 % – мікроелементи (Mn, B, Cu, Zn, Ba, Ni, Mo, Co) та ультрамікроелементи (Cs, Cd, Ag, Ra, Au, Hg, As та ін.). Для нормального перебігу всіх фізіолого-біохімічних процесів рослина має бути забезпечена всіма поживними елементами, кожен із яких має певне значення у метаболізмі. Зокрема, встановлена необхідність елементів живлення для нормального функціонування протоплазми, для структурної організації й активності живих клітин, передусім завдяки їх участі у генерації і регенерації енергії, для регуляції процесів обміну. Дослідження функції елементів живлення у життєдіяльності рослин дає змогу науковцям і практикам досягати високої продуктивності сільськогосподарських культур.

Вирішення багатьох практичних завдань живлення рослин потребує глибоких теоретичних досліджень, вивчення фізіолого-біохімічного значення поживних елементів, механізму їхнього поглинання, транспортування і використання рослиною. Відповідь на всі ці питання можна одержати експериментальним шляхом, застосовуючи фізіологічні, хімічні і фізико-хімічні методи.

У даному розділі описано основні методичні прийоми вирощування рослин методом водної культури (встановлення рН живильного розчину, забезпечення киснем, водою тощо), схарактеризовано склад живильних сумішей, розглянуто методи дослідження фізіології кореневої системи, якісного та кількісного визначення макро- та мікроелементів, їх антагонізму, а також фізіологічного значення у життєдіяльності рослин.

Робота 64. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЗОЛИ У РІЗНИХ ОРГАНАХ РОСЛИН

Елементи живлення в рослинному організмі розподілені нерівномірно. Так, атрагуючим центром для мікроелементів є листки. Це пов'язано з основною функцією листка зеленої рослини – фотосинтезом, транспірацією і синтезом різноманітних органічних сполук.

Рослинний матеріал, який висушують за температури $100\div 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ містить органічні та мінеральні речовини. Для визначення вмісту мінеральних елементів необхідно провести *озолення* (спалювання) рослинного матеріалу. За час спалювання органічні речовини вилучаються у вигляді CO_2 , H_2O , N_2 , а залишок – зола – містить мінеральні елементи, розчинні в неорганічних розчинниках.

Кількість золи у рослині та її склад непостійні. Вони залежать від виду рослини, органу, ґрунтово-кліматичних умов вирощування тощо. Найбільше золи у листках – $10\div 15\%$, у корі – 7% , у стеблах – $4\div 9\%$, насінні – 3% , деревині – 1% .

Існує два основних способи мінералізації рослинного матеріалу – сухе і мокре озолання.

Метод *сухого озолання* застосовується для аналізу вмісту майже всіх макро- і мікроелементів. Перед озоланням наважку рослинного матеріалу подрібнюють у ступці, або в кавомолці, висушують за температури $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, зважують у тиглях на аналітичних терезах. Сухе озолання проводять у порцелянових, кварцових або металічних тиглях у муфельній печі за температури $450\div 500\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом $4\div 6$ год. Охолоджені тиглі зважують. Прожарювання і зважування повторюють до встановлення сталої маси. Після повного спалювання матеріалу зола в більшості випадків має світло-сірий, майже білий колір. Якщо матеріал має багато заліза, то зола набуває червоно-бурого кольору, а марганцю – зеленуватого. Методом сухого спалювання отримують «сирозолу», бо вона містить домішки (солі, оксиди, пісок). «Сира зола» також втрачає певну кількість фосфору, калію, сірки.

Мокре озолання – основний спосіб розкладання органічних сполук азоту та фосфору, крім того, за цим методом не вилучаються калій та сірка, бо температура під час процесу не піднімається вище $340\text{ }^{\circ}\text{C}$. Його застосовують у разі точного визначення фосфору, калію, сірки та деяких інших елементів. Наразі, коли

визначають бор, застосовують лише сухе озолання, бо основна частина сполук бору випаровується з парами води і кислоти. Для озолання застосовують азотну і сірчану кислоти. Об'єкт дослідження спалюють в колбах К'ельдаля місткістю $100\div 250$ мл. У разі мокрого озолання проводять контрольний дослід без рослинного матеріалу, що дає змогу вносити поправки на вміст певного елемента в реактивах.

Мета роботи. Визначити кількість золи в корі, деревині, листках, коренях деревних рослин (яблуня, вишня, береза тощо) методом сухого озолання матеріалу.

Матеріали, реактиви, обладнання. Кора, деревина, листки, корені; етиловий спирт; аналітичні ваги, технічні ваги, ексікатор, порцелянові тиглі, муфельна піч, електрична плитка, скальпелі, кавомолка.

Хід роботи.

1. Рослинний матеріал подрібнити у кавомолці та висушити за температури $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ до сухої маси.

2. Порцелянові тиглі пронумерувати графітним олівцем (краще насиченим розчином нітрату кобальту), прожарити у муфельній печі, перенести в ексікатор, охолодити і зважити на аналітичних вагах.

3. У тиглях зважити сухий рослинний матеріал ($1\div 2$ г).

4. Сухий матеріал кілька разів залити $1\div 2$ мл етилового спирту та підпалити.

5. Тигель поставити на електричну плитку і прожарити впродовж $5\div 6$ хв.

6. Перенести тиглі в ексікатор, охолодити, зважити й обчислити вміст золи у рослинному матеріалі за формулою:

$$X = \frac{a \cdot 100}{H},$$

де X – вміст золи в рослинному матеріалі, %;

a – кількість «сирої золи», г;

H – наважка повітряно-сухої речовини, г;

100 – для перерахунку у відсотки.

Примітка. Отриману «сирозолу» використовують для визначення макро- та мікроелементів.

7. Результати роботи записати у таблицю 5.1.

Таблиця 5.1. Визначення вмісту золи у різних органах рослин

Об'єкт дослідження	Частина рослини	Номер тигля	Маса тигля, г			Маса, г		Вміст золи, %
			порожнього	з наважкою	із золою	наважки	золи	

8. Зробити висновки щодо вмісту золи в різних органах рослин.

Контрольні запитання та завдання

1. Схарактеризуйте хімічний склад рослин.
2. Назвіть методи мінералізації рослинного матеріалу.
3. У яких випадках проводять мокре та сухе озолення? Які переваги та недоліки кожного з цих методів?
4. Якими методами визначають вміст золи?
5. Чому у рослин в одних органах вміст золи вищий (листки), ніж у інших (деревина)?
6. Які фактори впливають на зміну якісного та кількісного складу золи?
7. Чи впливає вік рослини на кількісний і якісний склад золи?

Робота 65. МІКРОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ЗОЛИ

Серед усіх поживних елементів у рослин 24 хімічні елементи є життєво необхідними, 21 елемент вважають умовно необхідними. *Життєво необхідні* – це елементи, без яких рослина не може повністю закінчити цикл свого розвитку і які не можуть бути заміненими іншими елементами. Фізіологічне значення умовно необхідних елементів остаточно не досліджено. Елементи, необхідні рослинам, відносяться до різних груп періодичної системи

елементів Менделєєва. Наразі слід зазначити, що у високих концентраціях більшість елементів токсичні для рослин.

Для встановлення хімічного складу золи застосовують мікрохімічний метод – якісні реакції, в результаті яких утворюються характерні для певних речовин кристали або забарвлення розчину. Цей метод не потребує значної кількості матеріалу. Аналіз дає змогу виявляти як макро-, так і мікроелементи.

Мета роботи. Ознайомитися з мікрохімічними (крапельними) методами аналізу елементів і визначити елементний склад листків залежно від умов живлення та віку рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Зола листків різних видів рослин; дистильована вода, аміак, 10 %-й розчин соляної кислоти, 1 %-ві розчини: сульфату талію, хлориду платини, сірчаної кислоти, фосфату натрію, молібдату амонію в азотній кислоті, нітрату стронцію, жовтої кров'яної солі, тартрату натрію, щавлевої кислоти, гідрату нітрату ртуті (I), ацетату свинцю, нітрату срібла, комплексна натрієва мідно-свинцева нітратна сіль $\text{Na}_2\text{CuPb}(\text{NO}_2)_6$ для аналізу на калій; пробірки (по чотири на студента), скляні палички, штативи для пробірок, предметні стекла, маленькі лійки, мікроскопи, фільтрувальний папір, порцелянові пластинки.

Приготування реактиву:

• сіль $\text{Na}_2\text{CuPb}(\text{NO}_2)_6$: 2 г NaNO_3 (що не містить калію), 0,9 г $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 15 мл дистильованої води, підкисленої 0,2 мл 30 %-ї оцтової кислоти. Отриманий розчин зберігають у склянці з притертою кришкою.

Хід роботи.

Мінеральні речовини, що входять до складу золи, розчинні у воді, або кислоті. Тому для мікрохімічного аналізу готують два розчини золи: у воді і в 10 %-й соляній кислоті.

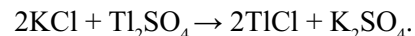
1. Приготування водної і кислотної витяжки золи – у дві пробірки внести по 1 см³ золи та додати: в першу 5 мл води, а в другу – 5 мл 10 %-ї HCl , розчини ретельно перемішати скляною паличкою (для кожної пробірки окремо). За 2÷3 хв. відфільтрувати крізь паперовий фільтр у чисті сухі пробірки.

2. На предметне скло на відстані 1 см нанести краплину ви-

тяжки золи (водної або кислотної, відповідно до елемента, який визначається) і краплину відповідного реактиву.

2.2. *Виявлення хлору.* Використовують водну витяжку золи.

• Реактивом на хлориди є сірчаноокислий талій (Ti_2SO_4). Між хлоридами і сульфатом талію відбувається реакція:



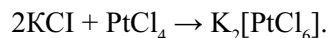
У результаті реакції хлорид талію випадає у вигляді кристалів хресто- або мечоподібної форми (рис. 5.1). Внаслідок значного заломлення променів ці кристали мають чорний колір. Сульфат талію можна замінити нітратом талію.

• Як реактив на хлориди використовують також розчин нітрату срібла AgNO_3 . Хлориди з AgNO_3 утворюють білий осад (реакція відбувається у пробірці).

2.3. *Виявлення калію.* Для реакції використовують як водну, так і кислотну витяжку золи залежно від реактивів.

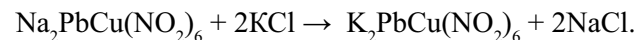
• Реактив тартрату натрію однозаміщеного $\text{NaHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ з нейтральним розчином солей калію утворює кристали тартрату калію однозаміщеного $\text{KHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ у вигляді великих призм і пластинок. Для реакції використовують водний розчин, який обов'язково доводять до нейтрального рН, оскільки кристали тартрату калію однозаміщеного добре розчиняються в кислотах і лугах.

• Реактив – хлорид платини PtCl_4 . Використовують водний або кислотний розчини. Відбувається реакція:



У результаті реакції утворюються жовто-зелені октаедричні кристали гексахлорплатинату калію, інколи у вигляді тетраedrів і кубів (рис. 5.1).

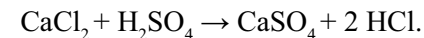
• Реактив комплексної солі $\text{Na}_2\text{PbCu}(\text{NO}_2)_6$. Використовують водну витяжку золи. Відбувається реакція:



Через деякий час утворюються свинцево-чорні і темно-коричневі кристали свинцево-мідного нітрату калію (рис. 5.1).

2.4. *Виявлення кальцію.* Для реакцій на кальцій і наступні елементи використовують кислотну витяжку золи.

• Реактив – сірчана кислота. Відбувається реакція:

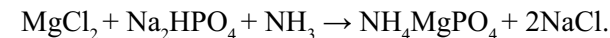


У результаті реакції утворюються характерні довгі тонкі голки гідратованого сульфату кальцію $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (гіпс), потім голки об'єднуються в структури, що нагадують сніжинки, які накопичуються одна на одну (рис. 5.1). Голки можуть переходити в тонкі призми та маси пластинок, що накопичуються одна на іншу.

• Реактив – щавлева кислота. У результаті реакції випадають кристали оксалату кальцію ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) у вигляді октаedrів, кубів, інколи хрестів.

2.5. *Виявлення магнію.*

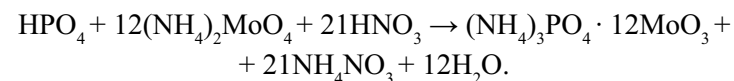
• Реактив – фосфат натрію Na_2HPO_4 . Спочатку в краплину досліджуваної рідини додають краплину аміаку для нейтралізації і вже потім з'єднують із реактивом дугоподібним каналом. Відбувається реакція:



У результаті реакції утворюються кристали фосфорно-аміачно-магнезійної солі у вигляді кришечок, сніжинок, крил, квадратів, прямокутників, зірок (рис. 5.1).

2.6. *Виявлення фосфору.*

• Реактив – 1 %-й розчин молібдату амонію в 15 %-й азотній кислоті. Відбувається реакція:

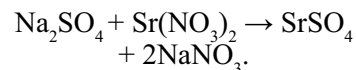


У результаті реакції випадає жовто-зелений осад дрібних кристалів фосфомолібдату амонію. З часом осад набуває інтенсивнішого забарвлення (рис. 5.1).

• Реактив – гідрат нітрату ртуті (I) $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$. У результаті реакції утворюється осад фосфату ртуті у вигляді пучків, голлок, кристалічних розеток.

2.7. Виявлення сірки.

• Реактив – азотнокислий стронцій $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$. Відбувається реакція:



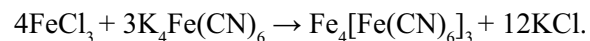
У результаті реакції випадає дрібнокристалічний осад сульфату стронцію. Кристалики мають заокруглену форму.

• Реактив – нітрат срібла AgNO_3 . У результаті реакції утворюються кристали сульфату срібла Ag_2SO_4 , які мають форму витягнутих шестикутників і ромбів. Охолодження може прискорити формування кристалів.

• Реактив – ацетат свинцю $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. У результаті реакції утворюються дуже дрібні кристали сульфату свинцю у вигляді довгих голок, зірок, ромбів (рис. 5.1).

2.8. Виявлення заліза.

• Реактив – жовта кров'яна сіль $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Реакція відбувається у пробірці або на порцеляновій пластинці. До кількох краплин досліджуваної рідини поступово додати кілька краплин 1 %-го розчину жовтої кров'яної солі. Відбувається реакція:



Наявність заліза визначають за утворенням берлінської лазурі яскраво-синього забарвлення.

3. Препарувальною голкою з'єднати обидві краплини дугоподібним каналом.

Примітка. Препарат можна злегка підсушити над полум'ям



Рис. 5.1. Кристали (під мікроскопом): 1 – хлориду талію; 2 – свинцево-мідного нітрату калію; 3 – сульфату кальцію (гіпсу); 4 – фосфорно-аміачно-магnezіальної солі; 5 – фосфорномолібдату амонію.

спиртівки. Однак слід пам'ятати, що тільки за повільної кристалізації утворюються великі, правильно сформовані кристали. Необхідно також уникати повного перемішування краплин, тому що відбудеться швидка кристалізація – випадуть дуже дрібні кристали, які майже непомітні в полі зору мікроскопа.

Скляні палички і мікропіпетки після нанесення реактиву слід вимити і витерти фільтрувальним папером, щоб його залишки не заважали наступній реакції.

4. Препарат розглянути під мікроскопом без накривного скельця (об'єктив $\times 8$, $\times 10$, окуляр $\times 15$)

5. Результати мікрохімічного аналізу записати у таблицю 5.2.

Таблиця 5.2. Мікрохімічний аналіз золи

Елемент	Витяжка золи (водна, кислотна)	Реактив	Хімічна реакція	Результат реакції (форма, розмір кристалів, колір розчину тощо)

Контрольні запитання і завдання

1. Як класифікують поживні елементи за їхнім вмістом у рослинах?

2. Які поживні елементи є життєво та умовно необхідними для рослин?

3. За якими критеріями хімічний елемент можна вважати життєво необхідним?

4. Для чого готують водну і кислотну витяжку золи?

5. Чому для одержання зольних елементів використовують соляну, а не інші кислоти?

6. Як виявити калій, кальцій, магній та інші елементи в золі?

7. Для чого проводять аналіз золи рослин?

Робота 66. ВИЗНАЧЕННЯ В ЗОЛІ МАКРО- І МІКРОЕЛЕМЕНТІВ

Поживні елементи, які поглинаються рослинами з ґрунту в різних концентраціях, мають певне біохімічне і фізіологічне зна-

чення і відповідають за синтез відповідних речовин у рослинному організмі.

Азот входить до складу амінокислот, білків, нуклеїнових кислот, гормонів росту, багатьох вітамінів, хлорофілу й інших життєво важливих органічних сполук.

Фосфор – компонент фосфопротеїнів, нуклеїнових кислот (НК), фосфоліпідів, фосфорних ефірів цукрів, нуклеотидів. Особливе значення фосфору в енергетиці клітини, оскільки він входить до складу основних енергетичних депо АТФ і НАДФ. Фосфор посилює накопичення цукрів у фруктах і овочах, крохмалю в бульбах картоплі.

Калій складає основну частину катіонів клітинного соку і є основним іоном нейтралізації від'ємно заряджених аніонів. Цей макроелемент сприяє підтримці стану гідратації колоїдів цитоплазми, регулює її водоутримуючу здатність і забезпечує надходження води в рослину, допомагає рослинам легше переносити посуху і заморозки. Калій потрібен для поглинання і транспортування води по рослині, один із катіонів-активаторів ферментних систем. Під впливом калію посилюється накопичення крохмалю в бульбах картоплі, сахарози в цукровому буряку, моносахаридів у плодах і овочах, підвищується стійкість рослин до грибкових і бактеріальних захворювань.

Кальцій стабілізує функції усіх клітинних структур. Йони кальцію виконують сигнальну функцію і є універсальними регуляторами життєдіяльності клітини. Кальцій регулює активність ферментів, бере участь у структурній організації хромосом, є зв'язуючою ланкою між ДНК і білком, виконує різноманітні функції в обміні речовин організму.

Магній входить до складу хлорофілу, підтримує структуру рибосом, сприяє обміну речовин, підвищує активність ферментів, він необхідний для процесів дихання, фотосинтезу, синтезу НК і білків. Магній підсилює синтез ефірних олій, каучуку, вітамінів А і С.

Сірка входить до складу амінокислот – цистину, цистеїну, метіоніну; вітамінів – ліпоевої кислоти, біотину, тіаміну; деяких антибіотиків, зокрема пеніциліну та багатьох ферментів. Одна з основних функцій сірки – участь SH-групи в утворенні ковалентних, водневих, меркаптидних зв'язків. Інша важлива функція сірки – підтримка певного рівня окисно-відновного потенціалу клітини.

Залізо міститься в окисно-відновних ферментах (цитохроми, цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза) і має важливе значення у диханні рослин, фотосинтезі, синтезі хлорофілу тощо.

В аналітичній хімії існує низка методів, за допомогою яких можна якісно й кількісно визначати наявність у золі певних елементів. Це потрібно для встановлення потреби рослин в елементах живлення.

Мета роботи. Визначити хімічний склад золи деревини кількох видів рослин: яблуні, сосни, берези; оцінити значення золи як мінерального добрива.

Матеріали, реактиви, обладнання. Зола деревини досліджуваних рослин; вода дистильована, HNO_3 (конц.), CH_3COOH (конц.), 1н. розчин NaOH , 5 %-і розчини HCl , NH_4CNS , гексанітрокобальтату натрію, щавлевої кислоти, 10 %-і розчини $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, BaCl_2 , HNO_3 , етиловий спирт, кристалічний NH_4NO_3 , пероксид свинцю, персульфат амонію; порцелянові тиглі, електрична плитка, фільтри, пробірки, лакмусовий папір, піпетки, чашки Петрі.

Хід роботи.

1. У порцеляновий тигель помістити 1 г золи, додати 1 мл концентрованої HNO_3 , перемішати скляною паличкою і додати 10÷20 мл дистильованої води.

2. Тигель з кислотною витяжкою золи поставити на електричну плитку, розчин довести до кипіння, відфільтрувати.

3. Одну частину фільтрату розлити у три пробірки по 2 мл для визначення калію, фосфору, сірки.

• *Визначення калію.* До 2 мл фільтрату додати 0,5 мл кобальтнітриту натрію і 2 мл етилового спирту. Витримати 15÷30 хв. За наявності йонів калію випадає жовтий осад.

• *Визначення фосфору.* До 2 мл фільтрату внести кристали нітрату амонію NH_4NO_3 , довести до кипіння, додати 1 мл 10 %-го водного розчину $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$. За наявності йонів фосфору випадає золотаво-жовтий осад.

• *Визначення сірки.* До 2 мл фільтрату додати 1 мл 10 %-го розчину BaCl_2 . За наявності SO_4^{2-} утворюється біла каламуть.

4. Другу частину фільтрату довести розчином NaOH до слаб-

кої лужної реакції (за лакмусом) і відфільтрувати драглистий осад, в якому міститься $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, $\text{Mn}(\text{OH})_2$.

Увага! Осад зберігають для визначення заліза та марганцю (див. п. 6.).

5. Лужний розчин після фільтрування нейтралізувати HCl і підкислити кількома краплинами оцтової кислоти для визначення кальцію.

- **Визначення кальцію.** До 2 мл фільтрату додати 1 мл 5 %-го розчину щавлевої кислоти. За наявності йонів кальцію розвивається біла каламуть.

6. Драглистий осад на фільтрі облити 10 мл азотної кислоти, відфільтрувати, фільтрат розлити у дві пробірки по 2 мл для визначення заліза і марганцю.

Примітка. Використовують фільтрат, що залишився після відокремлення драглистого осаду, нейтралізований та підкислений оцтовою кислотою (п. 4).

- **Визначення заліза.** До фільтрату в пробірку додати 2÷3 краплини 5 %-го NH_4CNS . За наявності заліза розвивається червоне забарвлення.

- **Визначення марганцю.** До 2 мл фільтрату додати 0,5 мл концентрованої азотної кислоти і 0,5 мл пероксиду свинцю (або 0,1 г персульфату амонію), нагріти 5 хв. на киплячій водяній бані. Якщо є марганець, розчин забарвлюється у фіолетовий колір.

7. Результати дослідів записати у таблицю 5.3.

Таблиця 5.3. Хімічний склад золи

Елемент	Реактив	Результат реакції

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке вибіркова поглинальна здатність?
2. Чому концентрація поживних елементів у рослин і в ґрунті суттєво відрізняється?
3. Наведіть приклади життєво необхідних елементів живлення рослин.
4. Яке фізіологічне значення життєво необхідних елементів у метаболізмі рослин?

Робота 67. ВИГОТОВЛЕННЯ ЖИВИЛЬНИХ РОЗЧИНІВ

Система живлення рослин, внесення органічних і мінеральних добрив, своєчасне і правильне підживлення разом із застосуванням інших агрозаходів забезпечують високі врожаї усіх сільськогосподарських культур. Щоб знайти потрібне дозування, встановити терміни внесення і виявити ефективність певних форм добрив або окремих елементів проводять вегетаційні досліді за умов вирощування рослин у *піщаних, ґрунтових і водних культурах*. Отримані дані вегетаційних досліджень перевіряють на великих площах.

Для вирощування рослин у водних і піщаних культурах використовують розчини солей, які містять усі необхідні елементи живлення. Вперше *метод водних культур* запропонували німецькі дослідники У. Кноп та Ю. Сакс. За цим методом готують спеціальні живильні суміші. Склад солей підбирають таким чином, щоб розчини солей за складом наближалися до розчину золи. Наразі одні елементи рослини засвоюють у вигляді катіонів (більшість металів), а інші – у вигляді аніонів (більшість неметалів), тому підбирають такі солі, де необхідні елементи містяться в катіонній і аніонній формі. Розчин, який містить у достатній кількості всі необхідні елементи для нормальної життєдіяльності рослин, називається *нормальним живильним розчином*.

До складу нормального живильного розчину обов'язково входять такі сім елементів: азот, фосфор, калій, сірка, кальцій, магній, залізо. Слід пам'ятати, що універсального живильного розчину для всіх рослин не існує.

Основні вимоги до нормального живильного розчину:

- до складу розчину повинні входити всі необхідні для рослин поживні елементи;
- окремі складові частини живильного розчину мають бути у формі, доступній для засвоєння рослиною;
- поживних речовин у розчині має бути стільки і в такому співвідношенні, щоб вони забезпечили високу продуктивність рослин;
- реакція середовища (pH) має бути оптимальною для рослин упродовж усього вегетаційного періоду.

Мета роботи. Ознайомитися зі складом найвідоміших розчинів для вирощування рослин, приготувати деякі з них, виростити на них розсаду для подальших дослідів з фізіології рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Дистильована вода, нітрат кальцію $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, хлорид калію KCl , сульфат магнію $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, фосфат калію KH_2PO_4 , хлорид заліза FeCl_3 , нітрат калію KNO_3 , сульфат кальцію CaSO_4 , фосфат кальцію $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, фосфат заліза $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$, нітрат амонію NH_4NO_3 , фосфат кальцію двозаміщений $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; мірні циліндри і колби, аналітичні ваги з різновагами, посуд для зберігання вихідних розчинів, піпетки.

Склад живильної суміші – **розчин № 1** (розчин У. Кнопа)

Реактив	Наважка, г
Нітрат кальцію $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1,000
Хлорид калію KCl	0,125
Сульфат магнію $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,250
Фосфат калію KH_2PO_4	0,250
Хлорид заліза FeCl_3	Кілька кристалів

Основний недолік живильного розчину У. Кнопа – швидке встановлення у ньому лужної реакції, що негативно позначається на фізіологічному стані рослин.

Склад живильної суміші – **розчин № 2**

Реактив	Наважка, г
Нітрат кальцію $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,492
Фосфат калію KH_2PO_4	0,136
Сульфат магнію $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,060
Хлорид калію KCl	0,075
Хлорид заліза FeCl_3	Кілька кристалів

Недолік розчину – кисла реакція (рН 4,2), яка швидко змінюється на лужну (рН 7,2).

Склад живильної суміші – **розчин № 3**

Реактив	Наважка, г
Нітрат калію KNO_3	0,500
Сульфат кальцію CaSO_4	0,500
Сульфат магнію $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,250
Фосфат кальцію $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0,136
Фосфат заліза $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$	0,250

Під час приготування розчину частина солей погано розчиняється у воді. Солі розчиняються поступово, в процесі засвоєння їх коренями рослин. Зміна рН у цьому розчині відбувається досить повільно (рН 6,4÷7,0).

Склад живильної суміші – **розчин № 4**

(розчин Д. М. Прянишникова)

Реактив	Наважка, г
Нітрат амонію NH_4NO_3	0,240
Фосфат кальцію двозаміщений $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,172
Хлорид калію KCl	0,150
Сульфат магнію $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,060
Сульфат кальцію CaSO_4	0,334
Хлорид заліза FeCl_3	0,025

Особливість розчину Д. М. Прянишникова в тому, що джерелом азоту є нітрат амонію – NH_4NO_3 . У цьому розчині показник рН середовища майже не змінюється, що позитивно впливає на ріст і розвиток рослин.

Склад живильної суміші – **розчин № 5**

(розчин В. А. Чеснокова і Є. М. Базиріна)

Реактив	Наважка, г
Нітрат кальцію $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,500
Нітрат калію KNO_3	0,400
Фосфат калію KH_2PO_4	0,140
Нітрат амонію NH_4NO_3	0,160
Сульфат магнію $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,230
Сульфат амонію $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,130
Хлорид заліза FeCl_3	0,006
Борна кислота HBO_3	0,001
Сульфат марганцю MnSO_4	0,001
Сульфат цинку ZnSO_4	Сліди
Сульфат міді CuSO_4	Сліди

Живильний розчин розроблений для вирощування огірків і помідорів без ґрунту. Склад даного розчину не постійний, його змінюють залежно від фази росту та розвитку рослин, від сезону вирощування (зима, літо).

Хід роботи.

1. Приготувати повний живильний розчин.

- Зазначену кількість солей розчинити у дистильованій воді та довести об'єм до 1 л.

2. Приготувати повний концентрований живильний розчин.

- Для дослідів, пов'язаних із вирощуванням рослин, приготувати вихідні концентровані розчини – концентрацію солей в 1 л збільшити у 200 разів.

- Перед дослідом 5 мл вихідного концентрованого розчину довести до 1 л дистильованою водою і використати у роботі.

Примітка. Для запобігання збільшення концентрації солей внаслідок випаровування такі розчини зберігають у добре закритих посудинах.

3. Приготувати неповний живильний розчин.

Примітка. У багатьох випадках виникає потреба культивувати рослини на неповному живильному розчині, зокрема при вивченні впливу окремого елемента живлення на ріст і розвиток рослин.

Для виготовлення живильного розчину Кнопа без калію замінюють KH_2PO_4 на $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, а KCl на NaCl . Треба розрахувати необхідну кількість $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, аби кількість фосфору була така сама, як у 0,25 г KH_2PO_4 .

Молекулярна маса KH_2PO_4 – 136 г; P – 31,0 г.

Складаємо пропорцію:

$$\begin{array}{l} 136 \text{ г} \text{ — } 31,0 \text{ г} \\ 0,25 \text{ г} \text{ — } X \text{ г, тоді} \end{array}$$

$$X = \frac{0,25 \text{ г} \cdot 31 \text{ г}}{136 \text{ г}} = 0,057 \text{ г}$$

Молекулярна маса $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 358,18 г.

Складаємо пропорцію:

$$\begin{array}{l} 358,18 \text{ г} \text{ — } 31 \text{ г} \\ X \text{ г} \text{ — } 0,057 \text{ г, тоді} \end{array}$$

$$X = \frac{0,057 \text{ г} \cdot 358,18 \text{ г}}{31 \text{ г}} = 0,659 \text{ г}.$$

Для заміни в даному розчині солі KH_2PO_4 на $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ останньої треба взяти 0,659 г на 1 л.

Аналогічно обчислюємо кількість грамів NaCl необхідні для заміни 0,125 г KCl у розчині.

Молекулярна маса KCl – 74, 56 г; Cl – 35,46 г.

Складаємо пропорцію:

$$\begin{array}{l} 74,56 \text{ г} \text{ — } 35,46 \text{ г} \\ 0,125 \text{ г} \text{ — } X \text{ г, тоді} \end{array}$$

$$X = \frac{0,125 \text{ г} \cdot 35,46 \text{ г}}{74,56 \text{ г}} = 0,059 \text{ г}.$$

Молекулярна маса NaCl – 58,46 г; Cl – 35,46 г.

Складаємо пропорцію:

$$\begin{array}{l} 58,46 \text{ г} \text{ — } 35,46 \text{ г} \\ X \text{ г} \text{ — } 0,059 \text{ г, тоді} \end{array}$$

$$X = \frac{58,46 \text{ г} \cdot 0,059 \text{ г}}{35,46 \text{ г}} = 0,097 \text{ г}.$$

Отже, склад живильного розчину без калію буде таким:

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 1 г;

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,659 г;

NaCl – 0,097 г;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,250 г;

FeCl_2 – сліди.

Для приготування розчину Кнопа без фосфору треба KH_2PO_4 замінити на KCl , а для приготування розчину без азоту – $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ замінити на $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Обчислення проводимо аналогічно.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке нормальний живильний розчин?

2. Які хімічні елементи є обов'язковими складовими нормального розчину?

3. За яким принципом підбирають складові живильного розчину?

4. Який рН живильного розчину є оптимальним для більшості культурних рослин?

5. Скільки потрібно взяти $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ замість 1 г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ у разі вилучення азоту із живильної суміші?

6. Яку кількість KCl необхідно взяти замість 0,25 г KH_2PO_4 у разі вилучення фосфору із живильної суміші?

Робота 68. ВИРОЩУВАННЯ РОСЛИН МЕТОДОМ ВОДНОЇ КУЛЬТУРИ З ВИЛУЧЕННЯМ ДЕЯКИХ ПОЖИВНИХ ЕЛЕМЕНТІВ

Для визначення необхідності певного елемента живлення для рослин його вилучають зі складу живильного розчину і аналізують фізіологічний стан проростків: наприклад, з однієї суміші вилучають азот, з інших – калій, сірку, фосфор тощо. Найзручнішим є метод водних культур, адже рослини, вирощені методом ґрунтової або піщаної культури, під час підготовки кореневої системи для аналізів втрачають меристематичні зони, кореневі волоски, бічні корені тощо. Якщо для дослідів використовують рослину, вирощену в ґрунтовій культурі, то після відмивання коренів її витримують у водному розчині деякий час, протягом якого утворюються нові кореневі структури.

У водній культурі широко використовують скляний або пластиковий посуд місткістю 0,5; 1; 2, а також 3,5 л і більше. На живильних сумішах рослини вирощують декілька тижнів і спостерігають за їхнім ростом і розвитком. Вилучення будь-якого макро- чи мікроелемента з живильної суміші зумовлює певні зміни обміну речовин, гальмування росту, інколи загибель рослин, що дає змогу зробити висновки щодо необхідності даного елемента.

Мета роботи. Навчитися вирощувати рослини методом водної культури з вилученням деяких елементів живлення. Провести морфометричний аналіз проростків.

Матеріали, реактиви, обладнання. Насіння різних рослин, живильні розчини, мірні циліндри, колби, кювети з пластмасовими пластинками для вирощування рослин, пінцети, фільтрувальний папір, скляні трубки і гумові груші для продування повітря, скляні палички, ніж, чорний і білий папір для обгортання посудин, вата, кювети для пророщування насіння, чашки Петрі, термостат; універсальний індикатор (суміш індикаторів – метилового червоного, бромтимолового синього і фенолового червоного у співвідношенні 2:2:1).

Хід роботи.

1. Скляні банки місткістю 1÷3 л, або пластикові кювети міст-

кістю 1 л обгорнути світлонепроникним папером (чорним – всередину, а білим – назовні), щоб живильний розчин не перегрівався.

2. Потрібну кількість однорідних насінин замочити у слабкому розчині перманганату калію на 0,5÷2,0 год (залежно від виду рослин).

3. Насіння проростити у чашках Петрі на фільтрувальному папері змоченому водою за температури 24 °С до утворення корінців завдовжки 0,5÷0,7 см.

4. Підрахувати кількість пророслого і непророслого насіння та визначити його схожість.

5. Найжиттєздатніші проростки пересадити на пластинки з отворами так, щоб не пошкодити корінці.

6. У кювети налити необхідні живильні розчини (робота 68), пластинки з насінням закріпити над кюветами, щоб коренева система була занурена у живильний розчин.

Примітка. Рівень рідини в посудині під час дослідів не повинен змінюватися, а пластинка з рослинами не торкатися розчину в кюветі.

Щоденно крізь живильний розчин продувати повітря, що-тижня розчин замінювати на щойно приготовлений.

7. Визначити величину рН живильного розчину, яка має бути в межах 5,5÷6,5. У порцелянову чашку налити 2 мл розчину, додати 2 краплини універсального індикатора та порівняти одержаний колір із кольором стандартної шкали.

Примітка. Якщо потрібно, розчин підкислити слабким розчином лимонної кислоти або підлужити їдким натром.

За рослинами вести систематичні фенологічні спостереження і ретельно записувати їх у щоденник.

8. Провести морфометричний аналіз рослин: визначити висоту стебла, кількість і площу листків, масу сирої та сухої речовини кореневої та надземної частин рослини.

9. Кореневу систему рослин занурити у мірний циліндр з водою. Об'єм витісненої води (в мл) визначити за підняттям рівня води в циліндрі, що відповідатиме об'єму кореневої системи.

10. Одержані середньостатистичні дані записати у таблицю 5.4.

Таблиця 5.4. Морфометричний аналіз рослин

Об'єкт дослідження	Варіант досліджу	Висота рослин, см	Надземна частина				Коренева система			Зовнішній вигляд рослин
			кількість листків	площа листків, см ²	маса сирої речовини, г	маса сухої речовини, г	об'єм, см ³	маса сирої речовини, г	маса сухої речовини, г	
	Без азоту									
	Без калію									
	Без фосфору									

11. Зробити висновки про вплив різних елементів мінерального живлення на ріст і розвиток рослин у водній культурі.

Контрольні запитання та завдання

1. Назвіть основні переваги методу водної культури.
2. Для чого насіння перед висаджуванням замочують у слабкому розчині KMnO_4 ?
3. Як і для чого забезпечують процес аерації у водних культурах?
4. Навіщо закривають темними футлярами прозорі посудини водної культури від світла?
5. Які умови (температура, вологість) є оптимальними для вирощування рослин методом водної культури?
6. Якими методами вимірюють об'єм кореневої системи рослин?
7. Який розчин називають зрівноваженим?

Робота 69. ВПЛИВ КОРЕНЕВОЇ СИСТЕМИ НА pH ЖИВИЛЬНОГО РОЗЧИНУ

За умови вирощування рослин методом водної культури істотне значення має показник pH живильного розчину, адже активна кислотність суттєво впливає на процеси обміну, ріст і розвиток

рослин. Від того, які солі входять до складу живильного розчину (фізіологічно кислі чи фізіологічно лужні), залежить величина його pH. Зміну pH розчину в основному зумовлюють солі, до складу яких входить азот, бо він засвоюється рослиною швидше і у більшій кількості, ніж інші йони. Якщо в складі живильного розчину джерелом азоту буде *фізіологічно лужна сіль*, наприклад NaNO_3 , то розчин з часом стане лужним. Якщо використовувати *фізіологічно кислу сіль*, наприклад $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, показник pH зміниться на кислий. Крім того, коренева система здатна активно змінювати pH розчину, постійно виділяючи йони H^+ , органічні кислоти, а також за рахунок функціонування клітинних стінок, що мають йонообмінні властивості.

Мета роботи. Перевірити здатність корневих систем дослідних рослин змінювати показник pH розчину живлення.

Матеріали, реактиви, обладнання. Рослини (пшениця, кукурудза, горох та інші) з добре розвинутою кореневою системою, вирощені методом водної культури; розчин Кнопа; склянки місткістю 100÷150 мл, pH-метр.

Хід роботи.

1. Розчин Кнопа (робота 68) розбавити дистильованою водою у співвідношенні 1 : 10.

2. У п'ять склянок налити по 50 мл розбавленого розчину Кнопа.

3. Приготувати серію розчинів із величиною pH 4,0÷8,0.

Примітка. Для підкислення у розчин Кнопа додавати 0,1 н. розчин HCl , для під луження – NaOH .

4. П'ять пучків рослин з однаковим об'ємом кореневої системи помістити у склянки з живильним розчином.

Примітка. Об'єм кореневої системи контролюють згідно з роботою 69. Коренева система рослин повинна бути повністю занурена у розчин живлення.

5. Визначити pH живильного розчину у склянках через кожні 20 хв.

6. Результати записати у таблицю 5.5 і для кожного об'єкту досліджень побудувати графічну криву зміни pH живильного розчину.

Таблиця 5.5. Вплив кореневої системи рослин на рН живильного розчину

Об'єкт дослідження	рН розчину				
	початковий	через 20 хв	через 40 хв	через 60 хв	через 80 хв
	4				
	5				
	6				
	7				
	8				

Примітка. Хід досліду можна змінити, використовуючи розчини фізіологічно кислих і фізіологічно лужних або нейтральних солей. Інколи зміни показника рН у розчині живлення в лужну сторону не відбувається. Це може бути наслідком виділення органічних кислот кореневими системами рослин. Для визначення ступеня підкислення розчину кореневими виділеннями, контрольну групу рослин витримують у дистильованій воді, визначаючи рН через кожні 20 хв. Згідно отриманих результатів вносять відповідні поправки в дослід із розчином Кнопа або іншим середовищем живлення.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке фізіологічно кислі та фізіологічно лужні солі?
2. Як впливають фізіологічно кислі та фізіологічно лужні солі на ріст і розвиток рослин?
3. Як змінюється рН розчину під час вирощування рослин методом водної культури?
4. Яка сіль зумовлює зміну рН розчину?
5. Яке екологічне значення корневих виділень?
6. Що таке алелопатія?
7. Яким чином можна оптимізувати рН ґрунтового розчину в польових умовах?

Робота 70. ВПЛИВ РІЗНОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ ВОДНЕВИХ ЙОНІВ ЖИВИЛЬНОГО РОЗЧИНУ НА МОРФОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ РОСЛИН

Для досліду рекомендується брати рослини кінських бобів, оскільки вони дуже чутливі до рН розчину і погано ростуть у кислому середовищі. Зазвичай вже за два тижні рослини, вирощені на кислому середовищі з рН 3÷4 відстають у рості, на листках з'являються темні плями, що швидко засихають, а на 25-ту добу досліду – гинуть. У лужному середовищі (рН 8 і вище) симптоми пригнічення проявляються пізніше, переважно вони не формують генеративних органів, що негативно впливає на врожайність.

Мета роботи. За морфометричними показниками виявити вплив концентрації водневих йонів на стан рослин, з'ясувати оптимальну величину рН живильного розчину для вирощування кінських бобів методом водної культури, відзначити концентрації йонів водню, за яких пригнічується ріст рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Насіння кінських бобів; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4 , KCl , KH_2PO_4 , FeCl_3 , NaOH , CH_3COOH , NaOH , універсальний індикатор; посудини для водних культур, чашки Петрі, фільтрувальний папір.

Хід роботи.

1. Виростити проростки кінських бобів методом водної культури на 1/3 живильної суміші Кнопа до появи першої пари листків.

2. Приготувати серію живильних розчинів з рН 3÷9.

Примітка. Для підкислення середовища використовують слабкий розчин оцтової кислоти, а для підлуження – слабкий розчин луку.

3. Відібрати проростки і висадити у посудини згідно схеми досліду.

Примітка. Величину рН визначати за допомогою універсального індикатора та перевіряти через кожні 3 доби. Живильну суміш змінювати кожні 8÷10 діб.

4. Упродовж експерименту уважно спостерігати за станом дослідних рослин, вимірювати висоту надземної частини, об'єм

кореневої системи, довжину головного кореня та масу рослин (робота 69).

5. Одержані середньостатистичні дані записати у таблицю 5.6.

6. Зробити висновки.

Таблиця 5.6. Вплив рН живильного розчину на морфометричні показники кінських бобів

Величина рН	Термін експозиції, діб	Висота надземної частини, см	Об'єм кореневої системи, см ³	Довжина головного кореня, см	Маса рослини, г	Загальний стан рослини
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						

Контрольні запитання та завдання

1. Яке значення в живильному розчині мають кореневі виділення рослин?
2. Як реагує рослина на концентрацію йонів водню?
3. Які рослини відносять до індикаторів рН середовища? Назвіть рослини-індикатори кислих і лужних ґрунтів.
4. Що розуміють під ацидифікацією ґрунтів, води?
5. У чому полягає явище алкалізації середовища?
6. Які методи використовують на практиці для зміни та стабілізації рН?

Робота 71. ВИЗНАЧЕННЯ ОБ'ЄМУ КОРЕНЕВОЇ СИСТЕМИ МЕТОДОМ Д. А. САБІНІНА ТА І. І. КОЛОСОВА

Одним з показників, що характеризує кореневу систему, є її об'єм. Найпростіший і досить точний метод визначення об'єму

кореневої системи запропонували Д. А. Сабінін і І. І. Колосов. Полягає цей метод у визначенні кількості води, яку витісняють корені під час занурення їх у мірний циліндр. Відносна похибка методу близько 5 %. Об'єм коренів визначають спеціальним *об'ємоміром*, який легко виготовити у будь-якій лабораторії.

Мета роботи. Визначити об'єми кореневих систем рослин, вирощених у водній культурі (або інакше) і схарактеризувати фізіологічний стан рослин, відзначити вплив недостачі або надлишку певних елементів у водній культурі на ріст і розвиток рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Дослідні рослини; дистильована вода; об'ємомір, кристалізатор, штатив, бюретка, фільтрувальний папір.

Хід роботи.

1. Підготувати об'ємомір до роботи. На штативі вертикально закріпити скляну посудину (1) (рис. 5.2).

Нижню її частину (2) з'єднати гумовою трубкою (3) з градуйованою піпеткою на 1÷2 мл (4). На тому самому штативі під невеликим кутом прикріпити градуйовану піпетку. Складіть частини приладу вимити хромовою сумішшю, залити у нього дистильовану воду. Перевірити, чи працює прилад: у посудину (1) з во-

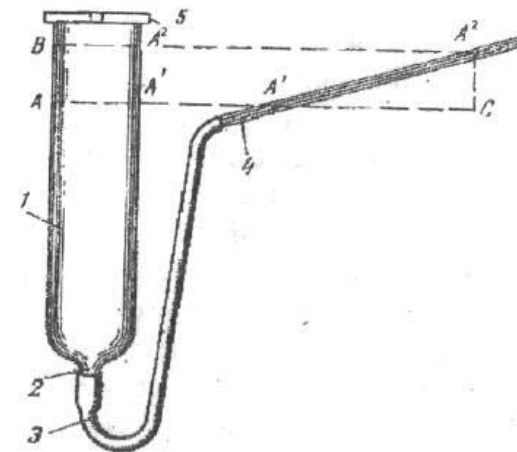


Рис. 5.2. Прилад для визначення об'єму коренів (за Д.А.Сабініним і І. І. Колосовим):
1 – циліндрична посудина;
2 – відтягнутий кінець посудини;
3 – гумова трубка;
4 – градуйована піпетка;
А – вихідний рівень води в циліндрі;
В – рівень води в циліндрі після занурення коренів;
А' – вихідне положення меніска у піпетці;
В' – положення меніска у піпетці після занурення коренів

дою занурити пробірку, при цьому меніск має переміщуватися у піпетці (4). Якщо меніск не рухається, то треба видалити повітря з гумової трубки.

2. Рослини, відібрані для аналізу, скласти у пучок, щоб кореневі шийки були на одному рівні. Корені злегка просушити фільтрувальним папером, відзначити положення меніска A' в піпетці (4).

3. Занурити кореневу систему рослин до кореневої шийки у воду. Рівень води у посудині підвищується, і меніск у піпетці підніметься до положення B' .

Примітка. Якщо відстань, яку проходить меніск $A'B'$ незначна, збільшують нахил (кут α) піпетки (4), підвищуючи чутливість приладу.

4. Корені рослин вийняти, зачекати поки вода стече в посудину.

Примітка. Якщо після стікання води меніск в піпетці буде нижче положення A' , в посудину обережно долити воду, щоб меніск зайняв це положення.

5. На штативі над посудиною закріпити бюретку з дистильованою водою.

6. Воду випустити в посудину, щоб меніск в піпетці зайняв положення B' . Долитий об'єм води з бюретки дорівнюватиме об'ємові кореневої системи досліджуваних рослин.

7. Визначення повторити тричі і обчислити середнє значення об'єму кореневої системи.

8. Результати досліджень записати у таблицю 5.7.

Таблиця 5.7. Визначення об'єму кореневої системи рослин

Об'єкт дослідження	Порядковий номер визначення	Положення меніску в піпетці, мл		Кількість доданої води з бюретки, мл	Об'єм кореневої системи, см^3
		A'	B'		
	1				
	2				
	3				
	середнє				

Контрольні запитання та завдання

1. Що може негативно вплинути на визначення об'єму кореневої системи за даним методом?

2. Чи можна правильно визначити об'єм корневих систем рослин, вирощених у ґрунтовій культурі?

3. Чи можна за об'ємом корневих систем проростків (наприклад, злаків) прогнозувати продуктивність рослин?

4. Як розрізняються ділянки кореневої системи рослини за кольором?

5. Як можна підвищити чутливість об'ємоміра Д. А. Сабініна та І. І. Колосова?

Робота 72. ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ, РОБОЧОЇ І НЕРОБОЧОЇ АДСОРБЦІЙНОЇ ПОВЕРХНІ КОРЕНЕВОЇ СИСТЕМИ

Речовини мінерального живлення надходять у рослину завдяки пасивному й активному поглинанню їх кореневою системою. Д. А. Сабінін та І. І. Колосов встановили, що явище *адсорбції* є першим етапом процесу поглинання та розробили метод визначення загальної поверхні корневих систем.

Загальна адсорбуюча поверхня коренів складається з активної робочої (поглинаючої) і неактивної поверхонь. *Активною робочою поверхнею* кореневої системи вважають ту, яка адсорбує речовини з навколишнього середовища, а потім десорбує їх усередину клітин кореня. *Неробочою поверхнею* вважають ту частину поверхні, яка поглинає речовини, але не десорбує їх углиб кореня.

Завдяки *амфотерності* біолоїдних систем поверхня живих клітин кореня має як позитивні, так і негативні заряди. Останніх більше, тому позитивні йони адсорбуються більше ніж негативні. Процес фізичної адсорбції відбувається швидко (майже миттєво), причому значна частина адсорбованих йонів може бути витіснена з поверхні кореня йонами того самого знака заряду, що є в зовнішньому розчині. Поверхню кореня, на якій відбувається адсорбція, називають *адсорбентом*, а речовину, що адсорбується, – *адсорбатом*. Залежно від характеру взаємодії між адсорбентом і адсорбатом виділяють *фізичну* і *хімічну* адсорбцію. На поверхні живих клітин адсорбція часто зумовлена фізичними та хімічними силами, тому різкої межі між видами адсорбції в даному разі немає. Поведінка адсорбованих молекул на поверхні адсорбента досить складна і залежить від багатьох факторів. Однак якщо

адсорбат вкриває поверхню шаром завтовшки в одну молекулу (мономолекулярна адсорбція), то дуже швидко припиняється поглинання речовин із розчину і можна визначити розміри площі, на якій ці йони адсорбуються.

Як адсорбат зручно використовувати метиленовий синій. Відомо, що 1 мг метиленового синього вкриває мономолекулярним шаром 1,1 м² поверхні адсорбенту. Кількість його, що адсорбується на поверхні кореневої системи з розчину, легко визначити колориметрично за зміною концентрації дослідного розчину. І. І. Колосов довів, що у разі дворазового 1,5-хвилинного занурення кореневої системи в 0,0002 н. розчин метиленового синього відбувається адсорбційне насичення неактивної й активної поверхонь. Під час третього 1,5-хвилинного занурення коренів метиленовий синій поглинається лише робочою поверхнею, яка раніше вже встигла провести всередину адсорбований метиленовий синій. Таким чином, кількість метиленового синього, поглинутого коренями під час першого та другого занурень, дає змогу обчислити площу загальної адсорбуючої поверхні, а під час третього – площу робочої поглинальної частини кореня.

Мета роботи. Використовуючи рослини, вирощені методом водної культури, визначити, як умови мінерального живлення впливають на формування загальної, активної робочої і неробочої поверхонь.

Матеріали, реактиви, обладнання. 25÷30-добові проростки пшениці, жита, кукурудзи (рослини з мичкуватою кореневою системою), вирощені методом водної культури на повному живильному розчині; 0,0002 н. розчин метиленового синього, 1 н. розчин NaOH, 1 н. розчин H₂SO₄, дистильована вода; склянки, місткість яких дещо більша за розміри кореневої системи дослідних рослин, гумова груша для продування повітря, скляні банки для розчинів лугу, кислоти і води, скляні трубки, гумові трубки, склянки, фотоелектроколориметр (ФЕК).

Хід роботи.

1. Відібрати 25÷30 рослин і визначити об'єм їхньої кореневої системи (робота 72). Корені виняти з води і обережно просушити фільтрувальним папером.

2. У три циліндри налити у 10 разів більше, ніж об'єм коренів,

0,0002 н. розчин метиленового синього. Циліндри пронумерувати, об'єм налитого розчину записати в таблицю 5.9.

3. Корені рослин послідовно занурити у три циліндри з метиленовим синім на 1,5 хв. у кожен.

Примітка. Під час занурень кореневої системи у розчин метиленового синього стежити, щоб інші органи рослини не контактували з ним.

4. Визначити оптичну густину розчинів у циліндрах 1, 2, 3, використовуючи червоний світлофільтр ФЕКа (товщина кювети 5 мм).

Примітка. За стандартний використовують вихідний 0,0002 н. розчин метиленового синього, розведений у 10 разів. Перед колориметруванням дослідні розчини також розводять дистильованою водою у 10 разів.

5. Побудувати калібрувальний графік: приготувати не менше чотирьох розведень стандартних розчинів і їх колориметрувати; на міліметровому папері накреслити систему координат, відкладаючи по осі абсцис концентрацію розчинів, а по осі ординат – показники ФЕКа (оптичну густину).

6. Визначити концентрацію дослідного розчину: знайти на осі ординат калібрувального графіку відповідну точку, провести від неї горизонтальну лінію до перетинання з графіком і провести перпендикуляр на вісь абсцис.

7. Отримані результати записати у таблицю 5.8.

Таблиця 5.8. Визначення концентрації метиленового синього у стандартному та дослідному розчині

Об'єкт дослідження	Оптична густина розчинів у циліндрах, ум. од.			Концентрація розчинів у циліндрах (згідно калібрувального графіка)		
	1	2	3	1	2	3

8. Об'єм розчину в циліндрах (табл. 5.9) помножити на концентрацію розчинів (табл. 5.8) і обчислити кількість метиленового синього до і після занурення коренів.

9. За різницею одержаних величин обчислити кількість фарби, адсорбованої кореневою системою.

Примітка. Адсорбована кількість метиленового синього із циліндрів 1 і 2 характеризує загальну адсорбуючу поверхню коренів, із циліндра 3 – активну робочу адсорбуючу поверхню.

10. Помножити кількість адсорбованого метиленового синього в міліграмах на 1,1 (1 мг метиленового синього вкриває мономолекулярним шаром 1,1 м² поверхні кореневої системи) та обчислити площу поверхні кореневої системи в квадратних метрах.

11. За різницею між загальною й активною робочою поверхнями обчислити площу недіяльної поверхні коренів.

12. Одержані дані записати у таблицю 5.9.

Таблиця 5.9. Визначення адсорбуючої поверхні коренів

Об'єм розчину в циліндрах, мл	Кількість метиленового синього в розчинах, мг				Адсорбована кількість метиленового синього коренями рослин із циліндрів, мг			Площа адсорбуючої поверхні кореня, м ²		
	до занурення коренів		після занурення коренів в циліндри		1	2	3	загальна	активна робоча	недіяльна
		1	2	3						

13. Кореневу систему після занурення в третій циліндр з метиленовим синім промити у дистильованій воді і занурити в склянку з 0,3 н. розчином CaCl₂.

Примітка. Спостерігають обмінну адсорбцію, йони Ca²⁺ обмінюються на йони метиленового синього, і розчин у циліндрі набуває синього забарвлення.

Контрольні запитання та завдання

1. Схарактеризуйте механізми поглинання мінеральних речовин коренями рослин.

2. Що таке адсорбція і абсорбція?

3. Що розуміють під загальною адсорбуючою поверхнею кореневої системи?

4. Що таке робоча адсорбуюча поверхня кореневої системи?

5. На чому ґрунтується принцип методу визначення загальної і робочої поверхні коренів за Д. А. Сабініним і І. І. Колосовим?

Робота 73. ВИЯВЛЕННЯ АНТАГОНІСТИЧНОГО ВПЛИВУ ЙОНІВ НА РІСТ І РОЗВИТОК РОСЛИН

Антагонізмом йонів називають таке явище, коли однойменно заряджені йони конкурують між собою під час поглинання їх рослинами. Антагонізм виявлений між йонами однакової та різної валентності. Найбільше він проявляється між одно- та двовалентними катіонами, наприклад, між калієм і кальцієм.

Антагонізм йонів можна пояснити їхньою конкуренцією за місця адсорбції на поверхні плазмалеми, за переносники й активні центри ферментів, а також протилежною дією на гідратацію білків, в'язкість і проникність цитоплазми тощо.

Чисті солі, взяті ізольовано, дуже шкідливо впливають на рослинний організм. Ті самі солі, але в суміші за певного співвідношення, сприяють процесам росту та розвитку рослин.

Мета роботи. З'ясувати вплив різних йонів на процеси життєдіяльності рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Проростки злакових; розчини KCl (9 г/л) і CaCl₂ (6,7 г/л) – обидва розчини готують із хімічно чистих солей на бідистильованій воді, бідистильована вода; кювети місткістю 250÷500 мл, порцелянові чашки, чашки Петрі, піпетки градуйовані, пінцети, ножиці, фільтрувальний папір, олівець по склу, лінійки.

Хід роботи.

1. У порцелянову чашку відібрати 30 однакових проростків і декілька разів промити їх бідистильованою водою.

2. Три кювети обгорнути щільним папером і пронумерувати.

3. У першу кювету налити 200 мл CaCl₂, у другу – 200 мл KCl, у третю – 100 мл KCl і 100 мл CaCl₂.

4. Висадити по 10 рослин у кожен кювету та помістити їх на світло.

5. За тиждень виміряти довжину коренів і надземної частини рослин, середні значення із 10 вимірів записати у таблицю 5.10.

Таблиця 5.10. Вплив йонів K^+ і Ca^{2+} на морфометричні показники проростків рослин

Варіант досліду	Середня довжина, см	
	надземної частини	коренів
KCl		
$CaCl_2$		
$KCl+CaCl_2$		

6. Зробити висновки щодо дії йонів калію та кальцію на ріст і розвиток проростків.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке антагонізм йонів?
2. Чим пояснити неоднаковий ріст проростків на розчинах окремих солей і на суміші, яка містить одно- і двовалентні катіони?
3. Які органи рослин найчутливіші до змін йонного складу живильного середовища?
4. Яке значення антагонізму йонів у продуктивності рослин?
5. Як можна послабити антагонізм йонів на ріст рослин?

Робота 74. АНТАГОНІСТИЧНИЙ ВПЛИВ ЙОНІВ K^+ і Ca^{2+} НА ЦИТОПЛАЗМУ РОСЛИННОЇ КЛІТИНИ

Питання про причини антагоністичного впливу йонів на рослинний організм – одне із найважливіших у теорії кореневого живлення – на сьогодні залишається остаточно не дослідженим. Встановлено, що *йони-антагоністи* не лише протилежно впливають на фізико-хімічні властивості протоплазми та на певні ланки обміну речовин, а й конкурують за участь в органічному комплексі та ферментативному каталізі. Класичними прикладами антагонізму є конкуренція між йонами калію та кальцію, натрію

та калію, амонію та калію, а також між різними двовалентними катіонами. Прояви антагонізму різноманітні, а приклади його численні: рослини, які вирощують на середовищі із високим вмістом калію, фосфору й заліза, страждають від недостатньої кількості фосфору; у рослин, які отримали помірні дози заліза і калію, за високого вмісту фосфору розвивається апікальний хлороз і ознаки нестачі калію в старих листках; молібден гальмує надходження заліза й уповільнює його рух у верхній частині рослин. Таким чином, формування високих врожаїв із високою якістю продукції залежить не лише від кількості поживних речовин, а й від співвідношення елементів мінерального живлення.

Мета роботи. Виявити антагонізм йонів калію та кальцію на цитоплазму рослинної клітини.

Матеріали, реактиви, обладнання. Синя цибуля; 1 М розчин KNO_3 , 1 М розчин $Ca(NO_3)_2$; мікроскопи, предметні стекла й покривні скельця, скальпелі, леза бритв, препарувальні голки, скляні палички, невеликі скляні бюкси з притертими кришками.

Хід роботи.

1. У три бюкси з притертими кришками налити по 5 мл 1 М розчину KNO_3 , 1 М розчину $Ca(NO_3)_2$ та суміш розчинів, що складається з 9 частин першого і 1 частини другого

$$\left(\frac{1 \text{ М } KNO_3}{1 \text{ М } Ca(NO_3)_2} = \frac{9}{1} \right).$$

2. У розчини занурити шматочки епідерми луски цибулі, клітини якої забарвлені пігментами у фіолетовий колір.

3. За 30 хв. зрізи виїняти і розглянути під мікроскопом.

Примітка. У клітинах епідерми зрізів, які були в розчині нітрату калію, спостерігатиметься ковпачковий плазмоліз. Це – результат впливу на цитоплазму йонів калію. В клітинах епідерми, що зазнали впливу йонів кальцію, ковпачкового плазмолізу не буде. В клітинах епідерми, які перебували в третьому розчині, ковпачковий плазмолізу також не спостерігається. Отже, за сумісної дії, йони кальцію мають антагоністичний вплив на йони калію. Незначна кількість йонів кальцію у розчині з йонами калію повністю нівелює вплив останнього на цитоплазму.

Дослід можна ускладнити, якщо приготувати кілька розчинів нітрату калію з нітратом кальцію. Їх змішують у співвідношенні: 90:10; 91:9; 92:8; 93:7; 94:6; 95:5; 96:4; 97:3; 98:2 і 99:1. Залежно від фізіологічного стану клітин антагоністичний вплив кальцію на йони калію припиняється, коли концентрація Ca^{2+} буде в межах від 1/35 до 1/60 загальної концентрації солей.

4. Результати спостережень записати у таблицю 5.11.

Таблиця 5.11. Вивчення антагоністичного впливу йонів K^+ і Ca^{2+} на цитоплазму рослинної клітини

Варіант досліду	Тривалість експозиції, год	Наявність плазмолізу	Форма клітини
1 M KNO_3			
1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$			
$\frac{1 \text{ M } \text{KNO}_3}{1 \text{ M } \text{Ca}(\text{NO}_3)_2} = \frac{9}{1}$			

5. Зробити висновки щодо отриманих результатів.

Контрольні запитання та завдання

1. Які фізіологічні механізми формування антагонізму йонів у рослин?
2. Наведіть приклади антагоністичного впливу йонів на рослини?
3. Яке фізіологічне значення антагонізму йонів для рослин?
4. На чому ґрунтується виявлення антагоністичної дії йонів калію та кальцію на цитоплазму рослинної клітини?
5. Чи впливає рН середовища на формування антагонізму йонів?

Робота 75. ФІЗІОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ (БОРУ ТА МАНГАНУ) У ЖИТТІ РОСЛИН

Мікроелементи виконують важливі функції у життєдіяльності рослин. Зокрема, вони беруть участь в окисно-відновних про-

цесах, фотосинтезі, азотному і вуглеводневому обміні, входять до складу активних центрів ферментів і вітамінів, підвищують стійкість рослин до хвороб і несприятливих факторів довкілля. Нестача мікроелементів може зумовити низку захворювань і призвести до загибелі рослин у ранньому віці.

Досліди проводять з водними культурами. Рослинні об'єкти вибирають з урахуванням їхніх потреб у певних мікроелементах. Для експерименту рекомендується використовувати рослини льону, коноплі, кінських бобів, оскільки досліди з ними нетривалі у часі (2÷5 тижнів) і дають показові результати.

Мета роботи. Виявити вплив мікроелементів на стан і морфометричні показники рослин за умов нестачі різних мікроелементів.

Матеріали, реактиви, обладнання. Насіння льону, конопель, кінських бобів; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4 , KCl , KH_2PO_4 , FeCl_3 , H_3BO_3 , MnSO_4 ; посудини для водних культур, чашки Петрі, фільтрувальний папір, мірні колби та піпетки, ваги, лінійки.

Хід роботи.

1. Рослини виростити на живильній суміші Кнопа, приготовленої на дистильованій воді, до появи корінців завдовжки 1,0÷1,5 см.

2. Відібрати однорідні паростки і перенести їх у посудини з різним складом живильних розчинів згідно зі схемою досліду (табл. 5.12).

Примітка. Бор слід вносити у вигляді борної кислоти (H_3BO_3) або бури (NaB_4O_7), а манган – у вигляді сірчаноокислого мангану (MnSO_4).

Живильні розчини треба змінювати на ранніх етапах онтогенезу рослин кожного тижня, а на пізніших – кожні десять діб.

3. Провести фенологічні спостереження за станом дослідних рослин: виміряти висоту надземної частини, об'єм кореневої системи, довжину головного кореня та масу рослини (робота 69).

4. Одержані середньостатистичні дані записати у таблицю 5.12.

Таблиця 5.12. Вплив бору та мангану на морфометричні параметри рослин

Склад живильної суміші	Доза мікроелементів, мг/л		Рослинний об'єкт	Висота надземної частини, см	Довжина головного кореня, см	Об'єм кореневої системи, см ³	Маса рослини, г
	бору	мангану					
Повна живильна суміш (без бору та мангану) контроль	–	–					
Повна живильна суміш (з бором та манганом)	0,3	0,4					
Повна живильна суміш (з бором)	0,3	–					
Повна живильна суміш (з манганом)	–	0,4					

5. Зробити висновки щодо отриманих результатів.

Контрольні запитання та завдання

1. Яке фізіологічне значення мікроелементів для рослин?
2. Які характерні симптоми проявляються у рослин за нестачі мангану?
3. До яких наслідків призводить борне «голодування»?
4. Від яких факторів залежить вплив мікроелементів на ріст і продуктивність рослин?

Робота 76. ХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ СОКУ РОСЛИН (за методом К. П. Магницького)

Визначення вмісту елементів живлення рослин за методом К. П. Магницького ґрунтується на їхній властивості утворювати з певними сполуками кольорові розчини або осаді. Наразі інтенсивність забарвлення порівнюють з паперовою еталонною кольоровою шкалою або зі шкалою стандартних розчинів, які одночасно з соком рослин обробляють однаковими реактивами.

Існує певний взаємозв'язок між вмістом у тканинах окремих елементів. За умови значної нестачі азоту в соку міститься багато мінерального фосфору (гальмуються процеси переходу його в органічні форми). За нестачі калію й мангану спостерігається підвищений вміст мінеральних сполук азоту та фосфору. Аналіз клітинного соку у польових умовах дає змогу контролювати динаміку живлення рослин та визначати їх потреби у певних мінеральних елементах.

Аналізуючи отримані результати, слід враховувати особливості видів і сортів рослин, взятих для аналізу. Наприклад, у листках зернових значно більше фосфору, а нітратів менше порівняно з черешками листків картоплі.

Під час діагностичних визначень особливу увагу звертають на відбір проб для аналізу. Рослин, що мають типовий вигляд для певної території, відбирають із трьох – п'яти ділянок. Дослідні ділянки розміром 50÷100 м² мають бути однорідними за рельєфом, агротехнікою й удобренням. За час вегетації з кожної ділянки беруть по одній пробі.

Склад і об'єм проби може варіювати залежно від культури. У картоплі, помідорів, буряка, кукурудзи, соняшника, тютюну, капусти проби беруть не менше ніж із шести рослин – по одній листовій пластинці однакового фізіологічного віку. У картоплі, помідорів, тютюну беруть листки, що закінчили ріст: до початку процесу бутонізації – 2÷3-й листок, під час цвітіння та пізніше – 3÷4-й листок нижнього ярусу. У буряка, турнепсу, капусти у молодому віці пробу беруть із зовнішніх листків розетки. Пізніше, коли листки зовнішнього ярусу відмирають, відбирають листки, що стоять напіввертикально і вже закінчили ріст. У плодово-ягідних культур проби беруть під час інтенсивного росту пагонів. У зернових культур у початкових фазах розвитку для аналізу беруть всю рослину, а у фазі трубкування – 2÷4-й листок нижнього ярусу.

Для контролю за живленням рослин проби беруть починаючи з молодого віку, аналіз повторюють через 1÷2 тижні залежно від культури. Наступні аналізи проводять відповідно до певних етапів розвитку рослин.

Проби беруть о 8÷11-й годині ранку. Якщо аналіз проводять не на полі, рослини вміщують у целофанові пакети з відповідними етикетками.

Для занять можна також використати рослини, вирощені

методом водних культур на середовищах живлення різного складу.

Мета роботи. Ознайомитися з діагностичним методом К. П. Магницького. За отриманими результатами дати рекомендації щодо підживлення рослин, що потребують певних мінеральних елементів.

Матеріали, реактиви, обладнання. Проби рослинного матеріалу, взяті з поля, або рослини, вирощені в лабораторії методом водних культур на живильних розчинах із дефіцитом деяких елементів; польова лабораторія К. П. Магницького.

Приготування реактивів польової лабораторії К. П. Магницького:

- *Змішаний концентрований стандартний розчин, який містить азот, фосфор, калій, магній, хлор.* Для приготування розчину беруть 7,22 г нітрату калію, 0,18 г гідроортофосфату калію, 6,05 г хлориду калію, 1,01 г сульфату магнію і розчиняють у 1 л дистильованої води. З цього розчину готують три стандартних розчини менших концентрацій: в мірні колби місткістю 100 мл наливають 10, 25 і 50 мл концентрованого розчину. Об'єм доводять водою до позначки і додають 4÷5 краплин толуолу чи хлороформу. Можна приготувати стандартний розчин. Для цього раніше зазначені наважки розчиняють у 100 мл води.

- *Сухий реактив на нітратний азот.* Беруть 100 г сульфату барію, 10 г сульфату мангану, 2 г цинкового пилю, 75 г лимонної кислоти, 4 г сульфанілової кислоти, 2 г альфа-нафтиламіну. Компоненти, до того як змішати у певній послідовності, розтирають у ступці кожен окремо. Усі вказані реактиви змішують окремо з невеликою кількістю сульфату барію (крім лимонної кислоти). Потім усі реактиви з лимонною кислотою включно ретельно змішують. Правильно приготовлений реактив має світло-сіре забарвлення. Поява рожевого чи червоного забарвлення вказує на те, що один із реактивів має домішки солей азотної кислоти і не може використовуватися для аналізів. Реактив зберігають у пофарбованій у чорний колір в склянці, щільно закритій корковою пробкою.

- *Буферний розчин.* До 10 мл оцтової кислоти і 3 г ацетату натрію поволі додають воду, ретельно перемішують і доводять водою до 100 мл.

- *Реактив на фосфор.* 1 г молібдату амонію розчиняють у

20 мл дистильованої води за нагрівання, фільтрують гарячим. Коли розчин охолоне, додають, помішуючи, 20 мл концентрованої соляної кислоти і доводять об'єм водою до 200 мл.

- *Реактив на калій.* 3 г дипікриламіна магнію і 1,3 г оксиду магнію розчиняють у 100 мл дистильованої води, витримують 15÷20 год і фільтрують.

- *Розбавлена соляна кислота.* Концентровану соляну кислоту розбавляють водою у співвідношенні 1 : 5.

- *Реактив на магній.* 10 мг титанового жовтого розчиняють у 5 мл води і 15 мл етилового спирту.

- *1 %-й розчин крохмалю.* В 100 мг крохмалю додають кілька краплин води і розмішують до стану пасти, поволі додають 10 мл окропу.

- *10 %-й розчин NaOH.*

- *Реактив на хлор.* 4,8 г нітрату срібла розчиняють у 1 л дистильованої води. 1 мл цього розчину осаджує 1 мг хлору. Розчин зберігають у склянці з темного скла.

- *Індикаторний папір на хлор.* Фільтрувальний папір насичують 10 % розчином хромовокислого калію, висушують, нарізають квадратами розміром 0,5×0,5 см.

Хід роботи.

1. Для приготування витяжки 2 г рослинного матеріалу подрібнити, додати 0,5 г активованого вугілля, 6 мл води, розтерти у ступці.

Примітка. Сік для аналізу краще вичавлювати з черешків листків. Якщо черешок довгий, використовують його нижню частину. Сік збирають у пробірки або у заглиблення в пластинках. Якщо черешки малі, а з листків вичавити сік важко (або він інтенсивно забарвлений), готують водну витяжку, в яку додають активоване вугілля. Вугілля, поглинаючи пігменти, освітлює витяжку. В основному такий спосіб використовують для аналізу зернових, овочевих і плодово-ягідних культур, кормових трав.

2. Розтерту масу загорнути у шматок щільної тканини і пресом вичавити витяжку у пробірку.

Примітка. Якщо потрібно, використовують паперовий фільтр. Враховують, що витяжка, порівняно з соком, буде розведена у чотири рази.

Щоб визначити фосфор і магній, сік розвести водою у співвідношенні 1:3 (у разі використання витяжки розведення не потрібне).

3. Визначити у витяжці хлор: реактив на хлор розвести водою в чотири рази.

4. Визначити калій і азот: чотири краплини витяжки перенести у заглиблення пластинки, випарити на сонці (або інакше) до сухого залишку, додати краплину води і провести аналіз згідно з інструкцією.

5. Результати аналізу записати у міліграмах елементу на 1 кг соку або в умовних балах (величина балу відповідатиме номеру стандартного розчину).

Примітка. Якщо забарвлення досліджуваного соку інтенсивніше за забарвлення останнього стандартного розчину, то сік розводять водою (на краплину соку краплину води). Відповідно до розведення збільшують результати.

Увага! Треба враховувати, що кольорові плями на папері রাখовані для краплин соку і реактиву однакового розміру – близько 0,04 мл. Використовуючи шкали стандартних розчинів, розмір краплин також має бути однаковим.

Для зручності у польовій лабораторії є змішані стандартні розчини, які вміщують усі елементи у відомій концентрації. Нумери стандартних розчинів від першого до четвертого йдуть у порядку збільшення концентрації усіх елементів.

6. Після відбору проби крапельницю ретельно промити водою, залишки вилучити фільтрувальним папером.

7. Результати аналізу розрахувати користуючись таблицею 5.13 або за надписами під шкалою кольорових плям.

Таблиця 5.13. Розрахунок результатів аналізу на окремі елементи під час порівняння зі шкалою стандартних розчинів або з паперовою еталонною кольоровою шкалою

Номер стандартного розчину	Бал	Характеристика вмісту елементів	Вміст елементів, мг/кг соку			
			нітратний азот	фосфор	калій	магній
1	1	Дуже низький	100	16	600	40
2	2	Низький	250	40	1500	100
3	3	Помірний	500	80	3000	200
4	4	Високий	1000	160	6000	400

Примітка. Концентрація фосфору та магнію в стандартних розчинах у чотири рази нижча, ніж вказано у табл. 5.13. Для аналізу на ці елементи використовують сік, розведений у чотири рази водою, тому дані таблиці відповідають концентрації соку.

8. Зробити висновки щодо отриманих результатів.

Визначення нітратного азоту.

Вміст нітратного азоту значно вищий у стеблах і черешках, ніж у листкових пластинках.

- *Визначення на зрізах рослин (якісне визначення).* На зріз стебла або черешка насипати сухий реактив на азот об'ємом, що дорівнює зерну жита, і розтерти іншою частиною зрізу стебла. Чим швидше з'явиться забарвлення і чим воно яскравіше, тим більше нітратів у рослинах.

- *Визначення в клітинному соку рослин (кількісне визначення).* У заглиблення порцелянової пластинки насипати реактив на азот об'ємом, що дорівнює зерну жита, додати по три краплини буферного розчину. У перший ряд заглиблень пластинки додати по одній краплині змішаних стандартних розчинів, а до тих, що залишилися, додати по одній краплині клітинного соку досліджуваних рослин. Розмішати і за 1 хв. порівняти забарвлення досліджуваних соків зі шкалою стандартних розчинів. Результати використовують для практичних рекомендацій.

Наприклад, для одержання високого врожаю картоплі, вміст нітратного азоту в клітинному соку стебел або черешків має дорівнювати 4 балам. Під час цвітіння він не повинен бути нижче 3 балів, за 1÷2 бали підживлюють аміачною селітрою (0,5÷1,5 ц/га).

Визначення фосфору.

Як загальна кількість фосфору, так і відносний вміст різних його форм в окремих частинах рослини бувають неоднаковими і змінюються залежно від виду рослин, дії зовнішніх і внутрішніх факторів.

- У заглиблення порцелянової пластинки, що має кілька рядів заглиблень, ввести по одній краплині соку, розведеного водою у співвідношенні 1:3.

- У перший ряд заглиблень додати по одній краплині з чотирьох змішаних стандартних розчинів.

- У всі заглиблення з пробами додати по дві краплини реактиву на фосфор.

- Вміст розмішати олов'яною паличкою (олово теж реактив), поки забарвлення не стане стійким – не зникатиме близько 10 с. Отримане забарвлення соку порівняти зі шкалою стандартних розчинів або з кольоровою паперовою шкалою.

Розведення клітинного соку водою зменшує концентрацію органічних кислот, які заважають утворенню синього забарвлення в результаті реакції.

Визначення калію.

Деякі види рослин потребують дуже багато калію (наприклад, картопля). У результаті реакції на калій утворюється осад помаранчево-червоного забарвлення.

- У заглиблення другого ряду пластинки внести по краплині соку.
- У перший ряд заглиблень додати по краплині з чотирьох змішаних стандартних розчинів.
- До соку і стандартних розчинів додати по краплині реактиву на калій і соляну кислоту. Суміш перемішати.
- Забарвлення проб порівняти зі шкалою стандартних розчинів (або плямами на папері).

Наприклад, для високого врожаю картоплі вміст калію в клітинному соку стебла до і під час бутонізації має бути високим (4 бали), під час цвітіння – не нижче 3 балів. За 1÷2 бали рослини підживлюють калійними добривами, що містять незначну кількість хлору: каліймагнєзією – 2÷3 ц/га, хлоридом калію – 0,5÷1,0, золою – 5÷10 ц/га.

Визначення магнію.

У разі взаємодії титанового жовтого з гідроксидом магнію розвивається жовто-червоне забарвлення.

- Одну краплину соку розвести водою у співвідношенні 1:3.
- В один ряд заглиблень порцелянової пластинки внести по одній краплині стандартних розчинів.
- Додати послідовно по краплині титанового жовтого і перемішати, потім по краплині 1 %-го розчину крохмалю (свіжоприготовленого), їдкою натру.
- Порівняти забарвлення зі шкалою стандартних розчинів або кольоровою паперовою шкалою.

Наприклад, для картоплі під час бутонізації вміст магнію має відповідати 3÷4 балам. Якщо до і під час бутонізації мають 1 бал,

то на 1 га вносять 1÷2 ц каліймагнєзії, на кислих ґрунтах доломітову муку (5÷10 ц/га).

Визначення хлору.

Вміст хлору в рослинах залежить від багатьох факторів. Надлишок хлору негативно позначається на фізіологічному стані рослин, зокрема, у картоплі різко знижується врожайність і крохмалистість бульб.

- У заглиблення пластинки помістити невеликі кружечки індикаторного паперу і додати по одній краплині соку.
- Краплинами додати реактив на хлор, щоразу перемішуючи скляною паличкою, поки не з'явиться стійке коричневе забарвлення. Використану кількість краплин реактиву відмітити в таблиці 5.14.

Хлор титрують у нейтральному середовищі. Вільні органічні кислоти (якщо вони є) нейтралізують сухим реактивом CaCO_3 . Якщо на титрування однієї краплини соку використано 1÷3 краплини нітрату срібла, вміст хлору для картоплі та деяких інших культур є нормальним. П'ять і більше краплин свідчать про появу ознак токсичності, зниження врожаю. У разі високого вмісту хлору в період бутонізації і одночасно низькому вмісті нітратів рослини підживлюють азотними добривами (аміачною селітрою або гноївкою). Завдяки антагонізму між йонами нітрати зменшують надходження хлору.

- Результати аналізів на хлор розрахувати за таблицею 5.14.

Таблиця 5.14. Розрахунок результатів аналізу на хлор за шкалою стандартних розчинів

Кількість краплин	1	2	3	4	5	6
Вміст хлору на 1 л, мг	0÷1	1÷2	2÷3	3÷4	4÷5	5÷6

Контрольні запитання та завдання

1. Якими методами можна визначити ступінь забезпеченості рослини основними мінеральними елементами?
2. При дефіциті кремнію рослини пшениці страждають від ураження грибковими хворобами і часто гинуть. Чи свідчить це про те, що кремній один з основних елементів живлення пшениці?

3. Одна з ознак нестачі азоту – пожовтіння у першу чергу, старих листових пластинок. Дефіцит заліза зумовлює міжжилковий хлороз у молодих листків. Чому нестача азоту й заліза позначається на формуванні тканин різного віку?

4. За якими правилами здійснюють підживлення рослин мікроелементами?

Робота 77. ВИЗНАЧЕННЯ НІТРАТІВ У РОСЛИНАХ І СУБСТРАТАХ ЖИВЛЕННЯ МЕТОДОМ ГРАНВАЛЬ-ЛЯЖУ

Корені рослин поглинають нітрати з ґрунту. Азот нітратів відновлюється у рослині до аміаку через ряд етапів, кожний з яких регулюється відповідними ферментами – *нітратредуктазою*, *нітрипрeredуктазою*, *гіпонітрипрeredуктазою*, *гідроксиламінредуктазою*. Аміак зв'язується кетокислотами (*α-кетоглутаровою*, *щавлевооцтовою* і *піровиноградною*) і утворюються первинні амінокислоти – *глутамінова*, *аспарагінова*, *аланін*. Внаслідок переамінування з первинних амінокислот утворюються інші амінокислоти. Ці біохімічні процеси відбуваються у клітинах коренів, проте частина нітратів проходить крізь паренхіму в судини ксилеми кореня без змін і транспортуються з висхідним током до листових пластинок. Там відбувається *фотохімічне відновлення* їх до аміаку. У разі недостатнього освітлення, надлишку азотних добрив у ґрунті та інших причин нітрати накопичуються в рослинах у значних кількостях (листовий салат у теплицях може набирати до 10000 мг на 1 кг сирої маси і більше). Це має негативний вплив на тварини і людей, у разі використання таких рослин в їжу. Таким чином, визначати вміст нітратів необхідно для якісної оцінки рослинної продукції. Крім того, можна мати уяву про активність ферментативних процесів у кореневій системі, нітратредуктазну активність клітин мезофілу листків тощо.

Визначення нітратів методом Гранваль-Ляжу ґрунтується на тому, що розчин нітрату за дії дисульфофенолової кислоти набуває жовтого забарвлення. Метод можна використовувати також для визначення вмісту нітратів у субстратах живлення.

Мета роботи. Визначити кількість нітратів у органах різних рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Картопля, капуста, морква, бегонія тощо; стандартний розчин KNO_3 , дисульфофенолова кислота, H_2SO_4 (конц.), 14%-й розчин аміаку; колби місткістю 50 (25) мл, ступки, хімічні склянки, порцелянові чашки, водяна баня, паперові фільтри, колонка з катіонітом КУ-1, ФЕК.

Приготування реактивів:

- *дисульфофенолова кислота*: 3 г чистого кристалічного фенолу змішати з 37 г (20,1 мл) концентрованої сірчаної кислоти (питома вага 1,84). Колбу з сумішшю закрити пробкою зі скляною трубкою, поставити на 6 год на водяну баню за температури 100 °С;

- *стандартний розчин KNO_3* (в 1 мл розчину міститься 0,01 мг NO_3^-): в 1 л колбі розчинити 0,1631 г сухого хімічно чистого KNO_3 у дистильованій воді, довести водою до мітки.

Хід роботи.

1. Наважку 1 г (свіжого) або 0,2 г (сухого) рослинного матеріалу розтерти в ступці до гомогенного стану.

2. Отриману масу кількісно перенести в мірну колбу місткістю 50 (25) мл і довести водою до мітки. Інкубувати впродовж 15 хв.

3. Суспензію перелити у хімічну склянку, додати дві краплі концентрованої сірчаної кислоти і нагрівати 5÷7 хв. на киплячій водяній бані.

4. За 15 хв. витяжку відфільтрувати крізь паперовий фільтр. Фільтрат пропустити крізь колонку з катіонітом КУ-1 в H^+ -формі.

5. За допомогою раніше наведених інструкцій з витяжки видалити органічні сполуки, які можуть заважати визначенню нітратів.

Примітка. Фільтрат крізь колонку з катіонітом проходить зі швидкістю одна крапля за 1 с. Якщо фільтрат залишається забарвленим, процедуру повторюють. Якщо час обмежений, а особлива точність не потрібна, для подальшого аналізу використовують фільтрат з водного гомогенату.

6. 10 мл досліджуваного розчину випарити на водяній бані у порцеляновій чашці, охолодити.

7. У порцелянові чашки додати 1 мл дисульфофенолової кислоти, ретельно змиваючи за допомогою скляної палички все дно чашки, і інкубувати впродовж 10 хв.

8. Додати 10 мл води, а потім із бюретки додати розчин аміаку до виникнення стійкого зелено-жовтого забарвлення.

9. Розчини з чашок кількісно перенести у мірні колби місткістю 50÷100 мл, довести дистильованою водою до мітки, визначити оптичну густину за допомогою ФЕК (товщину кювети вибирають залежно від інтенсивності забарвлення).

10. Для побудови калібрувальної кривої зі стандартного розчину виготовити серію розчинів менших концентрацій: 1000, 500, 250, 125 і 10 мг NO_3^- /л.

11. По 10 мл свіжовиготовлених стандартних розчинів KNO_3 налити у порцелянові чашки, випарити. Аналіз проводити за раніше наведеною послідовністю.

12. Побудувати калібрувальний графік, за допомогою якого визначити вміст нітратів у пробах.

Контрольні запитання та завдання

1. Як зовнішні та внутрішні фактори впливають на вміст нітратів у різних органах рослин?

2. Де і як нітратна форма азоту у рослині перетворюється на амонійну?

3. Чи впливає робота промислових підприємств на концентрацію нітрат-йонів у рослині?

4. Чи можуть нітрати проявляти токсичну дію на ріст, розвиток і продуктивність рослин?

5. Для чого контролюють вміст нітратів і нітритів у рослинній біомасі, воді, молоці?

Робота 78. СПРОЩЕНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ НІТРАТІВ У РОСЛИНАХ

Одним із методів визначення нітратів є використання реакції нітрат-йону з дифеніламіном, під час якої розвивається синє забарвлення. За інтенсивністю посиніння роблять висновок щодо кількості нітратів у об'єкті дослідження.

Мета роботи. Використовуючи напівкількісний швидкий метод, провести порівняльне визначення вмісту нітратів у різних рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Картопля, капуста, буряк столовий, морква тощо; 1 %-й розчин дифеніламіну в концентрованій сірчаній кислоті, контрольний розчин нітратів (1,631 г хімічно чистого сухого KNO_3 розчиняють у воді та доводять до 1 л); ручний прес для вичавлювання соку з рослин, чашки Петрі, піпетки, скальпелі.

Хід роботи.

1. З контрольного розчину нітратів виготовити стандартні розчини концентрацією: 1000, 500, 250, 125, 10 мг/л.

2. Чашку Петрі поставити на білий папір, на дно чашки нанести по краплині стандартних розчинів різної концентрації, а також краплину соку досліджуваної рослини, вичавлюючи її ручним пресом.

Примітка. Замість краплини соку можна використати гомогенну масу, отриману з рослинної проби в об'ємі краплини.

3. До стандартних розчинів і клітинного соку додати по одній краплині дифеніламінового реактиву.

Примітка. Поява синього забарвлення свідчить про наявність нітратів. Впродовж 1÷2 хв. забарвлення змінюється, тому оцінювати його треба відразу, порівнюючи зі стандартними розчинами.

Під час виконання цієї роботи доцільно вивчати такі питання: як впливає освітлення на вміст нітратів у різних органах рослин; в яких органах рослини перетворюються нітрати; як відновлюються нітрати в злакових і бобових рослинах.

4. Результати дослідів оцінити за шкалою стандартних розчинів нітратів і записати у таблицю 5.15.

Таблиця 5.15. Визначення вмісту нітратів у рослинах

Об'єкт дослідження	Умови вирощування	Фаза онтогенезу	Вміст нітратів (середнє з трьох повторностей), мг/л			
			у листку	у стеблі	у корені	сумарний

Контрольні запитання та завдання

1. Як пояснити зменшення вмісту нітратів у рослині, що перебуває на світлі?
2. Які ферментні системи відповідають за відновлення нітратів?
3. Чому нітрити не накопичуються в тканинах рослин?
4. Чи можна одержати азотові добрива з повітря й чому їх так не добувають у промислових масштабах?
5. Які форми азоту доступні для рослин?

Робота 79. ВИЗНАЧЕННЯ ПОГЛИНАННЯ РОСЛИНАМИ НІТРАТІВ І АМОНІЇ

У рослин азот входить до складу білків, нуклеїнових кислот, гормонів росту, багатьох вітамінів, хлорофілу та інших життєво важливих органічних сполук. Дефіцит азоту у рослин гальмує ріст, утворення бічних пагонів, послаблює синтез хлорофілів, при цьому нижні листки рослин набувають жовтого, помаранчевого або червоного забарвлення, з'являються некрози.

З ґрунту рослини поглинають як амонійну NH_4^+ , так і нітратну NO_3^- форму азоту. У ґрунті йони NO_3^- рухливі й тому легко вимиваються ґрунтовими водами. Йони NH_4^+ менш рухливі, добре адсорбуються ґрунтовими колоїдами, тому концентрація NH_4^+ значно вища ніж NO_3^- .

Процес засвоєння тієї або іншої форми залежить від багатьох факторів. У результаті вибіркового поглинання рослинами йонів з розчину відбувається зміна рН останнього. Нерівномірне поглинання аніонів і катіонів із мінеральних солей зумовлює фізіологічну кислотність або лужність солі.

Солі, з розчину яких коренева система поглинає аніони, є *фізіологічно лужними*, якщо поглинаються катіони – *фізіологічно кислими*.

Процес поглинання рослинами амонійної і нітратної форм азоту виявляють за зміною концентрації їх у живильному розчині. Для цього готують розчини певного складу, методом водної культури вирощують на них рослини, а потім визначають концентрацію амонію і нітратів.

Мета роботи. Вивчити вплив рН живильного розчину на інтенсивність поглинання нітратної і амонійної форм азоту рослинами.

Матеріали, реактиви, обладнання. Рослини, вирощені у водних культурах; стандартний розчин KNO_3 , видозмінене середовище Кнопа (в г/л: $Ca(NO_3)_2$ – 0,100; KH_2PO_4 – 0,025; $MgSO_4$ – 0,012; NH_4NO_3 – 0,010; KCl – 0,017), фенолят натрію C_6H_5ONa , фосфатна буферна суміш (рН 12), 0,05 %-й розчин нітропрусиду натрію $Na_2[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$ (готують перед використанням з 1 %-го розчину), хлорнуватистокислий натрій (4 % за хлором), дисульфофенолова кислота, 14 %-й розчин аміаку; склянки місткістю 200÷300 мл, чорний і білий папір, порцелянові чашки, піпетки, бюретки, ФЕК.

Приготування реактивів:

- *стандартний розчин KNO_3* (в 1 мл розчину міститься 0,01 мг NO_3^-): в 1 л колбі розчинити 0,1631 г сухого хімічно чистого KNO_3 в дистильованій воді, довести водою до мітки;
- *дисульфофенолова кислота*: 3 г чистого кристалічного фенолу змішати з 37 г (20,1 мл) концентрованої сірчаної кислоти (питома вага 1,84). Колбу з сумішшю закрити пробкою зі скляною трубкою, поставити на 6 год на водяну баню за температури 100 °С;
- *розчин аміаку*: 28 %-й розчин аміаку з питомою вагою 0,9 розводять дистильованою водою до 14 %-ї концентрації.

Хід роботи.

Визначення поглинання рослинами нітратів.

1. У склянки налити певний об'єм розчину KNO_3 (в 1 мл розчину міститься 0,01 мг NO_3^-). Відмітити рівень, до якого налито розчин. Склянки обгорнути спочатку чорним, потім білим папером.

2. У розчин нітрату калію занурити кореневі системи рослин і залишити на 2÷3 год за кімнатної температури.

3. Через 2÷3 год виїняти рослини з живильного розчину, рідину в банках довести до попереднього об'єму, доливаючи дистильовану воду до заздалегідь зробленої позначки.

Примітка. Доливаючи воду, одночасно змивають залишки розчину з кореневої системи рослини у склянку.

4. Визначити концентрацію NO_3^- методом Гранваль-Ляжу (колориметрування з дисульфофеноловою кислотою).

- У дві порцелянові чашки налити по 10 мл розчину KNO_3 (у першу стандартного – до початку експерименту, а в другу досліджуваного – після експозиції з рослинами).

- Розчини повністю випарити на водяній бані й охолодити.

- У порцелянові чашки налити по 1 мл дисульфогенолової кислоти, ретельно змиваючи за допомогою скляної палички все дно чашки, і залишити на 10 хв.

- Долити по 15 мл дистильованої води, а потім з бюретки додати розчин аміаку до виникнення стійкого зелено-жовтого забарвлення.

- Розчини з чашок кількісно перенести у мірні колби місткістю 100 мл, довести дистильованою водою до мітки, визначити оптичну густину за допомогою ФЕК (товщину кювети вибирають залежно від інтенсивності забарвлення).

5. Порівняти початкову та кінцеву концентрації NO_3^- у склянках.

Визначення поглинання рослинами амонію.

1. У дві склянки налити по 50 мл видозміненого розчину Кнопа.

2. Рослини промити дистильованою водою, корені просушити фільтрувальним папером і занурити у живильний розчин, щоб насінини залишилися зверху.

3. Склянки з рослинами зважити і поставити на світло на 30 хв.

4. Повторно зважити склянки. Масу склянок довести до початкової, доливаючи дистильовану воду.

5. Рослини вийняти з розчину і виміряти об'єм їхньої кореневої системи (робота 72).

6. Визначити концентрацію NH_4^+ методом Дюбошинського.

- У дві мірні колби місткістю 25 мл налити таку кількість розчину живлення (у першу стандартного, до початку експерименту, а в другу – досліджуваного, після експозиції з рослинами), щоб під час доведення до об'єму 25 мл концентрація азоту в ньому була $0,02 \pm 0,40$ мг/мл.

- У кожну колбу послідовно додати: фенолят натрію $\text{C}_6\text{H}_5\text{ONa}$ – 2,5 мл, фосфатну буферну суміш (рН 12) – 2,5 мл, 0,05 %-й розчин нітропрусиду натрію $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 мл, хлорноватистокислий натрій (4 % за хлором) – 0,5 мл.

Примітка. У разі взаємодії амонію, фенолу та хлорноватистокислого натрію утворюються похідні індофенолу, забарвлені в синій колір. Інтенсивність забарвлення зберігається кілька го-

дин. Як каталізатор реакцій використовують нітропрусид натрію.

- Вміст колб перемішати, довести об'єм розчину водою до риски, залишити у темряві на 30 хв.

- Визначити оптичну густину розчинів за допомогою ФЕК (світлофільтр червоний, товщину кювети вибирають залежно від інтенсивності забарвлення).

7. Обчислити вміст амонійного азоту, що залишився у склянках після експозиції рослин та поглинутого кореневою системою.

Примітка. У разі потреби роботу можна ускладнити, готуючи живильні розчини з різним значенням рН, або витримуючи рослини за різної температури. Можна вивчати також вплив інших факторів.

Контрольні запитання та завдання

1. У якій формі азот поглинається рослиною з ґрунту?

2. Яка з форм азоту є більш рухливою і доступнішою для рослин?

3. Що таке фізіологічно кислі та фізіологічно лужні солі?

4. Яким чином йони водню впливають на поглинання поживних елементів кореневою системою?

Робота 80. ВИЗНАЧЕННЯ НІТРАТНОГО ТА АМОНІЙНОГО АЗОТУ В РОСЛИНАХ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

Метод ґрунтується на вимірюванні активності йонів йон-селективними електродами в пробі, що суспензована в 1 %-му розчині алюмокалієвого галууну. Співвідношення проби і алюмокалієвого галууну 1 : 4 для свіжого рослинного матеріалу та 1 : 100 для сухого рослинного матеріалу.

Мета роботи. Визначити вміст нітратного та амонійного азоту у рослинному матеріалі потенціометричним методом.

Матеріали, реактиви, обладнання. Свіжий або сухий рослинний матеріал; 1 %-й розчин алюмокалієвого галууну, стан-

дартні розчини KNO_3 , NH_4Cl ; рН-метр (рН-121 або ЕВ-74), мембранні електроди ЕМ- NH_4 -01, ЕМ- NO_3 -01, допоміжний електрод з літєво-ацетатним ключем.

Приготування реактивів.

- *1%-й розчин алюмокалієвого галуу:* 10 г алюмокалієвого галуу розчиняють у дистильованій воді й доводять об'єм до 1 л.

1 %-й розчин галуу готують у достатній кількості, бо він потрібний як для екстрагування, так і для виготовлення стандартних розчинів. Якщо галун готують заново, то заново готують і стандартні розчини, а також будують новий калібрувальний графік.

- *Стандартні розчини нітрату калію:* 10,11 г нітрату калію (перекристалізованого, висушеного за температури 105 °С) розчиняють в 1 %-му розчині алюмокалієвого галуу в мірній колбі на 1 л, доводять об'єм до мітки і одержують 0,1 М розчин. З цього розчину послідовним 10-кратним розведенням 1 %-м розчином галуу готують стандартні розчини KNO_3 з концентрацією 0,01 М; 0,001 М; 0,0001 М, які використовують для калібрування приладу (табл. 5.17).

Для виготовлення стандартних розчинів, потрібних для визначення нітратів, готують вихідний 0,1 н. розчин, який можна зберігати впродовж місяця.

- *Стандартні розчини хлориду амонію:* готують їх так само, як і стандартні розчини нітрату калію (табл. 5.16).

Стандартні розчини амонійних солей довго не зберігають, їх готують лише у день проведення аналізу.

Хід роботи.

Визначення азотистих сполук у сухому рослинному матеріалі.

1. Сухий рослинний матеріал подрібнити до розміру часток 1 мм.

2. Із середньої проби взяти наважку 0,5 г і помістити її в колбу місткістю 100÷200 мл.

3. Додати 50 мл 1 %-го розчину алюмокалієвого галуу, закрити корком і суспензувати на качалці 30 хв.

4. В отриманій суспензії визначити вміст амонійного та нітратного азоту.

Визначення азотистих сполук у свіжому рослинному матеріалі.

1. Свіжий рослинний матеріал подрібнити ножицями і відібрати середню пробу.

2. Наважку рослинного матеріалу (12,5 г) розтерти у ступці до гомогенного стану і перенести в колбу місткістю 100÷200 мл.

3. Додати 50 мл 1 %-го розчину алюмокалієвого галуу.

4. Пробу витримати на качалці 30 хв.

5. У суспензії визначити вміст амонійного та нітратного азоту.

Визначення вмісту амонійного та нітратного азоту.

Активність йонів амонію визначити за допомогою мембранного електрода ЕМ- NH_4 -01, який селективний за наявності натрію, але малоселективний в присутності калію.

1. Приготувати стандартні розчини в мірних колбах місткістю 100 мл з вихідних розчинів хлориду амонію концентрацією 0,1 н. і 0,01 н. (табл. 5.16).

2. Скласти електрохімічний ланцюг допоміжного електрода з літєво-ацетатним ключем і електрода ЕМ- NH_4 -01.

3. Виміряти ЕРС стандартних розчинів і побудувати два калібрувальні графіки – для розчинів із вихідною концентрацією 0,1 н. і 0,01 н.

4. Занурити електроди в суспензію, отриману з дослідного матеріалу, і через 5 хв. виміряти ЕРС.

5. Визначити вміст нітратів (табл. 5.17) за допомогою електрода ЕМ- NO_3 -01.

Примітка. У склянці приладу знаходиться три електроди – два індикаторних і один допоміжний. Індикаторні електроди вмикають по чергово.

Таблиця 5.16. Виготовлення стандартних розчинів для визначення вмісту йонів амонію

Концентрація розчинів	Номер колби								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Хлорид амонію 0,01 н., мл	1	3	5	10	–	–	–	–	–
Хлорид амонію 0,1 н., мл	–	–	–	–	3	5	10	30	50
Активність йонів амонію	0,1	0,3	0,48	0,95	2,85	4,7	8,9	27,1	42,8
Концентрація йонів амонію, мг-екв/л	0,1	0,3	0,5	1,0	3,0	5,0	10,0	30,0	50,0

Таблиця 5.17. Виготовлення стандартних розчинів для визначення вмісту нітратного азоту

Концентрація розчинів	Номер колби										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0,001 н. розчин нітрату калію на 1 %-й розчин галууну, мл	5	8	10	30	–	–	–	–	–	–	–
0,01 н. розчин нітрату калію на 1%-й розчин галууну, мл	–	–	–	–	5	8	10	30	50	80	100
Концентрація нітрат-йонів, мг-екв/л	0,05	0,08	0,1	0,3	0,5	0,8	1,0	3,0	5,0	8,0	10,0

Примітка. Для побудови калібрувальних графіків, можна використовувати й інші концентрації хлориду амонію та нітрату калію.

6. Вміст амонію та нітратів розрахувати за формулою:

$$X = C(100B + bP) / (100H - bP),$$

де X – кількість розчину, мг-екв/л; C – концентрація йона, мг-екв/л; B – об'єм екстрагента, мл; b – вологість проби, г /г сухої речовини; P – наважка, г.

Контрольні запитання та завдання

1. Якими методами можна визначати амонійний та нітратний азот у рослинах?
2. Для чого визначають кількість сполук мінерального азоту в рослинній біомасі?
3. Чому після грозового дощу кількість окиснених азотних сполук у ґрунті та в тканинах рослин збільшується?
4. Чи можна підживлювати рослини сполуками азоту за допомогою літаків?
5. Назвіть позитивні й негативні наслідки обробки посівів азотними добривами.

Робота 81. ВИЗНАЧЕННЯ НІТРИТІВ (NO_2) У РОСЛИНАХ

Нітроти у рослинних організмах утворюються у результаті редукції нітратів, вони дуже нестійкі і швидко відновлюються до аміаку. Визначають вміст нітритів використовуючи *метод Гриса*, який ґрунтується на здатності цих азотистих сполук взаємодіяти з альфа-нафтиламином і сульфаніловою кислотою з утворенням діазосульфанілової кислоти рожево-червоного забарвлення. Переваги методу: реактив Гриса дуже чутливий до найменших концентрацій нітритів у розчині і на його точність не впливає наявність органічних сполук. Тому інколи цей метод зручно використовувати для загального визначення нітратів і нітритів. Для цього нітрати відновлюють до нітритів в слабо-кислому середовищі. Далі аналіз проводять за методом Гриса.

Мета роботи. Визначити рівень накопичення нітритів у різних рослинних об'єктах та порівняти їх з кількістю нітратів.

Матеріали, реактиви, обладнання. Рослинний матеріал; розчин параанілінсульфокислоти, розчин альфа-нафтиламіну в оцтовій кислоті, нітритний реактив, стандартний розчин нітриту натрію; колби місткістю 25÷200 мл, пробірки, ступки, хімічні склянки, порцелянові чашки, паперові фільтри, ФЕК.

Приготування реактивів.

- *розчин параанілінсульфокислоти:* 0,5 г хімічно чистої сульфанілової кислоти розчиняють в 100 мл оцтової кислоти густиною 1,01 (розчин I);

- *розчин альфа-нафтиламіну в оцтовій кислоті:* 0,1 г альфа-нафтиламіну кип'ятять з 20 мл дистильованої води і проціджують через бавовняну тканину в 180 мл оцтової кислоти з питомою вагою 1,04 (розчин II);

- *нітритний реактив:* змішують однакові об'єми розчинів I і II, суміш готують у невеликих кількостях безпосередньо перед аналізом. Якщо під час змішування утворюється червоне забарвлення додають цинкового пилю, збовтують і фільтрують;

- *стандартний розчин нітриту натрію:* 1,499 г NaNO_2 (двічі перекристалізованого і висушеного до сталої ваги за 85 °С) розчиняють в 1 л дистильованої води – 1 мл такого розчину містить 1 мг NO_2^- .

Хід роботи.

1. Приготувати з рослинного матеріалу розчини методом Гранваль-Ляжу (Робота 78).
2. Одночасно підготувати кілька розчинів різних концентрацій з основного стандартного розчину нітриту натрію.
3. До 8 мл досліджуваного розчину (отриманого методом Гранваль-Ляжу) додати 0,8 мл нітритного реактиву і довести об'єм до 10 мл.
4. Через 15 хв. проби колориметрувати за допомогою ФЕК і порівняти інтенсивність червоного забарвлення досліджуваного і стандартного розчинів.
5. Результати дослідів записати у табл. 5.18.

Таблиця 5.18. Визначення нітритів у рослинах

Варіант досліджу	Оптична густина розчинів, ум. од		Кількість нітритів у розчинах, мг	
	стандартний	досліджуваний	стандартний	досліджуваний

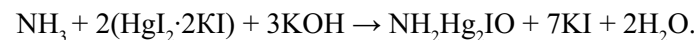
Контрольні запитання та завдання

1. Яке значення нітритів у метаболізмі рослин?
2. Чи є різниця між процесами накопичення нітратів і нітритів у рослинному організмі?
3. Які норми вмісту нітратів і нітритів у рослинній продукції?
4. Назвіть види азотних добрив. Які з них вважаються найкращими?
5. Чи вносять азотні добрива дощуванням? У чому переваги та недоліки цього агротехнічного заходу?

Робота 82. ВИЗНАЧЕННЯ АМІАКУ З ВИКОРИСТАННЯМ РЕАКТИВУ НЕСЛЕРА

Метод зручний для визначення поглинальної здатності кореневої системи, бо виконується досить швидко і легко. *Реактив Неслера* складається з подвійної солі йодиду ртуті і йодиду калію ($\text{HgI}_2 \cdot 2\text{KI}$), розчиненої у розчині KOH . Аміак з реактивом Несле-

ра дає сполуку – йодид меркурамонію, яка за незначних кількостей аміаку в розчині забарвлює його в жовтий колір, а за значних – у червоно-жовтий. Відбувається наступна реакція



Солі кальцію і магнію, якщо вони є у дослідному розчині, заважають колориметричному визначенню аміаку за допомогою реактива Неслера, бо утворюють осад. Негативну дію цих солей знешкоджують додаванням до дослідного розчину перед уведенням в нього реактиву Неслера 1÷2 мл 50 %-го водного розчину сегнетової солі.

Мета роботи. Визначити інтенсивність поглинання амонію кореневою системою рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Рослини (бажано з мичкуватою кореневою системою), вирощені на водній культурі; вода без аміаку (отримують перегонкою дистильованої води, підкисленої сірчаною кислотою; для колориметричних досліджень таку воду готують додаванням соди до слабколужного розчину і випарюванням близько 1/4 її об'єму; воду без аміаку використовують для виготовлення усіх наступних розчинів), 50 %-й розчин сегнетової солі, 20 %-й розчин NaOH або KOH , реактив Неслера, контрольний розчин хлориду амонію, контрольний розчин для фотоелектроколориметра; склянки місткістю 100÷200 мл, ФЕК.

Приготування реактивів:

- *реактив Неслера*: розчин хлорної ртуті (17 г в 300 мл) впливають в розчин йодиду калію (35 г в 100 мл), доки червоний осад йодистої ртуті не розчиниться. Тоді розчин доводять до 1 л 20 %-м розчином лугу і знову додають розчин хлориду ртуті, поки не з'явиться осад, що не зникає. Розчин витримують до повного просвітління і зберігають у щільно закритій колбі. Його колір повинен бути світло-жовтим, якщо він не має кольору – додають хлорид ртуті. Час від часу чутливість реактиву перевіряють слабким розчином хлориду амонію. Зберігають у темряві;

- *контрольний розчин хлориду амонію*: у воді розчиняють 0,7405 г чистого NH_4Cl і доводять до 1 л, 10 мл цього концентрованого розчину розбавляють водою до 500 мл. Розчин містить 0,005 мг NH_4^+ (або 0,0047 мг NH_3 в 1 мл);

• *контрольний розчин для фотоелектроколориметра*: 10 мл контрольного розчину хлориду амонію розбавляють водою до 90 мл, додають 4 мл реактиву Неслера і доводять водою до 100 мл. Готують одночасно з розчином для досліду.

Хід роботи.

1. У склянки, обгорнуті чорним, а зверху білим папером, налити фіксований об'єм відповідного живильного розчину, який має йони амонію.

2. Корені рослин занурити в живильний розчин, склянки зважити.

3. Витримати 30 хв. на світлі за кімнатної температури (залежно від складності досліду вплив факторів навколишнього середовища можна урізноманітнити).

4. Об'єм розчину у стаканах довести дистильованою водою без аміаку до початкового.

5. Рослини обережно вийняти і визначити вміст аміаку.

Примітка. Якщо досліджуваний розчин безбарвний і немає солей, що протидіють реакції, то аміак визначають без попередньої перегонки. В іншому випадку певну кількість розчину довести до лужного стану содою і перегнати у колбу з дистильованою водою.

6. Встановити приблизну концентрацію досліджуваного розчину – до кількох мілілітрів його в пробірці додати реактив Неслера. Якщо утворився осад, розчин розбавити і знову випробувати.

Примітка. Колір розчину повинен бути світло-жовтим. Якщо він темно-жовтий, або червоний, то це свідчить про те, що розчин занадто концентрований.

7. Відібрати 5 мл досліджуваної рідини, довести водою без аміаку до 40 мл, додати 1÷2 мл сегнетової солі і 2 мл реактиву Неслера. Об'єм довести до 50 мл.

Примітка. У разі необхідності об'єм досліджуваної рідини збільшити.

8. Приготувати контрольний колориметричний розчин.

9. За 15 хв. визначити оптичну густину розчинів за допомогою ФЕК.

10. За отриманими даними визначити кількість амонію, поглинутого кореневою системою, порівняти з контрольним розчином для ФЕК, враховуючи, що зменшення величини екстинкції свідчить про надходження амонію в рослину.

Контрольні запитання та завдання

1. Солі яких йонів заважають визначенню аміаку реактивом Неслера?

2. Що таке амоніфікація?

3. Як температура і світло впливають на процес надходження йонів амонію в рослину?

4. Які фактори впливають на надходження амонію в рослину?

5. Як метаболізується амоній в рослині?

Робота 83. ВИЯВЛЕННЯ РАДІОАКТИВНИХ ЕЛЕМЕНТІВ У РОСЛИН МЕТОДОМ РАДІОАВТОГРАФІЇ

У сучасних екологічних умовах визначення радіоактивних елементів у рослинних організмах набуває особливої актуальності. У природних умовах рослини містять незначну їх кількість, однак після Чорнобильської катастрофи концентрація радіоактивних елементів у рослинних тканинах може бути значною. Визначити вміст цих сполук за допомогою спеціальних приладів (дозиметрів) досить важко через їхню недостатню чутливість, тому застосовують *авторадіографічний метод*. Наразі слабке радіоактивне випромінювання тривалий інтервал часу впливає на чутливу поверхню фото- чи рентгенівської плівки, після проявлення якої можна розпізнати місця локалізації радіоактивних речовин у досліджуваній частині рослини.

Мета роботи. Виявити радіоактивні елементи у різних органах рослин, порівняти їхній вміст у рослин, вирощених на ґрунтах різного насичення ізотопами.

Матеріали, реактиви, обладнання. Дослідні рослини; фотопластинки або рентгенівська плівка, реактиви для проявлення, гранульований хлорид кальцію (для ексикаторів); парафіновий папір, чорний цупкий папір, термостат, скляні пластинки, затискачі, ексикатори.

Хід роботи.

Увага ! Проводячи аналіз слід пам'ятати, що волога негативно впливає на фотоматеріали. Тому досліджуваний рослинний

об'єкт слід висушити або покласти між рослиною і фотопластинкою водонепроникний матеріал (парафіновий папір, синтетичні плівки).

1. Для аналізу використовують верхні та нижні листки рослин. Половину досліджуваного матеріалу попередньо висушити у термостаті за температури 70...80 °С. Перед тим як листки покласти в термостат, їх вміщують між двома скляними чи картонними пластинками, скріпленими пластмасовими затискачами.

2. Висушені в темній кімнаті листки покласти на фотопластинку, підклавши спочатку аркуш тонкого паперу (щоб не пошкодити емульсію). Листок притиснути скляною пластинкою і зафіксувати затискачами.

3. Обгорнути чорним папером і покласти в екзикатор (з гранульованим хлоридом кальцію) для експозиції у темному місці.

4. Другу частину всіх листків покласти на фотопластинки без попереднього висушування. Водонепроникний листок чи поліетиленову плівку розмістити між пробою і фотопластинкою. Далі хід роботи такий самий, як і з висушеними листками.

5. Експозиція триває близько двох місяців, після чого фотопластинку (або плівку) проявити згідно з інструкцією та порівняти уміст радіоактивних речовин.

6. Зробити висновки.

Примітка. Аналіз досить тривалий і його слід виконувати у два етапи: на початку семестру закласти проби на експозицію, а під кінець проявити фотопластинки.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке радіоактивні ізотопи?
2. Які ізотопи та в яких кількостях входять до складу рослин у природних умовах?
3. Які ізотопи можуть з'явитися у рослинних об'єктах унаслідок антропогенного впливу?
4. Чи шкідливі для тварин і людини ізотопи, що містяться в рослинах?
5. Як можна запобігти надходженню радіоактивних елементів у рослини, використовуючи явище антагонізму йонів?
6. Які радіоактивні елементи «подарувала» рослинам аварія на ЧАЕС? Скільки років зберігатиметься у ґрунтах і рослинах цей «дарунок»?

Контрольні запитання та завдання до розділу «Кореневе живлення рослин»

1. Назвіть основні функції поживних елементів. Як їх класифікують?
2. Що таке методи штучних культур (водних, піщаних, ґрунтових)?
3. Які діагностичні прийоми застосовують для визначення потреб рослин в елементах мінерального живлення?
4. Охарактеризуйте фізіологічне значення елементів-органогенів, макро- та мікроелементів для рослин.
5. Яка будова та функції кореня рослини?
6. Як відбувається поглинання поживних речовин кореневою системою?
7. Що таке вибіркова проникність?
8. Назвіть механізми транспортування йонів по рослині?
9. Порівняйте симпластний та апопластний транспорт речовин.
10. Що таке антагонізм, синергізм і адитивність йонів?
11. Яке екологічне значення корневих виділень рослин?
12. Як властивості ґрунту впливають на процес кореневого живлення рослин?
13. Як відбувається надходження поживних речовин до верхніх коренів?
14. Як реагує рослина на концентрацію йонів водню?
15. Що таке «фізіологічно кислі» та «фізіологічно лужні» солі?
16. Назвіть етапи кругообігу азоту в природі.
17. Дайте характеристику основним джерелам азотного живлення вищих рослин?
18. Схарактеризуйте шляхи асиміляції азоту в рослинах.
19. Які ферментні системи беруть участь у відновленні нітратів?
20. Яке значення мають процеси амоніфікації та нітрифікації для живлення рослин?
21. Яким чином можна визначити потреби рослин в елементах живлення?
22. Назвіть фізіологічні основи застосування мінеральних добрив.
23. Що таке гідропоніка й аеропоніка?

24. Які ознаки рослин свідчать про нестачу елементів живлення?

25. Чому мінеральні добрива можуть бути джерелом забруднення довкілля? Яким чином цього можна уникнути?

Розділ 6.

СТІЙКІСТЬ РОСЛИН

Робота 84. СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОЗНАКИ ПРИСТОСУВАННЯ РОСЛИН ДО НЕСТАЧІ ВОДИ. ЯРУСНА МІНЛИВІСТЬ КСЕРОМОРФНИХ ОЗНАК (закон В.Р. Заленського).

Для підтримання рівноваги між надходженням і витрачанням води в рослинах сформувалась складна та ефективна система морфолого-структурних й анатомо-фізіологічних пристосувань. Вони властиві представникам різних екологічних груп рослин, проте найрізноманітніші вони у ксерофітів. В.Р. Заленський виявив закономірне наростання структурно-функціональних ознак ксероморфності в листках кожного наступного ярусу рослини – від нижнього до верхнього, що і визначає градацію підвищення посухостійкості в цьому напрямку. За його даними, вище розташовані листки різняться від нижче розташованих більшою кількістю продихів на одиницю поверхні і меншими розмірами, густішою сіткою водоносних структур, краще розвинутою палісадною паренхімою, підвищеною концентрацією клітинного соку, меншою товщиною листків тощо.

Визначення кількості продихів на одиницю поверхні листків різних ярусів є відносно простим і доступним методом, що демонструє ярусну мінливість ксероморфних ознак.

Мета роботи. Встановити залежність між кількістю продихів на одиницю листової поверхні та висотою розташуванням листків на пагоні. Переконатися, що наростання ксероморфних ознак корелює з ускладненням водозабезпечення листків вищих ярусів і забезпечує більш інтенсивну транспірацію.

Матеріали, реактиви, обладнання. Рослини пеларгонії; трирічні гілки сосни північноамериканської з хвоїнками; мікроскопи, предметні скельця й накривні скельця, скляні палички, склянки з водою, лінійки.

Хід роботи.

Завдання 1. Визначення кількості продихів у епідермі листків пеларгонії різних ярусів.

Для демонстрування закону В. Р. Заленського на лабораторному занятті можна обмежитись визначенням однієї анатомічної ознаки ксероморфності – кількості продихів на одиницю поверхні. При цьому для обчислення продихів в кожному листку вибирають ділянку, яка розташована посередині між основою і верхівкою, а також між центральною жилкою і краєм листової пластинки.

1. В зошиті замалювати 10÷15 кіл (4 см діаметром), що відображають поля зору мікроскопа.

2. З нижнього боку найнижчого листка пеларгонії відірвати шматочок епідерми.

3. Розмістити його у воді на предметному склі і накрити накривним скельцем.

4. Розглянути препарат за великого збільшення.

5. Схематично відзначити на одному з накреслених у зошиті кіл усі продихи, що видно у полі зору.

6. Підрахувати кількість продихів і записати під колом.

7. Такі ж дослідження провести з епідермою листків вище розташованих ярусів.

8. Кількість продихів у полі зору мікроскопа записати під відповідним колом, кожне з яких імітує це поле.

9. Обчислити значення середніх арифметичних кількості продихів у полі зору мікроскопа для листків усіх ярусів.

10. Отримані дані, а також результати досліджень інших студентів записати у таблицю 6.1.

Таблиця 6.1. Кількість продихів у полі зору мікроскопа у епідермі листків, розташованих на різних ярусах

Об'єкт	Ярус				
	1	2	3	4	5

Завдання 2. Визначення кількості продихів для шпилькових.

Якщо для дослідів використовувати хвою сосни, то під мікроскопом потрібно розглядати кожну хвоїнку на малому збільшенні у відбитому світлі. Якщо розглядають хвою найстаршу – (тре-

тього або четвертого року) беруть найнижче розташовану. Однорічну хвою беруть з найнижче розташованих ярусів (визначення в хвоїнці проводять в трьох зонах; знизу, посередині і зверху) і в кожній з цих зон визначення проводять для двох хвоїнок. Таким чином, у дослідника буде 18÷22 поля зору мікроскопа.

1. У зошиті намалювати кола діаметром 5÷7 см – поля зору мікроскопа.

2. На колі відмітити, яку його частину займає хвоїнка у полі зору мікроскопа.

3. Визначити ширину частин поля зору мікроскопа, зайнятих двома хвоїнками (на малюнку, см).

4. Обчислити кількість продихів в 1 см ширини малюнка.

Примітка. Необхідно поділити кількість продихів на ширину хвої (на малюнку) в сантиметрах (довжина однакова – діаметр поля зору). Ці величини потрібно визначити з точністю до десятичного знака.

5. Отримані середньостатистичні дані, а також результати досліджень інших студентів записати у таблицю 6.2.

Таблиця 6.2. Кількість продихів у полі зору мікроскопа у епідермі шпилькових різного віку

3-річна хвоя			2-річна хвоя			1-річна хвоя		
низ	середина	верх	низ	середина	верх	низ	середина	верх

Завдання 3. Визначення кількості продихів у епідермі хвої північноамериканської сосни (Pinus ponderosa).

Особливо зручно демонструвати закон В.Р. Заленського на хвої північноамериканської сосни (*Pinus ponderosa*), в якій за малого збільшення мікроскопа у відбитому світлі добре видно ряди блискучих цяток–продихів.

1. На малюнку відзначити, яке положення займає хвоїнка в полі зору мікроскопа.

2. Визначити кількість рядів з продихами по ширині хвоїнки, а потім кількість продихів у кожному рядку, пересуваючи його на діаметр поля зору.

3. У зошиті, де відмічали положення хвоїнки в полі зору мікроскопа, провести дотичні і одержати прямокутники, які є

збільшеними в однакову кількість разів для всіх частин хвоїнки.

4. Визначити площу прямокутників на малюнку та загальну кількість продихів на ньому.

Примітка. Визначити лінійкою сторони прямокутника: одна сторона – ширина хвоїнки, інша – діаметр поля зору мікроскопа.

5. Обчислити кількість продихів на 1 см² малюнка.

6. Такі ж обчислення зробити для нижніх, середніх і верхніх частин хвоїнок кожного року, отримані дані записати у таблицю 6.2.

Контрольні запитання та завдання

1. Чому навіть на одному листку виникає різниця в анатомічній будові і кількісних показниках?

2. Чому, визначаючи закон В.Р. Заленського, на листках кожного ярусу слід проводити визначення завжди у однакових частинах листка?

3. Чим можна пояснити формування ознак ксеноморфної будови у вище розташованих листків порівняно з нижче розташованими?

4. Перелічити ознаки ксероморфізму у рослин.

Робота 85. ВИЗНАЧЕННЯ ЖАРОСТІЙКОСТІ РОСЛИН (за Ф. Ф. Мацковим)

Вплив високих температур спричинює пошкодження структури й функції цитоплазматичних мембран, білків, гальмує рух цитоплазми, знижує мітотичний індекс тощо. Для з'ясування специфіки адаптації рослин до дії високих температур доцільними є дослідження їх фотосинтетичного апарату. Наразі за дії високих температур у клітинах мезофілу листка відбувається пошкодження цілісності напівпроникних мембран, внаслідок чого відбувається дифузія речовин по клітині та за її межі. Такий листок, занурений у розчин соляної кислоти, може набувати бурого забарвлення в результаті феофітинізації (окиснення) хлорофілів. За ступенем феофітинізації можна оцінювати жаростійкість рослин.

Мета роботи. Визначити рівень жаростійкості рослин різних видів.

Матеріали, реактиви, обладнання. Зелені листки різних видів рослин (сентполії, традесканції, пеларгонії, пеперомії, бегонії, плюща); 0,2 н. розчин соляної кислоти; водяна баня, термометри, піпетки, чашки Петрі, кристалізатори, чайник з киплячою водою, олівці по склу.

Хід роботи.

1. Нагріти водяну баню до 40 °С.

2. Занурити в неї по 5 листків кожного виду рослин і витримати протягом 30 хв., підтримуючи температуру водяної бані.

3. Взяти першу пробу, витягуючи по одному листку кожного виду рослин, і охолодити їх у чашці Петрі з холодною водою.

4. Збільшити температуру водяної бані до 50 °С і через 10 хв. витягнути ще по одному листку і охолодити їх у новій чашці Петрі з холодною водою.

5. Збільшити температуру водяної бані до 60 °С і через 10 хв. витягнути ще по одному листку, охолодити.

6. Аналогічно інкубувати листки за дії 70 °С та 80 °С. Листки охолодити.

7. Воду в чашках Петрі замінити на 0,2 н. розчин HCl і за 20 хв. оцінити ступінь пошкодження листків за величиною бурих плям.

8. Результати досліджень записати в таблицю 6.3, відмічаючи: відсутність побуріння знаком «–», незначне побуріння – «+», побуріння понад 50 % площі листка – «++», повне побуріння – «+++».

Таблиця 6.3. Визначення жаростійкості рослин за ступенем феофітинізації клітин мезофілу листка

Об'єкт дослідження	Ступінь пошкодження листків за температури, °С				
	40	50	60	70	80

9. Зробити висновки щодо жаростійкості рослин різних екологічних груп.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке феофітинізація хлорофілу? Чим вона зумовлена?
2. Чому за дії пошкоджуючих факторів зростає ступінь феофітинізації?
3. У рослин якої екологічної групи найвищий рівень жаростійкості? В яких рослин цей рівень найнижчий?

Робота 86. ДІАГНОСТИКА ЖАРОСТІЙКОСТІ РОСЛИН ЗА В'ЯЗКІСТЮ ЦИТОПЛАЗМИ

Відомо, що жаростійкі рослини характеризуються більш високою в'язкістю й еластичністю цитоплазми порівняно з рослинами менш жаростійкими. Ступінь в'язкості цитоплазми визначають за часом, протягом якого увігнутий плазмоліз переходить в опуклий.

Мета роботи. Визначити жаростійкість рослин за в'язкістю цитоплазми.

Матеріали, реактиви, обладнання. Дослідні рослини (цибуля, алое, традесканція); 1М розчин сахарози, розчин нейтрального червоного (1:5000), вазелін; фільтрувальний папір, леза, препарувальні голки, мікроскопи, предметні стекла та накривні скельця, скляні бюкси, крапельниці.

Хід роботи.

1. Приготувати мікропрепарати поперечних зрізів листків дослідних рослин.
2. Пофарбувати їх нейтральним червоним впродовж 5÷10 хв.
3. Промити зрізи водою, підсушити фільтрувальним папером і занурити у краплину 1М розчину сахарози на предметному склі.
4. Зрізи накрити покривним скельцем, краї якого змастити вазеліном. Розглянути їх під мікроскопом.
5. Відмітити час настання увігнутого та опуклого плазмолізу.
6. За часом появи опуклого плазмолізу зробити висновки про ступінь в'язкості цитоплазми в клітині та про відносну жаростійкість дослідних рослин.

Контрольні запитання та завдання

1. Чи існує залежність між в'язкістю цитоплазми та жаростійкістю рослин?
2. Якими фізіологічними механізмами зумовлена висока жаростійкість алое порівняно з цибулею, традесканцією?
3. Що таке в'язкість цитоплазми?

Робота 87. ВИЗНАЧЕННЯ ТЕМПЕРАТУРНОЇ МЕЖІ КОАГУЛЯЦІЇ ЦИТОПЛАЗМИ (за П. А. Генкелем)

Температуру за якої протягом 10 хв. повністю коагулюють білки цитоплазми, вважають умовною межею жаростійкості рослин. Клітини вважають мертвими, якщо вони втратили здатність до плазмолізу.

Мета роботи. Визначити рівень жаростійкості рослин за температурним порогом коагуляції цитоплазми.

Матеріали, реактиви, обладнання. Зелені листки різних рослин; 0,02 %-й розчин нейтрального червоного, 1М розчин сахарози в крапельницях; великі порцелянові склянки, електроплитки, пробірки, термометри, леза, препарувальні голки, мікроскопи, предметні стекла та накривні скельця, олівці по склу, фільтрувальний папір, електрочайник.

Хід роботи.

1. Закип'ятити воду.
 2. Виготовити 12 зрізів епідерми листка дослідної рослини.
 3. Помістити по 2 зрізи в пробірки з водогінною водою.
 4. Змішуючи гарячу і холодну воду у порцелянових склянках, приготувати водяні бані з температурою 48, 50, 52, 54, 56 та 58 °С (склянки підписати).
 5. Пробірки із зрізами інкубувати на водяній бані за різних температур впродовж 10 хв.
- Примітка. Температура водяної бані підтримується на одному рівні впродовж 10 хв.).*
6. Через 10 хв. зрізи перенести скляною паличкою на предметні стекла.

Примітка. Якщо клітини не містять забарвлених речовин, то їх слід витримати в розчині нейтрального червоного протягом 5-10 хв., який потім відгягнути фільтрувальним папером.

7. На зрізи епідерми нанести по 1 краплині 1 М розчину сахарози, накрити накривними скельцями і за 15÷20 хв. розглянути під мікроскопом.

8. Відмітити наявність плазмолізу знаком «+» або його відсутність знаком «-» для більшості клітин в полі зору мікроскопа.

9. Результати досліджень записати в таблицю 6.4.

Таблиця 6.4. Оцінка жаростійкості рослин різних екологічних груп

Об'єкт дослідження	Плазмоліз за температури, °С					
	48	50	52	54	56	58

10. Зробити висновки про рівень жаростійкості дослідних рослин.

Контрольні запитання та завдання

1. Чому за дії високих температур рослинні клітини втрачають здатність до плазмолізу?
2. Які листки (верхні чи нижні) у рослин пшениці відмирають раніше за дії довготривалої посухи?
3. Чи можна для підфарбовування клітин замість нейтрального червоного використовувати розчин йоду в йодиді калію?
4. Чи можна застосувати плазмолітичний метод для визначення пошкодження клітин за дії низьких температур?

Робота 88. ОЦІНКА ХОЛОДОСТІЙКОСТІ РОСЛИН НА ПЕРШИХ ЕТАПАХ РОСТУ Й РОЗВИТКУ

Холодостійкість - це здатність рослин протистояти тривалому впливу низьких позитивних температур та заморозків. Несприятлива дія холоду на перших етапах вегетації згубно впливає на наступні етапи росту й розвитку рослин та формування врожаю. Тому дослідження реакції організму на дію

температури має важливе народногосподарське значення. Різна здатність сортів кукурудзи адаптуватись до дії холоду позначається на швидкості проростання насіння та росту проростків.

Мета роботи. Дати оцінку холодостійкості рослин різних сортів кукурудзи за дії низьких температур.

Матеріали, реактиви, обладнання. Насіння кукурудзи різних сортів, що відрізняються за холодостійкістю; холодильні шафи з температурою 14; 10; 6 °С, фільтрувальний папір, кювети для вирощування рослин.

Хід роботи.

1. 50÷100 насінин кукурудзи різних сортів висадити в кювети на фільтрувальний папір, кінці якого занурені у воду.
2. Насіння проростити у холодильних камерах за різних температур – 14, 10, 6 °С.
3. За шість днів визначити відсоток пророслих насінин.
4. Результати дослідів записати у таблицю 6.5.

Таблиця 6.5. Вплив температури на швидкість проростання насіння кукурудзи

Сорт кукурудзи	Кількість пророслих насінин за температури, % від загальної кількості насінин			Висновки
	14°C	10°C	6°C	

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке холодостійкість рослин?
2. Яким чином можна підвищити холодостійкість рослин?
3. Чому для дослідів у цій роботі використовують рослини кукурудзи?
4. Які фізіологічні процеси за дії низьких температур у проростках гальмуються насамперед?

Робота 89. ЗАХИСНА ДІЯ ЦУКРІВ НА ЦИТОПЛАЗМУ

За дії негативних температур на рослинні тканини у міжклітинниках утворюється лід, який, відбираючи воду з клітин, зневоднює цитоплазму. За відповідного рівня зневоднення цитоплазма коагулює, клітини втрачають свою життєздатність.

Кристали льоду, що утворилися безпосередньо в клітинах, руйнують внутрішню структуру протопласту, зумовлюючи підвищення проникності цитоплазматичних мембран. Тривалий вплив низької температури може спричинити руйнування клітин. У процесі підготовки рослин до зими спостерігається збільшення вмісту цукрів та інших захисних сполук (кріопротекторів) в їхніх тканинах, що підвищує водоутримну здатність і морозостійкість клітин.

Мета роботи. Дослідити вплив цукрів на цитоплазму клітин за дії негативних температур.

Матеріали, реактиви, обладнання. Коренеплоди червоного буряка; 1М та 0,5М розчини сахарози, кухонна сіль; лід, свердло діаметром 5 мм, пробірки, піпетки, мікроскопи, ФЕК, леза, предметні стекла та накривні скельця, олівці по склу.

Хід роботи.

1. З коренеплоду червоного буряка свердлом діаметром 5 мм виготовити 3 висічки завдовжки 3 см.

2. Висічки ретельно промити водогінною водою і помістити їх у три пробірки.

3. У першу пробірку налити 5 мл дистильованої води, у другу – 5 мл 0,5 М розчину сахарози, а у третю – 5 мл 1 М розчину сахарози.

4. Пробірки підписати і помістити в охолоджуючу суміш на 20 хв.

Примітка. Для приготування охолоджуючої суміші змішати подрібнений лід і сіль у співвідношенні 3:1.

5. Після охолодження пробірки розморозити у склянці з водою кімнатної температури.

6. Висічки вийняти, розчини з пробірок колориметрувати на ФЕК за довжини хвилі 540 нм (зелений світлофільтр).

7. Зробити висновки з одержаних даних.

8. З висічок буряка виготовити тонкі зрізи і розглянути їх під мікроскопом за малого збільшення мікроскопа (у краплині розчину де вони знаходилися).

9. Підрахувати загальну кількість клітин в полі зору мікроскопа та кількість зруйнованих (непігментованих) клітин.

10. Результати досліджень записати в таблицю 6.6.

Таблиця 6.6. Захисна дія цукрів на цитоплазму

Варіант досліджу	Кількість клітин в полі зору мікроскопа		Відношення зафарбованих клітин до загальної їх кількості, %
	всього	зафарбованих	
Вода 0,5 М сахароза 1 М сахароза			

11. Узагальнити результати мікроскопіювання та колориметрування, зробити висновки.

Контрольні запитання та завдання

1. Як пояснити захисну дію цукрів на цитоплазму?
2. Як змінюється об'єм води під час замерзання?
3. Як за кімнатних умов приготувати охолоджуючу суміш?

Робота 90. ЗАХИСНИЙ ВПЛИВ ЦУКРІВ НА КОАГУЛЯЦІЮ БІЛКІВ ЦИТОПЛАЗМИ ЗА ДІЇ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

Порушення структури і функції білків цитоплазми може бути зумовлено їх коагуляцією за дії несприятливих факторів середовища (холоду, спеки тощо). За дії пошкоджуючих факторів в клітинах інтенсифікується синтез захисних речовин – *кріопротекторів* – зокрема, низькомолекулярних вуглеводів, які стабілізують структуру біоколоїдів.

Мета роботи. Дослідити протекторні властивості низькомолекулярних вуглеводів за дії низьких температур.

Матеріали, реактиви, обладнання. Бульби картоплі; 0,5 та 1 М розчини сахарози, сніг (лід), кухонна сіль, 0,6 М розчин NaCl; тертка, марля, колби, піпетки об'ємом 10 мл, пробірки, кристалізатори, термометри, ніж.

Хід роботи.

1. Натерти на тертці очищені бульби картоплі.
2. Сік відцідити крізь подвійний шар марлі в колбу і дати крохмалю відстоятися.
3. Супернатант налити у три пробірки по 2,5 мл.
4. У першу пробірку додати 2,5 мл дистильованої води, в другу – 2,5 мл 0,5 М розчину сахарози, а в третю – 1 М розчин сахарози, в четверту – 2,5 мл 0,6 М розчину NaCl.
5. Вміст пробірок перемішати і експонувати їх впродовж 20 хв. в охолоджуючій суміші (лід із сіллю у співвідношенні 3:1 за об'ємом).
6. Пробірки помістити у склянку з водогінною водою кімнатної температури.

Примітка. Вміст пробірок не струшувати. Спостерігають утворення осаду коагульованого білка.

7. За отриманими результатами зробити висновки щодо впливу різних концентрацій сахарози і хлориду натрію на стійкість рослинних клітин до дії низьких температур.

Контрольні запитання та завдання

1. Як низькі температури впливають на білки?
2. Яка мета дослідження впливу NaCl на рослини за дії низької температури?
3. У чому проявляється захисна дія цукрів на білки цитоплазми?
4. Перелічить речовини для яких характерні кріопротекторні властивості.

Робота 91. ВИЗНАЧЕННЯ МОРОЗОСТІЙКОСТІ ОРГАНІВ ПЛОДОВИХ КУЛЬТУР

Однією з найважливіших властивостей багаторічних рослин є їх здатність переносити без пошкоджень комплекс несприятли-

вих факторів зимового періоду і особливо дію морозів, що визначає рівень їх морозостійкості.

Морозостійкість рослин, особливо плодових культур, формується за певних кліматичних умов і залежить від віку, умов вирощування та фізіологічного стану рослин.

Існує ряд методів визначення рівня морозостійкості. Польовий метод заснований на візуальному обліку ступеня пошкодження й обліку кількості загиблих рослин або їхніх органів (бруньок, пагонів тощо).

Лабораторні методи ґрунтуються на визначенні мікроскопічних, біохімічних, фізіологічних, біофізичних та інших показників рослин як в процесі підготовки, так і в процесі зимівлі.

М. О. Соловйова запропонувала відносно простий, швидкий і надійний метод визначення порівняльної морозостійкості і ступеня підготовки органів і частин плодових культур до зими за вмістом в них кислоторозчинних метаболітів флавоноїдної природи. Доведено, що більш морозостійкі сорти містять в тканинах кори пагонів або бруньок більшу кількість не тільки антоціанових сполук, а й інших флавоноїдів.

Мета роботи. Дослідити залежність між рівнем морозостійкості деяких плодових культур і наявністю в них специфічних речовин (антоціанів та інших флавоноїдів). Визначити різницю кількісного вмісту цих речовин у різних за морозостійкістю сортів.

Матеріали, реактиви, обладнання. Для дослідження використовують контрастні за морозостійкістю сорти яблунь - Антонівка або Донешта (еталонні) і досліджувані – Ренет Симиренка, Папіровка, Кальвіль сніговий; абрикоси Київський ранній (еталон) і досліджувані – Червонощокий та ін.; 5 %-й розчин хлорної кислоти (HClO₄); спектрофотометр або фотоелектроколориметр (ФЕК-56, КФК-2 та ін.), секатори, скальпелі, ножиці, ступки, кварцовий пісок.

Хід роботи.

Завдання 1.

1. Із середньої частини пагонів досліджуваних рослин яблунь, абрикос, слив скальпелем зчистити кору, а окремо зрізати бруньки.

2. Секатором або ножицями їх швидко подрібнити, відібрати по дві наважки масою $0,2 \pm 0,5$ г.

3. Матеріал перенести в ступку, додати на кінчику скальпеля кварцовий пісок.

4. Додати $1 \div 2$ мл 5%-го розчину HClO_4 і розтерти до зникнення великих шматочків кори.

5. Розтерту масу кількісно перенести у мірні пробірки або пеніцилінові пляшечки, змиваючи ступку невеликими порціями розчинника до загального об'єму 10 мл.

6. Розтерту масу з розчином настоювати протягом $1 \div 2$ год., періодично помішуючи.

7. Забарвлений червоний розчин декантувати у суху пробірку.

Примітка. Якщо необхідно, матеріал центрифугують для осадження завису.

8. Виміряти оптичну густину розчину першої пари зразків на ФЕК за зеленим світлофільтром (товщина шару розчину в кюветі $1 \div 5$ мм) або на спектрофотометрі за довжини хвилі 520 нм.

Увага! Другу пару зразків зберегти і дослідити у завданні 2.

9. Дані записати до таблиці. 6.7.

Таблиця 6.7. Відносний вміст кислоторозчинних метаболітів в корі і бруньках пагонів

Варіант досліджу	Орган, частина	Оптична густина розчинів за довжини хвилі, нм		Відносний показник, X мл/см	
		520	364	520	364
1 2	Кора Бруньки Кора Бруньки				

10. Одержані результати оптичної густини розчинів виразити в умовних одиницях за формулою:

????????????????????????????????????

де X - умовна величина забарвлених речовин з розрахунку на 1 г кори в 1 мл розчину і за товщини кювети 1 см; E - оптична густина розчину (за 520 або 364 нм); V - об'єм витяжки, мл; P - наважка, г; E - товщина кювети, см

Примітка. Якщо співвідношення величин кількості антоціанових речовин, у досліджуваних рослин або органах досить велике і складає $2:1 \div 10:1$, то другий сорт або варіант досліджу є відносно неморозостійким. Якщо ж кількість пігментів еталонного і досліджуваного сортів відрізняються незначно, то обидва вони мають приблизно однаковий рівень морозостійкості.

Завдання 2.

Для більшої достовірності одержаних результатів морозостійкості плодів культур проаналізувати вміст кислоторозчинних метаболітів (халконів, флавонолів і подібних сполук).

1. Зразки, отримані у завданні 1 (п. 8) колориметрувати за довжини хвилі 364 нм (ультрафіолетовий діапазон).

Примітка. Як правило, оптична густина розчинів за цієї довжини хвилі надто велика, тому їх потрібно попередньо розбавити у $10 \div 15$ разів.

2. Отримані дані оптичної густини розчину виразити в умовних одиницях за формулою, наведеною у завданні 1 (враховуючи коефіцієнт розбавлення) та записати у таблицю 6.7.

3. Результати досліджень співставити і зробити висновки щодо наявності залежностей між вмістом флавоноїдів у органах рослин та їх морозостійкістю.

Контрольні запитання та завдання

1. Де локалізовані флавоноїдні сполуки?
2. Схарактеризуйте шляхи синтезу флавоноїдів.
3. Чому в роботі для екстракції речовин використовують розчин кислоти, а не спирт чи ацетон?
4. Чим відрізняються між собою антоціани і халкони?

Робота 92. ПЕРЕТВОРЕННЯ ЗАПАСНИХ РЕЧОВИН У ПАГОНАХ ДЕРЕВНИХ РОСЛИН У ЗИМОВИЙ ПЕРІОД

Під час зимівлі деревних рослин їхні запасні поживні речовини взаємоперетворюються, в результаті чого виникають сполуки, які підвищують стійкість клітин до дії морозів.

Мета роботи. Дослідити взаємоперетворення поживних речовин у пагонах зимуючих рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Пагони дуба, липи, яблуні, зрізані у жовтні та січні й зафіксовані парами спирту (поставлені у вертикальному положенні в щільно закупорені склянки, на дно яких наливають 96 %-й спирт); розчин йоду в КІ (конц.) розбавлений втричі, розчин фарби Судан III в крапельниці, насичений розчин CuSO_4 , лужний розчин сегнетової солі (86,5 г сегнетової солі і 60 г NaOH в 100 мл води), фелінгова рідина, гліцерин; мікроскопи, леза, скальпелі, штатив з пробірками, скляні палички, накривні скельця та предметні стекла, фільтрувальний папір.

Хід роботи.

1. Зафіксувати спиртом пагони деревних рослин у період зимівлі (січень).
2. Кінці пагонів, що були занурені у спирт зрізати ножицями
3. Виготовити з них тонкі зрізи для мікрохімічних реакцій (виявлення крохмалю, жирів та редукованих цукрів).

Виявлення крохмалю.

1. На предметному склі обробити тонкий зріз через серцевину, деревину і кору розчином йоду.
2. Накрити зріз скельцем і розглянути крохмальні зерна під мікроскопом за малого, а потім за великого збільшення.

Виявлення жирів.

1. Тонкий зріз помістити в розчин фарби Судан III, покрити накривним скельцем, експонувати 10 хв.
2. За 10 хв. зрізи промити водою, висушити фільтрувальним папером, помістити в краплину гліцерину.
3. Розглянути під мікроскопом за великого збільшення червоно-оранжеві краплини ліпідів у клітинах різних тканин стебла.

Виявлення редукованих цукрів.

1. Пагін довжиною 2 см розрізати вздовж і занурити в концентрований розчин CuSO_4 на 5 хв.
2. Зрізи промити водою і занурити в пробірку з киплячим розчином сегнетової солі на 2 хв.
3. Оброблені зрізи промити водою і зробити з них поперечні зрізи.
4. Розглянути під мікроскопом в краплині гліцерину.

Примітка. Кристали Cu_2O за малого збільшення виглядають чорними, а за великого – мають червоний відтінок.

5. Результати досліджень записати в таблицю 6.8, відмітивши у яких тканинах і в яких кількостях виявлені запасні поживні речовини (за 5–бальною шкалою).

Примітка. Для кожного виду рослин результати аналізу осінніх проб записують раніше зимових і весняних.

Таблиця 6.8. Виявлення запасних поживних речовин у пагонах деревних рослин різних видів

Вид рослин	Дата відбирання зразків	Крохмаль	Ліпіди	Цукри

Контрольні запитання та завдання

1. В який період року пагони мають максимальну кількість крохмалю, жирів, цукрів?
2. Чи існує різниця у кількості цих сполук на початку та наприкінці зимівлі?
3. Чи відрізняються за вмістом запасних поживних речовин пагони різного віку?
4. Які запасні речовини можна виявити в тканинах коренів у однакові пори року?

Робота 93. ВИЗНАЧЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ОЗИМИХ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР

Пошкодження клітин конуса наростання можуть бути виявлені за допомогою застосування різних барвників, наприклад тетразолу, кислого фуксину тощо.

Мета роботи. Провести оцінку результатів перезимівлі озимих культур.

Матеріали, реактиви, обладнання. Рослини пшениці у фазу кушіння після дії морозів; 0,3 %-й розчин кислого фуксину, 0,5 %-й розчин тетразолу; леза, препарувальні голки, крапельниці, чашки Петрі, мікроскопи, предметні стекла та накривні скельця.

Хід роботи.

Завдання 1. Фарбування тканин тетразолом.

Тетразол (трифенілтетразол хлорид) – сполука безбарвна. У живих клітинах під дією ферментів вона перетворюється на формазан – сполуку малинового кольору. У мертвих і пошкоджених клітинах формазан не утворюється і тому нежиттєздатні клітини не забарвлюються.

1. Лезом виготовити поздовжні зрізи через середину конуса наростання пшениці.

2. Одержані половинки занурити в 0,5 %-й розчин тетразолу і витримати впродовж 1 год. за 40 °С в термостаті.

3. Підрахувати кількість живих і мертвих рослин.

Примітка. У живих конус наростання набуває рожевого або оранжевого кольору, у мертвих – він безбарвний. Слід враховувати також, що мертві тканини можуть набувати темно-бурого забарвлення, тому до мертвих відносять рослини безбарвні та з інтенсивним темно-бурым забарвленням, до живих – темно-рожеві.

Завдання 2. Фарбування тканин кислим фуксином.

1. Лезом виготовити поздовжні зрізи через середину конуса наростання пшениці.

2. Занурити їх у 0,3 %-й розчин кислого фуксину на 15 хв.

3. Зрізи вийняти, промити водою з піпетки або крапельниці, поки змивна вода не стане прозорою.

4. Зрізи розглянути під мікроскопом за збільшення $\times 70 \div \times 100$.

5. Життєздатність пагона оцінити за станом клітин конуса наростання, оточуючих його листочків нижньої стеблової частини.

Примітка. Живі клітини мають блідо-зелене забарвлення або є безбарвними, пошкоджені – слабо-рожеві, мертві – яскраво-червоні. Наразі звергають увагу на те, що за наявності рожевого прошарку клітин стеблової частини пагона над конусом наростання пошкодження проявляються пізно (під час колосіння) й утворені колоски можуть бути безплідними; рожеве або червоне забарвлення клітин стебла і конуса наростання свідчить про суттєві пошкодження рослин.

Якщо центральний конус виявився життєздатним, то інші пагони цієї рослини не аналізують, вважаючи їх життєздатними. Якщо ж головний пагін мертвий, то аналізують другий, а у випадку його пошкодження – наступні пагони.

6. Ступінь пошкодження рослин виразити у відсотках від загальної кількості пагонів у пробі і записати у таблицю 6.9.

Таблиця 6.9. Оцінка життєздатності озимих зернових культур за станом конусів наростання

Варіант досліджу	Пагін	Стан конусів наростання		% живих рослин	Оцінка стану посівів
		кількість живих	кількість пошкоджених		

Контрольні запитання та завдання

1. В чому полягає різниця при оцінці життєздатності рослин з використанням солей тетразолу та кислого фуксину?

2. Які несприятливі фактори довкілля можуть впливати на зимуючі рослини пшениці?

3. Чому окремі тканини вузлів кушніння відрізняються за рівнем зимостійкості?

Робота 94. ДІАГНОСТИКА ГАЗОСТІЙКОСТІ РОСЛИН

Промислові гази та інші поллютанти здатні швидко проникати у мезофіл листка переважно крізь продихи, ступінь відкриття яких визначає можливість здійснення транспірації і газообмінних процесів у процесі фотосинтезу. Одночасно існує градація за чутливістю до дії шкідливих газів як між листками різних ярусів, так серед різних рослин, що визначається особливостями їхньої морфоанатомічної будови, спрямованістю та інтенсивністю фізіологічних і біохімічних процесів, деградацією забруднювачів.

Відомі рослини з високим рівнем газостійкості (тополі, липи, троянди) і дуже чутливі (хвойні, гірकोкаштан та ін.). Стійкість рослин до газів і пилу часто корелює з їхніми біологічними властивостями – для стійких видів характерним є більш тривалий вегетаційний період, більш пізніє і менш тривале за часом цвітіння, кращий розвиток кореневої системи.

До морфоструктурних діагностичних показників рослин відносять кількість і розміри продихів, співвідношення товщини палісадної і губчастої паренхіми, товщину кутикули й

воскового шару, насиченість поверхні трихомами тощо. Для стійких видів характерні більш розвинуті ксероморфні ознаки. Специфічність методів визначення газостійкості рослин полягає в необхідності врахування віку листків і рослин, концентрації газів, часу їхньої дії і ступеня пошкодження життєвих функцій. Найзручнішим для вимірювання процесом, що корелятивно змінюється в газонесприятливих умовах, є водний режим рослини. Здебільшого у рослин за таких умов збільшується втрата води, яку легко можна визначити ваговим методом.

Суть методу полягає у визначенні кількості втраченої води масою певної площі листків до і після дії на рослину газів, які впливають на механізм регуляції транспірації. Як правило, дія шкідливих газів супроводжується підвищеною втратою води листками.

Мета роботи. Визначити рівень стійкості до шкідливих газів листків рослин різних систематичних груп з урахуванням їхніх морфоструктурних ознак і функціональних показників. Встановити залежність між віком (ярусністю) листків і рівнем газостійкості за показником втрати води листками контрольного й дослідного варіантів.

Матеріали, реактиви, обладнання. Дослідні рослини (пеларгонія зональна, фуксія, хлорофітум, бегонія рясноквітна, пеперомія та ін. по 3÷5 рослин одного виду; прозорі камери з органічного скла або поліетиленової плівки, натягнутої на дерев'яний або дротяний каркас розміром 50×50×50 см, порцелянові чашки для проведення реакції газогенерації, озонатори, торсійні або аналітичні ваги, коркові свердла діаметром 10÷12 мм, пінцети, годинник, скельця або клаптики жорсткої поліетиленової плівки.

Хід роботи.

1. За допомогою трубчастого свердла зробити по 5÷7 висічок з листків середнього і верхнього ярусів кожної з 2÷3 досліджуваних рослин різних видів.

2. Проби взяти не з одного, а з кількох листків (з розрахунком, щоб після дії газів на ці рослини можна було взяти ще одну пробу висічок).

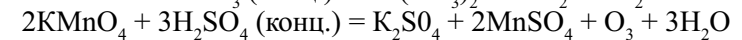
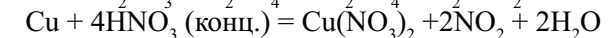
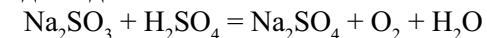
3. Пакетик висічок, виштовхнутий із свердла, швидко зважити з максимальною точністю.

4. Диски розкласти на клаптику фільтрувального паперу продишувальною стороною догори для вільного випаровування з них води.

5. Дві або три групи цих же досліджуваних рослин (залежно від кількості камер і досліджуваних газів) розмістити у витяжній шафі, ставлячи біля них порцелянову чашку або бюкс з визначеною кількістю відповідного реактиву.

6. Прилити потрібну кількість кислоти і швидко накрити камерами, експонувати впродовж 30 хв.

7. Для камери розміром 50 × 50 × 50 см, якою можна накрити рослини або в яку вміщується 4 горщики з досліджуваними рослинами, з урахуванням внутрішнього об'єму (0,125 м³) і створенням – фізіологічноактивних концентрацій газів (для NO₂ – 10⁻² об'ємн. %, для SO₂ – 10⁻³ %, для O₃ – 10⁻⁵ %) слід розрахувати потрібну кількість реактивів для реакцій, що супроводжуються виділенням відповідних газів:



За час експозиції гази, що виділяються в кожній фумігаційній камері, проникають в листки і проявляють свою дію.

8. За 30 хв. камери знімають і з листків, з яких бралися висічки, беруть нову порцію дисків в тій самій кількості, зважують.

Примітка. З метою порівняння даних і уніфікації розрахунків всі висічки повинні бути одного діаметра.

9. Після зважування диски листків загазованих рослин теж розкладають вільно продишувальною стороною догори і періодично зважують через кожні 15 хв. для встановлення динаміки процесу зневоднення. Результати зважувань зразків контрольного й дослідного варіантів заносять в таблицю.

Кожний студент відповідає за відбирання і послідовне зважування двох груп дисків з листків контрольного й дослідного варіантів.

Примітка. Метод дає змогу визначити рівень відносної стійкості рослин до різних газів або визначити порівняльну газостійкість різних рослин між собою за кількістю і швидкістю втрати води листками.

10. Зробити висновки:

- а) про порівняльну токсичність досліджуваних газів
- б) про рівень газостійкості різних видів рослин.

Примітка: В літній час замість рослин в горщиках можна використовувати пагони різних рослин, поставлених в стакан або колби з водою.

Таблиця 6.10. Порівняльна газостійкість рослин різних видів

Варіант досліджу	Ярус листків	Газ	Маса дисків					
			1 хв.	різниця, ± мг	15 хв.	різниця, ± мг	30 хв.	різниця, ± мг
Контроль	Середній	SO ₂ NO ₂ O ₃						
	Верхній	SO ₂ NO ₂ O ₃						
Дослід	Середній	SO ₂ NO ₂ O ₃						
	Верхній	SO ₂ NO ₂ O ₃						

Контрольні запитання та завдання

1. Чому визначення газостійкості найефективніше здійснювати на листках рослин?
2. Які тканини або клітини листка найчутливіші до токсичних газів?
3. В чому специфіка пошкоджуючої дії різних газів?
4. Які об'єктивні критерії рівня газостійкості рослин?
5. В чому перевага вагового методу визначення газостійкості рослин?

Контрольні запитання та завдання до розділу „Стієкість рослин”

1. Як співвідносяться поняття стійкості рослин і надійності?
2. Чому властивий рослинам рівень стійкості проявляється лише під час дії екстремальних факторів?
3. Як пояснити різний рівень стійкості рослин до дії несприятливих чинників?
4. Під час тривалої посухи часто спостерігається масове опадання недостиглих плодів. Поясніть це явище.
5. В чому суть фізіологічних адаптацій?
6. Схарактеризуйте особливості біохімічних адаптацій?
7. За яких умов проявляються фенотипові адаптації?
8. Чому адаптовані рослини значно менше реагують на повторний або посилений вплив екстремального фактора?
9. Як змінюється морозостійкість органів і частин рослин в онтогенезі?
10. Якими шляхами здійснюється руйнування шкідливих речовин забруднювачів рослинними організмами?
11. Яке значення поживних речовин у зимуючих органах і тканинах рослин?
12. В яких органах багаторічних рослин відкладається більше поживних речовин?

Розділ 7.

РІСТ І РОЗВИТОК РОСЛИН

Ріст – це незворотне збільшення розмірів і маси клітин, тканин і органів рослин, пов'язане з новоутворенням елементів їхньої структури. *Розвиток* – це якісні зміни в структурі та життєдіяльності рослин в онтогенезі. З наведених означень зрозуміло, що ріст і розвиток належать до інтегральних процесів, вивчення яких потребує багатогранного підходу, їх слід досліджувати на різних рівнях організації – субклітинному (молекулярному, надмолекулярних комплексів, окремих органел), тканинному, органному та рівні організму. Це можливо у разі застосування сучасних методів молекулярної біології, біохімії, цитології, гістології, імунології, біофізики, фізіології та ін. Лише всебічний аналіз процесів дає можливість проникнути в глибинні механізми росту та розвитку і відкриває можливості регуляції життєдіяльності рослин.

Ріст і розвиток детермінуються генетично та реалізуються під впливом багатоваріантних умов довкілля, фактори якого моделюють експресію геному. Серед них велике значення мають метеорологічні фактори, трофічна, електрофізіологічна і фітогормональна регуляції.

Ріст пов'язаний з локально розташованими твірними тканинами, тому частина лабораторних робіт розділу знайомить студентів із зонами росту рослин і цитологічними особливостями їхніх клітин. Звернуто увагу на початковий етап онтогенезу рослин – проростання насіння і методи визначення його життєздатності, явище апікального домінування, гео- і фототропічні реакції. Низка завдань присвячена вивченню ролі фітогормонів і вегетативному розмноженню рослин. Ці дослідження потребують значного інтервалу часу, їх доцільно проводити під час літньої виробничої практики.

Робота 95. ВИЯВЛЕННЯ ЗОН РОСТУ КОРЕНІВ І СТЕБЕЛ МЕТОДОМ ПОЗНАЧОК

Осьові органи рослин ростуть упродовж усього онтогенезу, досягаючи часто значних розмірів, їхній ріст зумовлений збільшенням кількості та розмірів клітин в апікальній меристемі (у однодольних – в інтеркалярній). Розмір меристемної зони кореня, завдяки якій він подовжується кілька міліметрів. У стеблі ця зона на порядок більша.

Мета роботи. Виявити зони ділення і розтягнення клітин коренів і стебел; на поперечних зрізах порівняти будову коренів у цих зонах, а на поздовжніх – величину клітин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Проросле насіння гороху, гарбуза, соняшника, огірків; проростки цих рослин; густа туш, міліметровий папір, лінійки, мікроскопи, безпечні леза, предметні стекла та накривні скельця, препарувальні голки, скляні палички, склянки з кришками, фільтрувальний папір, скляні пластинки.

Хід роботи.

1. Для дослідів відбирають рослини з однаковими корінцями та стеблами.

2. Рослини розміщують на міліметровому папері. Починаючи від апекса, з інтервалом у 1 мм на рослини наносять тушшю позначки. На коренях калібрують 1 см, на стеблах – 2÷3 см.

3. Калібровані рослини закріплюють на скляній пластинці, яку обгортають фільтрувальним папером і ставлять вертикально в камеру, на дно якої наливають тонкий шар води. Камерами можуть слугувати склянки з кришками.

4. Закриті камери ставлять на 24 год. в темне місце за температури 20÷25 °С.

5. За добу визначають ростову зону у коренів і підсім'ядольних колінах проростків (у мм).

Примітка. Роблять поперечні й поздовжні зрізи осьових органів у зонах росту. Зрізи розглядають під мікроскопом у краплі води за малого збільшення. Зарисовують і роблять висновки про будову клітин кореня та стебла у зонах ділення та розтягнення.

Контрольні запитання та завдання

1. Чому поділки, нанесені на апекси коренів і стебел, в різних зонах розходяться нерівномірно?
2. Чим відрізняється ріст стебла в довжину у розоцвітих і злакових?
3. Як потовщуються корені однодольних і дводольних рослин?
4. Назвіть рослини, ріст яких відбувається дуже швидко і дуже повільно.
5. Чи можливий вторинний ріст у однодольних рослин?
6. Чи всі клітини, які містяться в точках росту, однакові за функціональною активністю і значенням у гістогенезі тканин?
7. Яке значення мають „центр спокою” і „меристема очікування” в апексах рослин?

Робота 96. ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИН У ЗОНІ РОСТУ КОРЕНЯ

Зона ділення і зона розтягнення складають зону росту кореня. Поділ меристемних клітин у зоні ділення відбувається асинхронно, а тому одні з них перебувають в інтерфазі, інші – в різних фазах мітозу. Виявлення мітозів свідчить про наявність ростових процесів у коренях.

Мета роботи. Дослідити клітини в різних зонах апекса кореня; встановити, що деякі клітини перебувають в інтерфазі, інші – в певній фазі мітозу, що свідчить про асинхронність поділу клітин і ріст апекса кореня.

Матеріали, реактиви, обладнання. Корені рослин (часнику, цибулі, кінських бобів, гороху, квасолі), водяна баня, маленькі пробірки з корками для фіксації матеріалу, пробірки без пробок, чашки Петрі, предметні стекла і накривні скельця, препарувальні голки, скляні палички, скальпелі і безпечні леза, льодова оцтова кислота, 45%-ва оцтова кислота, 1н. HCl, реактив Шифа (фуксинсірчиста кислота), сірчиста вода.

Виготовлення реактиву Шифа (фуксинсірчистої кислоти): 1 г основного фуксину розтирають в ступці і розчиняють у 200 мл

киплячої дистильованої води. Після охолодження розчину до 50°C в нього додають 20 мл 1н. HCl. Розчин охолоджують до кімнатної температури, додають 1 г метабісульфіту натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Суміш збовтують 1÷3 хв. з активованим вугіллям, фільтрують, наливають у темну склянку і ставлять на 12 год. або більше в темряву до знебарвлення основного фуксину й утворення фуксинсірчистої кислоти.

Виготовлення сірчистої води. До 200 мл водогінної води додають 10 мл 10%-го розчину метабісульфіту натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) і 10 мл 1н. HCl. У роботі використовують лише свіжий розчин.

Хід роботи.

1. Відрізають верхівки коренів завдовжки 1 см, фіксують їх у невеликих пробірках з льодовою оцтовою кислотою. Пробірки закривають пробками і залишають за кімнатної температури на 10÷12 год.

2. Корені відмивають від кислоти дистильованою водою в чашках Петрі і переносять у пробірку з 1н. HCl. Пробірки ставлять на 6÷10 хв. на водяну баню, з температура якої 60 °C. (Відбувається мацерація тканин і гідроліз ДНК з утворенням вільних альдегідних груп, які виявляють реактивом Шифа).

3. Корені переносять у пробірки з реактивом Шифа. Пробірки закривають корками і ставлять на 2÷4 год. у холодильник (час фарбування визначають експериментально).

4. Матеріал промивають у трьох посудинах із сірчистою водою по 5÷10 хв. у кожній.

5. Матеріал промивають у водогінній воді, а потім у 45%-ій оцтовій кислоті.

6. Корінці розміщують у краплині реактиву Шифа (фуксинсірчистої кислоти) або 45%-ї оцтової кислоти на предметному склі. Відрізають від них апікальну частину завдовжки 1÷2 мм, розсмикують її двома препарувальними голками. Препарат накривають накривним скельцем, на яке зверху кладуть шматочок фільтрувального паперу. З силою натискають на препарат великим пальцем, не допускаючи зміщення накривного скельця.

7. За малого і великого збільшення мікроскопа розглядають роздушений корінець, відшуковують клітини в різних фазах мітозу, зарисовують їх. Роблять висновки про стан клітин в апікальній ростовій зоні кореня.

Контрольні запитання та завдання

1. Чи можна на препаратах, виготовлених за наведеною вище методикою, виявити послідовність фаз мітозу?
2. Назвіть фази мітозу і опишіть структурні зміни в клітинах у ці періоди.
3. Яке явище називають амітозом і в яких клітинах він відбувається?
4. Чим мітоз відрізняється від мейозу?
5. Чи існує відмінність між мітотичним і клітинним циклами для диференційованих клітин?
6. Які процеси відбуваються під час клітинного циклу меристемних клітин?
7. Які групи в молекулах виявляють за допомогою реактиву Шифа?

Робота 97. ВИЯВЛЕННЯ ВПЛИВУ ІНДОЛІЛОЦТОВОЇ КИСЛОТИ (ІОК) НА РІСТ ВІДРІЗКІВ КОЛЕОПТИЛІВ ВІВСА

Ауксини належать до фітогормонів, які необхідні на всіх фазах росту клітини: ділення, розтягнення та диференціації. Разом із гіберелінами вони регулюють процеси розтягнення клітин. Стимулюючий ефект ауксинів виявляється за незначних концентрацій, тоді як високий вміст фітогормону може зумовити гальмування ростових процесів.

Мета роботи. Дослідити вплив різних концентрацій ауксину (індолілоцтової кислоти – ІОК) на ростові процеси в фазі розтягнення клітин, використовуючи як біотест колеоптилі вівса.

Матеріали, реактиви, обладнання. Проросле насіння вівса, довжина колеоптилів якого не менша за 1,5 см (100÷200 шт.); дистильована вода, 2 %-й розчин сахарози, розчин ІОК (1 г на 1 л); шість пробірок у штативі, шість чашок Петрі з кришками, градуйовані піпетки на 5 і 10 мл, різак для нарізання колеоптилів, пензлик.

Виготовлення розчину ІОК. 0,3 г ІОК розчиняють в 0,5 мл етанолу. Розчин розбавляють водою до 100 мл, нагрівають до 80 °С 5 хв., після чого об'єм його доводять до 250 мл.

Хід роботи.

1. У шість пронумерованих пробірок наливають по 18 мл 2%-го розчину сахарози, необхідної як джерело енергії.
2. У першу пробірку наливають 2 мл розчину ІОК, збовтуючи її вміст. Чистою піпеткою з неї беруть 2 мл розчину і вносять його в другу пробірку. З другої пробірки теж відбирають 2 мл і вливають у третю пробірку. Операцію повторюють. У шосту (контрольну) пробірку наливають 2 мл води. Таким чином готують розчини п'яти концентрацій індолілоцтової кислоти.
3. Виготовлені розчини і воду наливають у шість чашок Петрі, в які пензликом вносять по 10 декапітованих (без апексів) колеоптилів завдовжки 10 мм. Верхівки їх відрізають, щоб природні ауксини, які синтезуються в них, не впливали на ріст. Колеоптилі зручно нарізати спеціальним різак, відступаючи 3 мм від верхівки.
4. Чашки накривають кришками і залишають у темряві на 3 дні за температури 25 °С.
5. За три дні вимірюють довжину колеоптилів. Результати записують у таблицю 7.1. Будують графік залежності довжини колеоптилів (відкладають дані на осі ординат) від концентрації ауксину (вісь абсцис). Дані дослідів обробляють статистично і роблять висновок про вплив різних концентрацій ІОК на ріст колеоптилів.

Таблиця 7.1. Вплив ІОК на ріст колеоптилів вівса

Номер чашки Петрі	Довжина колеоптилів, мм		Приріст колеоптилів, мм
	початкова	кінцева	

Контрольні запитання та завдання

1. Чи однаково реагують на концентрації ауксину стебла і корені?
2. Який механізм впливу ІОК на ріст клітин у фазі розтягнення?
3. Як відрізняється дія ауксину у фазі розтягнення клітин від дії гібереліну?

4. Які зміни в структурі клітин відбуваються під час їхнього розтягнення?
5. Як реагують на ІОК наземні та водні рослини?
6. Чи реагують на ІОК водорості?
7. Хто з українських вчених досліджував як реагують на фітогормони рослини багатьох видів?

Робота 98. ВПЛИВ АУКСИНІВ НА РІСТ ВІДРІЗКІВ КОЛЕОПТИЛІВ ЗЛАКІВ

Серед чисельних ефектів, які зумовлюють ауксини, найбільш вивченим є їхня дія на ріст розтягуванням відрізків колеоптилів або стебел, що і використовують як чутливий біотест на цей гормон.

Дія ауксину, як і інших фітогормонів залежить від концентрації. Збільшення концентрації ауксину вище оптимальної призводить до сповільнення росту. На деяких об'єктах показано, що збільшення кількості ауксину стимулює утворення етилену, який затримує ріст у довжину.

Мета роботи. Вивчити вплив ауксинів на ріст відрізків колеоптилів злаків.

Матеріали, реактиви, обладнання: проростки пшениці, дистильована вода, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ауксин, лінійка, безпечні леза, скляні капіляри, чашки Петрі, термостат, пластилін, ваги, стаканчики, пробірки, колби, мірні циліндри.

Хід роботи

1. Готують фосфатний буфер, pH 6,0.
Склад буфера: 87,9 мл 1/15М KH_2PO_4 (9,078 г/л) + 12,1 мл 1/15М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11,876 г/л).
2. Готують набір концентрацій ауксину (100; 20; 10; 5,0; 1,0 і 0,5 мг/л) на фосфатному буфері, pH 6,0.
3. Вибирають проростки пшениці (вирощеної у темряві впродовж трьох діб) однакового розміру, відділяють колеоптилі.
4. Колеоптилі розкладають на лінійку та, відступивши від верхівки 4 мм, відрізають лезом сегмент завдовжки 5 мм.
5. Вміщують колеоптиль у чашку Петрі з дистильованою

водою, попередньо видаливши капіляром первинний листок.

6. Набирають достатню кількість відрізків, нанижують їх на скляний капіляр і одягають на кінчики капіляра кульки з пластиліну (щоб втримати сегменти на капілярі).

7. На капілярі заміряють довжину всіх відрізків колеоптилів, складених разом.

8. Поміщають капіляр у чашку Петрі з певною концентрацією ауксину. Контрольний варіант містить лише буфер (без гормону).

9. Чашки Петрі ставлять у термостат з температурою 25 °C і відмічають час.

10. Приріст відрізків колеоптилів злаків під впливом ауксинів вимірюють через кожні 10 хв. упродовж 60÷80 хв.

11. Отримані результати записують до таблиці 7.2, будують графік залежності швидкості росту колеоптилів від концентрації ауксину і роблять висновки.

Таблиця 7.2. Вплив ауксинів на ріст відрізків колеоптилів злаків

Концентрація ауксину, мг/л	Довжина відрізків, мм	Приріст у довжину, мм						Відносний приріст, %
		10 хв	20 хв	30 хв	40 хв	50 хв	60 хв	

Контрольні запитання та завдання

1. Чи однаково реагують на концентрації ауксину стебла та корені?
2. Який механізм впливу ІОК на ріст клітин у фазі розтягнення?
3. Як відрізняється дія ауксину у фазі розтягнення клітин від дії гібереліну?
4. Як змінюється структура клітин під час розтягнення?

Робота 99. ВПЛИВ ІНДОЛІЛОЦТОВОЇ КИСЛОТИ НА РИЗОГЕНЕЗ (УКОРІНЕННЯ) ЖИВЦІВ

Одним із яскраво виражених ефектів ауксину є стимуляція ризогенезу на живцях. У разі обробки їх розчинами ІОК або її синтетичних аналогів індукується закладання додаткових коренів. Концентрація розчину та тривалість обробки залежать від виду рослин і стану живців. Для зелених пагонів використовують менші концентрації та менші експозиції обробки. Фізіологічно активні концентрації β -індолілоцтової кислоти, які використовують у рослинництві, коливаються в межах $10\div 20$ мг/л, а тривалість дії – $6\div 48$ год.

Мета роботи. Дослідити вплив різних концентрацій ІОК на індукцію ризогенезу у рослин; встановити залежність між концентрацією фітогормону та тривалістю дії його на укорінення рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Живці різних рослин (традесканції, пеларгонії, хризантеми, троянди та ін.), 12-денні проростки квасолі; розчини індолілоцтової кислоти – 10, 25, 50 і 100 мг/л; порцелянові склянки місткістю 200 мл; скальпелі, безпечні леза.

Хід роботи.

1. У чотири склянки наливають $80\div 100$ мл розчинів ІОК різних концентрацій, а в контрольну – водогінну воду.
2. Свіжозрізані або з поновленими під водою зрізами живців витримують у склянках три години і більше.
3. Живці виймають через різні інтервали часу, залежно від варіанта досліду, змивають водогінною водою і ставлять на укорінення (у воду або в кювети з піском).
4. Спостерігають за ризогенезом на живцях. Роблять висновки про вплив ауксину на ризогенез живців, а також про залежність укорінення від концентрації та тривалості обробки ІОК.

Примітка. Цю роботу проводять під час літньої виробничої практики. Для дослідів використовують зелені та здерев'янілі живці.

Контрольні запитання та завдання

1. Які фізіологічні показники свідчать про вплив ІОК на ризогенез у рослин?
2. У якій тканині закладаються додаткові корені?
3. Чи може ІОК гальмувати ризогенез?
4. Чи є зв'язок між розвитком кореневих систем і продуктивністю рослин?
5. Чи можна тестувати продуктивність рослин за розвитком кореневої системи у проростків?
6. Ауксини – це речовини природного чи синтетичного походження?

Робота 100. АПІКАЛЬНЕ ДОМІНУВАННЯ У РОСЛИН

Під апікальним домінуванням розуміють корелятивне гальмування бічних бруньок верхівковою (апикальною). Це явище значною мірою залежить від ауксину, який синтезується у верхівковій бруньці і базипетально транспортується по стеблу. Для пояснення апікального домінування запропоновано кілька гіпотез: ріст бічних пагонів гальмується ауксином, який надходить з апексу; під впливом ІОК синтезується інгібітор, який і гальмує розвиток бічних пагонів; апікальна брунька, збагачена на ауксин, атрагує (притягує) поживні речовини, внаслідок чого бічні бруньки не отримують їх у достатній кількості.

Мета роботи. Дослідити на різних рослинах, що верхівкова брунька гальмує розвиток бічних; показати значення ауксину в цьому процесі.

Матеріали, реактиви, обладнання. Рослини гороху, помідорів, квасолі, картоплі та інші, ланолінова паста з ІОК (дослідна) та водна ланолінова паста (контрольна), безпечні леза.

Хід роботи.

1. Вибирають рослини гороху однакової висоти (20 см).
2. У дослідних рослин зрізають верхівку.
3. На одні зрізи наносять пасту з ІОК, а на інші – ланолінову пасту з водою.

4. Рослини виставляють на світло і щоденно поливають їх. На світло виставляють також контрольні рослини з незрізаними апексами.

5. За кілька діб рослини обстежують. Аналізують і записують у протокол. Роблять висновки про вплив ауксину на розвиток бічних бруньок.

Контрольні запитання та завдання

1. Поясніть, чому не можна спостерігати апікальне домінування у злаків.
2. Як впливає ІОК на ростові процеси в апікальній меристемі?
3. Синтез якого фітогормона-інгібітора стимулює β -індолілоцтова кислота?
4. Де на практиці використовують ауксини?

Робота 101. ВИЯВЛЕННЯ ЗНАЧЕННЯ ГІБЕРЕЛІНІВ У ПРОРОСТАННІ НАСІННЯ

Фітогормони, в тому числі гібереліни, індують різноманітні біологічні ефекти в рослинах. Вони є результатом впливу фітогормонів насамперед на мембранні процеси і на генний апарат. Ендогенні високоактивні речовини діють на рівні транскрипції та трансляції, що зумовлює значні зміни в метаболізмі та життєдіяльності рослин.

Мета роботи. Перевірити гіпотезу, згідно з якою гіберелін стимулює розщеплення крохмалю в проростаючому насінні; дослідити, що фітогормон синтезується в зародку; виявити вплив гібереліну на матричну активність хроматину.

Матеріали, реактиви, обладнання. Зернівки ячменю; розчин йоду в йодиді калію, 5 %-й розчин гіпохлориту натрію, 70 %-й етиловий спирт; стерильні чашки Петрі з крохмальним агаром (1 % агару і 0,5 % крохмалю); стерильні чашки, до крохмального агару яких додано гіберелін (1 мл 1 %-го гібереліну на 100 мл середовища); 50 %-ва сірчана кислота, дистильована вода, колби Ерленмейєра, скальпелі, безпечні леза, стерильні пінцети.

Підготовка рослинного матеріалу. Із зерен ячменю знімають

шкірясті плівки. Для цього зернівки ячменю 3÷4 години замочують в 50 %-му розчині сірчаної кислоти. Потім насіння 10 разів промивають дистильованою водою в конічній колбі за енергійного його струшування. В дослідах із зернівками пшениці, які не мають плівок, обробка кислотою не потрібна.

Хід роботи.

1. Підготовлене до досліду сухе насіння розрізають поперек гострим скальпелем або безпечним лезом на дві частини: із зародком і без нього.

2. Половинки насіння стерилізують 5 хв. у 5 %-му розчині гіпохлориту натрію, промивають трьома порціями стерильної дистильованої води.

3. Простерилізованим у спирті пінцетом половинки насіння розміщують на агарі зрізом униз в стерильних чашках Петрі, намагаючись якнайменше відкривати кришки. Проводять такі варіанти дослідів:

крохмальний агар + половинки із зародком;

крохмальний агар з гібереліном + половинки із зародком;

крохмальний агар + половинки без зародка;

крохмальний агар з гібереліном + половинки без зародка.

4. Чашки із зернівками ставлять на 24÷48 год. в термостат за температури 20÷30 °С.

5. Після цього агар заливають розчином йоду в КІ (індикатором на крохмаль). Відмічають наявність або відсутність крохмалю в різних варіантах досліду. Пояснюють ці спостереження. Роблять висновок про вплив гібереліну на синтез *in vivo* ферменту β -амілази, який гідролізує крохмаль.

Контрольні запитання та завдання

1. Активність якого ферменту посилюється після обробки насіння гібереліном?

2. В якій частині зернівки запасється крохмаль?

3. Які сполуки утворюються в насінні за дії β -амілази?

4. Чому на основі одержаних в досліді даних можна говорити про вплив гібереліну на матричну активність хроматину?

5. Як широко використовуються гібереліни в господарстві різних країн і на яких рослинах?

6. Чому рослини бавовни стали одним із основних об'єктів використання гіберелінів?

Робота 102. ВПЛИВ ГІБЕРЕЛІНУ НА АКТИВНІСТЬ ГІДРОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ У ЗЕРНІВКАХ ЗЛАКІВ

Однією з найбільш вивчених реакцій рослин на гібереліни є індукція гідролітичних ферментів у насінні злаків. У 1960 р. встановлено, що після набухання зерен злаків вже за 12÷24 год. зародок починає виділяти гібереліни, які дифундують у алейроновий шар. Там вони індукують синтез або активують гідролітичні ферменти та стимулюють секрецію цих ферментів до ендосперму, де відбувається розпад запасних полімерів. Розчинні продукти розпаду потім надходять для живлення зародка. У разі видалення зародка із зернівок індукція ферментів не спостерігається. Обробка таких беззародкових насінин екзогенним гібереліном зумовлює індукцію ферментативної активності.

Мета роботи. Визначити вплив гібереліну на активність гідролітичних ферментів у зернівках злаків.

Матеріали, реактиви, обладнання. Зернівки ячменю, пшениці; 10%-й розчин йоду в йодиді калію, 5 %-й розчин гіпохлориту кальцію, 70 %-й етиловий спирт; стерильні чашки Петрі з агаровим середовищем (1 % агару), стерильні чашки Петрі, в яких до агару додано крохмаль (1 % агару та 1% крохмалю), 50 %-ва сірчана кислота, дистильована вода; колби Ерленмейера, скальпель, безпечні леза, стерильні пінцети.

Підготовка рослинного матеріалу. Із зерен ячменю знімають шкірясті плівки. Для цього зернівки ячменю 3÷4 год замочують у 50 %-му розчині сірчаної кислоти. Потім насіння 10 разів промивають дистильованою водою в конічній колбі за енергійного струшування. В дослідах із зернівками пшениці, які не мають плівок, обробка кислотою не потрібна.

Хід роботи.

1. Підготовлене до дослідження насіння розрізають поперек гострим скальпелем або безпечним лезом на дві частини: із зародком і без нього.

2. Половинки насіння стерилізують 30 хв. у 5 %-му розчині гіпохлориту кальцію, промивають трьома порціями стерильної дистильованої води та замочують у стерильній воді.

3. За 12 год. половинки насінин із зародком розміщують у стерильні чашки Петрі (у свіжу дистильовану воду), половинки зернівок без зародка ділять на дві групи, одну з яких вміщують у воду, а іншу – у водний розчин гібереліну, концентрація якого становить 25 мг/л (розчин стерилізують, пропускаючи крізь міліпоровий фільтр, діаметр пор якого 0,22 мкм).

4. Усі варіанти ставлять у термостат за температури 26 °С. Час інкубації – 24 і 48 год.

5. Простерилізованим у спирті пінцетом половинки зернівок розміщують на агарі зрізом униз в стерильних чашках Петрі, намагаючись якнайменше відкривати кришки.

6. Чашки із зернівками ставлять на 24 год у термостат за температури 26 °С.

7. Після інкубації половинки зернівок видаляють, а поверхню агару заливають 10%-вим розчином йоду в КІ (індикатором на крохмаль) на 2 хв.

8. Розчин йоду зливають і чашки промивають водою. Відмічають наявність або відсутність забарвлення середовища в різних варіантах досліду. Пояснюють ці спостереження.

9. Роблять висновок про вплив гібереліну на синтез *in vivo* ферменту β-амілази, який розщеплює крохмаль.

Контрольні запитання та завдання

1. В якій частині зернівки синтезується гіберелін?
2. Активність якого ферменту зростає після обробки насіння гібереліном?
3. В якій тканині синтезується β-амілаза?
4. В якій частині зернівки запасється крохмаль?
5. Які сполуки утворюються в насінні за дії β-амілази?

Робота 103. ГІСТОХІМІЧНЕ ВИЯВЛЕННЯ РОЗПОДІЛУ АУКСИНІВ У РОСЛИНАХ

Ауксини синтезуються в частинах рослин, що ростуть. Транспортуються вони від клітини до клітини шляхом дифузії, а

на далекі відстані - провідними тканинами, переважно флоємою. Значний вміст ІОК та її похідних відмічено в апексах рослин, молодих листках та їх зачатках, верхівках колеоптилів злаків, в активному камбії, в провідних пучках, у пилку та насінні, яке формується. В зрілих тканинах вміст ауксинів набагато менший. Залежно від виду рослини, її фізіологічного стану, умов онтогенезу та типу тканини вміст ауксину варіює від 1 до 1000 мкг на 1 кг сирової речовини. Гістохімічно розподіл ауксинів вивчають за допомогою реакцій на похідні індолу, зокрема реакцій Сальковського та Прохазки. У разі взаємодії індолілоцтової кислоти з реактивом Сальковського виникає фіолетово-червоне забарвлення. Після обробки ауксинів реактивом Прохазки спостерігають жовто-оранжево-зелену флуоресценцію в ультрафіолеті.

Мета роботи. Дослідити локалізацію ауксинів у різних частинах і тканинах рослин залежно від виду та фази онтогенезу.

Матеріали, реактиви, обладнання. Проростки однодольних рослин (пшениці, вівса, кукурудзи), інфіковані проростки злаків, листки бегонії, капусти та інших рослин, 0,5 М FeCl_3 , 35%-й розчин хлорної кислоти, залізоаміачний галун і 50%-й розчин сірчаної кислоти, 35%-й розчин формаліну, 25%-й розчин HCl , етанол, крапельниці з реактивами Сальковського і Прохазки, предметні та накривні скельця, препарувальні голки, мікроскопи, електроплитки або спиртівки, джерело УФ-світла, скляні палички, безпечні леза.

Реактив Сальковського складається з 1 мл 0,5М FeCl_3 , який диспергують у 50 мл хлорної кислоти. Реактив готують перед використанням.

Реактив Прохазки - це свіжовиготовлена суміш, яка складається з 25 мл 35%-го розчину формаліну, 25 мл 25%-ї HCl і 50 мл 95%-го етанолу.

Хід роботи.

1. Безпечними лезами роблять поперечні зрізи стебел, коренів, колеоптилів, листків та їхніх черешків.
2. Зрізи, зроблені з різних рослин і різних частин їх, розглядають у воді за малого збільшення мікроскопа.
3. Відбирають тонкі зрізи, на яких проводять реакції Сальковського і Прохазки.

Проведення реакції Сальковського: на зрізи наносять краплину реактиву Сальковського і накривають їх накривними скельцями. Зрізи обережно підігрівають і розглядають під мікроскопом. Поява коричнево-фіолетово-червоного забарвлення свідчить про наявність у тканинах ауксинів. Слід мати на увазі, що реакція Сальковського виявляє не лише ІОК, а й її похідні (інші індолні сполуки).

Проведення реакції Прохазки. Після обробки зрізів реактивом Прохазки їх прогрівають 5 хв. за температури 100 °С і розглядають в ультрафіолетових променях. Реакцію Прохазки дуже маскує флуоресценція деяких інших сполук, тому її доцільно проводити для проявлення хроматограм, на яких виявляють ауксини.

4. Роблять висновки про розподіл ауксинів у різних частинах стебел, коренів, колеоптилів і черешків листків; про вміст ауксинів у стеблах проростків злакових і дводольних рослин (квасоля, кінські боби); про наявність ауксинів у листках рослин різного віку (молодих і старих).

Контрольні запитання та завдання

1. Які фази ембріонального етапу онтогенезу рослин залежать від ауксинів?
2. Яку функцію виконують ауксини під час розтягнення клітин?
3. В яких частинах стебел, коренів і колеоптилів міститься найбільше ауксинів?
4. Які похідні ауксинів містяться в тканинах рослин?

Робота 104. СПОСТЕРЕЖЕННЯ ЗА ФІЗІОЛОГІЧНИМИ ЕФЕКТАМИ ЦИТОКІНІНУ

Цитокініни впливають на різні процеси життєдіяльності рослин: стимулюють клітинний поділ, диференціацію клітин та органів, усувають апікальне домінування верхівкової бруньки, сприяють росту бічних пагонів тощо. Специфічним проявом впливу цих фітогормонів на рослини є затримка старіння листків та індукція синтезу червоного пігменту бетаціаніну в проростках щиріці.

Мета роботи. Дослідити специфічний вплив цитокінінів на рослини, котрі використовують як біотести; показати, що цитокініни індукують синтез пігментів у рослинах і затримують руйнування хлоропластів у листках.

Матеріали, реактиви, обладнання. Рослини бегонії, традесканції, хлорофітума, проростки щиріці, пророщені в темряві впродовж 72 год за температури 24°C; 10^{-7} М розчин цитокініну (БАП або кінетин), фосфатний буфер з рН 6,3, розчин кінетину (5 мг кінетину, 1,5 мл 0,1 н. NaOH у 200 мл води), L-тирозин; кювети для пророщування насіння щиріці, чашки Петрі (діаметром 5-6 см), фільтрувальний папір, фільтри, термостат, коркові свердла.

Хід роботи.

Завдання 1

1. Контрольні листки обприскують водою, а дослідні - розчином БАП або кінетином.
2. За 24 год. роблять свердлами висічки листків і розміщують їх на вологому папері в чашках Петрі.
3. Чашки Петрі з висічками листків витримують три доби у темряві.
4. За три доби відмічають забарвлення висічок листків.
5. Спостереження продовжують ще кілька діб. Результати дослідів записують у протокол і роблять висновки про вплив цитокініну на старіння тканин.

Завдання 2

1. У проростків щиріці видаляють корінці.
2. Розкладають по 10 проростків на зволожені водою фільтри в чашках Петрі. Це контрольний варіант.
3. Дослідні проростки розміщують на фільтрах, які зволожують 2 мл фосфатного буфера (рН 6,3), що містить 1 мг/л L-тиозину та 10^{-7} М БАП або кінетину.
4. Чашки накривають кришками і ставлять на 18 год. за температури 24 °C у термостат.
5. За 18 год. аналізують інтенсивність забарвлення дослідних і контрольних проростків. Дані записують до протоколу і роблять відповідні висновки.

На цих тестових об'єктах вивчають також вплив різних кон-

центрацій цитокінінів (БАП і кінетину) на затримку старіння тканин і біосинтез пігменту бетаціаніну.

Контрольні запитання та завдання

1. Чим можна пояснити затримку старіння листків під впливом цитокініну?
2. Як можна пояснити індукцію пігментоутворення у щиріці під дією цитокініну?
3. Як цитокінін впливає на структуру хлоропластів?
4. Як цитокінін діє на поділ клітин?
5. Порівняйте реакції рослин на дію ауксину та гібереліну.

Робота 105. ВИЯВЛЕННЯ АНТАГОНІЗМУ ДІЇ ЦИТОКІНІНУ І АБСЦИЗОВОЇ КИСЛОТИ

Біологічні ефекти, зумовлені ауксинами, гіберелінами і цитокінінами усуваються абсцизовою кислотою (АБК) та етиленом. Цей антагонізм проявляється у багатьох фізіолого-біохімічних процесах. Протилежний вплив цитокініну й абсцизової кислоти на рослини можна виявити на такому тестовому об'єкті як ізольовані сім'ядолі гарбуза. Так, АБК гальмує зумовлену цитокініном активацію синтезу РНК і білка, утворення полісом, активність цитоплазматичних і хлоропластних ферментів, що призводить до гальмування росту сім'ядолей та їхнього позеленіння.

Мета роботи. Встановити антагонізм дії цитокініну й абсцизової кислоти на ростові процеси, а також синтез зелених пігментів в ізольованих сім'ядолях гарбуза.

Матеріали, реактиви, обладнання. Ізольовані сім'ядолі гарбуза; розчин БАП (10 мг/л), розчин АБК (10 мг/л); кювети, фільтрувальний папір, чашки Петрі, безпечні леза, предметні та накривні скельця, мікроскопи, препарувальні голки, скляні палички.

Хід роботи.

1. Насіння гарбуза замочують у воді (2 год.).
2. Виділяють сім'ядолі із насіння і розкладають їх на фільтрувальному папері в чашках Петрі (діаметром 5 см), куди наливають

по 2 мл води (контроль) або розчинів фітогормонів. Отже, дослід проводять у трьох варіантах: інкубація сім'ядолей у воді, в розчині БАП і в розчині АБК.

3. Чашки закривають і ставлять на 5÷6 діб у темряву.
4. За 5÷6 діб відмічають колір дослідних і контрольних сім'ядолей.
5. Роблять поперечні зрізи сім'ядолей, які розглядають під мікроскопом за малого збільшення. Препарати зарисовують.
6. Порівнюють зрізи, інкубовані у розчинах фітогормонів зі зрізами, інкубованими у воді. Констатують антагонізм впливу цитокінінів і абсцизової кислоти на рослини та роблять висновок.

Контрольні запитання та завдання

1. Які основні біологічні ефекти зумовлюють цитокініни? Які специфічні реакції характерні для абсцизової кислоти?
2. Назвіть реакції рослин, в яких проявляється синергізм впливу різних фітогормонів.
3. Порівняйте біологічні тести для виявлення у рослинах цитокінінів і АБК.
4. Які фітогормони є антагоністами?
5. За великої кількості гібереліну в тканинах посилюється синтез АБК. Чим це можна пояснити?
6. Чи застосовують цитокініни і АБК для регуляції ростових процесів рослин?

Робота 106. ВПЛИВ ЕТИЛЕНУ НА РОСТОВІ ПРОЦЕСИ У РОСЛИН

Етилен характеризується широким спектром фізіологічної дії на рослини. Він гальмує ріст проростків у довжину, порушує нормальне ортотропне положення рослин, сприяє потовщенню стебел, опаданню листків і плодів, старінню тканин, зумовлює епінастію листків, стимулює витікання латексу з молочників гевеї тощо. Усі ці та інші ефекти етилен зумовлює за дуже низької концентрації (1 частина газу на 1000000 частин повітря). Біосинтезу його в тканинах сприяють стресові фактори.

Мета роботи. Виявити вплив етилену на ростові процеси у рослин, показати значення в цих процесах ІОК.

Матеріали, реактиви, обладнання. Етіюльовані 5÷6-добові проростки гороху, кінських бобів, люпину; скляні ковпаки з скляними пластинками-підставками; світильний газ або дозрілі яблука, ланолінова паста з водою, ланолінова паста з 0,01%-ю ІОК.

Хід роботи.

1. Вирощені в темряві проростки рослин ставлять на скляні пластинки, які зверху накривають скляними ковпаками. Для кращого прилягання ковпака до пластинки знизу його змазують вазеліном.

2. Проводять чотири варіанти дослідів:

контрольний варіант - під ковпаком містяться рослини і звичайне повітря;

другий варіант – під ковпак ставлять етіюльовані проростки, але під нього кладуть кілька дозрілих яблук, які виділяють етилен. Можна замість яблук впустити під ковпак трохи світильного газу;

третій варіант – все роблять так само як в другому варіанті, але у рослин видаляють верхівки і на них наносять водну ланолінову пасту;

четвертий варіант – на декапітовані рослини наносять ланолінову пасту з 0,01 %-ою ІОК. Далі все роблять, як у другому варіанті.

3. Рослини усіх варіантів дослідів на 1÷2 тижні ставлять у темряву. Спостерігають за ростовими процесами (вимірюють висоту та діаметр стебел проростків). Результати вимірювань параметрів стебел записують в таблицю 7.3.

4. Після закінчення дослідів виготовляють поперечні й поздовжні зрізи стебел контрольних і дослідних рослин, порівнюють їхню анатомічну будову. Зарисовують препарати.

Таблиця 7.3. Вплив етилену на ростові процеси у рослин

Варіант дослідів	Довжина стебла, мм		Діаметр стебла, мм	
	за 7 діб	за 14 діб	за 7 діб	за 14 діб

5. Роблять висновки про вплив етилену на рослини і значення ауксину в цих процесах.

Контрольні запитання та завдання

1. Чому для дослідження впливу етилену на ростові процеси у рослин використовують етіюльовані проростки?
2. Як етилен впливає на геотропічне подразнення у рослин?
3. Як етилен впливає на декапітовані проростки?
4. Чи є зв'язок між біосинтезом етилену та вмістом у тканинах ауксину?
5. Назвіть синтетичні продуценти етилену, які використовують у рослинництві.
6. Для регулювання яких процесів у рослин використовують етилен?

Робота 107. СПОСТЕРЕЖЕННЯ ЗА ШВИДКІСТЮ РОСТУ ПИЛКОВИХ ТРУБОК

Швидкість росту різних рослин та органів неоднакова. Особливо інтенсивно збільшується довжина пилкових трубок після попадання пилку на приймочку маточки, що сумісна з рослинами-запилювачами. Ріст пилкової трубки можна безпосередньо спостерігати під мікроскопом.

Мета роботи. Дослідити характер росту пилкових трубок, визначити швидкість їхнього росту.

Матеріали, реактиви, обладнання. Пилок зі щойно розкритих пиляків (примули, амариліса, тюльпана, нарциса та інших рослин); 1%-й агар з 5-10% сахарозою або глюкозою; предметні стекла (можна з лунками), скляні палички, накривні скельця, вазелін; термостат, мікроскопи, окуляр-мікрометри.

Хід роботи.

1. На предметне скло накладають скляне кільце заввишки 0,5 см, а на дно цієї скляної камери наносять краплину води.
2. Зверху камеру закривають накривним скельцем, на нижній бік якого наносять краплину агару з 10%-ю сахарозою.
3. Агар засівають пилком, струшуючи його зі щойно розкритого пиляка.

4. Краї скла, що прилягають до кільця, змазують вазеліном, запобігаючи цим підсиханню пилку.

5. Камеру ставлять у термостат за температури 20 ± 25 °C.

6. Коли пилкок проросте, встановлюють одну пилкову трубку в центрі поля зору мікроскопа і спостерігають за швидкістю її росту, який виражають у мкм за 1 год. Одержані дані записують в таблицю 7.4 і статистично обробляють їх.

Таблиця 7.4. Швидкість росту пилкової трубки

Варіант досліджу	Довжина пилкової трубки, мкм				Швидкість росту (мкм/год)
	за 10 хв	за 20 хв	за 40 хв	за 60 хв	

Примітка. Цей дослід можна провести в іншій модифікації. Тоді використовують предметні стекла з лунками, в які вносять краплину 10÷20%-го розчину сахарози з 0,01%-м боратом натрію. Над краплею сахарози струшують щойно розкритий пиляк. Препарат розглядають під мікроскопом через однакові інтервали часу. Ядра, що містяться в кінчику пилкових трубок, що ростуть, можна зафарбувати, додаючи у розчин краплину ацетокарміну або нейтрального червоного. Для запобігання осмотичному розривові кінчиків пилкових трубок і для стимуляції росту, до розчину сахарози додають борат натрію.

Контрольні запитання та завдання

1. Для чого до агару добавляють сахарозу?
2. Які речовини виділяє приймочка на своїй поверхні?
3. Для чого в камеру для пророщування пилку наносять краплину води?
4. Порівняйте швидкість росту пилкових трубок та інших органів рослин, використовуючи власні дані та результати, відомі з літератури.
5. Як змінюється стан маточки під час проростання пилку?

Робота 108. ВИЗНАЧЕННЯ ФЕРТИЛЬНОСТІ ПИЛКОВИХ ЗЕРЕН

Фертильністю пилкових зерен називають їхню здатність зумовлювати запліднення жіночого гаметофіту. Для визначення фертильності застосовують два методи: ацетокарміновий та йодний.

Мета роботи. Дослідити різноякісність пилкових зерен у пиляках, вивчити вплив підсихання пилку на його життєздатність.

Матеріали, реактиви, обладнання. Пилок різних рослин, предметні стекла і накривні скельця; препарувальні голки, мікроскопи, розчини ацетокарміну та йоду в йодиді калію, крапельниці.

Виготовлення розчину ацетокарміну: розчиняють 0,5-2,0 г карміну в 100 мл 45%-ї оцтової кислоти під час кип'ятіння впродовж 20-30 хв.

Розчин фільтрують і додають до нього 1-2 краплі ацетату заліза.

Хід роботи.

Дослід проводять у двох варіантах: з пилком із щойно розкритого пиляка і з пилком, підсушеним упродовж 20÷30 хв.

1. Пиляк рослини роздушують на предметному склі скляною паличкою в краплині розчину ацетокарміну.

2. Препарат розглядають під мікроскопом: стерильні пилкові зерна в такому разі не забарвлюються зовсім або забарвлюються нерівномірно.

3. Роблять висновок про фертильність пилку.

Примітка. Якщо пилкове зерно має товсту екзину, то застосовують йодний метод визначення фертильності. Пилкові зерна в цьому разі фарбують йодним розчином. Метод базується на тому, що стерильні пилкові зерна крохмалю зовсім не містять або містять його сліди. Тому йодний розчин, проникаючи крізь товсту екзину, повністю забарвлює лише фертильний пилок.

Контрольні запитання та завдання

1. Чим відрізняється поняття “життєздатності” від “фертильності”?
2. Назвіть методи визначення життєздатності пилкових зерен.
3. Схарактеризуйте будову пилкового зерна.
4. Як формується пилкове зерно?
5. Пилкове зерно – це гаметофіт чи спорофіт?

Робота 109. ВПЛИВ АУКСИНУ, ГІБЕРЕЛІНУ ТА ЦИТОКІНІНУ НА ПРОРОСТАННЯ ПИЛКУ

Фітогормони регулюють ростові процеси вегетативних органів рослин. Від їхнього балансу в тканинах залежить ріст стебел, коренів, листків. Одночасно ці фізіологічно активні сполуки ендогенного походження виявляються ефективними і щодо генеративних органів. Від них залежить формування квіток і плодів, вони індукують цвітіння та значною мірою визначають процес запліднення у рослин.

Мета роботи. Визначити вплив фітогормонів на ростові процеси пилку.

Матеріали, реактиви, обладнання. Пилок зі щойно розкритих пиляків; сахарозо-агарове середовище (1%-й агар і 10 %-а сахароза), ІОК (3÷5 мг/л середовища), гіберелін (1 мг/л), кінетин (1 мг/л); предметні та накривні скельця, скляні палички, вазелін; термостат, мікроскопи, окуляр-мікрометри.

Хід роботи.

Пилок пророщують у вологій камері, так само як у роботі 107. Проводять чотири варіанти досліду:

контрольний варіант – пророщування пилку на сахарозо-агаровому середовищі;

другий варіант – до контрольного середовища додають ІОК;

третій варіант – до контрольного середовища додають гіберелін;

четвертий варіант – до сахарозо-агарового середовища додають кінетин.

1. Вологі камери з пилком ставлять для пророщування в термостат за температури 20-25°C на 1 год. Інтервал між посівом пилку в різних варіантах 10 хв.

2. За 40 хв. окуляр-мікрометром вимірюють довжину 10 пилкових трубок.

3. За 40 хв. вимірювання повторюють знову. Порівнюють швидкість росту пилкових трубок у контрольному та дослідному варіантах.

4. Роблять висновок щодо впливу фітогормонів на швидкість росту пилкових трубок, яку визначають у мкм/год. Одержані дані заносять до таблиці 7.5.

Таблиця 7.5. Вплив фітогормонів на швидкість росту пилкових трубок

Варіант дослідів	Кількість пророслих пилкових зерен		Довжина пилкової трубки, мкм		Швидкість росту, мкм/год
	за 40 хв	за 80 хв	за 40 хв	за 80 хв	

Контрольні запитання та завдання

1. Які сполуки, що сприяють проростанню пилку, виділяє приймочка маточки?

2. Як впливають досліджувані фітогормони на проростання пилку?

3. Яке значення гібереліну в індукції цвітіння?

4. Що являє собою флориген згідно з сучасними уявленнями?

Робота 110. ВИЗНАЧЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ НАСІННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНТНИМ МЕТОДОМ

Метод заснований на флуоресценції речовин, які виділяють мертві тканини насіння у разі набрякання його на вологому фільтрувальному папері. Цей метод широко застосовують під час оцінки життєздатності насіння конюшини та люцерни.

Мета роботи. Дослідити відмінність у стані тканин живого та мертвого насіння, виявити у нього різну проникність мембран.

Матеріали, реактиви, обладнання. Живе та мертве насіння конюшини, синьої і синьогібридної люцерни й інших рослин, фільтрувальний папір, чашки Петрі, безпечні леза, ультрафіолетовий освітлювач.

Хід роботи.

1. Насіння розкладають у чашках Петрі на вологому фільтрувальному папері.

2. Чашки накривають кришками і 30÷45 хв. витримують за температури 20÷22 °C.

3. Чашки відкривають і насіння освітлюють ультрафіолетовим світлом. Якщо насіння нежиттєздатне, то на фільтрувальному папері з'являється яскрава блакитна або золотисто-жовта зона у люцерни і червона – у конюшини. За цими зонами виявляють нежиттєздатне насіння.

4. Живе та мертве насіння розрізають й опромінюють. Наявність світіння досліджують безпосередньо в насінні. Спостереження заносять до протоколу. Визначають люмінесцентні зони, характерні для насіння різних культур.

5. Роблять висновки про стан тканин живого й мертвого насіння.

Контрольні запитання та завдання

1. Яке значення для рослинництва має визначення життєздатності насіння?

2. Як можна пояснити появу люмінесцентної зони навколо мертвого насіння?

3. Назвіть сполуки, які світяться під впливом ультрафіолетових променів?

4. Чи відносяться до сполук, що світяться під впливом ультрафіолетових променів, хлорофіли? Як вони світяться в УФ-променях?

Робота 111. ВИЗНАЧЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ НАСІННЯ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ АНІЛІНОВИХ БАРВНИКІВ

Визначення життєздатності та енергії проростання насіння шляхом пророщування за оптимальних стабільних умов - простий і досить точний метод, але він потребує багато часу. Проте у разі дефіциту часу тканини фарбують аніліновими барвниками, на які живі та мертві клітини реагують по-різному. Так, жива цитоплазма непроникна для індигокарміну та кислого фуксину, тоді як мертва легко пропускає їх.

Мета роботи. Показати, що живі клітини мають напівпроникні мембрани, крізь які барвники не проникають. Мембрани мертвих клітин втрачають цю властивість.

Матеріали, реактиви, обладнання. Замочене впродовж доби у воді живе і мертво насіння різних культур (пшениці, ячменю, вівса, кукурудзи, соняшника, редиски тощо), мертво насіння (отримують двогодинним прогріванням за температури $70\div 80^{\circ}\text{C}$ у термостаті), 0,1%-й водний розчин індигокарміну, 0,1%-й водний розчин кислого фуксину, леза, препарувальні голки, склянки, лупи х 7, термостат.

Хід роботи.

1. Замочене насіння розрізають у напрямі від зародка на дві половинки, стежачи, щоб поверхня зрізу була гладенькою.

2. Насіння відмивають від зруйнованих тканин водою. По 100 половинок насіння поміщають у розчин 0,1%-го індигокарміну або кислого фуксину. Експозицію визначають за таблицею 7.6.

Таблиця 7.6. Тривалість фарбування насіння

Культура	Тривалість фарбування насіння
Пшениця, жито, ячмінь, овес, рис, кукурудза, соняшник, льон, огірки, диня, гречка	10÷15 хв.
Конопля, редиска, капуста	30 хв.
Кавун, гарбуз	1 год
Горох, квасоля, люпин, боби, вика, соя	2÷3 год

3. Після фарбування насіння промивають водою, розкладають на фільтрувальному папері і розглядають під лупою. До життєздатного належить насіння з повністю незабарвленим зародком, зі слабко забарвленим корінцем та окремими ділянками на корінцях і сім'ядолях. До нежиттєздатного – насіння з повністю або частково забарвленим зародком, з інтенсивними великими плямами на корінці та сім'ядолях. Одержані дані записують в таблицю 7.7.

Таблиця 7.7. Визначення життєздатності насіння

Культура	Кількість зародків, шт.				Життєздатне насіння, %
	усього	незабарвлених	забарвлених локально	інтенсивно забарвлених	

Контрольні запитання та завдання

1. Якими методами визначають життєздатність насіння?
2. Назвіть причини втрати життєздатності зерна під час зберігання.
3. Чому мертві клітини зафарбовуються аніліновими барвниками, а живі – не зафарбовуються?
4. Як мертві та життєздатні клітини світяться в УФ-променях?
5. Чи залежить світіння насіння від його вологості?

РОБОТА 112. ВИЗНАЧЕННЯ СХОЖОСТІ НАСІННЯ ПШЕНИЦІ ЗА МЕТОДОМ ГУРЕВИЧА

Метод базується на тому, що живе насіння в розчині безбарвного динітробензолу в процесі дихання відновлює його. Розчин набуває яскраво-жовтого забарвлення, а у разі взаємодії з аміаком стає темно-пурпуровим. Мертве насіння нездатне відновлювати динітробензол, тому він залишається безбарвним. Динітробензол легко проникає крізь насінну оболонку.

Мета роботи. Показати, що живе насіння відновлює динітробензол, а мертво – не відновлює. Визначити схожість насіння.

Матеріали, реактиви, обладнання. Замочене впродовж доби у воді живе та мертво насіння пшениці, мертво насіння (отримують двогодинним прогріванням за температури 70-80°C в термостаті), динітробензол, аміак, стаканчики, годинникове скло, леза, препарувальні голки, термостат.

Увага! Динітробензол дуже отруйний. Після роботи з ним треба ретельно мити руки з милом.

Хід роботи.

1. Відбирають 100 непошкоджених зернівок пшениці, поміщають їх у стаканчик і заливають насиченим розчином динітробензолу.
2. Закриті годинниковим склом стаканчики поміщають у термостат за температури 40÷45 °С.
3. За годину розчин динітробензолу зливають і заливають розчин аміаку.
4. За 15 хв. роблять поперечний зріз через зародок. Зріз треба робити так, щоб добре було видно зародковий корінець. У схожого життєздатного насіння корінець має темно-пурпурове забарвлення, у мертвого – він безбарвний.
5. Підраховують відсоток життєздатних насінин.

Контрольні запитання та завдання

1. Чому для визначення життєздатності використовують замочене насіння?
2. Чому живе насіння здатне відновлювати динітробензол?
3. Як впливають на насіння інші барвники?
4. Як змінюється забарвлення насіння після обробки його іншими барвниками?
5. Чи застосовують метод Гуревича у практиці сільського господарства?

Робота 113. ВИЗНАЧЕННЯ ЗАКІНЧЕННЯ ЯРОВИЗАЦІЇ ЗА МЕТОДОМ М.О.БАСАРСЬКОЇ

Яровизація – це процес, що сприяє прискоренню генеративного розвитку та відбувається у озимих одно-, дво- і багаторічних рослин під дією певної тривалості низьких позитивних температур.

Для визначення закінчення яровизації анатомічні зрізи зародка злаків послідовно обробляють хлорним залізом і жовтою кров'яною сіллю. Після цього точка росту стебла яровизованої зернівки і суміжних клітин набуває синього забарвлення, а неяровизованої – зеленуватого. Різниця забарвлення клітин є результатом різної окисно-відновної здатності яровизованого і неяровизованого зародків.

Мета роботи. Визначити закінчення стадії яровизації. Показати різну окисно-відновну здатність яровизованого і неяровизованого зародків.

Матеріали, реактиви, обладнання. Зернівки яровизованої і неяровизованої озимої пшениці, вода, 5%-й розчин хлорного заліза, 5%-й розчин жовтої кров'яної солі, фільтрувальний папір, бюкси з кришками, предметні та накривні скельця, мікроскоп, леза, голки, пінцет.

Хід роботи.

1. Роблять кілька поздовжніх зрізів зародків яровизованих і неяровизованих зернівок озимої пшениці.
2. Зрізи розкладають на предметних скельцях, розглядають під мікроскопом і знаходять такий, де добре видно точку росту стебла.
3. Вибраний зріз поміщають на 3 хв. у 5%-й розчин хлорного заліза.
4. Зріз промивають 30 с у воді.
5. Після промивання зріз переносять на сухе предметне скло, злегка підсушують фільтрувальним папером і обробляють розчином жовтої кров'яної солі та зразу накривають накривним скельцем (інакше препарат на повітрі почне окиснюватися, що зумовить зміни забарвлення).
6. Виготовлений та оброблений препарат досліджують за допомогою збільшення мікроскопа та замальовують.

Контрольні запитання та завдання

1. Що розуміють під яровизацією?
2. У чому відмінність озимих і ярових рослин?
3. Як встановити закінчення стадії яровизації?
4. Як проводять яровизацію зернових?

Робота 114. ВИЯВЛЕННЯ АМІЛАЗИ В НАСІННІ, ЩО ПРОРОСТАЄ

У сухому насінні, яке перебуває в стані фізіологічного спокою, ферменти здебільшого дезактивовані. Під час набрякання насіння активність гідролаз різко зростає. Це відбувається досить швидко, з одного боку за рахунок активації ферментів, з іншого – за рахунок їх новоутворення. Ферменти переміщуються з клітин, у яких вони синтезувались, до інших або у зовнішнє середовище.

Крохмаль розщеплюють амілази. У рослинних тканинах виявлено ізоформи двох амілаз: α -амілаза, яка зумовлює розпад молекули крохмалю на частини (декстрини), і β -амілаза, яка відщеплює від крохмалю кінцеві залишки мальтози.

Сухе насіння пшениці, жита і ячменю містить тільки β -амілазу в зв'язаному неактивному стані. Під час проростання цей фермент переходить у вільний стан і, крім цього, α -амілаза синтезується *de novo*.

Мета роботи. На модельному досліді порівняти активність амілаз сухого та проростаючого насіння злаків.

Матеріали, реактиви, обладнання. Сухе і набрякле насіння пшениці, вівса або кукурудзи, ваги, водяна баня, скальпель, мірний циліндр місткістю 100мл, чашки Петрі, 1%-й крохмаль, розчин Люголя, агар.

Підготовка рослинного матеріалу. Насіння розрізають поперек гострим скальпелем або лезом безпечної бритви на дві частини: із зародком і без нього. Половинки насінин поміщають у воду і ставлять у термостат за температури 26 °С. Час інкубації становить 24 год.

Хід роботи.

1. На водяній бані розчиняють 1 г агару в 100 мл води, додають 10 мл 1%-го крохмалю і виливають розчин у шість чашок Петрі так, щоб товщина шару крохмального агару в кожній чашці була не менше 0,5 см.

2. Після застигання агару на його поверхні поміщають половинки насінин пшениці, вівса або кукурудзи зрізом униз. В першій чашці – набубнявілі половинки; в другій – сухі; в

третій – сухі половинки, але місця зрізу у них змочені водою (три чашки Петрі містять половинки з зародком, а три – без зародка).

3. За годину насіння видаляють, а на поверхню гелю наливають слабкий розчин Люголя (10 мл води + 10 крапель розчину Люголя). Спостерігають за забарвленням крохмального гелю. Результати записують до таблиці 7.8 і роблять висновки.

Таблиця 7.8. Забарвлення крохмального гелю після обробки розчином Люголя

Злак	Половинки із зародком			Половинки без зародка		
	набубнявілі	сухі	сухі, але місця зрізу змочені водою	набубнявілі	сухі	сухі, але місця зрізу змочені водою

Контрольні запитання та завдання

1. Які ферменти розщеплюють крохмаль?
2. У якій частині насінини синтезуються гібереліни?
3. Чому амілаза активується під час проростання насіння?
4. Як можна виявити активізацію амілази?

Робота 115. ПЕРЕТВОРЕННЯ РЕЧОВИН ПІД ЧАС ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ

Насіння рослин містить різноманітні запасні поживні речовини – білки, жири, вуглеводи. Насіння, в якому основною запасною речовиною є крохмаль, називають *крохмальним* (наприклад, насіння пшениці, жита, гороху), а те, в якому жири переважають над вуглеводами – *олійним* (наприклад, насіння ріцини, соняшника, ріпака).

Під час проростання насіння складні запасні речовини за участю ферментів перетворюються у простіші, які використовуються в процесі росту й розвитку паростка.

Усі моносахариди, а також дисахариди завдяки наявності аль-

дегідної або кето-групи є редукуючими, тобто мають відновлювальні властивості. Сахароза – нередукуючий цукор. Характерною реакцією на редукуючі цукри є відновлення рідини Фелінга.

Мета роботи. Встановити перетворення, яких зазнають запасні поживні речовини під час проростання насіння. Порівняти хімічний склад непророслого та пророслого насіння.

Матеріали, реактиви, обладнання. Сухе і проросле насіння пшениці та соняшнику, рідина Фелінга, розчин І у KI, розчин судану, водяна баня, фарфорові ступки, скальпелі, мікроскоп, предметні стекла, накривні скельця, препарувальні голки, фільтрувальний папір.

Хід роботи.

1. Розтирають у чотирьох ступках по 10 непророслих і пророслих насінин пшениці та соняшнику.

2. Розтерту масу переносять у чотири підписані пробірки, доливають воду до половини об'єму пробірки і ставлять на 15 хв. на киплячу водяну баню для екстракції розчинних речовин.

3. Зливають витяжки у чисті підписані пробірки, доливають рівний об'єм рідини Фелінга та витримують 5 хв на киплячій водяній бані.

4. За кількістю Cu_2O , що утворився, оцінюють вміст редукуючих цукрів.

5. До залишку матеріалу у пробірках першої групи доливають розчин йоду і за інтенсивністю посиніння оцінюють вміст крохмалю.

6. Роблять тонкі зрізи пророслого і непророслого насіння соняшнику, поміщають їх на предметні стекла в краплі розчину фарби судан III і накривають накривними скельцями.

7. За 5 хв. зрізи промивають водою, розглядають у мікроскоп та оцінюють вміст жиру за кількістю і розмірами червоних або оранжевих крапель.

Результати записують в таблицю 7.9, оцінюючи вміст крохмалю, цукру та жиру за п'ятибальною шкалою.

Таблиця 7.9. Перетворення речовин під час проростання насіння

Насіння		Крохмаль	Редукуючі цукри	Жири
Крохмальне	сухе			
	проросле			
Олійне	сухе			
	проросле			

Роблять висновки про перетворення вуглеводів і жирів під час проростання крохмального та олійного насіння.

Контрольні запитання та завдання

1. У яких органах рослин запасуються поживні речовини?
2. Які групи запасних поживних речовин містить насіння?
3. Яких перетворень зазнають запасні речовини під час проростання насіння?
4. Які ферменти беруть участь в активації поживних речовин, що є в насінині?
5. Що дає більший резерв енергії для руху: крохмаль чи ліпіди?

Робота 116. СПОСТЕРЕЖЕННЯ ЗА ФОТОТРОПІЧНОЮ РЕАКЦІЄЮ РОСЛИНИ

Фототропізм – ріст стебла рослин у напрямі одностороннього освітлення внаслідок нерівномірного росту освітленої і затіненої його сторін. Це пов'язано з неоднаковим балансом фітогормонів на різних боках рослини.

Мета роботи. Виявити вплив одностороннього освітлення на ріст стебла, дослідити вплив верхівки колеоптиля на цей процес.

Матеріали, реактиви, обладнання. Молоді (4÷5-добові) проростки злаків та інших рослин, станіоль для ковпачків, фототропічна камера.

Хід роботи.

1. Усі проростки ділять на три групи.

2. Верхівки третини проростків накривають станіольовими ковпачками, розміром до 1 см. Виготовляють їх так: маленький шматочок станіолу завширшки 1 см закручують на сірнику або на тоненькій паличці та скручують зверху.

3. У проростків другої третини зрізають 0,5÷1,0 см верхівки колеоптилів.

4. Решту рослин залишають для контролю.

5. Горщик з проростками ставлять поблизу лампи для однобічного освітлення.

6. За 45÷60 хв. спостерігають за напрямом росту проростків. Роблять висновки про місце сприйняття світлового сигналу у молодих проростків злаків.

Примітка. Типове явище фототропізму можна продемонструвати також на рослинах, які ростуть на вікні або в глибині кімнати. Усі листкові пластики у таких рослин обернені до світла.

Контрольні запитання та завдання

1. Схарактеризуйте механізм фототропічного руху? Яке значення цього руху для рослин?

2. Якою частиною сприймають світлові подразнення проростки злаків?

3. Назвіть рослини, яким властива фототропічна реакція.

4. Фітогормони якого класу беруть участь у фототропізмі?

5. Як розподіляється заряд на освітленому і затемненому боках стебла?

6. Чи відбуваються під час фототропізму електрокінетичні реакції на поверхневих мембранах клітин?

Робота 117. СПОСТЕРЕЖЕННЯ ЗА ГЕОТРОПІЧНОЮ РЕАКЦІЄЮ РОСЛИНИ

Корінь рослини проявляє позитивний геотропізм, а стебло – негативний. Це явище пов'язане з впливом на рослини сили земного тяжіння, яке сприймається, згідно з сучасними дослідженнями, кореневим чохлаком. У горизонтально розміщеного проростка корінь загинається вниз, а стебло – догори. Це визначається гормональним статусом нижньої і верхньої частин проростка.

Мета роботи. Дослідити залежність росту осевих органів рослини від сили земного тяжіння.

Матеріали, реактиви, обладнання. Скляні банки, скло для їх закривання, скляні пластинки, на яких закріплюються проростки, фільтрувальний папір, проростки гороху, кінських бобів та інших рослин.

Хід роботи.

1. Квадратну скляну пластинку обгортають папером і прикріплюють до неї в нормальному положенні (кінчиками вниз) кілька пророслих насінин.

2. На дно скляної банки наливають трохи води і ставлять у неї вертикально квадратну пластинку з рослиною. Банку закривають зверху склом.

3. Коли корінці виростуть на 8÷10 см, квадратну пластинку з насінням повертають на 180° і спостерігають за напрямом росту кореня та стебла.

4. Роблять висновки про геотропічну реакцію кореня та стебла.

Контрольні запитання та завдання

1. Як продемонструвати наявність геотропічних згинів кореня та стебла?

2. Яка причина різної реакції кореня та стебла на вплив земного тяжіння?

3. Чи відбувається геотропізм у багаторічних рослин?

4. Які досліді підтверджують участь кореневого чохлака у геотропічній реакції кореня?

Робота 118. СПОСТЕРЕЖЕННЯ ЗА ГІДРОТРОПІЧНОЮ РЕАКЦІЄЮ РОСЛИНИ

Гідротропізмом називають ростові рухи рослин, зумовлені одностороннім водопостачанням. Позитивний гідротропізм добре виражений у коренів, які за нерівномірного розподілу вологи у ґрунті вигинаються до більш зволжених ділянок.

Мета роботи. Виявити вплив вологи на ріст кореня.

Матеріали, реактиви, обладнання. Насіння льону або гірчиці, скляні банки, скло для їх закривання, скляні пластинки, фільтрувальний папір.

Хід роботи.

1. Скляні пластинки обгортають фільтрувальним папером, змочують папір водою і розкладають рядками на одному боці насіння льону або гірчиці. Змочене насіння прилипає до паперу.

2. У скляні банки наливають трохи води і під нахилом ставлять у них пластинки, щоб насіння було з нижнього боку пластинки. Одну банку закривають зверху склом, щоб створити насичену вологою атмосферу, другу залишають відкритою.

3. Банки поміщають в темне місце.

4. Через кілька днів розглядають і замальовують результати досліду. У висновках пояснюють причини різного росту коренів у варіантах досліду.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке тропізми?
2. Як називають рух кореня у нерівномірно зволоженому ґрунті?
3. Назвіть типи ростових рухів рослин. Як їх можна реєструвати?
4. Яке значення ростових рухів у житті рослин?
5. Що лежить в основі ростових рухів рослин?
6. Назвіть механізми ростових рухів?
7. Як впливає на рухи рослин Сонце та його активність?

**Робота 119. РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН
ТРАВ'ЯНИСТИМИ ЖИВЦЯМИ**

Трав'яністі живці часто використовують для розмноження смородини, агрусу, малини, троянд, гвоздики, багатьох лікарських і кімнатних рослин.

Мета роботи. Одержання студентами навичок розмноження рослин зеленими живцями, виявлення значення гетероауксину для їх укорінення.

Матеріали, реактиви, обладнання. Трав'яністі живці різних рослин; розчин гетероауксину (50÷80 мг/л); скляні ковпаки або невеликий парничок, склянки, кювети з піском, установка для вирощування рослин „Тюльпан”, гострі ножі.

Хід роботи.

1. Для живців відбирають добре розвинені та не надто соковиті пагони завдовжки 5÷7 см, які мають 2÷4 сформованих листки.

2. Нижній листок на живцях зрізають, а від верхнього відрізають половину для зменшення випаровування води. Нижній зріз роблять безпосередньо під місцем прикріплення листка, а верхній – на відстані 0,5 см над брунькою.

Примітка. Крім пагона, живцем може бути також окремих листок, а у деяких рослин – частина листка або навіть сім'ядоля. Зручними рослинами для розмноження живцями-листками є бегонія та сенполія. Їхні листки зрізають разом із черешками.

3. Для кращого укорінення живці занурюють на 3÷6 год. у розчин ІОК (20 мг/л). Контрольні живці такий самий час витримують у воді.

4. Після відмивання живців від ІОК їх висаджують під нахилом у річковий пісок або інший субстрат на глибину 1,0÷1,5 см.

Примітка. Глибоке садіння живців затримує ріст і зумовлює їхнє загнивання.

Якщо живцем слугує листок (бегонія), то його черешок занурюють у субстрат, а з нижнього боку впоперек жилки (у місцях їхнього перетину) роблять надрізи. Листкову пластинку нижнім боком притискають до субстрату, прикріплюючи гачками. У місцях поперечних надрізів розвиваються окремі рослини.

5. Висаджені живці накривають скляними ковпаками або прозорою плівкою. Кілька днів їх витримують у тіні, після чого виставляють на світло. Оптимальна температура культивування 25÷30 °С. Про укорінення живців свідчить утворення нових пагонів із верхніх бруньок.

6. Перед посадкою у ґрунт живці загартовують, поступово привчаючи їх до сухого атмосферного повітря. Дані записують

до протоколу і роблять відповідні висновки про вплив гетероауксину на ризогенез у рослин.

Контрольні запитання та завдання

1. У чому перевага розмноження рослин трав'янистими живцями порівняно зі здерев'янілими?
2. Чому живці не можна садити у ґрунт верхньою частиною?
3. Що розуміють під полярністю рослин? Наведіть кілька прикладів, які свідчать про існування полярності у рослин.
4. Чи застосовують для прискорення укорінення живців біологічно активні сполуки природного або синтетичного походження?
5. Наскільки широко біологічно активні сполуки нового покоління апробовані на різних рослинах?

Робота 120. РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН ЗДЕРЕВ'ЯНІЛИМИ ЖИВЦЯМИ

Здерев'янілими, або зимовими, живцями розмножують багато рослин. Найкраще їх заготовляти восени після опадання листків. Живці зв'язують по 50÷100 шт. у пучки і прикопують до весни у землю на ділянці або в холодному погребі. Стежать за тим, аби живці передчасно не почали рости і не пересохли.

Мета роботи. Набуття навичок розмноження рослин здерев'янілими живцями, виявлення впливу гетероауксину на укорінення живців.

Матеріали, реактиви, обладнання. Здерев'янілі живці різних рослин; розчин гетероауксину (50÷100 мг/л), гострі ножі, шпагат, невеликий парник.

Хід роботи.

1. Навесні з прикопаних пагонів нарізають живці з трьома-чотирма бруньками. Якщо міжвузля короткі, то залишають більшу кількість бруньок. Нижній зріз роблять перпендикулярно до бруньки, а верхній – над нею (паралельно бруньці).
2. Дослідні живці витримують 24 год. у розчині ІОК, а контрольні – у воді.

3. Живці висаджують в субстрат з невеликим нахилом, щоб до майбутніх коренів потрапляло більше повітря й тепла. На початку живці накривають плівкою або відразу висаджують у парник. Під час укорінення стежать за оптимальним зволоженням субстрату. Живці також обприскують водою.

4. Результати спостережень записують до протоколу і роблять відповідні висновки про вплив гетероауксину на ризогенез у живців.

Примітка. Цю роботу починають під час практичних занять у лабораторіях, а продовжують під час літньої виробничої практики.

Контрольні запитання та завдання

1. Чому живці спершу висаджують у парник і лише потім – у ґрунт?
2. Чому здерев'янілі живці зрізують після опадання листків?
3. Чи має відношення до цього сокорух, який відбувається в рослині від листків до коренів й навпаки?
4. Чому для укорінення живців використовують гетероауксин? Коротко схарактеризуйте цю сполуку.

РОБОТА 121. РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН ЩЕПЛЕННЯМ

Щеплення використовують для швидкого розмноження цінних сортів, прискорення цвітіння та плодоношення рослин, створення декоративної крони. Щеплення проводять на підщепах: яблуні – на дикій лісовій яблуні, китайській сливолистій, сибірській яблуні; груші – на груші звичайній та усурійській верболистій; вишні та черешні – на вишні звичайній, вишні кислій, дикій черешні; сливи – на домашній сливі, аличі, терені, абрикосах; абрикоси – на диких абрикосах (жерделях) і аличі. Крім сильнорослих підщеп, використовують напівкарликові та карликові форми. Щеплять рослини в різні пори року. Навесні щеплять за кору, врозщеп, окулірують брунькою, а літом окулірують вічком. Необхідно, щоб у період щеплення кора добре відділялася від деревини. У разі окулірування як прищепу беруть щиток, тобто шматочок кори з тонким шаром деревини і брунькою або вічком. На прищепі роблять лише невеликий розріз. За інших способів щеплення як прищепу вико-

ристовують живець з 2÷3 бруньками, який відповідно зрощують зі зрізаною підщепою.

Мета роботи. Здобути навички щеплення рослин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Садові й окулірувальні ножі, секатори, бруски для точіння ножів, рафія або лико (можна лейкопластир), вода, гілки різних рослин.

Хід роботи.

1. Окулірування. Це дуже поширений спосіб щеплення рослин. Він дає високий процент приживання. В умовах України його звичайно проводять у липні-серпні. У цей період кора відстає від деревини внаслідок сокоруху. Живці заготовляють у день окулірування або напередодні; стежать, щоб вони не підсохли. Для цього з середньої частини крони родючих маточних дерев зрізають однорічні пагони, з них видаляють листки, залишаючи лише 1,5 см черешка. Для окулірування використовують середні вічка. До зрізування вічок живці обгортають вологим мохом або іншим матеріалом, що зберігає їх від висихання. Зберігають живці у темному прохолодному місці.

Примітка. Опускати живці у воду не можна, бо тоді бруньки бубнявляють і гинуть.

Підщепи готують заздалегідь. Навесні в розсадниках висівають стратифіковане насіння. В сім'ядольній фазі сіянці пікірують. Протягом літа розпikirовані рослини ростуть на грядках. Навесні їх пересаджують в розсадник, а влітку окулірують. Перед цим на підщепях підчищають бічні гілки та відкривають кореневу шийку. Окулірують підщепи поблизу кореневої шийки на північному або північно-східному боці стовбура дички. На корі підщепи роблять Т-подібний надріз, спочатку поперечний завдовжки 1 см, а потім поздовжній – завдовжки 2 см.

Після цього з живця швидко вирізають щиток з вічком посередині. Загальна довжина щитка 22÷25 мм. Починають вирізати щиток на 1 см нижче бруньки, намагаючись зрізати якомога менше деревини. Під вічком роблять маленький поворот окулірувального ножа, трохи заглиблюючи його під подушечкою, де містяться судинно-волокнисті пучки. Щиток при цьому тримають за залишок черешка.

Відрізаний щиток швидко вставляють у Т-подібний розріз на

підщепі, попередньо тупим кінцем ножа відхиливши кору від деревини. Верхню частину щитка, що виступає над поперечним зрізом, відрізають і до нього щільно притуляють стулки кори дички. Місце окулірування міцно обв'язують ликом так, щоб вічко на щитку залишилося відкритим. Замість лика можна використати лейкопластир або ізоляційну стрічку.

Якщо за 10÷12 діб після окулірування черешок на щитку за легкого дотику відвалюється, щеплення вдалося. Через деякий час після окулірування пов'язку послаблюють.

Примітка. На практичних заняттях проводять окулірування на відрізаних пагонах, а на рослинах – під час літньої практики. Це стосується і наступних видів щеплення.

2. Щеплення за кору. У цьому виді щеплення підщепу зрізають упоперек і прикладжують поперечний зріз гострим ножом. Потім роговою п'яткою, що є на окулірувальному ножі, або спеціальним клиноподібним коровідділювачем відхиляють кору і в ці місця вставляють живці з трьома бруньками. На нижньому кінці живця роблять навскісний зріз з протилежного боку добре розвинутої бруньки. Живці вставляють у відхилену кору, а підщепу з живцями туго обв'язують ликом. Зрізи змазують садовим варом.

Примітка. Якщо щеплюють за кору то використовують двоі трирічні живці.

3. Щеплення врозщеп. У разі щеплення врозщеп підщепу зрізають і на ній роблять поздовжню щілину або виріз. На живці знизу роблять два косих зрізи, після чого його швидко вставляють у розщеп. Обов'язковою умовою щеплення є збіг кори прищепи з корою підщепи. Місце щеплення добре замазують садовим варом. Обв'язувати стовбур не треба, бо живець міцно стискується стулками розщепленої деревини.

Щеплення врозщеп часто застосовують у разі перещеплення товстих гілок і підщеп. Тоді в розріз підщепи вставляють кілька живців (з кожного боку по одному живцю). Стежать, аби камбіальні шари у підщепи і прищепи збігалися. Якщо вставляють чотири живці, то на підщепі роблять хрестоподібний розріз. Після того як живці вставлені врозщеп щілину закривають шматком кори, а місце щеплення міцно обв'язують. Поверхню підщепи густо змазують варом. Кількість прищеплюваних живців залежить від товщини підщепи або гілки.

Спостереження за результатами щеплення записують до протоколу.

Контрольні запитання та завдання

1. Для чого місця щеплення обмазують садовим варом?
2. Чому через деякий час після щеплення слід послабити пов'язку?
3. Для чого у разі літнього окулірування з живців зрізають листки?
4. Чи можна під час щеплення використовувати тупий і брудний ніж?
5. Чому важливо у разі щеплення врозщеп і за кору, щоб кора прищепи і підщепи збігалися?
6. Чи застосовують для стимуляції приживлення живців різні біологічно активні сполуки?

Контрольні запитання та завдання до розділу “Ріст і розвиток рослин”

1. Назвіть етапи онтогенезу рослинної клітини.
2. Назвіть етапи життєвого циклу вищих рослин.
3. Назвіть типи росту рослин. Що зумовлює різноманітність типів росту?
4. Що таке адвентивний ріст? Які структури називають адвентивними?
5. Що таке корелятивний ріст? Наведіть приклади практичного використання корелятивного росту.
6. Як змінюється швидкість росту з часом? Схарактеризуйте велику криву росту.
7. Поясніть, що таке періодичність росту, циркадна ритміка, біологічний годинник.
8. Поясніть явище полярності у рослин.
9. Назвіть системи регуляції морфогенезу рослин на рівні клітини і цілого організму.
10. Яке значення гормональної системи регуляції для багатоклітинних рослинних організмів?
11. Що таке фітогормони? Назвіть класи фітогормонів.
12. Які речовини є попередниками фітогормонів?
13. Назвіть основні прояви фізіологічної дії ауксинів, цитокінінів, гіберелінів, а також абсцизової кислоти та етилену.

14. Що таке фотоперіодизм? Яка функція фотоперіоду в регуляції росту і розвитку рослин?

15. Наведіть приклади рослин довгого і короткого дня та нейтральної групи.

16. Які ймовірні механізми дії фітохромів?

17. Як впливає температура на перехід рослин до цвітіння? Що таке яровизація?

18. Назвіть основні положення гормональної теорії цвітіння.

19. Поясніть участь фітохромів та біологічного годинника в індукції цвітіння.

20. Які процеси лежать в основі рухів рослин?

21. Сформулюйте основні положення гормональної теорії тропізмів.

22. Що таке настичні рухи?

23. Назвіть ймовірні механізми настій.

24. Що таке таксиси?

25. Назвіть основні форми розмноження рослин.

26. Назвіть основні стимулятори росту рослин природного та синтетичного походження. Як вони застосовуються на практиці?

27. Чому в рослинництві частіше використовують синтетичні, а не природні регулятори росту?

Розділ 8.

ФІТОБІОТЕХНОЛОГІЯ

Фітобіотехнологія – це сукупність технічних прийомів для модифікації, покращення, створення та розмноження рослинних організмів, одержання з них корисних речовин. Основою фітобіотехнології є метод культури тканин – вирощування ізольованих клітин, їхніх структур, тканин і органів на штучних живильних середовищах у стерильних умовах. В останні роки значно зріс інтерес до використання методу культури рослинних тканин. Це пояснюється тим, що новітні досягнення сучасної фізіології рослин, вірусології, цитології, генетики, селекції, молекулярної біології значною мірою зумовлені розвитком методів культивування *in vitro* ізольованих клітин, тканин і органів рослин. Фундаментальні дослідження клітин і тканин *in vitro* є основою, яка дає змогу об'єднати різні рівні досліджень, починаючи з молекулярного та закінчуючи популяційним, що надзвичайно важливо для вивчення різних проблем рослинного організму в цілому. Цей метод біологічного моделювання дає змогу вивчати елементи кореляційних зв'язків і ефектів, характерних для всього рослинного організму. Одним із основних принципів методу культури тканин є ступінь відтворення *in vitro* умов, близьких або ідентичних до тих, в яких клітина міститься на материнській рослині *in vivo*.

Відомо, що клітини різних тканин, органів, організмів функціонують *in vivo* в специфічних метаболічних умовах. Це є науковою основою для розробки різних за складом живильних середовищ. Існує більше ста живильних середовищ для культивування *in vitro* рослинних клітин, тканин і органів.

На основі методу культури рослинних клітин і тканин створені різні технології, серед яких:

- клональне мікророзмноження та оздоровлення рослин;
- одержання промисловим способом біологічно активних речовин рослинного походження;
- одержання соматичних гібридів рослин;
- створення генетично модифікованих рослин методами клітинної та генної інженерії.

Метод культури рослинних тканин останнім часом все ширше застосовують для вивчення: дії на рослини різних екстремаль-

них факторів, взаємодії рослинної клітини з патогенними організмами, гетерозису, несумісності генетичної інформації двох геномів, стерильності гібридів у разі віддаленого схрещування, трансплантації клітин, їхніх частин і навіть органів.

Усі проблеми, для вирішення яких використовують метод культури тканин, поділяють на три групи, які вирішуються на основі:

- епігенетичної зміни генетичної інформації, її поступової реалізації під впливом умов вирощування *in vitro*;
- зміни генетичної інформації шляхом мутагенезу;
- перенесення й інтеграції генетичної інформації.

Робота 122. МЕТОДИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ПОСУДУ, ІНСТРУМЕНТІВ І ДОПОМІЖНИХ МАТЕРІАЛІВ

Чистота і стерильність – головні вимоги роботи в біотехнологічній лабораторії. Стерилізація приміщення, ламінарів, інструментів, посуду, живильних середовищ, рослинного матеріалу на всіх етапах роботи є основою спіху і в багатьох випадках набагато важливіші, ніж спеціальне обладнання.

Мета роботи. Оволодіти основними способами стерилізації посуду, інструментів і допоміжних матеріалів.

Матеріали, реактиви, обладнання. Колби, пробірки, чашки Петрі, мірні піпетки, скальпелі, пінцети, 96° спирт, папір для загортання посуду, целофан, фільтрувальний папір, металевий або скляний пенал для інструментів, спиртівка, термостат, автоклав, ламінар-бокс.

Хід роботи.

1. Стерилізація посуду.

Стерилізація сухим жаром. Лабораторний посуд (колби, пробірки, чашки Петрі тощо) перед наповненням живильним середовищем попередньо стерилізують сухим жаром у сушильній шафі. Піпетки зручно стерилізувати в скляних пеналах, на дно яких необхідно покласти вату, щоб запобігти обламіванню носиків піпеток.

Тривалість стерилізації: за 150°C – 2,5 год, за 160°C – 2 год, за 170°C – 1 год.

Примітка. Слід пам'ятати, що до цього часу стерилізації необхідно додавати час, який потрібний для нагрівання завантажених у шафу предметів до заданої температури.

Стерилізація сухим паром. Посуд загорнутий у папір або з ватними тампонами стерилізують автоклавуванням. За автоклавування піпеток верхню частину закривають ватним тампоном (приблизно на 2 см) і кожну окремо загортають у папір.

Залежно від заповнення автоклава автоклавування триває 30÷40 хв. за тиску 2 атм і температури 133 °C.

Примітка. Камера автоклава заповнюється не більш як на 2/3 об'єму.

2. Стерилізація інструментів.

Стерилізація сухим жаром. Інструменти попередньо стерилізують сухим жаром у сушильній шафі так само як і посуд.

Стерилізація полум'ям. У боксі безпосередньо перед роботою інструменти занурюють у порцеляновий стакан із 96° спиртом і стерилізують обпалюванням у полум'ї спиртівки. Стерильний інструмент використовують лише для одноразової маніпуляції. Перед повторним використанням його знову необхідно простерилізувати спиртом і обпалити.

3. Стерилізація допоміжних матеріалів.

Вату, корки, марлю, папір, целофан, фольгу стерилізують автоклавуванням.

4. Перед початком операцій ламінарний бокс необхідно підготувати до роботи. Для цього упродовж 30 хв. його стерилізують ультрафіолетом, після чого робочу поверхню протирають 70÷96° спиртом.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке біотехнологія?
2. Чому біотехнологію поділяють на класичну і сучасну?
3. У чому полягає суть методу культури *in vitro* клітин, тканин та органів рослин?
4. Як на практиці застосовують культуру тканин?
5. Який посуд використовують для роботи з культурою ізолюваних клітин, тканин та органів рослин?
6. Як здійснюється стерилізація посуду та допоміжних матеріалів?
7. Назвіть методи стерилізації інструментів.

Робота 123. ПРИГОТУВАННЯ МАТОЧНИХ РОЗЧИНІВ ДЛЯ СЕРЕДОВИЩА МУРАСИГЕ І СКУГА

Живильне середовище – основний фактор успішного культивування ізолюваних органів, тканин і клітин рослин. Основними компонентами живильних середовищ є мінеральні солі (макро- і мікроелементи), джерело вуглеводного живлення (звичайно сахароза або глюкоза), вітаміни та регулятори росту (табл. 8.1). Для вирощування *in vitro* рослин і клітин найчастіше використовують середовище Мурасиге і Скуга (МС).

Живильні середовища готують на бідистильованій або дистильованій воді.

Таблиця 8.1. Середовища для культивування *in vitro* рослин і калюсної тканини

Компоненти	Середовище МС для рослин	Середовище №1 для калюсу *	Середовище №2 для калюсу **
NH_4NO_3	1650	1650	1650
KNO_3	1900	1900	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	440	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	370
KH_2PO_4	170	170	170
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8	27,8
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3	37,3
H_3BO_3	6	6	6
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6	8,6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025
KI	0,83	0,83	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	22,3	22,3
Мезоінозит	100	100	100
PP	0,5	0,5	0,5
B_1	0,1	0,1	0,1
B_6	0,5	0,5	0,5
НОК			2
2,4-Д		3	2
Кінетин		1	1
Сахароза	30000	25000	25000
Агар	0,7%	0,7%	0,7%
pH	5,6 – 5,8		

* – Середовище для калюсу картоплі.

** – Середовище для калюсу гвоздики, тютюну, топінам бура, сої, моркви

Для зручності і прискорення процесу приготування живильного середовища доцільно заздалегідь приготувати концентровані (маточні) розчини макро- і мікросолей, вітамінів і регуляторів росту. Розчини зберігають у холодильнику за $2 \div 4^\circ\text{C}$ у посуді з темного скла не більше $4 \div 6$ тижнів.

Маточні розчини макро- і мікросолей готують у концентраціях, що у 10 разів перевищують потрібні. Зберігають у стерильному посуді або у замороженому стані.

Маточні розчини мікросолей готують у концентраціях, що у 100 разів перевищують потрібні, з розрахунку, щоб у 1 мл маточного розчину містилась маса речовини, потрібна для приготування 1 л середовища. Об'єм цих розчинів має бути 0,1 л.

Для виготовлення маточних розчинів кожен сіль зважують і розчиняють окремо у новій порції бідистильованої води.

Розчини вітамінів готують у концентрації 1 мг/мл. Розчиняють у бідистильованій воді.

Розчини фітогормонів готують таким чином: цитокініни (кінетин, зеатин, БАП) спочатку розчиняють у невеликій кількості 1н. розчину лугу або кислоти, ауксини (ІОК, НОК, 2,4-Д) – у краплі етанолу, підігрівують і додають відповідний об'єм бідистильованої води; гібереліни розчиняють у бідистильованій воді. Концентрація розчинів фітогормонів 1 мг/мл.

Розчини вітамінів і фітогормонів (ІОК, зеатин, гіберелін) розливають по $3 \div 5$ мл і зберігають у замороженому стані.

Вуглеводи і органічні добавки зважують і додають безпосередньо до середовища.

Мета роботи. Приготувати маточні розчини макро- і мікросолей, вітамінів, фітогормонів, Fe-хелату.

Матеріали, реактиви, обладнання. NH_4NO_3 , KNO_3 , CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KI, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,4-Д, кінетин, B_1 , B_6 , PP, спирт, 1н. HCl і 1н. KOH, ваги,

магнітний змішувач, плитка, лопатки (шпателі), лабораторний посуд – склянка або колба місткістю 1 л, мірні циліндри місткістю 500 і 100 мл, мірні піпетки на 5 і 1 мл, пляшки з темного скла – 1 л, 100 мл, 50 і 25 мл.

Примітка. Для розчинів макросолей і вітамінів бажано використовувати стерильний посуд.

Хід роботи.

1. Приготувати розчини макро- і мікро солей для середовища МС.

Макросолі – 1 л розчину:

NH_4NO_3	16,5 г
KNO_3	19,0 г
CaCl_2	3,3 г
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,2 г
KH_2PO_4	1,7 г

Мікросолі – 100 мл розчину:

H_3BO_3	620 мг
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,23 г
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860 мг
KI	83 мг
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25 мг
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5 мг
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5 мг

2. Приготувати 100 мл розчину Fe-хелату:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	557 мг
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	745 мг

Наважки розчинити окремо у бідистилаті, злити і довести до кипіння.

3. Приготувати розчини фітогормонів: 2,4-Д і кінетин.

4. Приготувати розчини вітамінів B_1 , B_6 і РР.

Контрольні запитання та завдання

1. Які групи речовин входять до складу живильного середовища для вирощування *in vitro* клітин, тканин та органів рослин?

2. Назвіть основні живильні середовища, які використовують для культивування ізолюваних клітин, тканин та органів рослин.

3. Чому до складу більшості середовищ залізо додають у хелатованій формі?

4. Які азотовмісні сполуки використовують як джерела азоту у живильних середовищах для культивування *in vitro* рослинних клітин, тканин та органів?

5. Вітаміни якої групи найважливіші для росту ізолюваних рослинних тканин?

6. Які вуглеводи і у якій концентрації є найкращим джерелом вуглеводного живлення для більшості рослинних тканин?

Робота 124. ПРИГОТУВАННЯ СЕРЕДОВИЩА МУРАСИГЕ І СКУГА

Приготування живильних середовищ вимагає особливої ретельності і послідовності у роботі.

Після змішування усіх компонентів (мінеральних солей, вуглеводів, вітамінів і регуляторів росту) у середовище додають воду до потрібного об'єму і доводять рН до 5,6÷5,8 (звичайно 1н. КОН).

Значення рН середовища впливає на стійкість та засвоєння низки складових середовища. Для більшості рослинних тканин значення рН становить від 5,0 до 6,0, а оптимальне – 5,6÷5,8. Величину рН середовища перед автоклавуванням доводять до 5,5÷6,0, оскільки під час автоклавування вона трохи зменшується в результаті утворення цукрових кислот.

За консистенцією середовища бувають тверді, або агарові, і рідкі. Для приготування твердих живильних середовищ використовують агар-агар.

Середовища стерилізують автоклавуванням або фільтруванням.

Мета роботи. Приготувати живильне середовище Мурасиге і Скуга (МС) і простерилізувати середовище автоклавуванням.

Матеріали, реактиви, обладнання. Маточні розчини макро- і мікросолей, Fe-хелату та вітамінів, мезо-інозит, сахароза, агар, 1 н. HCl і 1н. КОН, ваги, шпателі, магнітний змішувач, рН-метр, плитка, автоклав, склянка або колба місткістю 1 л, мірні циліндри місткістю 500 і 100 мл, мірні піпетки на 5 і 1 мл, ватні корки або фольга.

Хід роботи.

Для приготування 1 л середовища МС необхідно:

Макросолі	100 мл
Мікросолі	1 мл
Fe-хелат	5 мл
B ₁	0,1 мг
B ₆	0,5 мг
PP	0,5 мг
Мезо-інозит	100 мг
Сахароза	30 г (3%)
Агар	7 г

1. Для приготування 1 л середовища МС колбу або склянку місткістю 1 л помістити на магнітний змішувач, налити 250÷300 мл бідистилату і додати потрібну кількість розчинів макро- і мікросолей, Fe-хелату, вітамінів і фітогормонів, якщо останні входять до складу середовища.

2. Зважити потрібну кількість мезо-інозиту, сахарози і органічних добавок, якщо вони входять до складу середовища. Кожну наважку розчинити в окремій порції бідистильованої води.

3. Довести рН до 5,6÷5,8 за допомогою 1н. КОН або 1н. HCl.

4. Наважку агару помістити у термостійку колбу або склянку, залити холодною бідистильованою водою (300÷400 мл), залишити на 20 хв. для набухання та нагріти, постійно помішуючи до повного розчинення агару.

Примітка. При приготуванні рідкого середовища агар не додається.

5. Додати розчинений агар до рідкого середовища і довести до потрібного об'єму бідистильованою водою. Розчин і воду підігріти.

6. Розлити тепле середовище у колби або пробірки і закрити ватними корками або фольгою.

Примітка. У колби наливаємо середовище до 1/2-2/3 об'єму.

7. Простерилізувати середовище у автоклаві за тиску 0,8-1,0 атм (температура 115÷120 °C) 20÷25 хв. залежно від об'єму (табл. 8.2).

Примітка. Після закінчення стерилізації середовища в автоклаві варто повільно зменшувати тиск в апараті і відкривати кришку лише після того, як внутрішній тиск дорівнюватиме зовнішньому (на манометрі стрілка вказуватиме на 0). Інакше, за різкої зміни тиску середовище може змочити, або навіть виштовхнути корки.

Таблиця 8.2. Час стерилізації живильного середовища

Об'єм на посудину, мл	Час стерилізації, за 121 °C (1атм), хв..
20-50	15
75	20
250-500	25
1000	30
2000	40

Контрольні запитання та завдання

1. Якими є оптимальні межі величини рН середовища для більшості рослинних культур?

2. На які процеси впливає величина рН середовища?

3. Які типи культур особливо чутливі до величини рН?

4. На які типи поділяють середовища залежно від консистенції?

5. Які полісахариди використовують для приготування твердих середовищ?

6. У яких випадках до складу живильного середовища додається активоване вугілля?

7. Назвіть основні способи стерилізації живильних середовищ.

Робота 125. СТЕРИЛІЗАЦІЯ НАСІННЯ ТА ВИРОЩУВАННЯ АСЕПТИЧНИХ РОСЛИН

Основна умова вирощування *in vitro* рослинних клітин, тканин і органів - це стерильність. У зв'язку з тим, що поверхневі тканини органів рослин інфіковані епіфітними бактеріями, грибами та їхніми спорами, першим кроком для отримання ізольованих клітин, тканин і органів рослин є стерилізація вихідного матеріалу.

Для стерилізації рослинного матеріалу використовують широкий набір різних стерилізуючих речовин. Найпоширенішими є розчини, що містять активний хлор (гіпохлорит кальцію та натрію, хлорамін, "Білизна"), ртутні препарати (сулема, діацид) і окисники (перекис водню, перманганат калію). Іноді використовують препарати азотнокислого срібла – $0,5 \div 2,0 \text{ \% AgNO}_3$.

Правильний вибір стерилізуючої речовини полягає у тому, щоб нейтралізувати епіфітну мікрофлору і не пошкодити тканини рослин. Крім цього, речовина не повинна глибоко проникати у тканину і має легко вимиватися.

Залежно від ступеня забруднення насіння ділять на три групи:

- із незначним зараженням поверхні мікроорганізмами (насіння пшениці, сорго, капуста);

- із зараженням лише зовнішньої поверхні насіння (латук, шпинат, редис, томат, кукурудза, морква);

- з наявністю мікроорганізмів на поверхні і в середині насіння (рис, соняшник, соя, сосна).

Режим обробки насіннєвого матеріалу обирають залежно від того, до якої групи належить насіння. Але стерилізуючу речовину, її концентрацію, а також час стерилізації необхідно визначати для кожного виду та сорту дослідним шляхом.

Мета роботи. Отримати стерильне насіння та виростити з нього асептичні рослини.

Матеріали, реактиви, обладнання. Мильний розчин, 70 %-й розчин спирту, склянки зі стерильною водою, концентрований розчин "Білизни", склянки для стерилізуючих розчинів, мірний циліндр, насіння сої, пробірки з безгормональним середовищем МС для рослин сої, чашки Петрі зі стерильним фільтрувальним

папером, стерильні чашки Петрі, марля, пінцети, скальпелі, спиртівка, спирт для стерилізації інструментів, ламінар-бокс.

Хід роботи.

1. Приготувати розчин "Білизни" – одна частина препарату і три частини води (1:3).

Примітка. Розчин використовують одноразово відразу після приготування.

2. Промити насіння сої мильним розчином.

3. У марлеві мішечки покласти по 10 насінин.

4. Промиті насіння у боксі на 1 хв. помістити у склянку з 70 %-м етанолом.

5. Стерильним пінцетом перенести мішечки з насінинами у склянку зі стерилізуючим розчином і витримати 15÷18 хв.

Примітка. Об'єм насіння має займати 1/4 об'єму стерилізуючого розчину. Мішечки потрібно перевертати кожні 2 хв., аби розчин гарно змочував насіння.

6. Простерилізоване насіння промити у стерильній дистильованій воді. Стерильним пінцетом перенести мішечки із склянки зі стерилізуючим розчином у склянку зі стерильною дистильованою водою. Витримати 10 хв. Промивання повторити тричі, використовуючи нову порцію води.

7. Мішечки з промитим насінням стерильним пінцетом перенести у стерильну чашку Петрі з проавтоклавованими паперовими фільтрами, аби забрати надлишок води.

8. Стерильним пінцетом перенести один із мішечків до іншої чашки Петрі, розгорнути його двома пінцетами і згребти насіння у цю саму чашку.

9. Стерильним пінцетом перенести насіння на безгормональне живильне середовище у пробірки. Відкрити пробірку, обпалити горло пробірки у полум'ї спиртівки, стерильним пінцетом помістити насінину на середовище, знову обпалити горло пробірки і корок в полум'ї спиртівки, після чого закрити пробірку корком.

Підписати пробірку, зазначивши середовище, вид або сорт рослини і дату посадки.

10. Пробірки з насінням помістити у термостат за температури $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$.

11. За 4÷6 діб перевірити чистоту посіву та схожість насіння. Визначити відсоток асептичного насіння. Результати записати у таблицю 8.3.

12. Після проростання насіння пробірки перенести у термостат з освітленням 400 лк і температурою $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Таблиця 8.3. Визначення оптимальних умов стерилізації насіння

Номер досліду	Концентрація розчину "Білизни"	Тривалість стерилізації, хв	Загальна кількість насіння	Кількість інфікованого насіння за 7 діб		Схожість насіння		Ефективність стерилізації, %
				штук	%	штук	%	
1	1:3	15						
2	1:3	17						
3	1:3	18						

Контрольні запитання та завдання

1. Назвіть речовини, які використовують для стерилізації рослинного матеріалу.
2. Які характеристики рослинного матеріалу необхідно враховувати, вибираючи речовину для стерилізації?
3. Назвіть загальні правила стерилізації рослинного матеріалу.

Робота 126. СТЕРИЛІЗАЦІЯ БУЛЬБ, КОРЕНЕПЛОДІВ І КОРЕНЕВИЩ

Однорідність клітинного складу, синхронність поділів, чітка відповідь у стані спокою на дію індукторів поділу роблять бульби і коренеплоди зручною моделлю для вивчення метаболізму клітини під час проходження нею клітинного циклу і переходу із

диференційованого у дедиференційований стан. Цю модель використовували для вивчення індукції синтезу ДНК, білка і різних форм ДНК, дослідження ферментативної активності у різні фази клітинного циклу.

Для отримання експлантатів використовують здорові бульби, коренеплоди або кореневища.

Мета роботи. Оволодіти методикою стерилізації обпалюванням бульб, коренеплодів і кореневищ, отримати первинний калюс.

Матеріали, реактиви, обладнання. Бульби картоплі, мильний розчин, чашки Петрі з калюсним середовищем № 1, пінцети, скальпелі, коркові свердла, спирт, спиртівка, ламінар-бокс, парафілм.

Хід роботи.

1. Бульби вимити проточною водою й обчистити від шкірки.
2. Бульби вимити у мильному розчині, а потім ополіснути дистильованою водою.
3. У боксі бульбу на кілька секунд занурити у спирт, дати йому стекти і обпалити бульбу у полум'ї спиртівки.
4. Покласти обпалену бульбу у стерильну чашку Петрі і притримуючи її стерильним пінцетом, скальпелем відрізати частину бульби.
5. Стерильним корковим свердлом вичленити циліндр з бульби.
6. Циліндр тканини порізати скальпелем на диски, помістити їх на середовище для калюсогенезу. Два крайні диски відкинути.
7. Чашки Петрі підписати і закрити парафілмом.
8. Чашки з експлантатами культивувати у термостаті без освітлення за температури $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Примітка. У даній роботі можна використовувати бульби топінамбура, коренеплоди моркви, кореневища женьшеню.

Контрольні запитання та завдання

1. Для вивчення яких процесів використовують тканини бульб і коренеплодів?

2. Чому бульби, коренеплоди і кореневища стерилізують обпалюванням?

3. Назвіть загальні правила стерилізації рослинного матеріалу.

Робота 127. МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН ЖИВЦЯМИ

Мікроклональне розмноження – це безстатеве вегетативне розмноження в культурі *in vitro*, за якого отримують рослини генетично ідентичні вихідній батьківській формі, що сприяє збереженню генетично однорідного посадкового матеріалу. Воно має низку переваг порівняно з традиційними методами розмноження рослин:

- економія вихідного матеріалу;
- отримання великої кількості копій із мінімальної кількості рослинного матеріалу;
- отримання генетично однорідного матеріалу;
- можливість відбирати *in vitro* рослинний матеріал з бажаними ознаками;
- можливість отримання безвірусного матеріалу;
- можливість розмножувати рослини впродовж року, оскільки їх ріст і розвиток *in vitro* практично не залежать від сезону;
- можливість отримувати у великих кількостях вегетативне потомство видів рослин, що важко розмножуються у звичайних умовах;
- економія площі для вирощування;
- можливість тривалого збереження пробірочних рослин за понижених температур, що дає змогу створити банк цінних форм рослин.

На сьогодні розроблено різні способи біотехнології мікроклонального розмноження. В їх основі лежать чотири принципових підходи:

- активація розвитку рослинних меристем (апекс пагона, пазушні та сплячі бруньки пагона);
- утворення адвентивних бруньок із тканин експлантата;
- індукція соматичного ембріогенезу;
- диференціація адвентивних бруньок у первинній та перевинній калюсній тканині.

Основним методом мікроклонального розмноження рослин є активація пазушних меристем, яка базується на знятті апікального домінування.

Інший метод – це індукція виникнення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експлантата.

У певних випадках ефективним методом розмноження рослин *in vitro* є соматичний ембріогенез.

Основними факторами, що впливають на процес мікроклонального розмноження, є тип експлантата, склад живильного середовища й умови культивування.

Як вихідний матеріал для мікроклонального розмноження можна використовувати верхівкові та пазушні меристеми стебла, молоді листки, елементи суцвіття та квітки, цибулин і бульбоцибулин. Ідеальним матеріалом для отримання численних пагонів є апікальні та пазушні бруньки здорових рослин і тих, що активно ростуть.

У більшості випадків для мікроклонального розмноження рослин *in vitro* використовують різні модифікації середовища Мурасиге і Скуга.

Мета роботи. Оволодіти методикою вегетативного розмноження рослин *in vitro*, що базується на активації пазушних меристем.

Матеріали, реактиви, обладнання. Асептичні рослини картоплі, гвоздики або тютюну, стерильне середовище МС (у пробірках для рослин картоплі та гвоздики або баночках для рослин тютюну), стерильні чашки Петрі, скальпелі, пінцети, спирт, спиртівка, ламінар-бокс.

Хід роботи.

1. Пробірку з рослиною протерти спиртом і обпалити горло у полум'ї спиртівки.

2. Стерильним пінцетом дістати рослину-регенерант із пробірки, в якій вона росла, і помістити її у стерильну чашку Петрі.

3. Підтримуючи рослину пінцетом, скальпелем порізати стебло на сегменти завдовжки приблизно 10 мм, щоб частина над брунькою становила 2÷3 мм, а під нею – 5÷7 мм. Обрізати листки.

Примітка. У верхівки рослини листки не обрізати.

4. Пінцетом перенести кожний сегмент у пробірку з живильним середовищем МС.

Примітка. Пазуха листка має бути над середовищем.

5. Культивування проводити за температури $25^{\circ}\pm 28^{\circ}\text{C}$, освітлення 2÷3 клк, 16-годинного фотоперіоду, відносної вологості повітря 70÷75 %.

6. За 3÷4 тижні з пазушних бруньок розвиваються рослини-регенеранти, які знову можна використати для розмноження живцюванням та отримання калюсної тканини, ізольованих протопластів тощо.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке мікроклональне розмноження?
2. Назвіть основні переваги мікроклонального розмноження над традиційним.
3. Від яких факторів залежить здатність рослинної клітини реалізувати властиву їй тотипотентність?
4. Назвіть методи мікроклонального розмноження.
5. Назвіть етапи мікроклонального розмноження рослин.

Робота 128. ОТРИМАННЯ ПЕРВИННОГО КАЛЮСУ

Основним типом рослинної культури *in vitro* є калюсна. Вона використовується як вихідний матеріал для отримання суспензійної культури, ізольованих протопластів, сполук вторинного синтезу, проведення клітинної селекції для отримання нових форм рослин тощо.

У відповідь на поранення паренхімні клітини дедиференціюються, переходять до проліферації, внаслідок чого утворюється первинна калюсна тканина. Утворення та ріст калюсу регулюються певним співвідношенням ауксинів і цитокінінів. За допомогою цих речовин можна індукувати утворення калюсу тими тканинами рослини, які його не утворюють у разі поранення.

Для отримання калюсу використовують середовища Уайта, Мурасиге і Скуга, Гамборга та інші, доповнені регуляторами росту. Для індукції калюсоутворення слід використовувати живильні середовища з високим співвідношенням ауксину і цитокініну (10:1).

Утворення калюсу залежить також від розмірів експлантата. Розмір первинного експлантата, $5\div 10\text{ мм}^3$, а вага – $20\div 100\text{ мг}$.

Мета роботи. Отримати калюсну тканину з експлантів листкового, стеблового, черешкового і міжвузлового походження; порівняти частоту калюсоутворення на експлантатах різного походження.

Матеріали, реактиви, обладнання. Асептичні рослини картоплі, гвоздики або тютюну; чашки Петрі зі стерильним середовищем для калюсу, стерильні чашки Петрі, скальпелі, пінцети, леза, спирт, спиртівка, ламінар-бокс, парафілм.

Хід роботи.

1. Стерильним пінцетом дістати рослину із пробірки (картопля, гвоздика) або баночки (тютюн) і помістити у стерильну чашку Петрі.

2. Підтримуючи рослину пінцетом, скальпелем розрізати її на експлантати: стебло, міжвузля, листок і черешок ($5\div 10\text{ мм}$). На листках зробити додаткові надрізи.

3. Експлантати помістити у чашки Петрі з калюсогенним середовищем.

4. Закрити чашки та підписати їх.

5. Чашки Петрі з рослинним матеріалом культивувати у термостаті за температури $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

6. За 25÷30 діб візуально визначити частоту калюсоутворення на експлантатах. Результати записати у таблицю 8.4.

Таблиця 8.4. Частота калюсоутворення на експлантатах різного походження

Номер досліджу	Тип експлантата	Загальна кількість експлантів	Кількість експлантів, що утворили калюс		Індекс росту
			штук	%	

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке калюс?
2. Які зміни відбуваються у спеціалізованій клітині під час переходу до дедиференціації?
3. Із яких органів рослини можна отримати калюсну тканину?
4. Які фітогормони індукують утворення калюсної тканини?
5. Чим відрізняються середовища для вирощування рослин від середовищ для вирощування калюсу?

Робота 129. ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗІОЛОГІЧНОЇ ПОЛЯРНОСТІ

Полярність – це фізіологічна відмінність протилежних полюсів певної клітини, органа або усієї рослини. У рослин вона виникла як наслідок нерівномірного впливу факторів навколишнього середовища на різні її частини. Полярність властива усім рослинним організмам, але найбільшого розвитку вона досягла у вищих рослин. Найяскравіше полярність виявляється під час вкорінення живців: на верхньому кінці живця розвиваються бруньки, а на нижньому – утворюються корені незалежно від положення його у просторі. У зв'язку з цим калюс утворюється інтенсивніше на боці експлантата, який на материнській рослині обернений до кореня, тому в разі отримання калюсу на фрагментах стебла, шматочках кореня моркви експлантати поміщають на агар апікальним боком. Якщо ізолюють експлантати із бульб (топінамбур, картопля), то полярність не має суттєвого значення. Для повного виключення впливу полярності експлантати бульб можна поміщати на середовище тангентально. Крім цього, якщо шматочок тканини досить великого розміру, його варто поміщати на середовище апікальним боком, за невеликих розмірів експлантата дотримання умов полярності не важливе.

Мета роботи. Ознайомитись із явищем фізіологічної полярності під час культивування рослинних тканин *in vitro*.

Матеріали, реактиви, обладнання. Коренеплоди моркви; чашки Петрі зі стерильним середовищем №2 для калюсу, сте-

рильні чашки Петрі, скальпелі, пінцети, коркові свердла, спирт, спиртівка, ламінар-бокс, парафілм.

Хід роботи.

1. Простерилізувати коренеплоди моркви.
 2. Стерильним корковим свердлом вичленити циліндр тканини : гладкий зріз – це апікальний бік, а надірваний – базальний.
 3. Циліндр тканини скальпелем порізати на диски завтовшки $1,5 \div 2,0$ мм.
 4. Диски помістити на середовище для калюсогенезу: частину апікальним боком донизу, а частину – базальним боком донизу.
 5. Чашки Петрі з рослинним матеріалом культивувати у термостаті за $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$.
 6. За $5 \div 6$ тижнів порівняти частоту калюсоутворення на експлантатах моркви з різним положенням на середовищі. Частоту калюсоутворення визначають як відсоток експлантатів, які утворили калюс, від загальної їх кількості.
- Результати записати у таблицю 8.5.

Таблиця 8.5. Вплив полярності на частоту калюсоутворення

Номер досліджу	Положення експлантата на середовищі	Загальна кількість експлантатів, шт.	Частота калюсоутворення, %

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке полярність?
2. Чи всім частинам рослинного організму властива полярність?
3. На якому боці експлантата інтенсивніше формується калюс?
4. Під час культивування експлантатів якої культури обов'язково дотримуватися полярності?
5. Як виключити вплив полярності у разі культивування експлантатів бульб?

Робота 130. ОТРИМАННЯ ПЕРЕВИВНОЇ КАЛЮСНОЇ КУЛЬТУРИ

Первинний калюс – це той, що утворився на експлантатах за 4÷6 тижнів. Його переносять на свіже живильне середовище – перевивають (субкультивують). У результаті цього отримують калюсну тканину, яка має вигляд аморфної маси, що складається з тонкостінних паренхімних клітин без визначеної анатомічної структури. Розмір трансплантата, культивованого на агаровому середовищі, коливається від 60 до 100 мг тканини на 30÷40 мл живильного середовища.

Калюсну тканину можна підтримувати в культурі необмежено тривалий час, періодично розділяючи її на фрагменти та пересаджуючи на свіже середовище.

Мета роботи. Наростити калюсну тканину й отримати перевивну культуру.

Матеріали, реактиви, обладнання. Чашки Петрі з експлантатами, на яких утворився калюс, чашки Петрі зі стерильним середовищем для калюсу, пінцети, скальпелі, стерильні чашки Петрі, спирт, спиртівка, ламінар-бокс, парафілм.

Хід роботи.

1. Експлантат з первинним калюсом перенести у стерильну чашку Петрі.

2. Притримуючи експлантат пінцетом, скальпелем зрізати калюс.

3. Скальпелем поділити калюсну тканину на рівні фрагменти, які перенести на свіже живильне середовище. Підписати чашку Петрі та закрити парафілмом.

4. Чашки культивувати у термостаті за $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

5. За 4÷6 тижнів від наростлої калюсної тканини відокремити шматочки агарового середовища, а калюс розділити на рівні фрагменти, які перенести на свіже живильне середовище для калюсу.

Примітка. Для підтримання калюсної культури дану операцію необхідно проводити кожні 4÷6 тижнів. Період субкультивування встановлюють для кожної культури експериментально.

Контрольні запитання та завдання

1. Назвіть цитолого-морфологічні особливості клітин калюсної тканини.

2. Наведіть приклади можливого використання калюсної тканини.

3. Які фітогормони використовують для росту та диференціації рослинних клітин?

4. Що таке клітинна селекція?

5. Назвіть переваги клітинної селекції над традиційною.

6. Що таке соматоклональна мінливість і де її використовують?

Робота 131. ВПЛИВ СПІВВІДНОШЕННЯ АУКСИН: ЦИТОКІНІН НА РІСТ КАЛЮСНОЇ ТКАНИНИ ТА ЇЇ ТИП

Залежно від походження та умов вирощування калюсні тканини бувають :

- пухкими, сильно обводненими, які легко розпадаються на окремі клітини;

- середньої щільності, з добре вираженими меристематичними осередками;

- щільними (компактними) з зонами редукованого камбію і судин.

У разі тривалого культивування на живильних середовищах на щільність калюсу впливають ауксини, особливо 2,4-Д: чим вищий вміст 2,4-Д у середовищі, тим пухкіша калюсна тканина. Встановлено, що щільні калюси можуть дати початок пухким тканинам, але не навпаки.

Для визначення росту калюсних тканин в першу чергу визначають збільшення сирої маси ($W_t - W_0$), де W_0 – початкова маса калюсу, W_t – кінцева маса калюсу. Результати можуть бути виражені відносно вихідної маси

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0}.$$

Це дає змогу встановити у скільки разів збільшилася маса впродовж дослідження.

Величину приросту маси можна виразити у відсотках

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot 100\%.$$

Якщо тривалість росту в окремих випадках неоднакова, необхідно ввести у формулу фактор часу

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot \frac{1}{t}.$$

Так само можна проводити облік результатів за масою сухої речовини.

Як правило, для оцінки росту калюсу визначення приросту маси сирої і сухої речовини недостатньо. Більше інформації про особливості росту калюсу отримують у разі визначення кількості клітин на одиницю маси тканини або на калюс. Підрахунок клітин дає змогу визначити за рахунок чого відбувається збільшення маси тканини: за рахунок поділу клітин чи їхнього росту. Це дає можливість розрахувати і середню вагу клітини. Кількість клітин визначають за методом Брауна, який полягає у мацерації і наступному підрахунку клітин у краплі суспензії. Використовують кілька методів мацерації, більшість із яких базується на обробці тканин кислотами, котрі гідролізують серединні пластинки, що з'єднують клітини.

Клітини підраховують у камері Фукс–Розенталя.

Мета роботи. Візуально визначити тип калюсної тканини на середовищах з різним співвідношенням ауксин:цитокінін; визначити співвідношення ауксин:цитокінін, яке забезпечує максимальний приріст маси калюсної тканини.

Матеріали, реактиви, обладнання. Чашки Петрі з калюсом (картоплі, тютюну, сої, топінамбура тощо); маточні розчини макро- та мікросолей МС, Fe-хелату, вітамінів, 2,4-Д, кінетину, інозит, сахароза, агар, 1н. КОН, пеніцилінові флакончики, фольга, склянки, мірний циліндр, мірні піпетки, ваги, рН-метр, автоклав, стерильні чашки Петрі, скальпелі, пінцети, спирт, спиртівка, хромовий ангідрид, пробірки, камера Фукс-Розенталя, мікроскоп.

Хід роботи.

Робота складається з кількох завдань.

Завдання 1.

1. Приготувати 1 л середовища МС з додаванням 3 мг/л 2,4-Д.
2. Розділити середовище на 10 частин по 100 мл і розлити у пронумеровані склянки.
3. До середовища у кожну склянку додати відповідну кількість кінетину від 0,1 до 1,0 мг/л (0,1, 0,2, 0,3...1,0 мг/л).
4. Середовище розлити у пеніцилінові флакончики (по 5 мл), закрити фольгою і проавтоклавувати.

Завдання 2.

1. У боксі 4÷6-тижневу калюсну тканину розділити на рівні фрагменти, які перенести на середовище у пеніцилінові флакончики. 20÷30 експлантів залишити і окремо зважити для встановлення середньої маси експлантата.
2. Флакончики з калюсом культивувати у термостаті за температури $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$.
3. За шість тижнів візуально визначити тип калюсу, після цього кожний шматочок калюсу виїняти із флакончика, відокремити від нього агар і зважити.
4. Відносний приріст маси калюсної тканини визначити за формулою

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot 100\%,$$

де ΔW – відносний приріст маси,

W_0 – початкова маса калюсу,

W_t – кінцева маса калюсу.

Результати записати у таблицю 8.6, побудувати діаграму.

Таблиця 8.6. Вплив співвідношення 2,4-Д:кінетин на приріст маси калюсу

Номер досліду	Вміст кінетину в середовищі, мг/л	Середня вага калюсу, мг		Відносний приріст маси калюсу, %	Тип калюсу
		початкова	кінцева		

Завдання 3.

1. Приготувати 100 мл 7,5 %-го розчину хромового ангідриду.
2. У 30 пробірок налити по 2 мл розчину хромової кислоти.
3. Із кожного варіанта досліду приготувати по три наважки калюсної тканини по 0,1 г, які помістити у пробірки з розчином для мацерації.
4. Пробірки помістити у термостат на 24 год. за температури 25 °С.

Примітка. Час інкубації для кожної культури підбирають експериментально.

5. Перед підрахунком ретельно струсити вміст пробірки, щоб вийшла рівномірна суспензія клітин.

Примітка. Робити це треба дуже акуратно, бо для мацерації використовують кислоту.

Якщо суспензія дуже густа, то її треба розвести водою (розведення враховують під час перерахунку).

6. Піпеткою з широким кінчиком швидко нанести по краплі суспензії клітин на кожну сітку лічильної камери Фукс-Розенталя, закрити її склом і притерти його до бічних граней сіток до появи кілець Ньютона.

7. Підрахувати клітини у чотирьох великих квадратах, розташованих по діагоналях сітки лічильної камери.

8. Промити камеру, знову заповнити суспензією клітин і провести повторний підрахунок.

Операцію повторювати тричі для кожної пробірки.

9. Кількість клітин у 1 г калюсної тканини обчислюють за формулою

$$N = \frac{n \cdot 1000 \cdot V}{0,2 \cdot d},$$

де N – кількість клітин у 1 г калюсної тканини;

n – кількість клітин у одному великому квадраті;

0,2 – глибина камери Фукс-Розенталя;

d – наважка калюсної тканини, яку використали для підрахунку клітин (г);

V – кінцевий об'єм суспензії клітин.

10. Побудувати графік залежності кількості клітин у 1 г калюсної тканини від співвідношення 2,4-Д:кінетин. Зробити висновки про оптимальне співвідношення ауксин: цитокінін у середовищі для калюсу.

Контрольні запитання та завдання

1. Назвіть типи калюсної тканини.
2. Які складові живильного середовища впливають на щільність калюсної тканини?
3. Як впливає співвідношення ауксин:цитокінін на процеси органогенезу?
4. Для чого використовують пухкі калюси?
5. Який тип калюсної тканини використовують для отримання рослин-регенерантів?
6. Які показники визначають для характеристики росту калюсної тканини?

Робота 132. ОТРИМАННЯ КЛІТИННОЇ СУСПЕНЗІЇ

Клітинна суспензія – це окремі клітини або клітинні агрегати, які вирощують у рідкому живильному середовищі в умовах постійної аерації. Вирощування суспензійних культур у рідкому середовищі має низку переваг перед вирощуванням калюсних тканин поверхневим методом. У цих культурах легше впливати на метаболізм і ріст клітинних популяцій екзогенними факторами; вони зручніші для біохімічних і молекулярно-біологічних експериментів.

Основним способом отримання суспензійних культур є занурення шматочка калюсу в рідке середовище, яке перемішується. Для ініціації суспензійної культури потрібно 2÷3 г калюсної тканини на 60÷100 мл рідкого живильного середовища. Первинну суспензію отримують на шейкері, швидкість обертання якого 100÷120 об/хв.

Суспензійну культуру можна отримати із фрагмента органа, однак це потребує більше часу: клітини експлантата мають утворити первинний калюс, який розпадається на окремі клітини.

Оптимальною для отримання високодиспергованої суспензійної культури є пухка, обводнена калюсна тканина, вирощена на середовищі з 2,4-Д, без йонів Ca^{2+} .

Для вирощування клітинних суспензій використовують в основному ті самі живильні середовища, що й для калюсних культур. Але є ряд середовищ, призначених безпосередньо для вирощування суспензійних культур.

Щоб позбутися крупних, щільних грудок калюсної тканини, залишків експлантата або дуже крупних агрегатів первинну суспензію перед субкультивуванням фільтрують крізь 1÷2 шари марлі, нейлонові або металеві ситечка. До набуття клітинною суспензією бажаних ознак її необхідно фільтрувати під час субкультивування. Тривалість пасажу під час культивування клітинних суспензій становить 14÷18 діб. Густина популяції за цей інтервал часу досягає $10^6 \div 5 \times 10^6$ клітин/мл.

Ріст суспензійних культур можна оцінити за такими параметрами:

- об'єм осаджених клітин (ООК);
- кількість клітин;
- сира і суха маса;
- вміст білка і ДНК;
- життєздатність клітин.

Суспензійні культури рослинних тканин часто використовують для отримання традиційних для рослин сполук вторинного синтезу: алкалоїдів, терпеноїдів, глікозидів, полісахаридів, ефірних олій, антиканцерогенів тощо.

Мета роботи. Отримати суспензійну культуру картоплі або тютюну, топінамбура і моркви.

Матеріали, реактиви, обладнання. Калюсна культура картоплі, вирощена на середовищі №1 для калюсу; колби Ерленмейера місткістю 250 мл з рідким (без агару) середовищем №1 для калюсу (100 мл середовища на колбу), стерильні чашки Петрі, фольга, пінцети, скальпелі, спирт, спиртівка, ламінар-бокс, шейкер, стерильні лійки з нейлоновими фільтрами.

Хід роботи.

1. Перенести шматочки калюсної тканини у стерильну чашку Петрі.

2. Стерильним пінцетом подрібнити калюс на фрагменти та помістити їх у колби Ерленмейера з рідким живильним середовищем (2÷3 г/100 мл).

3. Колби з рослинним матеріалом культивувати у темряві на шейкері за 120 об/хв.

4. За 10÷14 діб середовище з клітинною суспензією профільтрувати крізь нейлон.

5. Фільтрат розділити на три порції, які розлити у стерильні колби Ерленмейера.

До клітинної суспензії додати свіже середовище, довести об'єм до 100 мл.

6. Колби з суспензійною культурою знову помістити на шейкер.

Примітка. Субкультивувати клітинну суспензію кожні 14÷18 діб.

Для цього у ламінар-боксі з колби з клітинною суспензією відібрати 50÷60 мл ($\approx 2/3$ об'єму) середовища з клітинами та замінити свіжим середовищем того самого складу. Відібране середовище перенести у стерильну колбу Ерленмейера і додати свіже середовище, щоб загальний об'єм становив 100 мл.

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке клітинна суспензія та для чого її використовують?
2. Які експлантати використовують для отримання суспензійної культури?
3. Калюсній тканині якого типу надається перевага для отримання клітинної суспензії?
4. Як довго триває пасаж під час культивування клітинних суспензій?
5. Назвіть показники, за якими оцінюють ріст суспензійної культури.
6. Назвіть переваги отримання вторинних метаболітів *in vitro*?
7. Які типи культур *in vitro* використовують для отримання речовин вторинного синтезу?

Контрольні запитання та завдання до розділу «Фітобіотехнологія»

1. Назвіть загальні принципи організації біотехнологічної лабораторії.
2. Які елементи обов'язково входять до складу живильного середовища.
3. Назвіть основні суміші вітамінів, які додають до живильного середовища?

4. Як вік рослинної тканини, що культивується *in vitro*, впливає на склад живильного середовища?
5. Які фітогормони використовують для росту і диференціації рослинних клітин?
6. На які групи розділяють рослинні тканини за потребою у фітогормонах?
7. Чим обумовлене обмежене використання рослинних екстрактів як стимуляторів росту?
8. У яких випадках до складу живильного середовища додається активоване вугілля?
9. Для вивчення яких процесів використовують культуру ізольованих коренів?
10. Чому перевага надається культивуванню *in vitro* пилку, а не пиляків?
11. Для яких цілей використовують культуру ізольованих меристем?
12. Що таке протокорм?
13. Яке практичне використання пухких калюсів?
14. Назвіть методи культивування одиночних клітин.
15. Які показники визначають для оцінки росту суспензійної культури?
16. Що таке ізольований протопласт?
17. Що таке соматична гібридизація?
18. Назвіть переваги клітинної селекції над традиційною селекцією.
19. Які типи культур використовують як вихідний матеріал для проведення клітинної селекції?
20. Що таке соматоклональна мінливість?
21. Назвіть способи генетичної трансформації.
22. Що таке плазміда?
23. Схарактеризуйте соматичний ембріогенез як спосіб мікроклонального розмноження рослин.
24. Які типи культур *in vitro* використовують для отримання речовин вторинного синтезу?
25. Назвіть способи оцінки життєздатності рослинних клітин після розморожування.

ДОДАТКИ