



## Лабораторна робота № 1

**Тема:** Будова рослинної клітини  
та водний обмін рослин

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



## ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИННОЇ КЛІТИНИ

**Мета заняття:** Дослідити основні фізичні та хімічні властивості рослинної клітини, зокрема її мембранного апарату щодо функціонування за різних умов існування, оволодіти основними засобами визначення життєздатності клітини та швидкості метаболічних процесів.

### 1.1 Властивості клітинних мембран

Зовнішня цитоплазматична мембрана клітини (плазмалема) відділяє клітину від навколишнього середовища, контролює транспорт речовин в клітину та із клітини, перша сприймає інформацію про зовнішнє середовище. Внутрішньоклітинні мембрани забезпечують просторову впорядкованість численних процесів, що протікають в клітині. Вони створюють ізольовані простори (компарменти), в яких одночасно можуть протікати протилежно направлені процеси. В мембрани вбудована велика кількість мультиферментних комплексів, транспортних систем, рецепторних молекул, що забезпечують протікання основних життєвих процесів.

Найважливіша властивість клітинних мембран — вибіркова проникність, завдяки якій крізь них проходять молекули тільки деяких речовин. Ця властивість може змінюватися залежно від процесів, що протікають в клітині. Вибірча проникність мембрани зберігається до тих пір, поки клітина залишається живою. Після її загибелі мембрани стають повністю проникними.

Матеріали і обладнання: 1) мікроскоп; 2) предметні і покривні скельця; 3) скляна паличка; 4) препарувальна голка, скальпель або лезо безпечної бритви; 5) пробірки; 6) штатив для пробірок; 7) фільтрувальний папір; 8) спиртівка або газовий пальник; 9) 30% розчин оцтової кислоти; 10) 1М розчин глюкози; 11) 1М розчин роданіду калію; 12) 1М розчин нітрату калію; 13) 0,7М розчин нітрату кальцію; 14) 1М розчин карбаміду; 15) коренеплід столового буряка; 16) цибулина синьої ріпчастої цибулі; 17) листя елодеї і валіснерії.

#### 1.1.1 Порівняння проникності клітинних мембран для різних речовин. Стійкий і тимчасовий плазмоліз

Вибірча проникність мембран забезпечує проходження через них молекул води, перешкоджає проникненню розчинених у воді речовин і обумовлює явище плазмолізу при дії на клітину гіпертонічного розчину. Якщо ж молекули розчиненої речовини через мембрану проходять, але повільніше, ніж молекули води, то

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



плазмоліз потім зникає. Деплазмоліз відбувається в результаті поступового проникнення розчиненої речовини в клітину, вирівнювання концентрацій зовні і всередині, а також надходження води в клітину із зовнішнього розчину за градієнтом концентрації.

## Хід роботи

На два предметні скельця наносять по краплі розчину: на одне — 1 М розчин сахарози, на інше — 1 М розчин карбаміду. В кожну краплю поміщають по листку елодеї, накривають покривним скельцем і розглядають під мікроскопом спочатку при малому (об'єктив 8), потім при великому збільшенні (об'єктив 40). Знаходять ділянки листка, в яких добре помітні плазмолізовані клітини. Визначають час початку плазмолізу (початок спостереження), замальовують плазмолізовані клітини і залишають препарати на 30—60 хвилин, потім знову їх розглядають. В розчині сахарози плазмоліз в клітинах зберігався, а в розчині карбаміду відбувався деплазмоліз. В розчині сахарози спостерігається стійкий плазмоліз, а в розчині карбаміду — тимчасовий. Причиною деплазмолізу в розчині карбаміду є проникність клітинних мембран для його молекул. Оскільки проникність для карбаміду менше ніж для води, то вода з клітини виходить швидше, ніж в неї входить сечовина. Це і викликає плазмоліз, який потім зникає при збільшенні в клітині концентрації карбаміду і надходженні води.

**Завдання:** описати роботу, замальовати плазмолізовані та деплазмолізовані клітини і сформулювати висновки.

Малюнок плазмолізованої клітини	Малюнок деплазмолізованої клітини

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



## 1.1.2 Вплив іонів калію і кальцію на форму плазмолізу

В ході плазмолізу форма плазмолізованого протопласту міняється. Спочатку протопласт відстає від клітинної стінки лише в окремих місцях, частіше всього в куточках. Плазмоліз такої форми називають **кутковим**. Потім протопласт продовжує відставати від клітинних стінок, зберігаючи зв'язок з ними в окремих місцях, поверхня протопласту між цими точками має увігнуту форму. На цьому етапі плазмоліз називається **увігнутим**. Поступово протопласт відривається від клітинних стінок по всій поверхні і приймає округлу форму. Такий плазмоліз носить назву **опуклого**. А якщо між протопластом та клітинною стінкою зв'язок в окремих місцях зберігається, то при подальшому зменшенні об'єму в ході плазмолізу протопласт набуває неправильної форми. Такий плазмоліз носить назву **судорожного** (рис. 1.1). Час, протягом якого увігнутий плазмоліз переходить в опуклий, дозволяє оцінювати ступінь в'язкості цитоплазми.

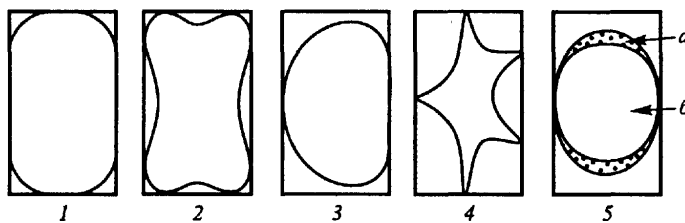


Рис. 1.1 Форми плазмолізу:

1 – кутковий; 2 – увігнутий; 3 – опуклий; 4 – судорожний; 5 – ковпачковий (а-цитоплазма; б-вакуоль)

При порівнянні в'язкості цитоплазми в розчинах солей калію і кальцію можна відзначити, що іони калію, проникаючи в цитоплазму, підвищують її гідрофільність, зменшують в'язкість і сприяють її швидкому відриву від клітинної стінки. Тому в розчинах солей калію плазмоліз швидко приймає форму опуклого. Іони кальцію, навпаки, підвищують в'язкість цитоплазми, збільшують сили зчеплення її з клітинною стінкою, і плазмоліз приймає форму судорожного.

### Хід роботи

На одне предметне скельце наносять краплю 1 М розчину нітрату калію, на інше — 0,7 М розчину нітрату кальцію. В обидві краплі поміщають по шматочку епідермісу цибулі, знятого з увігнутої поверхні однієї і тієї ж луски цибулини (лист елодеї або валіснерії), накривають покривними скельцями. Через 5—10 хв. препарати розглядають під мікроскопом.

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



**Завдання:** замалювати форми плазмолізу, пояснити, чому при дії цих речовин спостерігаються різні форми плазмолізу і зробити висновки.

Нітрат калію	Нітрат кальцію

## **1.1.3 Спостереження ковпачкового плазмолізу в розчинах нітрату калію і роданіду калію**

При тривалому знаходженні клітин в розчині нітрату калію (15 хв. і більше) цитоплазма набухає в подовжених клітинах, там, де протопласт не торкається клітинних стінок, утворюються так звані ковпачки цитоплазми. Такий плазмоліз носить назву **ковпачкового** (див. рис. 1.1). Ще більше набухання відбувається в розчинах роданіду калію, в яких ковпачки цитоплазми утворюються зразу ж після початку плазмолізу. Ковпачковий плазмоліз може свідчити про різну проникність плазмалемі і тонопласту для іонів калію.

Іони калію, проникаючи через плазмалему в цитоплазму, викликають її набухання. У вакуоль через тонопласт вони не проходять. Об'єм плазмолізованої вакуолі не збільшується і плазмоліз зберігається.

### Хід роботи

На предметне скло наносять краплю 1М розчину роданіду калію, поміщають в неї шматочок епідерми луски ріпчастої цибулі, накривають покривним склом і відразу розглядають під мікроскопом з об'єктивом  $\times 40$ .

**Завдання:** зробити малюнок і сформулювати висновок про причину появи ковпачкового плазмолізу.

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Нітрат калію	Роданід калію

## 1.1.4 Проникність живої і мертвої цитоплазми

Мембрани цитоплазми – плазмолема і тонопласт – мають вибіркову проникність. Це явище властиво тільки живим клітинам. При дії на клітину пошкоджуючих агентів мембрани втрачають властивість напівпроникності. Це добре можна прослідити на рослинних об'єктах, що містять в клітинному соці пігмент антоціан. Ступінь пошкодження корелює з кількістю пігменту, який виділяється у водне середовище.

Частіше за все для демонстрації цього досліду використовують столовий буряк. Його пігмент –  $\beta$ -ціанін – добре розчиняється у воді.

Матеріали і обладнання: 1) столовий буряк (*Beta vulgaris L.*); 2) штатив з пробірками; 3) пробкове свердло; 4) піпетки; 5) скальпель; 6) електрична плитка; 7) хлороформ; 8) 30% оцтова кислота; 9) 50% етиловий спирт; 10) 1М розчин нітрату калію; 11) мікроскоп; 12) покривні та предметні скельця; 13) пробірки; 14) ФЕК.

### Хід роботи

Вирізують пробковим свердлом циліндри з коренеплоду червоного буряка (діаметр 0,5-0,7 мм). Нарізують їх на рівні частини завдовжки 2 см і промивають проточною водою. Потім кладуть по одному шматочку коренеплоду в пробірки (варіанти розчинів в пробірках за табл.1.1), через 1 годину пробірки струшують. Визначають інтенсивність забарвлення розчинів в пробірках за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК), використовуючи синій світлофільтр. У відповідну графу табл.1.1 записують показання ФЕКу. Шматочки буряка витягують з пробірок і готують тонкі зрізи, які розглядають під мікроскопом в

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



1М розчині нітрату калію. Наявність плазмолізу свідчить, що клітина жива. В мертвих клітинах плазмоліз не спостерігається.

Таблиця 1.1

Номер пробірки	1	2	3	4	5
Варіант	10 мл водопровідної води	10 мл водопровідної води, кип'ятити	10 мл водопровідної води + 6 крапель хлороформу	10 мл 30% оцтової кислоти	10 мл 50% етилового спирту
Забарвлення розчину в пробірці					
Показання ФЕКу, опт.од.					

**Завдання:** простежити залежність інтенсивності забарвлення розчину від природи пошкоджуючого агенту та зробити висновок про зміну проникності цитоплазми при пошкодженні клітин різними агентами.

## 1.2 Виявлення життєздатності клітин

### 1.2.1 Прижиттєве фарбування клітин нейтральним червоним

Матеріали та обладнання: 1) цибулина звичайної цибулі, листя різних рослин; 2) 0,02% розчин нейтрального червоного в крапельниці; 3) 1 М розчин  $KNO_3$  в крапельниці; 4) 10% розчин аміаку в крапельниці з піпеткою; 5) скальпель; 6) лезо бритви; 7) препарувальна голка; 8) мікроскоп; 9) предметні і покривні скельця; 10) скляна паличка; 11) стаканчик з водою; 12) шматочки фільтрувального паперу; 13) кольорові олівці.

Подібно до метиленової сині, фарбник нейтральний червоний здатний проникати в живі клітини і накопичуватись в них у великих кількостях. При нетривалому перебуванні клітин в розчині нейтрального червоного цитоплазма не відмирає, в чому

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



можна переконатися, викликавши плазмоліз забарвлених клітин (плазмолізуватися можуть тільки живі клітини). Нейтральний червоний — двобарвний індикатор: в кислому середовищі ( $\text{pH} < 6$ ) він має малинове забарвлення, в лужному — жовте.

Для розуміння результатів даної роботи необхідно мати на увазі, що в розчині з  $\text{pH}$  близько 7 нейтральний червоний знаходиться у формі недисоційованих молекул, добре розчинних в ліпідах мембран, тоді як в кислому середовищі ця речовина дисоціює на іони, погано розчинні в ліпідах. Цитоплазма живої клітини має слабку спорідненість до фарбника. Забарвлення цитоплазми і ядра — ознака пошкодження клітини.

## Хід роботи

Приготувати 2—3 зрізи епідермісу луски цибулі або листя рослин і помістити їх на предметне скло у велику краплю розчину нейтрального червоного, не накриваючи покривним склом (при доброму доступі повітря забарвлення відбувається швидше). За 10—15 хв. (не більше) відсмоктати фарбу фільтрувальним папером, перенести зрізи в краплю води, накрити покривним склом і розглянути в мікроскоп. Замінити воду 1 М розчином  $\text{KNO}_3$  і продовжувати спостереження при великому збільшенні. Замалювати плазмолізовану клітину, відзначивши, яка частина забарвлена барвником (клітинна стінка, цитоплазма або вакуоль) і в який колір (замалювати кольоровим олівцем).

Відсмоктати з-під покривного скла розчин  $\text{KNO}_3$ , ввести краплю 10% аміаку, що є сильною отрутою та проаналізувати яким чином відбудеться забарвлення клітини.

**Завдання:** розглянути препарат під мікроскопом, звернувши увагу на забарвлення цитоплазми і ядра в загиблих клітинах. Замалювати забарвлену живу, плазмолізовану та вбиту аміаком клітину і зробити висновок щодо застосування цього барвника у дослідженнях стану рослинних клітин.

Забарвлена клітина	Плазмолізована клітина	Вбита аміаком клітина



# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



## 1.2.2 Використання солей тетразолію для виявлення живих і мертвих клітин

Солі тетразолію в окисленому стані безбарвні, а при відновленні забарвлюються. Відновлення їх відбувається за участю ферментів дегідрогеназ, які активні тільки в живих клітинах. Тому відновлення тетразолію в мертвих клітинах, а тому, відповідно, і появи забарвлення не відбувається.

Відновлені форми солей тетразолію (формагани) — інтенсивно забарвлені сполуки. Різні солі тетразолію (трифенілтетразолій хлористий — ТТХ, неотетразолій синій, нітросиній тетразолій та ін.) при відновленні забарвлюються у різний колір (червоний, синій, фіолетовий) залежно від виду барвника і повноти відновлення. На повітрі формагани не окислюються, тому їх зручно використовувати для виявлення активності дегідрогеназ на зрізах рослинних тканин.

Матеріали і обладнання: 1) проростки насіння різних культур; 2) лезо безпечної бритви; 3) покривні і предметні скельця; 4) мікроскоп; 5) 0,1 % розчин ТТХ, виготовлений на 0,87% розчині  $K_2HPO_4$ ; 6) термостат.

### Хід роботи

З вибраних об'єктів (зародки насіння, верхівки проростків, великі бруньки деревних рослин) роблять зрізи лезом безпечної бритви. Зрізи не повинні бути тонкими. Можна використовувати також цілі кінчики коренів завдовжки не більше 2—3 см. Частину об'єктів «вбивають», нагріваючи у воді над полум'ям. Для цього зрізи тканин або корінці поміщають у пробірку, заливають їх водою та кип'ятять над спиртівкою. Живі і мертві тканини поміщують в бакпечатки в 0,1 % розчин ТТХ, приготований на 0,87%-ном розчині  $K_2HPO_4$ , і витримують протягом 10-15 хв в термостаті з температурою 35°C. У живих зрізів спостерігається забарвлення, особливо яскраве в місцях розташування меристематичних тканин. Зрізи мертвих тканин не забарвлюються.

Завдання: у всіх дослідах порівняти забарвлення живих і мертвих клітин, зробити малюнки, сформулювати висновки про можливість використання барвників для виявлення живих і мертвих клітин. Пояснити різне забарвлення різних частин зародків.

Живий проросток	Мертвий проросток

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



## ВОДНИЙ ОБМІН РОСЛИН

**Мета заняття:** Дослідити основні етапи водного обміну рослин на клітинному та організмовому рівнях, зокрема властивості рослинної клітини як осмотичної системи та процесів поглинання, пересування та випаровування води в залежності від фізіологічного стану рослини, оволодіти основними засобами визначення осмотичної сили клітини та транспіраційної активності тканин.

### 2.1 Рослинна клітина як осмотична система

Вода рослинними клітинами поглинається за законами осмосу. Переміщення молекул води із зовнішнього середовища в клітину, а також від клітини до клітини відбувається за градієнтом рівня вільної енергії молекул води, який визначається їх **хімічним потенціалом** ( $\mu_w$ ). Точкою відліку рівня вільної енергії молекул води береться її рівень у молекул чистої води в стандартних умовах ( $\mu_w^0$ ). Хімічний потенціал води у водних розчинах і клітинах менше ніж у чистої води. Ця різниця, **водний потенціал** ( $\psi$ ), відображає здатність води в даній системі здійснювати роботу порівняно з роботою, яку за тих же умов здійснювала б чиста вода. Водний потенціал розраховується за рівнянням

$$\psi = \frac{\mu_w - \mu_w^0}{\bar{V}_w} \quad (2.1)$$

де  $\bar{V}_w$  — парціальний мольний об'єм води.

Водний потенціал визначає здатність молекул води дифундувати, випаровуватися або поглинатися. Він має розмірність енергії, поділеної на об'єм, що співпадає з розмірністю тиску (атмосфери, бари, паскалі).

Молекули розчинених у воді речовин знижують рівень вільної енергії молекул води. Це зниження вимірюється осмотичним потенціалом ( $\psi_{осм}$ ).

**Осмотичний потенціал** — компонент водного потенціалу розчину, який визначається присутністю розчинених речовин, що знижують хімічний потенціал води. Тому ( $\psi_{осм}$ ) завжди величина негативна.

Якщо два розчини з різними концентраціями розділити напівпроникною мембраною, проникною тільки для молекул води, то молекули води перемістяться за градієнтом  $\psi$  — з розчину з меншою концентрацією, в якому ( $\psi_{осм}$ ) вище (тобто

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



менш негативна величина), в розчин з більшою концентрацією, в якому ( $\psi_{осм}$ ) нижче (тобто більш негативна величина).

У молекул води, що знаходяться під тиском, рівень вільної енергії підвищується. Тому величина водного потенціалу розчину або клітини збільшується при підвищенні в них гідростатичного (тургорного) тиску. Водний потенціал, залежний від гідростатичного тиску (величина завжди позитивна), називається потенціалом тиску ( $\psi_{тиску}$ ). Загальний **водний потенціал клітини** залежить від осмотичного потенціалу ( $\psi_{осм}$ ) і потенціалу тиску ( $\psi_{тиску}$ ).

$$\psi_{кл} = \psi_{осм} + \psi_{давл} \quad (2.2)$$

При переміщенні клітини в чисту воду остання входить в клітку до тих пір, поки  $\psi_{осм}$  в клітці не буде урівноважений. Збільшення  $\psi_{тиску}$  відбувається через опір клітинної стінки збільшенню об'єму протопласта під час надходження до нього води.

Якщо клітину помістити у водний розчин,  $\psi_{осм}$  якого буде більш негативним, ніж,  $\psi_{кл}$ , то вода вийде з клітини в цей зовнішній розчин. При цьому  $\psi_{кл}$  зменшуватиметься через зменшення в клітині як  $\psi_{осм}$ , так і  $\psi_{тиску}$ . Вихід води з клітини відбуватиметься до тих пір, поки  $\psi$  у клітині і у зовнішнього розчину не зрівняються.

## 2.1.1 Визначення всисної сили клітин за зміною концентрації розчинів

Силу, з якою клітина здатна поглинати воду, називають **всисною силою клітини (S)**. На відміну від будь-якого розчину, всисна сила якого чисельно дорівнює його потенційному осмотичному тиску, всисна сила рослинної клітини, пружна стінка якої перешкоджає надходженню води, дорівнює різниці між осмотичним тиском клітинного соку (P) і тургорним протivotиском клітинної стінки (T):

$$S = P - T \quad (2.3).$$

Обчислити осмотичний тиск клітинного соку можна за рівнянням Вант-Гоффа:

$$P_{осм} = RTCi \quad (2.4)$$

де  $P_{осм}$  — осмотичний тиск, МПа;

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



$R$  — універсальна газова постійна (0,00831 кДж/град-моль);

$T$  — абсолютна температура, К (+273,4° С);

$C$  — концентрація розчину, моль/л;

$i$  — ізотонічний коефіцієнт, що показує відношення числа частинок (молекул і іонів) в розчині до початкової кількості молекул розчиненої речовини.

Для неелектролітів, наприклад для сахарози,  $i = 1$ . Для розчинів електролітів  $i$  залежить від числа іонів, на які розпадається молекула, і ступені дисоціації. Значення  $i$  для розчинів NaCl дані в таблиці 2.1:

Таблиця 2.1.

Концентрація NaCl, моль/л	,0	,8	,7	,6	,5	,4	,3	,2	,1	,01
Ізотонічний коефіцієнт, $i$	,62	,64	,66	,68	,70	,73	,75	,78	,83	,93

Для характеристики енергетичного рівня молекул води (їх здібності дифундувати або випаровуватися) використовується термодинамічний показник — водний потенціал, який для чистої води прийнятий за нуль ( $\psi_{H_2O} = 0$ ), а для будь-якого розчину — менше нуля. При заміні осмотичних показників рослинної клітини термодинамічними вищенаведене рівняння прийме наступний вигляд:

$$- \psi_{кл} = -\psi_p + \psi_T \quad (2.4)$$

де  $\psi_{кл}$  - водний потенціал клітини;  $\psi_p$  - осмотичний потенціал клітинного соку;  $\psi_T$  - потенціал тургорного тиску.

З рівняння (2.4) видно, що осмотичний потенціал знижує водний потенціал клітини, а потенціал тургорного тиску підвищує його. Як правило  $\psi_{кл}$ , негативний, і лише при повному насиченні клітини водою, коли  $\psi_p = \psi_T$ , цей показник дорівнює нулю.

При зануренні рослинної клітини в який-небудь розчин водообмін між ними визначається співвідношенням їх всисних сил: вода переміщується у бік більшої всисної сили (більш негативного водного потенціалу).

Для визначення всисної сили клітин шматки досліджуваної тканини занурюють в ряд розчинів відомої концентрації і підбирають такий розчин, всисна сила якого дорівнює всисній силі клітин.

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Якщо занурити рослинну тканину в розчин, всисна сила якого більше всисної сили клітин, то навколишній розчин буде відсмоктувати воду з клітин, внаслідок чого його концентрація зменшиться. Навпаки, якщо всисна сила клітин більше всисної сили розчину, то клітини всмоктують воду з розчину, який стає при цьому більш концентрованим. При рівності всисних сил клітин і розчину не відбувається ні всмоктування, ні відняття води, внаслідок чого концентрація розчину залишається без змін.

Зміну концентрації можна встановити шляхом визначення показника заломлення (рефрактометричний метод) або густини розчинів (метод цівок). В даній роботі рекомендується використовувати обидва методи (з одним і тим же матеріалом).

Матеріали і обладнання: 1) свіже листя рослин; 2) 1М розчин сахарози; 3) дистильована вода; 4) метиленова синь кристалічна; 5) рефрактометр; 6) пробкове свердло діаметром 7—8 мм; 7) препарувальна голка; 8) термометр; 9) бюретки з воронками (2 шт.); 10) дворядний штатив з пробірками: в нижньому ряді — звичайні пробірки з пробками (7 шт.), у верхньому — маленькі пробірки об'ємом 3—4 мл з пробками (7 шт.); 11) велика кіркова пробка; 12) скляна паличка; 13) піпетки з відтягнутим в капіляр кінцем, з вихідним отвором не більше 1 мм (7 шт.); 14) олівець по склу; 15) шматочки фільтрувального паперу.

## Хід роботи

Ретельно вимити пробірки (7 звичайних і 7 маленьких), сполоснути їх дистильованою водою, висушити в сушильній шафі і забезпечити написами олівцем по склу. Змішуючи відповідні кількості 1М розчину сахарози і дистильованої води, приготувати по 10 мл розчинів наступних концентрацій (моль/л): 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1. Для приготування розчинів використовувати великі пробірки. Після ретельного перемішування відлити в маленькі пробірки по 1 мл приготованих розчинів.

Вирізати пробковим свердлом диски з листя недалеко від середньої жилки, не захоплюючи по можливості крупних жилок (для цього повернути листя нижньою стороною вгору і підкласти під листя пробку). Розкласти по 5 дисків в маленькі пробірки. Витримати диски в розчинах 30 - 40 хв, час від часу струшуючи пробірки і стежачи за тим, щоб диски були весь час занурені в розчини.

Після закінчення вказаного часу вийняти проби з розчинів препарувальною голкою і визначити зміну концентрації розчинів після перебування в них дисків з листя.

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



## **2.1.1.1 Рефрактометричний метод (за Н. А. Максимовим і Н. З. Петіновим)**

Рефрактометр — оптичний прилад, за допомогою якого визначають показник заломлення променя при проходженні його через призму з нанесеним на неї досліджуванним розчином. Показник заломлення залежить від концентрації розчину і температури.

Основна частина рефрактометра — дві скляні призми, причому нижня призма закріплена нерухомо, а верхня може підійматися і опускатися. Між цими призмами потрібно помістити досліджуваний розчин: підняти верхню призму, нанести паличкою з оплавленим кінцем на нижню призму 2—3 краплі досліджуваного розчину сахарози і негайно опустити верхню призму повністю. Сполоснути паличку у воді і витерти фільтрувальним папером. Дивлячись в окуляр, направити за допомогою дзеркала світло в отвір призми, сумістити межу світлої і темної частин поля зору з пунктирною лінією (в рефрактометрах іншого типу — з перетином ліній хреста) і зробити відлік по шкалі коефіцієнтів заломлення. Визначити концентрації розчинів в обох рядах пробірок (початкових розчинів і після перебування в них дисків). Знайти такий розчин, концентрація якого не змінилася. Після кожного визначення видаляти з поверхні призми краплі розчину сухим фільтрувальним папером, потім двічі протерати папером, змоченим дистильованою водою, і знову витерати сухим фільтрувальним папером.

## **2.1.1.2 Метод цівки (за В. С. Шардаковим)**

Даний метод заснований на зміні густини розчинів після перебування в них досліджуємих об'єктів.

Розчин, в якому знаходилися шматочки досліджуваного листя, вносять піпеткою в пробірку з розчином початкової концентрації. Якщо цівка піде вниз, це свідчитиме про збільшення концентрації розчину. Рух цівки вгору вказує, що концентрація розчину зменшилася. Якщо цівка залишиться на місці, то густина розчину не змінилася і, отже, всисна сила клітин дорівнює всисній силі цього розчину.

Роботу проводять з тими ж розчинами, які використовувалися для рефрактометричного методу. Перед визначенням треба підфарбувати розчини, для чого внести в маленькі пробірки по кристалу метиленової сині на кінчику препарувальної голки. Багато барвника додавати не можна, оскільки це може викликати збільшення концентрації розчину.

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Струсивши вміст пробірки, набрати забарвлену рідину в піпетку з відтягнутим в капіляр кінцем і опустити у відповідну пробірку з початковим розчином так, щоб нижній кінець піпетки був занурений в розчин на 2—3 см. Поволі випускаючи розчин, прослідити за напрямом руху цівки забарвленої рідини. Кожний розчин слід брати чистою сухою піпеткою. Отримані результати записати у формі таблиці:

Таблиця 2.2.

Концентрація розчину сахарози, моль/л	Осмотичний тиск при 20°C, МПа	Концентрація розчинів, %		Напрямок руху цівки	Співвідношення між розчином і клітин
		Початкова	Після перебування на дисках		
0,1	0,263				
0,2	0,537				
0,3	0,821				
0,4	1,125				
0,5	1,449				
0,6	1,803				
0,7	2,178				

**Завдання:** зробити висновки про причини зміни концентрації розчинів, знайти ізотонічний розчин і розрахувати всисну силу клітин .

## **Розв'язати наступні задачі:**

1. Клітина знаходиться в стані повного насичення водою. Осмотичний тиск клітинного соку дорівнює 8 атм. Обчисліть висну силу цієї клітини.
2. Обчисліть осмотичний тиск клітинного соку при температурі 17°C, якщо відомо, що ізотонічний розчин сахарози для даної клітки має концентрацію 0,3 М (для сахарози  $i = 1$ )?
3. Осмотичний тиск клітинного соку дорівнює 10 атм, а тургорний тиск цієї клітини дорівнює  $3/4$  від максимальної величини. Чому дорівнює всисна сила клітини?



## 2.2. Водобмін рослин

### 2.2.1. Визначення різних форм води в рослині

Нормальний хід процесів життєдіяльності клітин обумовлений не тільки їх загальним обводненням, але і відношенням вільної і зв'язаної води.

Вода в рослині знаходиться як у вільному, так і в зв'язаному стані. **Вільною** називають воду, що зберегла всі або майже всі властивості чистої води. Вільна вода легко пересувається, вступає в різні біохімічні реакції, випаровується в процесі транспірації і замерзає при низьких температурах. **Зв'язана** вода має змінені фізичні властивості.

Молекули води завдяки їх діпольності можуть взаємодіяти як друг з другом, так і з молекулами інших хімічних сполук. Завдяки водневим зв'язкам, молекули води утворюють ажурну квазікристалічну структуру з тетраедричною координацією сусідніх молекул. Така решітка може відносно міцно зберігатися в гелеподібних структурах і біологічних мембранах. В рідкому стані тепловий рух молекул не дає можливості формуватися постійній жорсткій решітці. В цьому випадку час існування окремих структур не перевищує  $10^{-9}$  –  $10^{-10}$  сек.

Іншим способом взаємодії води з речовинами клітини є хемогідратація низькополімерних (**осмотично зв'язана**) і високополімерних (**колоїдно-зв'язана вода**) сполук. Біля кожної полярної або іонізованої групи розташовується декілька шарів орієнтованих молекул води, складаючи гідратну оболонку.

Крім кристалічно і гідратаційно зв'язаної води у фізіології розглядають поняття **структурно зв'язаної води**. Це вода, яка вступає у взаємодію з молекулами органічних сполук завдяки водневим зв'язкам. Вона грає велику роль при формуванні структури цитоплазми. В певних умовах в молекулах білка відбуваються конформаційні перетворення, перехід фібрил у глобули, золя у гель і т.д. При цьому молекули води можуть утворювати тривимірну сітку або вузькі порожнисті простори, заповнені водою. Ця вода виявляється зв'язаною через свою просторову ізолюваність. Даний тип структурно зв'язаної води отримав назву *іммобілізованої*.

Провести чітку грань між вільною і зв'язаною формами води дуже важко. До міцно зв'язаної води слід віднести велику частину води, що утримується при хемогідратації іонів і молекул низько- і високополімерних сполук, до слабкозв'язаної – воду дифузних шарів гідратаційних сфер, молекули яких зберегли рухливість,



# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



структурно зв'язану воду та осмотично поглинену воду клітинного соку.

Суть методу полягає в тому, що наважка досліджуваного рослинного матеріалу у вигляді висічок поміщається в розчин сахарози певної концентрації (наприклад, 30%). За зниженням концентрації цього розчину, визначеної за допомогою рефрактометра, можна визначити, скільки води відняв розчин з висічок. Розчин віднімає з висічок вільну, вільніше, слабко зв'язану, легко рухому воду. В іншій паралельній наважці визначається загальна кількість води в рослинному матеріалі. За різницею між кількістю загальної і вільної води знаходять зв'язану воду.

Матеріали і обладнання: 1) рефрактометр; 2) бюкси; 3) піпетки на 5 мл; 4) сушильна шафа; 5) терези з важками.

## Хід роботи

Зміст води визначається в листях різних рослин.

**Загальний зміст води** визначається шляхом висушування приблизно 1г наважки рослинного матеріалу в сушильній шафі при температурі 105°C протягом 2-3 годин до постійної ваги.

Розрахунок **загальної води** проводиться за формулою:

$$X = \frac{(C - B) \times 100}{A - B} \quad (2.5)$$

$X$  – кількість загальної води у % від сирої ваги;

$A$  – маса алюмінієвого бюкса з сирою наважкою, г;

$B$  – маса порожнього бюксу, г;

$C$  – маса алюмінієвого бюкса з сухою наважкою, г.

**Вміст вільної води** визначається наступним чином. В заздалегідь зважені скляні бюкси з притертими кришками наливають по 2 мл 30% розчину сахарози. Бюкси зважують і по різниці між першим і другим зважуванням визначають вагу розчину сахарози в бюксі. Потім дуже швидко береться наважка висічок листа (0,5 г) і поміщається в бюкси з сахарозою, після чого бюкси знову зважуються і залишаються при кімнатній температурі на 2 години. Вільна вода витягується сахарозою з досліджуваного об'єкту і внаслідок цього концентрація початкового розчину сахарози, змінюється. Визначають (на рефрактометрі) концентрацію початкового і дослідного розчинів сахарози. Зміна концентрації розчину сахарози вказує на кількість води, витягнутої з об'єкту.

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Розрахунок **вільної води** проводиться за формулою:

$$X = \frac{100 \times (A - B) \times C}{B \times D} \quad (2.6), \text{ де}$$

$X$  – кількість вільної води в % від сухої ваги;

$A$  – відсоток сахарози в початковому розчині;

$B$  – відсоток сахарози в дослідному розчині;

$C$  – вага розчину сахарози;

$D$  – вага наважки рослинного матеріалу, в г .

Кількість **зв'язаної води** розраховується за різницею між загальною кількістю води і кількістю зв'язаної води.

Таблиця 2.4.

Об'єкт	
Вага порожнього алюмінієвого бюкса	
Вага алюмінієвого бюкса з сирюю наважкою	
Вага алюмінієвого бюкса з сирюю наважкою через 2 години	
Вага порожнього бюкса	
Вага бюкса з розчином сахарози	
Вага бюкса з сахарозою і наважкою	
% початкового розчину сахарози	
% дослідного розчину сахарози	
Кількість вільної води	
Кількість загальної води	
Кількість зв'язаної води	

**Завдання:** заповнити таблицю 2.4 та зробити висновок про співвідношення різних форм води в листках різних рослин.

## 2.2.2. Визначення інтенсивності транспірації за зменшенням маси зрізаного листа

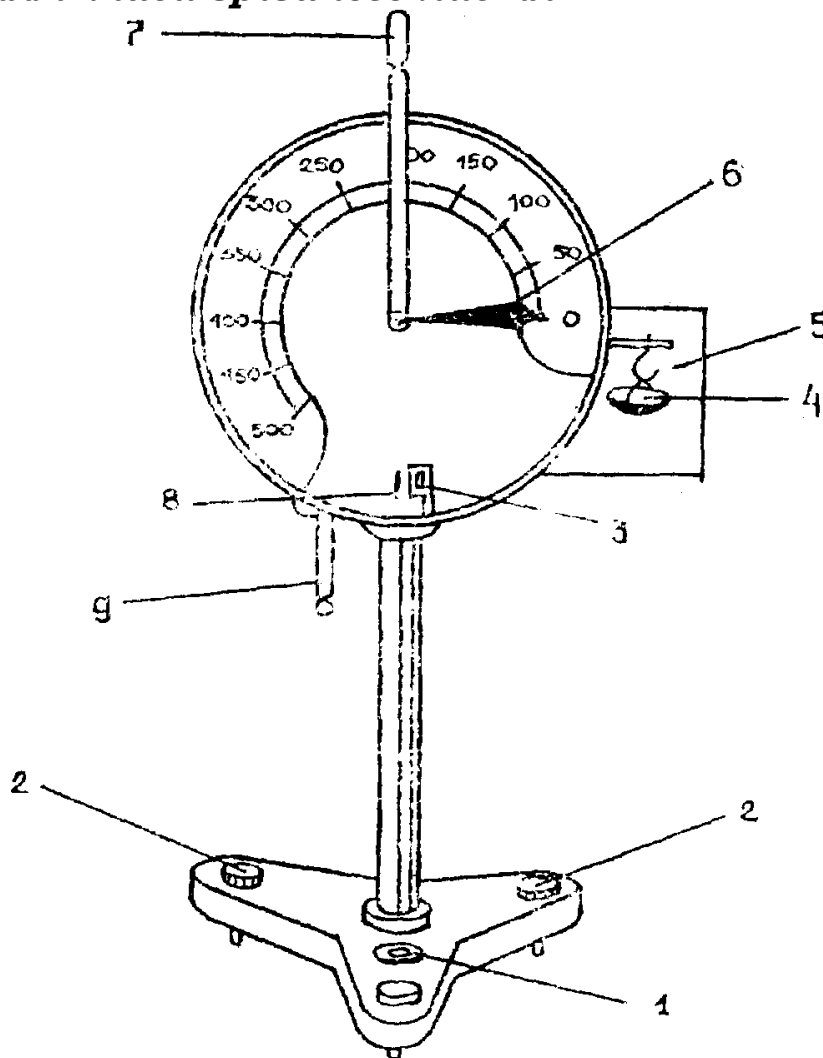


Рис. 2.1 Торсійні терези: 1 - рівень; 2 - опорні гвинти; 3 - показчик рівноваги, 4 - кошик; 5 - гачок; 6 - стрілка-показчик маси; 7 - рукоятка; 8 - нульова межа; 9 - аретир

Матеріали і обладнання: 1) кімнатні рослини (пеларгонія, примула і ін.); 2) торсійні терези; 3) технічні терези з важками; 4) ножиці; 5) скальпель; 6) кришка чашки Петрі; 7) нитки; 8) міліметровка; 9) фільтрувальний папір.

**Транспірація** — процес випаровування води надземними частинами рослин. **Інтенсивність транспірації** — це кількість води, яка випаровується за одиницю часу одиницею листової поверхні. Відношення **інтенсивності транспірації** до **інтенсивності евапорації** (випаровування з вільної водної поверхні) за тих же умов називається **відотною транспірацією**; цей показник характеризує здатність рослин регулювати транспірацію і виражається у вигляді десяткового

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



дробу. Найпростіший і достатньо точний метод обліку транспірації – метод швидкого зважування, запропонований Л. А. Івановим: пагін або окремий лист зрізають і двічі зважують з інтервалом не більше 5 хв, оскільки при більш тривалій експозиції може початися в'янення листа, що знижує транспірацію. Встановлене цим методом зменшення маси листа відповідає кількості води, яка випарювалась (збільшенням маси в процесі фотосинтезу можна нехтувати, оскільки інтенсивність фотосинтезу у багато разів менше інтенсивності транспірації).

## Хід роботи

Для визначення інтенсивності транспірації методом швидкого зважування доцільно використовувати торсіонні терези (рис. 2.1). Перш за все слід встановити терези у вертикальному положенні за рівнем 1 за допомогою опорних гвинтів 2. Приступаючи до роботи, необхідно строго дотримувати правило: щоб уникнути поломки терезів підвішувати груз до гачка 5 або знімати його тільки при закритому аретирі .

В даній роботі визначають різницю результатів двох зважувань, а не абсолютну масу листа, тому можна зняти з гачка терезів кошик 4 і тим самим збільшити їх навантаження.

Зрізати лист з невеликим відрізком черешка, підвісити за допомогою нитки з петлею на кінці до гачка терезів (при закритому аретирі!) і негайно зважити: відкрити аретир і, обертаючи рукоятку 7, добитися поєднання покажчика рівноваги 3 з нульовою межею 8; провести відлік по покажчику маси 6 і відзначити час. Якщо маса узятого листа виявиться більше максимального навантаження терезів, то слід використовувати лист менших розмірів або відрізати частину листової пластинки ножицями. Через 3-4 хв зробити друге зважування, також відзначивши час. Якщо випаровування йде слабо, можна збільшити експозицію до 5 хвилин. Закрити аретир і зняти лист з гачка.

Для визначення поверхні листа зважити на технічних терезах квадрат міліметрівки відомої площі (наприклад, 100 см<sup>2</sup>), накласти на цей квадрат досліджуваний лист, ретельно обвести олівцем листову пластинку, вирізати і зважити отриману паперову фігуру. Площу листа обчислити за пропорцією:  $a/b = c/s$ , де  $a$  — маса квадрата;  $b$  — маса паперової фігури;  $c$  — площа квадрата;  $s$  — площа листа.

Одночасно визначити за тих же умов **інтенсивність евапорації** (вільного випаровування). Для цього зважити чашку, наповнену майже до краю водою кімнатної температури (зовнішня поверхня чашки повинна бути абсолютно сухою), і

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



через будь-який час, наприклад через 30 хвилин, зробити друге зважування. Визначити поверхню випаровування, змірявши внутрішній діаметр чашки. Результати записати в таблицю 2.5, вказавши вид дослідної рослини:

Інтенсивність транспірації ( $I_T$ ) та інтенсивність евапорації ( $I_E$ ) ( $\frac{г}{м^2 \cdot год.}$ ) обчислити за формулою:

$$I_T = \frac{n \times 10\,000 \times 60}{s \times t} \quad (2.7.)$$

де  $n$  — кількість води, що випарувалася, г;

$s$  — площа,  $см^2$ ;

$t$  — експозиція, хв;

10 000 — коефіцієнт перекладу  $см^2$  в  $м^2$ ;

60 — коефіцієнт перекладу хвилин в години.

Таблиця 2.5

Об'єкт	Умови досліджу	Час зважування		Експозиція, хв	Маса, г		Випаровано води, г	Площа $см^2$
		1	2		1	2		
		-го	-го		-го	-го		
Лист	сві							
	тло							
	те мрява							
Сушина з водою								

**Завдання:** обчислити інтенсивність евапорації ( $I_E$ ) за тією ж формулою; знайти відносну транспірацію  $I_T/I_E$ ; на підставі величини відносної транспірації ( $I_T/I_E$  менше 0,5 вважається низкою) зробити висновок про регуляцію листом процесу транспірації.

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



## **2.2.3. Порівняння транспірації верхньої і нижньої сторін листа хлоркобальтовим методом**

Матеріали і обладнання: 1) свіже листя рослин (гортензії, фуксії, традесканції і ін.); 2) кружки хлоркобальтового паперу діаметром 1 см наклеєні ліпкою стрічкою на предметні скельця; 3) пінцет; 4) мікроскоп; 5) лезо бритви; 6) предметні і покривні стекла; 7) препарувальна голка; 8) стаканчик з водою.

Якщо притиснути до листка заздалегідь висушений шматок фільтрувального паперу, просоченого розчином хлориду кобальту, то папір, поглинаючи водяну пару, що виділяється в процесі транспірації, міняє забарвлення з голубого (колір сухого  $\text{CoCl}_2$ ) на рожеве (колір  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ). За швидкістю набуття рожевого забарвлення можна приблизно судити про інтенсивність транспірації.

### **Хід роботи**

Відклеїти ліпку стрічку з двома кружками хлоркобальтового паперу і негайно прикласти кружки до двох сторін листка (безпосередньо на рослину). Хлоркобальтові папірці слід тримати за ліпку стрічку, не торкаючись до них пальцями, від яких можуть залишитися рожеві плями. Спостерігати за зміною забарвлення хлоркобальтового паперу і записати результат.

**Завдання:** зробити висновки про причини різної інтенсивності транспірації верхньої і нижньої сторін листа даної рослини.

## **2.2.4. Вплив зовнішніх умов на стан продихів (за Молішем)**

Матеріали і обладнання: 1) різні кімнатні рослини (за годину до початку роботи полити рослини та помістити деякі екземпляри у темряву); 2) бензол, ксилол і етиловий спирт в крапельницях.

Міжклітинники листа зазвичай заповнені повітрям, завдяки чому при розгляді на світлі лист здається матовим. Якщо відбудеться інфільтрація, тобто заповнення міжклітинників якою-небудь рідиною, то відповідні ділянки листа стають прозорими.

Визначення стану продихів методом інфільтрації засновано на здатності рідини, що змочує клітинні стінки, проникати через відкриті продихові щілини до найближчих міжклітинників, витісняючи з них повітря, в чому легко переконатися за появою на листі прозорих плям. Рідини проникають в продихові щілині залежно від їх ширини: петролейний ефір — крізь слабо відкриті

# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



продихи, ксилол — крізь середньо відкриті, а етиловий спирт — тільки через широко відкриті. Даний метод дуже простий і цілком застосовний навіть в польових умовах.

## Хід роботи

На нижню поверхню листа нанести окремо маленькі краплі бензолу, ксилолу і етилового спирту. Тримати лист в горизонтальному положенні до повного зникнення крапель, які можуть або випаруватися, або проникнути всередину листа, і розглянути лист на світло.

Досліджувати листя, витримане в різних умовах (свіжі і підв'ялі, освітлені і затемнені).

Результати записати в таблицю 2.6, відзначаючи проникнення рідини знаком „+”, а відсутність проникнення знаком „—”:

Таблиця 2.6

Об'єкт	Умови досліджу	Бензол	Ксилол	Спирт	Стан продихів
	світло				
	темрява				

**Завдання:** зробити висновки про вплив зовнішніх умов на стан продихів.

## **2.2.5 Визначення стану продихів методом відбитків**

Матеріали і обладнання: 1) кімнатні рослини (деякі рослини або окреме листя за 2-3 години до заняття помістити у темряву); 2) лак для нігтів, розведений ацетоном до сироподібного стану; 3) тонка скляна паличка; 4) пінцет; 5) мікроскоп; 6) окуляр - мікрометр; 7) об'єктив - мікрометр; 8) предметні скельця.

На поверхню листа наносять тонкий шар лаку. Після випаровування розчинника утворюється плівка, на якій відбивається епідерміс з продихами. Розглядаючи отримані відбитки в мікроскоп, можна визначити кількість і розмір продихів, а також виміряти ширину щілин продихів. Даний метод можна використовувати не тільки для лабораторних, але і для польових досліджень (в останньому випадку відбитки бережуть до визначення в пробірках з водою). Для дослідження листя, продихи яких розташовані в поглибленнях епідермісу (наприклад, у олеандра), цей метод незастосовний, оскільки у такого листя відбитки не виходять.





# ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



**Завдання:** заповнити таблицю 2.7, зробити висновки про вплив умов освітлення на розміри отворів продихів; порівняти розміри отворів продихів у різних рослин. Розрахувати відношення площі листової поверхні до площі продихових щілин.

## 2.2.6 Підняття води в рослині по судинах

Рух води здійснюється по судинах і трахеїдах. Вода в судинах знаходиться у вигляді суцільних водяних ниток, які спираються на живі клітини кореня і сполучені з живими клітинами листка. Сила налипання води до стінок судин і сила зчеплення окремих молекул води між собою дорівнює декільком сотням атмосфер. Для пересування води вгору потрібно, щоб клітини, які випаровують воду, мали достатню всисну силу. В клітинах листкової паренхіми вона сягає 20-40 атм. і більше. Вода випаровується листком і тягне за собою водяну нитку. Рух води по судинах пояснюється присмоктуючою силою транспірації, кореневим тиском і наявністю безперервних водяних ниток.

Присмоктуюча сила транспірації і сили зчеплення води в рослині (адгезії та когезії) зумовлюють рух води в рослині і без кореневої системи. Це можна бачити на досліді з гілками або листками рослин, які ставлять в забарвлений розчин.

**Матеріали і обладнання:** 1) листок герані, суцвіття спатіфілліума та білі квіти інших рослин; 2) мікроскоп; 3) 1% розчин еозину; 4) препарувальне обладнання; 5) предметні і покривні скельця; 6) колба.

### Хід роботи

Зрізають листок герані (під водою) і ставлять черешок в розчин еозину. Виставляють на яскраве світло. Через півгодини жилки листка забарвлюються в рожевий колір. Роблять зрізи листка під мікроскопом. Звертають увагу, по яких частинах провідного пучка пересувається забарвлений розчин.

**Завдання:** замалювати дослід, зробити висновок, по яких елементах провідного пучка пересувається вода; замалювати основний пучок і відзначити забарвлені елементи.

### **Розв'язати наступні задачі:**

1. Обчисліть коефіцієнт транспірації дерев, які за період вегетації випарували 2 т води і накопичили 10 кг сухої маси.
2. Скільки води випарує рослину за 15 хв, якщо площа її листків складає 200 см<sup>2</sup>, а інтенсивність транспірації — 5г Н<sub>2</sub>О/дм<sup>2</sup> • годину.
3. Обчисліть інтенсивність транспірації рослини з площею листків 4 м<sup>2</sup>, якщо відомо, що за 45 хв вона випарувала 750 г води.