



Лабораторна робота № 2

Тема: Фотосинтез та дихання

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



ФІЗІОЛОГІЯ ФОТОСИНТЕЗУ

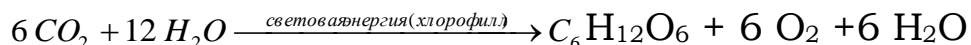
Мета заняття: Дослідити основні фізичні та хімічні властивості окремих фотосинтезуючих пігментів рослинної клітини, ефективність роботи фото систем та асиміляційні характеристики тканин зеленої рослини, оволодіти основними засобами визначення якісного та кількісного складу пігментів та швидкості фотосинтетичних процесів.

3.1 Пігментний апарат рослини

3.1.1 Отримання витяжки пігментів зеленого листа

Матеріали і обладнання: 1) листя кімнатних рослин; 2) 85% етиловий спирт; 3) CaCO₃ 4) кварцовий пісок або товчене скло; 5) вазелін; 6) ніж; 7) фарфорові ступки (2 шт.); 8) колби (2 шт.); 9) воронки (2 шт.); 10) скляна паличка; 11) паперові фільтри.

Фотосинтез — процес перетворення енергії світла, що поглинається хлорофілом, в хімічну енергію органічних сполук, що утворюються з діоксиду вуглецю і води:



Фотосинтез відбувається в хлоропластах, які оточені двома білково-ліпідними мембранами. Хлоропласт включає систему ламелярних подвійних мембран — тілакоїдів, утворених внутрішньою мембраною. В тілакоїдах здійснюється світлова фаза фотосинтезу, тобто перетворення енергії світлового проміння в хімічну енергію молекул АТФ і НАДФН·Н, а біохімічні реакції відновлення CO₂ і синтезу вуглеводів відбуваються в міжтілакоїдному просторі.

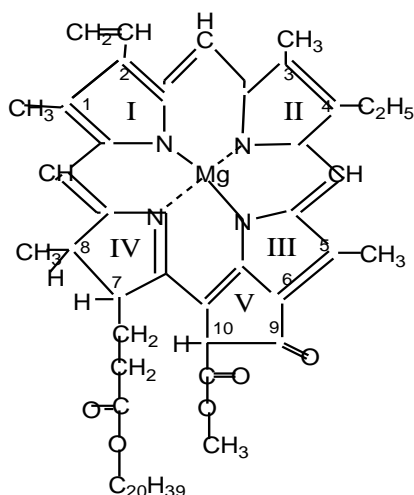


Рисунок 3.1. Структура хлорофілу а

В мембранах тілакоїдів містяться наступні пігменти: хлорофіл а (C₅₅H₇₂O₅N₄Mg) — зелений з синюватим відтінком; хлорофіл b (C₅₅H₇₀O₆N₄Mg) — зелений з жовтим відтінком; каротин (C₄₀H₅₆) — жовто-помаранчевий; - ксантофіл (C₄₀H₅₆O₂) — золотисто-жовтий. Всі ці пігменти не розчинні у воді, але розчиняються

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



в органічних розчинниках (спирті, ацетоні і ін.).

За хімічною природою хлорофіл (рис.3.1) є складним ефіром дікарбонної кислоти хлорофіліну і двох спиртів — метанолу CH_3OH і фітолу $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{OH}$. Хлорофілін містить порфірінове ядро, що складається з чотирьох пірольних кілець, сполучених один з одним метиновими містками $=\text{CH}-$. В центрі порфірінового ядра розташований атом магнію, сполучений з атомами азоту пірольних кілець. Крім того, в ядрі молекули хлорофілу є п'яте кільце — циклопентанове, що містить карбонільну групу. Хлорофіл *b* відрізняється від хлорофілу *a*, лише тим, що у другого пірольного кільця замість метильної групи є альдегідна.

Порфірінове ядро має гідрофільний характер і пов'язане з білками мембран. В той же час довгий гідрофобний «хвіст», утворений залишком фітолу, обернутий у бік ліпідних шарів тілакоїдів і обумовлює добру розчинність хлорофілу в неполярних розчинниках (бензин, петролейний ефір). Проте для повного виділення хлорофілу з листя використовують не ці безводні розчинники, а спирт або ацетон, що містить невелику кількість води, необхідної для гідролізу хлорофіл-білкового комплексу.

Разом з хлорофілами *a* і *b* в хлоропластах містяться каротиноїди — група жовтих пігментів, що є за хімічною природою тетратерпеноїдами (8 залишків ізопрену C_5H_8).

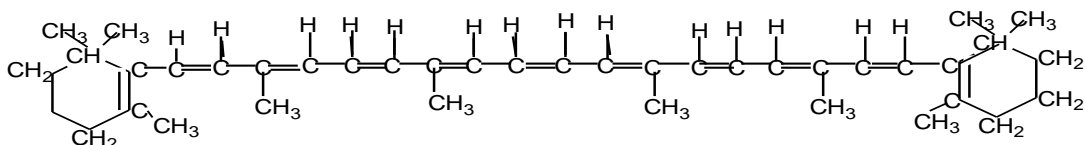


Рисунок 3.2 Структура β - каротину

Каротини (в основному β - каротин) — ненасичені вуглеводні, що містять два симетрично розташованих іононових кільця, сполучених довгим вуглецевим ланцюгом (рис.3.2). Серед ксантофілів, що є кисневмісними похідними каротину, переважає лютеїн, який має в кожному іононовому кільці спиртову групу.

Хід роботи

Свіже або сушене листя (0,5-2 г) подрібнити ножицями, відкинувши крупні жилки і черешки, помістити в ступку, додати на кінчику ножа CaCO_3 (для нейтралізації кислот клітинного соку) і трохи чистого кварцового піску або товченого скла. Ретельно розтерти, підливаючи потроху 85 % етиловий спирт, змазати носик ступки із зовнішньої сторони вазеліном і злити отриманий темно-зелений розчин по паличці у воронку з фільтром. Підлити

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



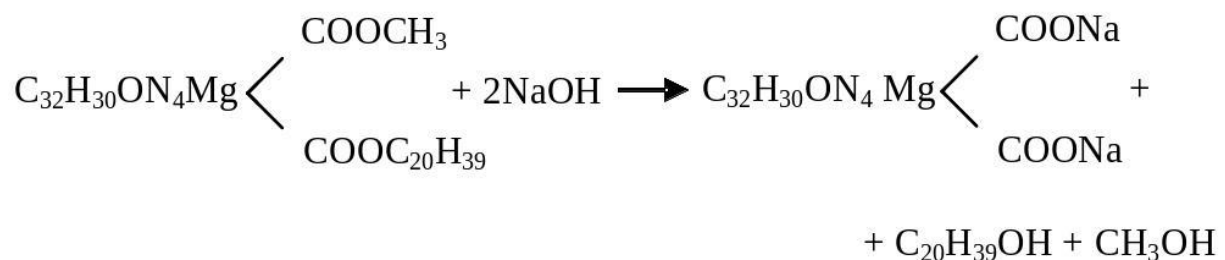
в ступку ще трохи спирту, розтерти і злити на той же фільтр. Повторити цю операцію кілька разів до повного виділення пігментів (всього витратити 10-20 мл спирту).

3.1.2 Хімічні властивості пігментів

Матеріали і обладнання: 1) спиртова витяжка пігментів; 2) 20% розчин КОН в крапельниці; 3) бензин; 4) пробірка з притертою пробкою; 5) 10% соляна кислота в крапельниці; 6) оцтовокисла мідь; 7) пробірки (2 шт.); 8) скальпель; 9) утримувач для пробірок; 10) спиртівка; 11) сірники.

3.1.2.1 Омилення хлорофілу лугом

При додаванні лугу до розчину хлорофілу відбувається реакція омилення: відщеплюються спирти — метанол і фітол, а двоосновна кислота хлорофілін утворює сіль:



Солі хлорофіліну мають зелене забарвлення, але відрізняються від хлорофілу нерозчинністю в бензині.

Хід роботи

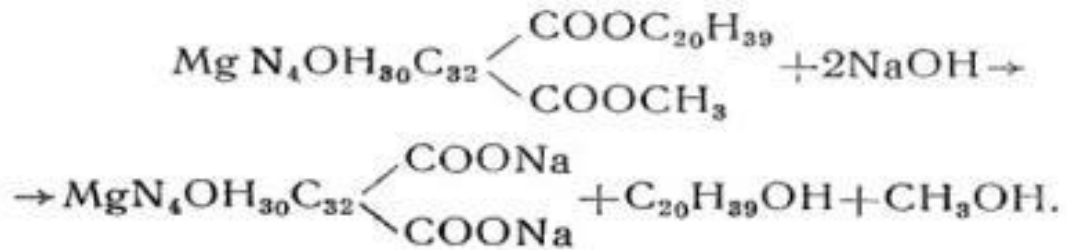
До 2 мл спиртової витяжки пігментів додати 4—5 крапель 20% розчину лугу і збовтати. Підлити в пробірку рівний об'єм бензину, сильно струсити і дати відстоятися.

Завдання: відзначити забарвлення нижнього спиртового і верхнього бензинового шарів (замалювати). Вказати, які речовини розчинені в спирті, і які в бензині, маючи на увазі, що жовті пігменти з лугом не реагують. Зробити висновок щодо різної розчинності пігментів.

3.1.2.2 Отримання феофітину і відновлення металоорганічного зв'язку

Якщо до розчину хлорофілу додати невелику кількість соляної кислоти, то можна одержати буро-оливковий феофітин — продукт заміщення магнію в молекулі хлорофілу двома атомами водню:

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Металорганічний зв'язок можна відновити шляхом нагрівання феофітину з оцтовою кислотою міддю: атом двовалентного металу витісняє водень з феофітину; оцтова кислота, що утворюється при цьому, служить каталізатором.

Хід роботи

Налити в дві пробірки по 2 мл спиртової витяжки пігментів зеленого листа і додати в них по 2 краплі 10% соляної кислоти. Відзначити забарвлення отриманого продукту реакції.

В одну з пробірок з феофітином внести декілька кристалів оцтової кислоти міді і довести розчин до кипіння (нагрівати слід обережно, не допускаючи викидання рідини з пробірки). Якщо забарвлення не зміниться, додати ще оцтової кислоти міді і продовжувати нагрівання. Відзначити зміну забарвлення, викликану заміщенням двох атомів водню у феофітині атомом міді.

Завдання: замалювати пробірки і написати рівняння прямої і зворотної реакцій. На основі проведеного експерименту зробити висновок щодо вкладу магнію у оптичні властивості хлорофілу

3.1.3 Розділення суміші фотосинтетичних пігментів

Один з перших методів розділення пігментів був запропонований німецьким вченим Краусом в 1860 р. Він заснований на різній розчинності пігментів в спирті і бензині. Ці розчинники не змішуються при зливанні і утворюють два шари: верхній — бензиновий, де розчинені хлорофіли і каротин, і нижній — спиртовий, де розчинений ксантофіл.

Цей метод не дозволяє розділити хлорофіли *a* і *b*, проте його доцільно використовувати для отримання жовтих пігментів каротину і ксантофілу у великих кількостях.

Для розділення і отримання хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів застосовують інший метод розділення пігментів, розроблений в 1906 р. російським вченим М. С. Цветом. Метод отримав назву **адсорбційного**. Саме він лежить в основі сучасних методів хроматографії.

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Суть методу полягає в тому, що різні речовини мають неоднакову здатність адсорбуватися на твердому порошкоподібному адсорбенті. Якщо суміш пігментів листа, розчинену в якому-небудь органічному розчиннику, наприклад бензині, пропустити через сухий адсорбент (цукрова пудра, крохмаль, вуглекислий кальцій, окис цинку, фільтрувальний папір), то відбудеться розділення пігментів. Кожний пігмент має визначену, тільки йому властиву здатність адсорбуватися на даному адсорбенті. В результаті на адсорбційній колонці пігменти розділяться і розподіляться в певному порядку.

До різновиду адсорбційного методу відноситься і метод розділення пігментів за допомогою паперової хроматографії, розроблений в 1951 р. і до теперішнього часу широко застосовується при розділенні сумішей, різних сполук і їх ідентифікації.

Матеріали і обладнання: 1) штатив з пробірками; 2) 75 % етанол; 3) NaOH або KOH кристалічний; 4) бензин; 5) ступка з пестиком; 6) терези з важками; 7) ділильна воронка; 8) конічна колба з пробкою, в яку вставляють адсорбційну колонку; 9) адсорбційна колонка, скляні бюкси з притертими кришками; 10) вата; 11) ацетон; 12) хроматографічний папір (1,5 x 13 см); 13) дистильована вода; 14) абсолютно суха цукрова пудра або крохмаль; 15) крейда (1 x 10 см).

3.1.3.1 Метод Крауса

Хід роботи

В пробірку з 2 мл спиртового розчину пігментів додають таку ж кількість бензину і одну краплю води (для кращого відділення спирту від бензину). Пробірку добре збовтують і дають суміші пігментів відстоятися. Відбувається розшарування рідини: у верхній, бензиновий, шар, переходять обидва хлорофіли і каротин, в нижньому, спиртовому, шарі залишається жовтий пігмент — ксантофіл, оскільки він краще, ніж бензин, розчинний в спирті.

Для відділення каротину від хлорофілу верхній бензиновий шар піпеткою переносять в чисту пробірку. В цій зеленій витяжці каротин непомітний, оскільки його маскує хлорофіл, переважаючий кількісно. В пробірку додають 2 мл етилового спирту і 3 краплі води, вносять декілька кристалів луку і сильно струшують. При взаємодії луку з хлорофілом відбувається його омилення, утворюється лужна сіль хлорофіліну, яка легко переходить з бензину в спирт. В результаті в пробірці утворюються два шари: верхній, бензиновий, шар — жовтого

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



кольору, що містить каротин і нижній, спиртовий, — зеленого кольору, що містить лужну сіль хлорофіліну.

Завдання: замалювати пробірки з розділеними пігментами; зробити висновки про розчинність пігментів в різних розчинниках і способах виділення окремих пігментів.

3.1.3.2 Метод Цвета

Недоліком методу Крауса є те, що за допомогою нього складно провести кількісний аналіз пігментного складу рослини (не розділяються хлорофіли). Для розділення і отримання хлорофілів *a* і *b* і каротиноїдів застосовують інший метод розділення пігментів - адсорбційний.

Хід роботи

1. Приготування витяжки пігментів з листя рослин.

Наважку свіжого листя (3 г) ретельно розтирають у фарфоровій ступці з невеликою кількістю розчинника, що складається з суміші 10 мл бензину і 10 мл ацетону. Продовжують розтирання до гомогенного стану з одночасною екстракцією пігментів невеликими порціями суміші.

Осад і надосадову рідину переносять на складчастий паперовий фільтр. Ступку змивають невеликою кількістю чистого ацетону і також зливають на паперовий фільтр.

2. Концентрування пігментів в бензині.

Відфільтровану витяжку переливають в пробірку на 50 мл і проводять відмивання ацетону для концентрації пігментів в бензиновій фракції. Обережно, додають 30 мл дистильованої води та декілька разів перевертають пробірку так, щоб не утворилася стійка емульсія. Після розділення рідини на дві фази: усі пігменти переходять у верхню – бензинову, а ацетон у нижню – водну. Обережно дозатором відбирають верхній бензиновий шар, що містить пігменти. Очищену від домішок сконцентровану витяжку пігментів переливають в бюкс з притертою кришкою і висипають туди 3—5 г прожареного Na_2SO_4 , залишають на 15-20 хв для повного зневоднення екстракту. Це дуже важливо для подальшого розділення пігментів на адсорбційній колонці.

3. Приготування адсорбційної колонки.

Адсорбційна колонка є скляною трубкою діаметром 1-1,5 см і завдовжки 10-15 см, звужена на одному кінці. В звужений кінець трубки вкладають шматочок вати, щоб цукрова пудра не висипалася. Невеликими порціями вводять в колонку, добре висушену цукрову пудру або крохмаль на 2/3 її висоти, злегка постукуючи об твердий предмет. Для успішного розділення пігментів треба мати абсолютно сухі колонки, цукрову пудру (крохмаль, крейду) і прожарений сірчаноокислий натрій і стежити

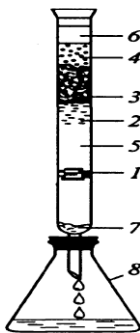
ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



за рівномірним наповненням цукрової пудри у всьому об'ємі трубки.

4. Розділення пігментів.

Бензинову витяжку (3 мл) обережно наливають по краю трубки у вільний простір колонки. Через декілька хвилин відбувається розділення і відокремлення пігментів. Зверху колонки залишається зелена зона, що складається з суміші пігментів, потім жовто-зелена зона хлорофілу *b*, потім синьо-зелена зона хлорофілу *a*, нижче розташовується зона темно-жовтого пігменту ксантофілу, а в самому низу колонки — яскраво-жовтий каротин, який першим змивається з колонки (рис. 3.3). Пігменти по черзі можна змити з колонки бензином і зібрати у випарювальні чашки або колби для подальшого дослідження.



- 1 — каротин;
- 2 — ксантофіл;
- 3 — хлорофіл *a*;
- 4 — хлорофіл *b*;
- 5 — скляна колонка з адсорбентом;
- 6 — бензиновий екстракт;
- 7 — шматочок вати;
- 8 — конічна колба

Рисунок. 3.3 Розділення пігментів на адсорбційній колонці (за М. С. Цветом):

Розділення пігментів зеленого листа можна проводити на шматку крейди у формі стовпчика, заздалегідь добре висушеного в сушильній шафі. Одним кінцем крейду занурюють на 0,5-1,0 см в бензиновий екстракт пігментів (теж осушений Na_2SO_4). Чітке розділення пігментів відбувається на стовпчику крейди протягом 5-10 хв.

Завдання: зробити малюнок почергового розділення пігментів на колонці та підписати зони з різними пігментами. Вказати переваги та недоліки цього методу розділення пігментів у порівнянні з попередніми.

3.1.3.3 Метод хроматографії на папері

Цей метод заснований на розділенні пігментів між волокнами целюлози хроматографічного паперу і рухомою фазою — розчинником. Коли розчин рухається по паперу під дією капілярних сил, то молекули пігментів розподіляються між двома фазами. Чим вище розчинність пігменту в рухомій фазі, тим далі він просувається по паперу разом з розчинником, і навпаки.

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Відстань, пройдена нанесеним на папір пігментом у напрямі руху розчинника, характеризується величиною R_f , яка є відношенням відстані, пройденої розчиненим пігментом, до відстані, пройденої фронтом розчинника. В стандартних умовах ця величина для даного пігменту постійна і відповідає його коефіцієнту розподілу.

Хроматографування на папері проводять висхідним і низхідним способами. При висхідній хроматографії паперову смужку підвішують вертикально; її нижній кінець, на який нанесена суміш пігментів, занурюють в розчинник. При цьому місце нанесення суміші повинне знаходитися вище за рівень розчинника. Під час руху розчинника під дією капілярних сил вертикально вгору відбувається розділення розчинених речовин.

При низхідній хроматографії верхній кінець паперової смуги з сумішшю пігментів, нанесених недалеко від кромки паперу, закріплюють в судині і розміщують у верхній частині камери. Нижній кінець паперу спускають вниз, але так, щоб він не торкався налитого на дні камери розчинника. В результаті дії капілярних сил і сили тяготіння розчинник починає пересуватися вниз по паперовій смугі, внаслідок чого відбувається розділення суміші.

Хід роботи

Смужку хроматографічного паперу шириною 1,5 см і довжиною, відповідною висоті судини, кладуть на чисту поверхню і олівцем на папері креслять горизонтальну лінію старту на відстані 1 см від краю.

З раніше приготовленої ацетонової витяжки беруть капіляром або інсуліновим шприцом невелику порцію екстракту і наносять її багато разів на стартову лінію хроматографічного паперу у вигляді плями діаметром не більше 1 см. Папір підсушують на повітрі і нанесення повторюють доти, доки пляма не стане інтенсивно зеленою.

Висушивши смужку до повного зникнення запаху ацетону, помістити її у вертикальному положенні в циліндр, на дно якого налита суміш бензолу і бензину (3:1). Смужку потрібно підвісити на гачок так, щоб в розчинник був занурений тільки незабарвлений кінець, і щоб вона не торкалася стінок судини. У зв'язку з тим, що пігменти руйнуються на світлі, розділення слід проводити в темряві або при слабкому освітленні.

Через 10-15 хвилин розчинник підніметься на 10-12 см. Пігменти розподіляються в наступному порядку: першим знизу адсорбується хлорофіл *b* жовто-зеленого кольору, потім синьо-зелена зона хлорофілу *a*, вище — жовтий ксантофіл, каротин дуже

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



швидко рухається і розташовується зверху смужки хроматографічного паперу у фронті розчинника, він має темно-жовтий колір.

Після закінчення розділення пігментів хроматограму виймають, зразу ж відзначають межу підйому розчинника, так звану лінію фронту, висушують і розраховують значення R_f для кожного пігменту.

Завдання: наклеїти хроматограму в лабораторний журнал. Плями пігментів обвести відповідним за кольором олівцем та зверху наклеїти скетчем (пігменти нестійкі, швидко руйнуються і втрачають колір при дії світла та кисню). Розрахувати значення R_f для кожного з пігментів. Відзначити у висновку переваги методу розділення пігментів за допомогою паперової хроматографії.

3.1.4 Оптичні властивості пігментів зеленого листа

Матеріали і обладнання 1) концентрована спиртова витяжка пігментів зеленого листа; 2) розчин каротину (бензинова витяжка коренеплоду моркви); 3) розчин ксантофілу, отриманий при розділенні пігментів за Краусом; 4) етиловий спирт; 5) спектроскоп; 6) настільна лампа потужністю 100 Вт; 7) чавунний штатив з двома лапками; 8) штатив з пробірками (7 шт.); 9) піпетки, градуйовані на 1—10 мл; 10) шматок чорної тканини або паперу.

3.1.4.1 Спектри поглинання пігментів

Найважливіша властивість хлорофілу — його здатність поглинати світлову енергію в межах видимої частини спектру (380—720 нм). Поглинання світла хлорофілом є не суцільним, а вибіркоvim.

В цьому можна переконатися, пропускаючи біле світло через розчин хлорофілу, а потім розкладаючи його за допомогою призми. Окремі ділянки спектру виявляються поглиненими, а на їх місці будуть видні темні смуги. Отриманий спектр називається **спектром поглинання**.

Зіставляючи спектри поглинання розчинів різної концентрації (або одного і того ж розчину, але при різній товщині шару), можна встановити ступінь поглинання окремого проміння: чим слабше поглинається дана ділянка спектру, тим більш концентрований потрібно узяти розчин, щоб добитися зникнення цієї ділянки в спектрі поглинання. Проміння, що сильно поглинається, можна визначити за смугами в спектрі поглинання дуже розбавленого розчину, тоді як проміння, що

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



найменше поглинається, проходить навіть через досить концентрований розчин. Спектр поглинання каротиноїдів охоплює тільки короткохвильову область видимого спектру (до 540 нм).

Хід роботи

Направити спектроскоп на джерело світла. Відрегулювати ширину щілини на кінці труби спектроскопа так, щоб спектр вийшов чітким і достатньо яскравим (при дуже широкій щілині спектр виходить розмитим, нечистим, при дуже вузькій щілині освітленість спектру недостатня).

Налити досліджуваний розчин в пробірку і закріпити її в лапці штатива перед щілиною спектроскопа. Вивчити спектри поглинання розчинів хлорофілу різної концентрації, розбавляючи витяжку із зеленого листа в співвідношеннях 1:1, 1:3, 1:5, 1:15 та 1:30. Для порівняння розглянути спектр бензинової витяжки з коренеплоду моркви, що містить каротин, і спиртовий розчин ксантофілу, отриманий при розділенні пігментів за Краусом.

Таблиця 3.1.

Розчин	Колір						
	с	с	п	з	ж	п	ч
Хлорофілу:							
1:30							
1:15							
1:5							
1:3							
1:1							
1:0							
Каротину							
Ксантофілу							

Завдання: замалювати спектри за формою, наведеною в таблиці 3.1, причому ділянки, які поглинаються, закрасити чорним, а видимі ділянки — кольоровими олівцями. Зробити висновок щодо спектрів поглинання різних фотосинтетичних пігментів.

3.1.4.2 Флуоресценція хлорофілу

Флуоресценція є свіченням активності речовин при поглинанні ними світла. Флуоресценція хлорофілу, не будучи

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



фотосинтетично утилізованою формою енергії, служить ознакою його фотохімічної активності.

В темряві молекула хлорофілу знаходиться в основному стані з найнижчим енергетичним рівнем валентних електронів. При поглинанні кванта світла один з p -електронів молекули хлорофілу переходить на більш високий енергетичний рівень, внаслідок чого виникає електронно-збуджений стан молекули. При поверненні із збудженого стану в основний енергія електронів може витратитися на: 1) фотохімічну роботу, 2) збудження сусідніх молекул хлорофілу, 3) втрату у вигляді тепла, 4) флуоресцентне випромінювання. Незалежно від довжини хвилі спектр флуоресценції хлорофілу *a* має максимум при 670 нм. Хлорофіл сильно флуоресцирує в розчинах і слабо — в листі, що пояснюється щільною упаковкою молекул в тілакоїдах і використанням поглиненої енергії у фотохімічних процесах.

Хід роботи

Витяжку пігментів в пробірці помістити на темному фоні у світлі настільної лампи або освітити пучком світла проекційного ліхтаря. Розглянути витяжку з тієї сторони, звідки падає світло (рис.3.4.).

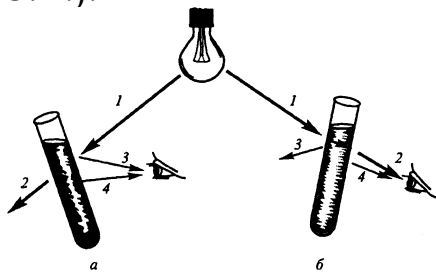


Рисунок. 3.4. Спиртна витяжка хлорофілу у відбитому (а) і прямому промінні (б):

1 — світло лампи, що освітлює пробірку з розчином хлорофілу та збуджує його флуоресценцію;

2 — світло лампи, що проходить через пробірку з розчином хлорофілу;

3 — світло лампи, відбите від пробірки;

4 — флуоресценція хлорофілу.

Завдання: відзначити забарвлення розчину і зробити висновок про причину флуоресценції.

3.2 Визначення інтенсивності фотосинтезу і дихання за зміною вмісту вуглецю

Матеріали і обладнання: 1) колба конічна на 50 мл; 2) бюретка для титрування; 3) воронка (діаметр 4 см) або пробка-

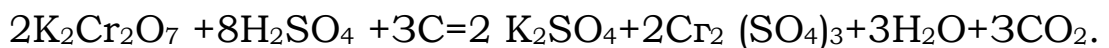
ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



холодильник; 4) піпетка; 5) пробкове свердло; 6) терези; 7) лампа для освітлення; 8) рослини герані, примули; 9) $K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$. 10) сіль Морю 0,2 н $((NH_4)SO_2 \cdot FeSO_4 \cdot 6H_2O)$. 11) фенілантранілова кислота 0,2%.

Визначення асимілюючої здатності рослин за зміною вмісту вуглецю аналогічно методу Сакса, коли про інтенсивність процесу фотосинтезу судять за збільшенням сухої ваги одиниці поверхні листя за певний проміжок часу. Ці методи характеризують загальний баланс в накопиченні органічних речовин, різниця між утворенням асимілянтів і відтоком їх до інших органів і використанням в процесі дихання. Щоб отримати уявлення про новоутворення речовин в процесі фотосинтезу, необхідно поставити спеціальні досліди в темряві для визначення відтоку і витрати асимілянтів.

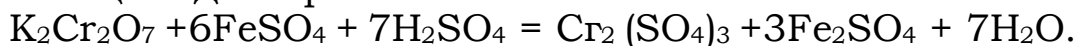
В основі методу лежить визначення вуглецю методом мокрого озолення органічних речовин біхроматом калію в кислому середовищі ($K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$). Вуглець окислюється до CO_2 .



За кількістю використаного $K_2Cr_2O_7$ розраховують кількість окисленого вуглецю.

Надлишкову кількість біхромату калію, яка була використана на окислення органічних речовин, визначають титруванням 0,2 н розчином солі Морю $(NH_4)SO_2 \cdot FeSO_4 \cdot 6H_2O$.

Реакція йде за рівнянням:



Спочатку в листі рослин визначають початкову кількість вуглецю (на одиницю поверхні). Потім рослину переносять на деякий час в умови освітлення (фотосинтез) або темряви (дихання) і після закінчення експозиції визначають повторно кількість вуглецю в органах, що вивчаються. За різницею між першим і другим визначенням роблять висновок про кількість накопиченого або використаного вуглецю.

Хід роботи

Для дослідів використовують листя одного ярусу. Досліди проводять з відрізаним листям або ж з листям, яке не відокремлені від рослини.

Зважаючи на те, що у кожній рослині на будь-якій стадії розвитку вже є автотрофно синтезована органічна речовина, спочатку визначають нульову (стартову) кількість органічної речовини в листі. Для цього роблять 5 висічок пробковим свердлом з листя рослин. Потім ці ж рослини ставлять: одну у темряву, іншу – на світло на 1 годину.

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



На протязі цього часу висічки з нульового листа піддають мокрому озоленню. В колбу за допомогою мірних циліндрів наливають 10 мл 0,4 н хромової суміші. Колбу закривають маленькою скляною воронкою і ставлять на азбестову сітку на задалегідь розігріту електричну плитку. По мірі нагрівання спочатку виділяються дуже дрібні пухирці вуглекислого газу з карбонатів і бікарбонатів, які містяться в листі. Через 3-5 хв починається кипіння рідини. Повільне кипіння повинне продовжуватися 5 хв. За цей час органічна речовина згорає, і розчин біхромату набуває бурого забарвлення. Неоднакові умови кипіння можуть призвести до великої розбіжності вмісту вуглецю в паралельних визначеннях. Окислення хромової суміші повинне протікати при її надлишку. Показником того, що хромовій суміші було недостатньо, є її зелене забарвлення.

Після охолодження розчину змивають в нього краплі хромової суміші із стінок колби, обмивають воронку мінімальною кількістю води, додають 3-5 крапель 0,2% розчину фенілантранілової кислоти і титрують сіллю Мора до переходу забарвлення з фіолетового в зелене.

Після закінчення експозиції перебування даних рослин у темряві та на світлі (на протязі години) з їх листя також роблять по 5 висічок та піддають мокрому озоленню з біхроматом калію та титруванню залишку біхромату сіллю Мора, як з нульовим листям (див. вище).

Паралельно з дослідами проводять контроль без рослинного матеріалу. Ретельно дотримують всі вище вказані операції.

Різниця в кількості солі Мору, яка пішла на титрування контрольної і дослідних колб, відповідає кількості біхромату, який пішов на окислення вуглецю. 1 мл 0,2 н солі Мору відповідає 1 мл 0,4 н розчину біхромату калію. Останній відповідає 0,6 мг вуглецю.

Перед проведенням досліду визначають титр солі Мору і враховують поправку до титру.

Вміст вуглецю в мг на 1 дм² листової поверхні розраховують за формулою:

$$X = \frac{(A - B) \times K \times 0,6 \times 100}{C} \quad (3.2.), \text{ де}$$

X - вміст вуглецю;

A - кількість (мл) солі Мору, яка пішла на титрування контрольної проби;

B - кількість (мл) солі Мору, яка пішла на титрування

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



залишку хромової суміші після спалювання органічної речовини;

K - поправка до титру солі Мору;

S - площа листя в см^2 .

Площу листової поверхні визначають за формулою 3.3:

$$S = \pi r^2 \quad (3.3),$$

де S - площа листової поверхні, см^2 ;

π - 3,14;

r - радіус діаметра пробкового свердла, см.

За різницею вмісту вуглецю в 1 дм^2 листовій поверхні до і після експозиції визначають зміну його вмісту за час досліджень. Інтенсивність дихання або фотосинтезу розраховують за збільшенням або зменшенням вмісту вуглецю в мг С/дм^2 за годину.

Так, у так званому нульовому листі, ми визначаємо вихідну кількість органічної речовини. У темряві проходить тільки процес дихання, тобто окислення органічної речовини (її кількість при цьому зменшується у порівнянні з вихідною кількістю). На світлі ж паралельно йдуть два процеси – дихання (розщеплення органічних речовин) та фотосинтезу (утворення органічних речовин).

Тому для визначення інтенсивності дихання беруть різницю між кількістю органічної речовини у нульовій та темновій пробі та розраховують її за формулою:

$$I_o = X_0 - X_m \quad (3.4),$$

де I_o - інтенсивність дихання листя (мг вуглецю/дм^2 за годину);

X_0 - вміст вуглецю у нульовому листі (мг /дм^2 за годину);

X_m - вміст вуглецю у темновому листі (мг /дм^2 за годину)

При визначенні інтенсивності дихання усе набагато складніше: треба врахувати як кіот кість вуглецю, яка була утворена у процесі фотосинтезу, так і кількість, яка була окислена у процесі дихання, тому, що у рослині ці процеси йдуть паралельно, а нам треба розрахувати чисту кількість вуглецю, який був утворений.

Тому для визначення інтенсивності фотосинтезу до різниці між кількістю органічної речовини у нульовій та світовій пробі додають інтенсивність дихання, яка визначається за формулою 3.4. Цю величину розраховують за формулою 3.5:

$$I_\phi = (X_0 - X_m) + X_c - X_0 \quad (3.5),$$

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



де I_ϕ - інтенсивність дихання листя (мг вуглецю/дм² за годину);

X_0 - вміст вуглецю у нульовому листі (мг /дм² за годину);

X_m - вміст вуглецю у темновому листі (мг /дм² за годину);

X_c - вміст вуглецю у світловому листі (мг /дм² за годину)

Таблиця 3.2.

Об'єкт	Час визначення	Взято $K_2Cr_2O_7$, мл		Пішло солі Мору, мл		Площа висічок, см ²	Кількість вуглецю мг/дм ²	Інтенсивність фотосинтезу, мг дм ² /годину	Інтенсивність дихання, мг дм ² /годину
		Контроль (а)	Дослід (в)	Контроль (а)	Дослід (в)				
	Нульова проба								
	Світлова проба								
	Темнова проба								

Завдання: записати отримані дані в таблицю 3.2.; розрахувати інтенсивність фотосинтезу та дихання; порівняти ці значення та зробити висновок про вплив інтенсивності освітлення на інтенсивність фотосинтезу.

Розв'язати наступні задачі:

1. Скільки органічної речовини накопичує рослину за 15 хв, якщо відомо, що інтенсивність фотосинтезу складає 20 мг CO_2 /дм² • годину, а площа листків — 2,5 м²?

2. За 20 мін пагін, площа продихової поверхні якого складає 240 см², поглинув 16 мг вуглекислого газу. Обчисліть інтенсивність фотосинтезу.

3. Щоб визначити інтенсивність фотосинтезу пагону, площа листків якого дорівнює 80 см², його помістили в колбу. Через 15 хв пагін вийняли, а в колбу налили 20 мл розчину $Ba(OH)_2$. Після збовтування вміст колби протитрували щавлевою кислотою, витративши 18 мл розчину. На титрування аналогічної кількості бариту в контрольній колбі (без рослини) витратили 14 мл щавлевої кислоти. Обчисліть інтенсивність фотосинтезу, якщо відомо, що 1 мл щавлевої кислоти еквівалентний 0,6 мг CO_2 .

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



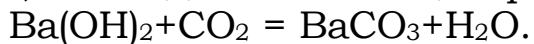
ДИХАННЯ РОСЛИННОГО ОРГАНІЗМУ

Мета заняття: Визначити функціональну активність дихальних процесів в залежності від дихального субстрату та стану рослини.

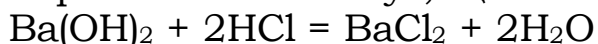
4.1. Визначення інтенсивності дихання

Матеріали і обладнання: 1) проросле і непроросле насіння; 2) 0,1 н розчин Ва(ОН)₂; 3) 0,2н розчин щавлевої кислоти; 4) 5% розчин фенолфталеїну в крапельниці; 5) терези з важками; 6) однакові конічні колби на 250 мл з гумовими пробками, в які вставлені металеві гачки (3 шт.); 7) шматки марлі; 8) стакан з водою.

Для визначення інтенсивності дихання за кількістю виділеного діоксиду вуглецю в замкнуту судину поміщають наважку досліджуваного матеріалу і певну кількість розчину лугу. Двооксид вуглецю, що виділяється в процесі дихання, реагує з лугом, внаслідок чого концентрація розчину зменшується:



Через певний час луг, що залишився в судині, титрують:



Порівнюють отриману величину з результатом титрування такої ж кількості початкового розчину лугу. Останнє необхідне для визначення початкової концентрації лугу і одночасно для обліку тієї невеликої кількості СО₂, яка містилася в судині до досліду, а також що поглинається лугом під час відкриття колби. Різниця між результатами титрування вмісту контрольної і дослідної колб прямо пропорційна кількості виділеного при диханні СО₂.

Тривалість досліду залежить від розміру наважки і інтенсивності дихання досліджуваного об'єкту. При дуже короткій експозиції різниця між результатами титрування контрольної і дослідної колб буде недостовірною. Якщо ж в дослідній колбі залишиться дуже мало бариту, то може відбутися неповне поглинання СО₂. Бажано тому підібрати таку експозицію, щоб на зв'язування СО₂ було витрачене 20 - 50% лугу (якщо, наприклад, на титрування бариту в контрольній колбі пішло 10 мл щавлевої кислоти, то на титрування розчину в дослідній колбі повинне піти не більше 8 і не менше 5 мл).

Хід роботи

Помістити наважку дослідного матеріалу (5 г) в марлевий мішечок і прикріпити його до пробки гачком, вставленим в пробку.

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



Провести пробну збірку установки, перевіривши, чи вільно проходить мішечок з матеріалом через горло колби і чи не опускається він дуже низько. Налити в колбу 10 мл розчину $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Швидко опустити в колбу матеріал, злегка змочити пробку водою (для герметичності) і щільно (обертальним рухом) закрити колбу пробкою. Записати час початку експозиції.

Задача роботи — порівняння інтенсивності дихання різних об'єктів. Для цього потрібно узяти дві колби і помістити в них проросле і непроросле насіння.

В контрольну (порожню) колбу також налити 10 мл бариту і щільно закрити пробкою. Колби з об'єктами, що містять хлорофіл, необхідно на весь час досліду помістити в темряву для виключення процесу фотосинтезу.

Час від часу колби слід обережно похитувати, щоб порушити плівку BaCO_3 , перешкоджаючи повноті поглинання CO_2 , при цьому не допускати попадання жодної краплі розчину на мішечок з матеріалом.

Через 1 годину вийняти матеріал, швидко закрити колбу пробкою і відмітити час закінчення досліду. Внести в колби по 2—3 краплі фенолфталеїну і відтитрувати луг, що залишився 0,2 н розчином щавлевої кислоти до зникнення рожевого відтінку.

Контрольну колбу можна титрувати через 20 хв після того, як налитий розчин бариту (протягом цього часу колбу необхідно збовтувати).

Результат записати в таблицю 4.1:

Таблиця 4.1

Об'єкт	Наважка, г	Об'єм $\text{Ba}(\text{OH})_2$, мл	Час			Витрата щавлевої кислоти		Інтенсивність дихання, мг/г × год
			Початок	Кінець	Експозиція	Конт	Дослід	

Інтенсивність дихання обчислюють за формулою 4.1:



$$I = \frac{(a - b) \times 0,55}{p \times t}, \quad (4.1)$$

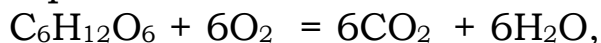
де a — результат титрування вмісту контрольної колби;
 b — результат титрування вмісту дослідної колби;
 $0,55$ — кількість мг CO_2 , еквівалентна 1 мл 0,2 н. щавлевої кислоти;
 p — наважка, г;
 t — експозиція, год.

Завдання: зробити висновок, зіставив інтенсивність дихання різних об'єктів з різними дихальними субстратами (білками, жирами, вуглеводами) на різних етапах онтогенезу (проросле та непроросле насіння).

4.2 Визначення дихального коефіцієнта

Дихальним коефіцієнтом (ДК) називається відношення об'єму виділеного при диханні CO_2 до об'єму поглиненого O_2 . Величина цього відношення характеризує хімізм дихання і може змінюватися залежно від того, які органічні сполуки використовуються на дихання.

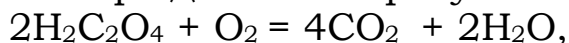
Якщо дихальним субстратом служать вуглеводи, реакція йде за рівнянням:



$$\text{тобто ДК} = \frac{6 \text{ CO}_2}{6 \text{ O}_2} = 1$$

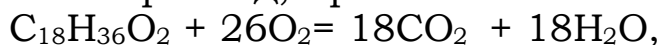
Якщо дихальним субстратом служать органічні кислоти, що містять більше кисню на 1 атом вуглецю, ніж вуглеводи, то дихальний коефіцієнт буде більше 1.

Так при диханні за рахунок щавлевої кислоти за рівнянням:



$$\text{ДК} = \frac{4 \text{ CO}_2}{\text{O}_2} = 4$$

Якщо на дихання використовуються сполуки (жири, білки), що збагачені воднем, то дихальний коефіцієнт буде менше 1, оскільки на окислення водню буде потрібно додаткова кількість кисню. Наприклад, при окисненні стеаринової кислоти:



$$\text{тобто ДК} = \frac{18 \text{ CO}_2}{26 \text{ O}_2} = 0,7$$

При нестачі кисню в атмосфері або неможливості його легкого доступу в клітини і тканини (занурене у воду насіння,

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



тканини в глибині масивних органів) посилюється анаеробне дихання. При цьому окислення субстрату і виділення CO_2 відбуваються без поглинання кисню повітря, в цьому випадку ДК буде більше.

Прилад для визначення ДК складається з пробірки з щільно пригнаною пробкою, в яку вставлена вимірювальна трубка, занурена в бюкс з розчином еозину.

Матеріали і обладнання: 1) прилад для визначення ДК; 2) бюкси; 3) проросле насіння квасолі, соняшнику або пшениці; 4) пінцет; 5) фільтрувальний папір; 6) ножиці; 7) 0,1 н розчин $\text{Ba}(\text{OH})_2$; 8) годинник; 9) вата; 10) нитки; 11) штатив; 12) розчин еозину (або будь-який інший забарвлений розчин).

Хід роботи

В пробірку, приблизно до половини, насипають проросле насіння і щільно закривають пробкою. Кінець капілярної трубки опустити в бюкс з розчином еозину, а колбу закріпити в штативі. Відразу після цих операцій відзначають положення меніска розчину еозину в трубці (А). За 10 хвилин відзначають число поділок на трубці, на яке піднявся еозин. Вимірювання ще раз повторити через той же інтервал часу. Після цього обережно відкрити пробку, вийнявши трубку з розчину еозину і видаливши його з неї.

Помістити під трубку в пробірку шматочок вати на нитці (вату заздалегідь змочити лугом), закрити щільно пробірку, укріпити її в штативі і кінець трубки знов опустити в розчин еозину. Знову провести виміри руху розчину в трубці (В) за ті ж проміжки часу.

Дослід поставити в триразовій повторності. Після закінчення досліду демонтувати систему і зважити насіння.

Перший відлік (А) відповідатиме різниці об'ємів поглиненого кисню і виділеного CO_2 за даний проміжок часу. Другий відлік (В), у варіанті з лугом виражає собою об'єм тільки поглиненого кисню, оскільки виділений CO_2 поглинається лугом.

Об'єм CO_2 знаходять за різницею:

$$\text{CO}_2 = \text{B} - \text{A}.$$

Звідси ДК:

$$\text{ДК} = \frac{\text{B} - \text{A}}{\text{B}} \quad (4.2)$$

Якщо 10 малих поділок на капілярній трубці дорівнює 0,1 мл газу, то за даними досліду можна обчислювати і інтенсивність дихання пророслого насіння в мл O_2 або CO_2 на 1г насіння за 1 годину. В цьому випадку для розрахунку використовують формулу:

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН



$$I_d = \frac{(A - B) \times 60}{M \times n}, \text{CO}_2 \text{ на 1 г за годину. (4.3)}$$

$$I_d = \frac{B \times 60}{M \times n}, \text{O}_2 \text{ на 1 г за годину, (4.4)}$$

Де I_d - інтенсивність дихання;

M - вага насіння в досліді, г;

n - інтервал часу вимірювання, хвилин

При цьому дихальний коефіцієнт розраховують за формулою:

$$DK = \frac{I_o(\text{CO}_2)}{I_o(\text{O}_2)} \quad (4.5),$$

де DK - дихальний коефіцієнт;

$I_o(\text{CO}_2)$ - інтенсивність дихання за CO_2 ;

$I_o(\text{O}_2)$ - інтенсивність дихання за O_2

Завдання: замалювати систему для вимірювання інтенсивності дихання і ДК, розрахувати дихальний коефіцієнт і інтенсивність дихання за O_2 і CO_2 . Порівняти значення інтенсивності дихання і ДК для проростків з різними дихальними субстратами.

Розв'язати наступні задачі:

1. Інтенсивність дихання насіння становить 0,15 мг CO_2 на 1 г сухої речовини за 1 годину. Скільки вуглекислого газу виділить 1,2 кг насіння за 5 діб?

2. Скільки кисню поглинають рослини загальною масою 2 кг в кімнаті об'ємом 45 м³ за 10 год, якщо відомо, що середня інтенсивність дихання їх становить 12 мл кисню на 1 г за добу? Відповідь обґрунтуйте розрахунками. Дати оцінку ефективності використання рослиною певних запасних речовин у якості дихального субстрату (білків, вуглеводів, жирів тощо). У відповіді застосуйте показник „дихальний коефіцієнт”.

3. Були узяті дві наважки насіння по 10 г кожна. Одну наважку висушили при 100° С для визначення абсолютно сухої маси, що дорівнювалась 8,8 г. Другу порцію насіння пророщували в темряві протягом 2 тижнів на чистому піску, змоченому дистильованою водою. Отримані паростки мали сиру масу 21,7 г, а абсолютно суху — 7,0 г. Як пояснити зміну сухої і сирої маси в процесі проростання?