

Розділ I

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИННОЇ КЛІТИНИ

Тема 2 : Оцінка життєздатності клітин

Мета: дослідити основні фізичні та хімічні властивості рослинної клітини, зокрема її мембранного апарату щодо функціонування за різних умов існування, оволодіти основними засобами визначення життєздатності клітини.

Матеріали та обладнання: 1) столовий буряк (*Beta vulgaris L.*); 2) насіння гороху, намочене у воді за 10 – 15 годин; 3) цибулина звичайної цибулі; 4) проростки різних культур; 5) штатив з пробірками; 6) чашки фарфорові; 7) пробкове свердло; 8) піпетки; 9) скальпель; 10) лезо бритви; 11) препарувальна голка; 12) покривні та предметні скельця; 13) фільтрувальний папір; 14) електрична плитка; 15) мікроскоп; 16) ФЕК; 17) термостат; 18) хлороформ; 19) 30% CH_3COOH ; 20) 50% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; 21) 1М розчин KNO_3 ; 22) 0,1% розчин індигокарміну; 23) 0,02% нейтральний червоний; 24) 10% аміак в крапельниці; 25) 0,1% ТТХ, виготовлений на 0,87% K_2HPO_4 ; 26) кольорові олівці.

Питання для самостійної підготовки

1. Засоби визначення життєздатності клітин.
2. Фізичні та хімічні властивості цитоплазми.

Виконання роботи

Завдання 1. Проникність живої і мертвої цитоплазми.

 Мембрани цитоплазми – плазмолема і тонопласт – мають вибіркочну проникність. Це явище властиво тільки живим клітинам. При дії на клітину пошкоджуючих агентів мембрани втрачають властивість напівпроникності. Це можна прослідити на рослинних об'єктах, що містять в клітинному соці пігмент антоціан. Ступінь пошкодження корелює з кількістю пігменту, який виходить у водне середовище. Частіше за все для демонстрації використовують столовий буряк, пігмент якого – β -ціанін – добре розчиняється у воді.

Вирізати пробковим свердлом циліндри з коренеплоду червоного буряка (діаметр 0,5-0,7 мм). Нарізати їх на рівні частини завдовжки 2 см і промити проточною водою. Покласти по одному шматочку коренеплоду в пробірки (варіанти розчинів в пробірках за табл.2.1), через 1 годину пробірки струсити. Визначити інтенсивність забарвлення розчинів в пробірках за допомогою фотоелектроколометра (ФЕК), використовуючи синій (зелений) світлофільтр. У відповідну графу табл.2.1 записати показання ФЕКа.

Таблиця 2.1 – Пошкодження мембран фізичними та хімічними чинниками

Варіант	10 мл водопровідної води	10 мл водопровідної води кип'ятити	10 мл водопровідної води + 6 крапель хлороформу (фенолу)	10 мл 30% оцтової кислоти	10 мл 50% етилового спирту	
Забарвлення розчину в пробірці						
Показання ФЕКу, опт.од.						

Зробити висновок про зміну проникності цитоплазми при пошкодженні клітин та ранжувати впливи за пошкоджуючою дією.

Завдання 2. Прижиттєве фарбування клітин нейтральним червоним.

 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 можна переконатися, викликавши плазмоліз забарвлених клітин (плазмолізуватися можуть тільки живі клітини). Нейтральний червоний – двобарвний індикатор: в кислому середовищі (рН<6) він має малинове забарвлення, в лужному – жовте.

Для розуміння результатів даної роботи необхідно мати на увазі, що в розчині з рН 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.

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 1М розчином 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 KNO_3 і ввести краплю 10% аміаку, що є сильною отрутою. Розглянути препарат під мікроскопом,

звернувши увагу на забарвлення цитоплазми і ядра в загиблих клітинах.
Замалювати клітину.

Завдання 3. 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 значить, і появи забарвлення не відбувається.

Відновлені форми солей тетразолію (формазани) – 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 ступеня відновлення. На повітрі формазани не окислюються, тому їх зручно використовувати для виявлення активності дегідрогеназ на зрізах рослинних тканин.

З вибраних об'єктів (зародки насіння, верхівки проростків, великі бруньки деревних рослин) зробити зрізи лезом безпечної бритви. Зрізи не повинні бути тонкими. Можна використовувати також цілі кінчики коренів завдовжки не більше 2–3 см. Частину об'єктів «вбити», нагріваючи у воді над полум'ям. Живі і мертві тканини помістити в бакпечатку в 0,1 % розчин ТТХ, приготований на 0,87%-ному розчині K_2HPO_4 , і витримати 10-15 хвилин (цей час можна скоротити, помістивши в термостат з температурою 30 – 35°C). У живих зрізів спостерігається забарвлення, особливо яскраве в місцях розташування меристематичних тканин. У мертвих зрізів забарвлення не спостерігається.

При дистанційному виконанні!

Подивіться

відео

<https://www.youtube.com/watch?v=uHEQkdmU-sk>

Зробіть схему досліду та зафіксуйте наведені у відео результати.



У всіх дослідах порівняти забарвлення живих і мертвих клітин, зробити малюнки, сформулювати висновки про можливість використання фарбників для виявлення живих і мертвих кліток.