

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ФАКУЛЬТЕТ БІОЛОГІЧНИЙ  
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ ТА РОСЛИННИХ РЕСУРСІВ

# **ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ З ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН**

**для студентів денної форми навчання  
014 Середня освіта (Біологія та здоров`я людини)**

ступінь вищої освіти: Бакалавр

спеціальність: 014 Середня освіта (Біологія та здоров`я людини)

спеціалізація: 014.05 Середня освіта (Біологія та здоров`я людини)

освітньо-професійна програма: Середня освіта (Біологія та здоров`я людини)

Форма навчання: денна

**Запоріжжя  
2020**

## ЗМІСТ

Атестація 1. Фізіологія рослинної клітини. Водобмін. Фотосинтез. Дихання.....	4
Розділ 1. Фізіологія рослинної клітини.....	4
Лабораторна робота №1.1 Плазмоліз .....	4
Лабораторна робота №1.2 Цитоплазма .....	7
Розділ 2. Водний режим рослин.....	12
Лабораторна робота №1.3 Рослинна клітина як осмотична система .....	12
Лабораторна робота №1.4 Водний обмін.....	17
Розділ 3. Світлова стадія фотосинтезу .....	22
Лабораторна робота №1.5.1 Хімічні властивості пігментів.....	22
Лабораторна робота №1.5.2 Фізичні властивості пігментів.....	28
Розділ 4. Темнова стадія фотосинтезу.....	30
Лабораторна робота №1.6.1 Хлорофіл .....	30
Лабораторна робота №1.6.2 Інтентисивність фотосинтезу.....	32
Розділ 5. Дихання рослин.....	36
Лабораторна робота №1.7.1 Ферменти дихання .....	36
Лабораторна робота №1.7.2 Інтентисивність дихання .....	39
Лабораторна робота №1.7.3 Дихальний коефіцієнт.....	42
Атестація 2. Мінеральне живлення. Фізіологія росту та розвитку рослин. Розмноження рослин. Стійкість.....	44
Розділ 6. Мікро- та макроелементи.....	44
Лабораторна робота №2.1.1 Підготовка до гідропоніки .....	44
Лабораторна робота №2.1.2 Закладка досліду.....	48
Лабораторна робота №2.1.3 Мікрохімічний аналіз золи.....	51
Лабораторна робота №2.1.4 Ліквідація досліду гідропоніки.....	55
Розділ 7. Мінеральне живлення.....	57
Лабораторна робота №2.2 Нітрати .....	57
Розділ 8. Розмноження рослин.....	61
Лабораторна робота №2.3.1 Насіння .....	61
Лабораторна робота №2.3.2 Щеплення.....	73
Розділ 9. Стійкість рослинного організму.....	77
Лабораторна робота №2.4 Стійкість.....	77
Розділ 10. Ріст та розвиток рослин.....	79
Лабораторна робота №2.5.1 Ріст. Тропізми.....	79
Лабораторна робота №2.5.2 Розвиток. Аналіз досліду.....	82

## ВСТУП

Фізіологія рослин – це наука про організацію та координацію функціональних систем зеленої рослини, завдання якої – це пізнання закономірностей життєдіяльності рослин, розкриття молекулярних основ складних функцій та механізмів їх регуляції в системі цілого організму. Фізіологія рослин – фундаментальна біологічна дисципліна, вивчення якої здійснюється впродовж 3 курсу денного відділення спеціальності «Біологія» та є логічним послідовним кроком у формуванні системи знань про структуру та функціонування рослинного організму у майбутніх фахівців-біологів. Базою сприйняття цієї дисципліни є знання отримані при вивченні дисциплін ботанічного напрямку (морфологія, анатомія, систематика рослин), біохімії та цитології. В той же час розуміння основних механізмів здійснення основних фізіологічних процесів є необхідною передумовою підготовки студентів для вивчення інших фундаментальних біологічних (генетики, екології та ін.).

Об'єкт фізіології рослин - це еукаріотичний організм з фототрофним засобом живлення, який є основою специфічного обміну зелених рослин і стосується усіх основних процесів метаболізму. II частина «Лабораторного практикуму» містить повний обсяг лабораторних робіт, передбачених навчальною програмою за темами „Фізіологія дихання рослин”, „Фізіологія мінерального живлення”, „Фізіологія стійкості” та «Ріст та розвиток рослин». Кожній роботі передує короткий огляд теоретичного матеріалу за темою дослідження, що в значній мірі спрямовує студента на виконання роботи з метою чи то практичного підтвердження, чи то деталізації вивчення певного фізіологічного явища або процесу.

При виконанні робіт, передбачених «Лабораторним практикумом» перед студентами ставляться наступні завдання: набуття практичних навичок щодо дослідження певних фізіологічних явищ, зокрема вміння планувати експеримент, моделювати необхідні умови для спостереження, здійснювати поточний контроль за ходом експерименту, отримувати результати практичних досліджень та аналізувати їх, роблячи обгрутовані та змістовні висновки.

Наведені лабораторні роботи можуть бути використані під час виконання курсових та дипломних проектів, а також модифіковані залежно від спрямованості наукових досліджень студента.

# **АТЕСТАЦІЯ 1. ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИННОЇ КЛІТИНИ.**

## **ВОДООБМІН. ФОТОСИНТЕЗ. ДИХАННЯ.**

### **РОЗДІЛ 1. ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИННОЇ КЛІТИНИ.**

#### **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1.1 ПЛАЗМОЛІЗ**

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) фільтрувальний папір;
- 6) 30% розчин оцтової кислоти;
- 7) 1М розчин глюкози;
- 8) 1М розчин роданіду калію;
- 9) 1М розчин нітрату калію;
- 10) 0,7М розчин нітрату кальцію;
- 11) 1М розчин карбаміду;
- 12) цибулина синьої ріпчастої цибулі;

#### ***Завдання 1. Виготовлення тимчасового препарату. Плазмоліз***

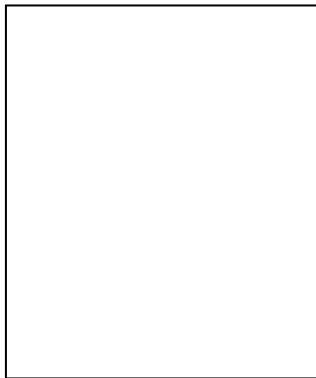
Пригадайте правила користування мікроскопом і підготуйте його до роботи. Скальпелем від соковитої луски цибулини відріжте смужку завширшки 3-4 мм, переламайте її навпіл та зніміть пінцетом тонку верхню шкірку (забарвлену). Шматочок шкірки покладіть у краплину води на предметному склі та розправте препарувальною голкою. Бережно накрийте накривним скельцем. Виготовлений препарат покладіть на предметний

столик мікроскопа і розгляньте його, використовуючи об'єктив малого збільшення.

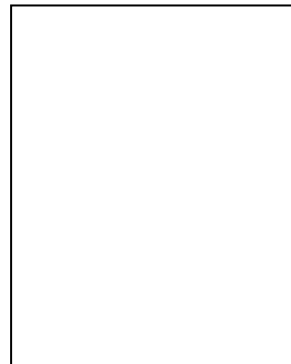
Зробіть ще один препарат, але помістити шкірку цибулі у розчин сахарози.

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

Малюнок деплазмолізованої клітини:



Малюнок плазмолізованої клітини:



### ***Завдання 2. Різновиди плазмолізу.***

Виборча 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 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.

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 увогнуту форму. На цьому етапі плазмоліз називається **увогнутим**. 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 увогнутий плазмоліз переходить в опуклий, дозволяє оцінювати ступінь в'язкості цитоплазми.

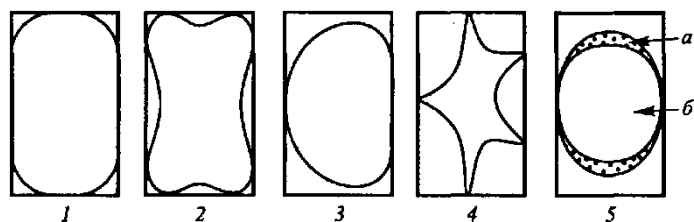


Рис. 1.1 Форми плазмолізу:

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

### Хід роботи

Необхідно зробити декілька тимчасових препаратів з різними розчинами.

**1 М розчин сахарози,**

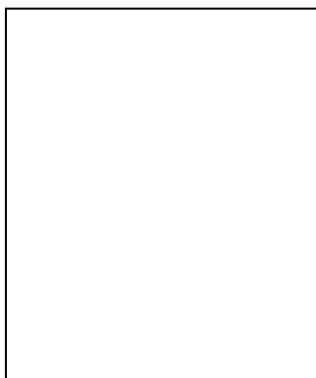
**1 М розчин карбаміду,**

**1 М розчину нітрату калію,**

**0,7 М розчину нітрату кальцію**

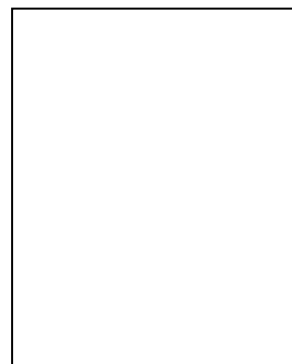
**1 М розчин сахарози**

Вид плазмолізу, швидкість



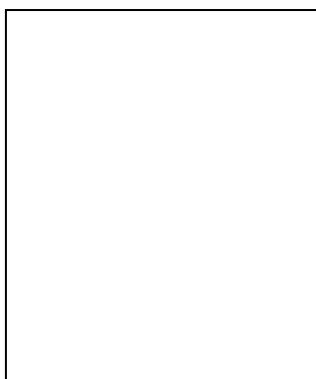
**1 М розчин карбаміду**

Вид плазмолізу, швидкість



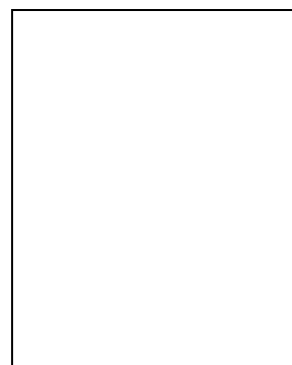
**1 М розчину нітрату калію**

Вид плазмолізу, швидкість



**0,7 М розчину нітрату кальцію**

Вид плазмолізу, швидкість



Завдання: замалювати форми плазмолізу, описати роботу і зробити висновки.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1.2 ЦИТОПЛАЗМА

### *Завдання 1. 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 –  $\beta$ -цианін – 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 (горілка);
- 7) хлороформ;
- 8) 30% оцтова кислота;
- 9) 50% етиловий спирт;
- 10) 1М розчин нітрату калію;
- 14) ФЕК.

#### Хід роботи

Вирізають пробковим свердлом циліндри з коренеплоду червоного буряка (діаметр 0,5-0,7 мм). Нарізають 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 1М розчині нітрату калію. Наявність плазмолізу свідчить, що клітина жива. В мертвих клітинах плазмоліз не спостерігається.

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

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 2. Визначення життєздатності насіння методом фарбування (за Д. Н. Нелюбовим)***

Метод фарбування насіння для визначення їх схожості заснований на непроникності живої цитоплазми для деяких фарбників (індигокармін, кислий фуксин), тоді як мертва цитоплазма легко забарвлюється. Бувають випадки, коли зародок мертвий, але насіння не забарвлюється через те, що оточуючі зародок частини насіння не пропускають фарбник. У зв'язку з цим необхідно заздалегідь оголити зародок: у насіння з ендоспермом витягнути зародок або розрізати насінину уподовж, а у насіння без ендосперма видалити насінні покриви.

Підготовлене таким чином насіння витримують в розчині фарбника від 1 до 3 годин (залежно від виду рослини) і оцінюють життєздатність насіння: насіння з повністю забарвленими зародками або із забарвленими корінцями вважається несхожими, насіння незабарвлене або з частково забарвленими сім'ядолями відносять до числа життєздатних.

Даний метод використовують для швидкої оцінки схожості насіння гороху, квасолі, люпину, льону, коноплі, гарбуза.

#### Матеріали і обладнання:

- 1) проросле насіння гороху;
- 2) 0,1% розчин індигокарміну (1 г на 1 л дистильованої води);
- 3) чашки фарфорові (бак печатки) (2 шт.);
- 4) стакан хімічний;
- 5) препарувальна голка;
- 6) електроплитка (горілка);

#### Хід роботи

Відрахувати, не вибираючи, дві порції по 5-10 штук набряклого насіння гороху. Одну порцію помістити в стакан з водою (пробірку) і прокип'ятити протягом 5 хв. (контроль). Обережно, не ушкоджуючи сім'ядолі, очистити препарувальною голкою насіння обох порцій від шкірки, помістити у фарфорові чашки (бак печатки), залити розчином індигокарміну



і витримати 1 годину, після чого злити барвник назад в пляшку, а насіння відмити водою від надлишку барвника.

Відзначити забарвлення насіння, вбитого кип'ятінням. В дослідній порції підрахувати кількість забарвленого, частково забарвленого і незабарвленого насіння. Результати записати в таблицю 1.2:

Таблиця 1.2

№ п/п	Об'єкт	Кількість узятго насіння, шт.	Кількість насіння, шт.	
			Забарвлених	Незабарвлених

Завдання: заповнити таблицю і написати висновок.

### ***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 (формази) — 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 формази 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) 0,1 % розчин ТТХ, виготовлений на 0,87% розчині  $K_2HPO_4$ ; 6) термостат
- 4) електроплитка (горілка);

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. Живі і мертві тканини поміщують в бакпечатку в 0,1 % розчин ТТХ, приготований на 0,87%-ном розчині  $K_2HPO_4$ , і витримують протягом 10-15 хв. Цей час можна скоротити, помістивши зразки в термостат з температурою 30—35°C. У живих зрізів спостерігається забарвлення,

особливо яскраве в місцях розташування меристематичних тканин. У мертвих зрізів такого забарвлення не відбувається.

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

#### ***Завдання 4 Рух цитоплазми***

Рух цитоплазми — характерна особливість живої рослинної клітини, показник активності процесів її життєдіяльності. Найбільш зручними для спостереження за переміщенням клітинних органел є крупні клітини з великими вакуолями. Розрізняють рух цитоплазми ***спонтанний, постійний та індукований зовнішніми чинниками*** — зміною освітленості, температури, хімічними речовинами, механічними впливами і т.п. Рух цитоплазми — один з найчутливіших показників життєздатності клітини. Навіть незначні впливи зупиняють або, навпаки, прискорюють його. Рух цитоплазми забезпечує внутріклітинний і міжклітинний транспорт речовин, переміщення органел всередині клітини. В його здійсненні беруть участь елементи цитоскелету — мікрофіламенти. Джерелом енергії цього руху служить АТФ.

Матеріали і обладнання:

- 1) мікроскоп;
- 2) настільна лампа;
- 3) термостат на 35 і 40°C;
- 4) предметні і покривні скельця;
- 5) препаратівна голка;
- 6) фільтрувальний папір;
- 7) рослини елодеї
- 8) натрієва сіль АТФ.

#### ***1.3.1 Спостереження за рухом цитоплазми у різних об'єктів***

##### Хід роботи

*1. Елодея.* Відривають лист поблизу верхівки і кладуть його в краплю води, взятої з судини з елодеєю. Об'єкт накривають покривним склом і розглядають спочатку при малому, потім при великому збільшенні. Лист елодеї складається тільки з двох шарів кліток, і кожний шар є легко видимим під мікроскопом. Обрив листка викликає в його клітках рух цитоплазми, який легко спостерігати за переміщенням всіх хлоропластів в одному напрямку уздовж клітинної стінки. Такий рух називається ротаційним. В двох сусідніх клітинах він може відбуватися у різних напрямках — за годинниковою стрілкою і проти неї. Найінтенсивніший рух можна побачити в довгих вузьких клітинах середньої жилки листа. У рослин, що знаходилися перед дослідженням при слабкому освітленні або в темряві, рух хлоропластів зазвичай не спостерігається. Нерухомі хлоропласти розташовуються під клітинними стінками паралельно поверхні листової пластинки. Але якщо препарат витримати декілька хвилин при освітленні, не знімаючи із столика

мікроскопа, то рух з'являється. Хлоропласти починають рухатися спочатку поволі, потім швидше і займають положення уздовж бічних клітинних стінок, розташованих перпендикулярно поверхні пластинки. Рух цитоплазми в клітинах елодеї можна побачити також за переміщенням більш дрібних, ніж хлоропласти, органел — дрібних безбарвних «зерняток», зважених в цитоплазмі. Їх переміщення найлегше виявити в крайових клітинах листової пластинки, де значно менше хлоропластів або вони відсутні.

Якщо рух хлоропластів не спостерігається, то можна додати краплину АТФ.

Завдання: зробити схематичні малюнки клітин всіх розглянутих об'єктів і стрілками вказати напрям руху цитоплазми. Відзначити, чи спостерігався рух відразу після приготування препарату або він змінювався під дією освітлення.

## РОЗДІЛ 2. ВОДНИЙ РЕЖИМ РОСЛИН.

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1.3 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, звана водним **потенціалом** ( $\psi$ ), 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

$$\psi = \frac{\mu_w - \mu_w^0}{\bar{V}_w} \quad (3.1)$$

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 переміщатимуться за градієнтом  $\psi$  — з розчину з меншою концентрацією, в якому ( $\psi_{осм}$ ) вище (тобто 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 ( $\psi_{тиску}$ ).

$$\psi_{кл} = \psi_{осм} + \psi_{давт} \quad (3.2)$$

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.

Знайти ізотонічну концентрацію і обчислити осмотичний тиск клітинного соку за рівнянням Вант-Гоффа:

$$P_{осм} = RTCi \quad (3.3)$$

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

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

$T$  — абсолютна температура (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 3.3:

Таблиця 3.3.

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

Силу, з якою клітина здатна поглинати воду, називають **сисною 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 противотиском клітинної стінки (T):

$$S = P - T \quad (3.4).$$

На сьогодні 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:

$$- \psi_{кл} = -\psi_P + \psi_T \quad (3.5)$$

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

З рівняння (3.5) видно, що осмотичний потенціал знижує водний потенціал клітини, а потенціал 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. На відміну від плазмолітичного методу визначення осмотичного тиску клітинного соку, де критерієм служить початок плазмолізу, при визначенні всисної сили клітин критерієм є незмінність вмісту води в клітинах. Найточніші методи визначення всисної сили клітин засновані на вимірюванні концентрації оточуючих клітини розчинів.

Якщо занурити рослинну тканину в розчин, всисна сила якого більше всисної сили клітин, то 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) розчини сахарози та NaCl;
- 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.

#### ***Завдання 1 Визначення сисної сили клітин за зміною концентрації розчинів, рефрактометричний метод (за Н. А. Максимовим і Н. З. Петіновим)***

##### 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 0,5 - 1 мл приготованих розчинів і закрити пробірки пробками.

Вирізати гострим 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, закрити їх пробками. 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 виїняти проби з розчинів препарувальною голкою і закрити пробірки пробками. Визначити зміну концентрації розчинів після перебування в них дисків з листя.

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

Існує декілька типів рефрактометрів, пристрій яких і правила роботи з ними описані в інструкціях до кожного приладу. Основна частина рефрактометра — дві скляні

призми, причому нижня призма закріплена нерухомо, а верхня може підійматися і опускатися. Між цими призмами потрібно помістити досліджуваній 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 перетином ліній хреста (в рефрактометрах іншого типу — з пунктирною лінією) 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 видалити з поверхні призм краплі розчину сухим фільтрувальним папером, потім двічі протерти папером, змоченим дистильованою водою, і знову витерти сухим фільтрувальним папером.

### ***Завдання 2 Метод цівок (за В. С. Шардаковим)***

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

Розчин, в якому знаходилися шматочки досліджуваного листа, 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 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. 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 3.4.

Концентрація розчину сахарози, моль/л	Осмотичний тиск при 20 <sup>0</sup> С, МПа	Коефіцієнт заломлення розчинів		Напрямок руху цівки	Співвідношення між S розчину і S клітин
		Початковий	Після перебування дисків		
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 і записати значення всисної сили клітин, перед їх зануренням в розчини.

### ***Завдання 3 Визначення водного потенціалу рослинних тканин методом Уршпрунга (за зміною довжини брусків тканини)***

Цей метод заснований на підборі зовнішнього розчину відомої концентрації, водний потенціал якого виявиться рівним величині водного потенціалу кліток тканин ( $\psi_{mk}$ ). Водний потенціал зовнішнього розчину визначається його осмотичним потенціалом ( $\psi_{осм}$ ). При зануренні смужок досліджуваної тканини в розчин,  $\psi_{осм}$  якого менше, довжина смужок тканини зменшується. Якщо  $\psi_{mk}$  менше  $\psi_{осм}$  розчину, то клітини поглинають воду з розчину, об'єм їх збільшується і довжина смужок тканини теж збільшується. Довжина смужок тканини залишається без зміни в тому розчині, у якого  $\psi_{осм}$  дорівнює  $\psi_{осм}$  тканини.

**Матеріали і обладнання:** 1) 1М розчин хлориду натрію; 2) дистильована вода; 3) пробірки; 6) ніж для вирізування смужок тканини; 7) лінійки або міліметровка; 8) бульби та коренеплоди овочів, плоди фруктів.

#### ***Хід роботи***

У пробірках готують по 20 мл розчинів хлориду натрію з концентрацією: 1,0; 0,8; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 М, у восьму наливають дистильовану воду. Для приготування розчинів користуються бюретками. Початковий 1 М розчин NaCl розбавляють дистильованою водою.

З органу рослини вирізають пластини завтовшки 5—10 мм і ділять на однакові бруски завширшки близько 5 мм і завдовжки 40—70 мм. Довжину кожного бруска точно вимірюють за допомогою лінійки перед його зануренням в розчин і після витримки в розчині протягом 40—50 хв. Результати вимірювань записують в таблицю 3.5.

Таблиця 3.5.

1	Концентрація NaCl, моль/л	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0
2	Всисна сила розчину, МПа							
3	Початкова довжина бруска коренеплоду, мм							
4	Довжина після перебування в розчині, мм							
5	Різниця, мм							
6	Тургор							

**Примітка:** в другому рядку таблиці записати всисну силу розчинів, яка чисельно дорівнює їх осмотичному тиску (розрахувати за формулою 3.3. і таблицею 3.3.). Дані для п'ятого рядка отримати, віднявши з більшої величини меншу, причому збільшення довжини позначити знаком «+», а зменшення – знаком «-». В останньому рядку відзначити ступінь тургору тканини (сильний, середній, слабкий) або його відсутність; для визначення цього показника розкласти бруски на тарілці так, щоб вони наполовину звисали з її краю.

**Завдання:** визначити величину водного потенціалу тканин бульб методом Уршпрунга, пояснивши причини зміни розмірів брусків в розчинах різної концентрації, і визначити всисну силу клітин.



## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1.4 ВОДНИЙ ОБМІН

### *Завдання 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 імобілізованої.

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 високополімерними сполуками, до слабкозв'язаної – воду дифузних шарів гідратаційних сфер, молекули яких зберегли рухливість, структурно зв'язану воду та осмотично поглинену воду клітинного соку.

Суть методу полягає в тому, що наважка досліджуваного рослинного матеріалу 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, вірніше, слабо зв'язану, легко рухому воду. В іншій паралельній наважці визначається загальна кількість води в рослинному матеріалі. По різниці 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. 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 концентрацію початкового і дослідного розчинів сахарози. Зміна концентрації розчину сахарози вказує на кількість води, витягнутої з об'єкту.

Розрахунок *вільної води* проводиться за формулою:

$$X = \frac{100 \times (A - B) \times C}{B \times D} \quad (3.6), \text{ де}$$

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

$A$  – відсоток сахару в початковому розчині;

$B$  – відсоток сахару в дослідному розчині;

$C$  – вага розчину сахарози;

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

**Загальний зміст води** визначається шляхом висушування приблизно 1 г наважки рослинного матеріалу в сушильній шафі при температурі 105<sup>0</sup>С протягом 2-3 годин до постійної ваги.

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

Таблиця 3.6.

Об'єкт	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

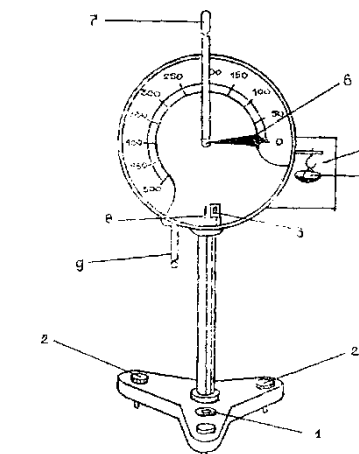
**Завдання:** заповнити таблицю 3.6., зробити висновок про співвідношення форм води в листі різних рослин.

### Завдання 2 Визначення інтенсивності транспірації за зменшенням маси зрізаного листя

**Матеріали і обладнання:** 1) кімнатні рослини (пеларгонія, примула і ін.); 2) торсіонні терези; 3) технічні терези з важками; 4) ножиці; 5) скальпель; 6) кришка чашки Петрі; 7) нитки; 8) міліметрівка; 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 **відносною транспірацією**; цей показник характеризує

1 - рівень; 2 - опорні гвинти; 3 - показчик рівноваги, 4 - кошик; 5 - гачок; 6 - стрілка-показчик маси; 7 - рукоятка; 8 - нульова межа; 9 - апетип



Торсіонні терези;

здатність рослин регулювати транспірацію і виражається у вигляді десяткового дробу. Найпростіший і достатньо точний метод обліку транспірації – метод швидкого зважування, запропонований Л. А. Івановим: пагін або окремих лист зрізають і двічі зважують з інтервалом не більше 5 хв, оскільки при більш тривалій експозиції може початися в'янення листя, що знижує транспірацію. Встановлене цим методом зменшення маси листя 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 торсійні терези (мал. 3.2). 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 через будь-який час, наприклад через 30 хвилин, зробити друге зважування. Визначити поверхню випаровування, змірявши внутрішній діаметр чашки. Результати записати в таблицю 3.8., вказавши вид дослідної рослини:

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

$$I_T = \frac{n \times 10\,000 \times 60}{s \times t} \quad (3.6.)$$

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

$s$  — площа, см<sup>2</sup>;

$t$  — експозиція, хв;

10 000 — коефіцієнт переведення см<sup>2</sup> в м<sup>2</sup>;

60 — коефіцієнт переведення хвилин в години.

Таблиця 3.8.

Об'єкт	Час зважування		Експозиція, хв	Маса, г		Випарована вода, г	Площа см <sup>2</sup>
	1-го	2-го		1-го	2-го		
Лист							
Судина з водою							

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

### ***Завдання 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 папіру 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 рослині). Хлоркобальтові папірці слід тримати за ліпку стрічку, не торкаючись до них пальцями, від яких можуть залишитися рожеві плями. Щоб усунути дію атмосферної вологи, приклейте ліпку стрічку папірцями до листка, а ліпкою стрічкою назовні. Спостерігати за зміною забарвлення хлоркобальтового паперу і записати результат.

Зробити зрізи верхнього і нижнього епідермісу дослідного листка (або іншого листка цієї ж рослини), розглянути їх в мікроскоп при великому збільшенні і замалювати.

Завдання: зробити висновки про причини різної інтенсивності транспірації верхньої і нижньої сторін листа даної рослини і про співвідношення продигової та кутикулярної транспірації.

### ***Завдання 4 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.

Продихи можна спостерігати також безпосередньо на епідермісі. Для цього знімають верхній або нижній епідерміс (в залежності від того, де більше продихів – це визначають хлоркобальтовим методом), розташовують його на предметне скельце у краплю дистильованої води та розглядають під мікроскопом на малому та великому збільшенні, визначають площину продихових щілин за допомогою окуляр-мікрометра.

#### Хід роботи

Нанести на нижню поверхню листа скляною паличкою краплю розчину лака і швидко розмазати тонким шаром. Після повного висихання зняти плівку пінцетом, розмістити на предметне скло і розглянути при великому збільшенні без покривного скла. Вставити в мікроскоп окуляр - мікрометр і виміряти ширину і довжину щілини продихів не менше ніж у десяти продихів, обчислити середні величини.

Визначити ціну ділення окуляр – мікрометра за допомогою об'єктив – мікрометра. Помноживши довжину і ширину отворів продихів, виражених в поділках окуляр - мікрометра, на ціну одного ділення, знайти абсолютні розміри щілин продихів. Обчислити площу продихової щілини, з деяким наближенням приймаючи її форму за ромб, за формулою, де  $a$  — ширина,  $b$  — довжина щілини.

Завдання: порівняти розміри отворів продихів у різних рослин.

#### ***Завдання 5 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 листової 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 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: зробити висновок, по яких елементах провідного пучка пересувається вода; замалювати основний пучок і відзначити забарвлені елементи.

## РОЗДІЛ 3. СВІТЛОВА СТАДІЯ ФОТОСИНТЕЗУ

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1.5.1 ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПІГМЕНТІВ

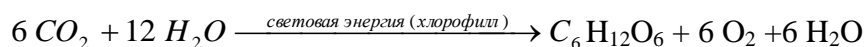
#### Пігментний апарат рослини

##### Матеріали і обладнання:

- 1) листя кімнатних рослин;
- 2) 85% етиловий спирт;
- 3)  $\text{CaSO}_3$
- 4) кварцовий пісок або товчене скло;
- 5) спиртівка;
- 6) ніж;
- 7) фарфорові ступки (2 шт.);
- 8) колби (2 шт.);
- 9) воронки (2 шт.);
- 10) скляна паличка;
- 11) паперові фільтри.
- 12) 20% розчин КОН в крапельниці;
- 13) бензин;
- 14) 10% соляна кислота в крапельниці;
- 15) оцтовокисла мідь;
- 16) пробірки (8 шт.);
- 17) NaOH або КОН кристалічний;
- 18) ступка з пестиком;
- 19) терези з важками;
- 20) хроматографічний папір (1,5 x 13 см);

#### **Завдання 1 Отримання витяжки пігментів зеленого листа**

**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  $\text{CO}_2$  і синтезу вуглеводів відбуваються в міжтілакоїдному просторі.

В мембранах тілакоїдів містяться наступні пігменти: хлорофіл *a* ( $\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{O}_5\text{N}_4\text{Mg}$ ) — зелений з синюватим відтінком; хлорофіл *b* ( $\text{C}_{55}\text{H}_{70}\text{O}_6\text{N}_4\text{Mg}$ ) — зелений з жовтим відтінком; каротин ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ ) — жовто-помаранчевий; - ксантофіл ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$ ) — золотисто-жовтий. Всі ці пігменти

не розчинні у воді, але розчиняються в органічних розчинниках (спирті, ацетоні і ін.).

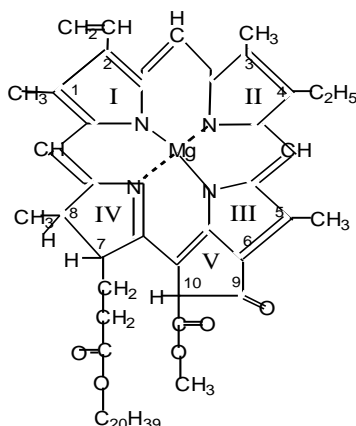


Рисунок 4.1. Структура хлорофілу *a*

За хімічною природою хлорофіл (рис.4.1) є складним ефіром дікарбонової кислоти хлорофіліну і двох спиртів — метанолу  $\text{CH}_3\text{OH}$  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 добуття 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  $\text{C}_3\text{H}_8$ ).

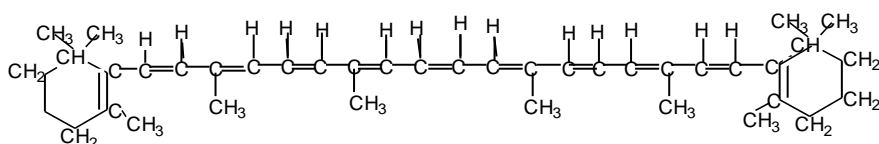


Рисунок 4.2  
Структура  $\beta$ -каротину

Каротини (в основному  $\beta$ -каротин) — ненасичені вуглеводні, що містять два симетрично розташованих ієнонових кільця, сполучених довгим вуглецевим ланцюгом (рис.4.2). Серед ксантофілів, що є кисневмісними

похідними каротину, переважає лютеїн, який має в кожному іононовому кільці спиртову групу.

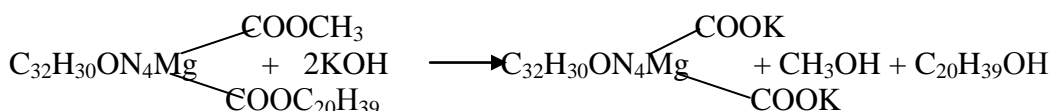
#### Хід роботи

Свіже або сушене листя (0,5-2 г) подрібнити ножицями, відкинувши крупні жилки і черешки, помістити в ступку, додати на кінчику ножа  $\text{CaCO}_3$  (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 в ступку ще трохи спирту, розтерти і злити на той же фільтр. Повторити цю операцію кілька разів до повного добуття пігментів (всього витратити 10 мл спирту).

### **Завдання 2 Хімічні властивості пігментів**

#### **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 хлорофілінів мають зелене забарвлення, але відрізняються від хлорофілу нерозчинністю в бензині.

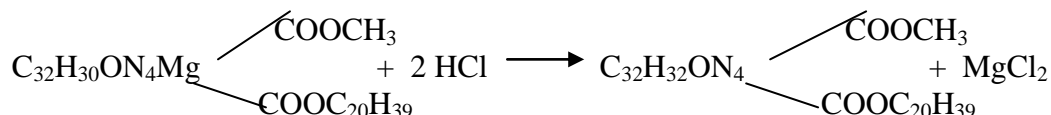
#### Хід роботи

До 2—3 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. Записати реакцію омилення хлорофілу.

#### **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:





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

#### Хід роботи

Налити в дві пробірки по 3—4 мл спиртової витяжки пігментів зеленого листа і додати в них по 2—3 краплі 10% соляної кислоти. Відзначити забарвлення отриманого продукту реакції.

В одну з пробірок з феофітином внести декілька кристалів оцтовокислої міді і довести розчин до кипіння (нагрівати слід обережно, не допускаючи викидання рідини з пробірки). Якщо забарвлення не зміниться, додати ще оцтовокислій 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 реакції.

### ***Завдання 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.

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.

### **3.1 Метод Крауса**

Заснований цей метод 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.

#### Хід роботи

В пробірку з 3-5 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—4 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 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 індивідуальних пігментів.

### **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

#### **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.

Відстань, пройдена нанесеним на папір пігментом у напрямі руху розчинника, характеризується величиною *R<sub>f</sub>*, яка є відношенням відстані, пройденої розчинним 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 смузі, внаслідок чого відбувається розділення суміші.

#### Хід роботи

Смужку хроматографічного паперу шириною 2 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 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 5-6 разів, щоб сконцентрувати пігмент і не допустити утворення великої плями.

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 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 зошит. Плями пігментів обвести відповідним за кольором олівцем (пігменти нестійкі, швидко руйнуються і втрачають колір). Відзначити у висновку переваги методу розділення пігментів за допомогою паперової хроматографії.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1.5.2 ФІЗИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПІГМЕНТІВ

### 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.

### ***Завдання 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 виборчим.

В цьому можна переконатися, пропускаючи біле світло через розчин хлорофілу, а потім розкладаючи його за допомогою призми. Окремі ділянки спектру виявляться 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 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, каротину, і спиртовий розчин ксантофілу, отриманий при розділенні пігментів за Краусом.

Таблиця 4.1.

Розчин	Колір						
	ф	с	г	з	ж	п	ч
Хлорофілу:							
Каротину							
Ксантофілу							

Завдання: замалювати спектри за формою, наведеною в таблиці 4.1, причому ділянки, які поглинаються, закрасити чорним, а видимі ділянки — кольоровими олівцями:

### Завдання 2 Флуоресценція хлорофілу

**Флуоресценція** є свіченням активності речовин при поглинанні ними світла. Флуоресценція хлорофілу, не будучи 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  $\pi$ -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 витрачатися 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.4.4.).

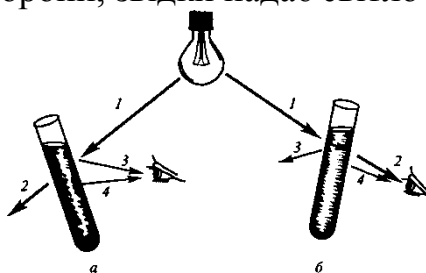


Рисунок. 4.4. Спиртна витяжка хлорофілу у відбитому (а) і прямому промінні (б):

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.

## РОЗДІЛ 4. ТЕМНОВА СТАДІЯ ФОТОСИНТЕЗУ

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1.6.1 ХЛОРОФІЛ

#### *Фотосенсибілізуєча активність хлорофілу*

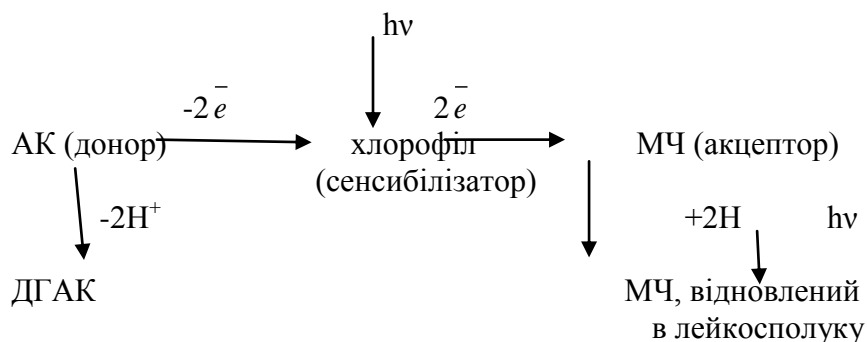
Матеріали і обладнання: 1) лампа 100 W; 2) штатив; 3) пробірки; 5) ступка; 6) товкач; 7) чорний папір; 8) етанол; 9) кристалічна аскорбінова кислота (АК); 10) насичений спиртовий розчин метилового червоного (МЧ) на 70 % спирті; 11) зелене листя рослин.

В 1948 р. академік А. А. Красновський простим дослідом довів, що хлорофіл у фотосинтезі є учасником і ініціатором окислювально-відновних реакцій. Показати цю здатність хлорофілу можна в модельному досліді за допомогою двох сполук — аскорбінової кислоти (АК) і метилового червоного (МЧ), які мають окислювально-відновні властивості. АК здатна до необоротної окислювально-відновної реакції з утворенням дегідроаскорбінової кислоти (ДГАК), що супроводжується перенесенням електрону до акцептора:



В цьому полягає найважливіша функція АК в клітинах живих організмів, де вона виступає як джерело енергії, віддаючи електрони і протони в дихальний електрон-транспортний ланцюг. Окислювально-відновний потенціал ( $E_0$ ) АК рівний 0,1 еВ (при рН 5,75). АК є відновником, а в даній реакції — донором електронів.

МЧ також має окислювально-відновні властивості, і його  $E_0$  складає 0,8 еВ. Будучи окислювачем, МЧ через велику різницю потенціалів ( $\Delta E_0 = 0,7$  еВ) не може окислити АК спонтанно. Проте здійснити відновлення МЧ можна за допомогою фотосенсибілізатора, тобто речовини, що використовує енергію світла і стимулює хімічну реакцію, але не бере участь в ній. Таким чином моделюється принцип ланцюга окислювально-відновних реакцій, що відбуваються при фотосинтезі після поглинання світла молекулами хлорофілу. Транспорт  $\bar{e}$  в окислювально-відновній реакції з участю фотосенсибілізатора (збудженого хлорофілу) можна представити у вигляді схеми:



В тілакоїдній мембрані хлоропласту завдяки високоенергетичному електрону ( $\bar{e}$ ) хлорофіл має властивості сильного відновника і може відновлювати редокс-системи з великим негативним потенціалом. Електрон, що віддається при цьому, залишається високоенергетичним і може свою енергію витратити на подальші окислювально-відновні реакції, направлені на перенесення протонів із зовнішньої сторони мембрани тілакоїда на внутрішню для подальшого синтезу АТФ.

#### Хід роботи

Листя (0,5 г) подрібнюють в ступці з додаванням 5-6 мл етанолу. Осад пропускають через воронку з паперовим фільтром, екстракт хлорофілу (ХЛ) розливають порівну в три пробірки. Дослід закладають в чотирьох варіантах (таблиця 4.3.).

Таблиця 4.3. Виявлення фотохімічної активності хлорофілу

Варіант	Компоненти середовища і освітленість	Первинне забарвлення	Зміна забарвлення	Причини зміни забарвлення або їх відсутність
I	ХЛ + МЧ + АК + світло			
II	ХЛ + МЧ + АК + темрява			
III	ХЛ + МЧ + світло			
IV	МЧ + АК + світло			

В четверту пробірку наливають стільки ж етанолу. Потім у всі чотири пробірки по краплях додають спиртовий розчин метилового червоного, поки зелене забарвлення не набуває бурого кольору у перших трьох варіантах досліду і червоний в IV варіанті. Багато додавати метилового червоного не слід.

В пробірки I, II і IV варіантів додають по 30 мг (на кінчику скальпеля) кристалічної аскорбінової кислоти і струшують. В II варіанті пробірку закривають чорним папером. Штатив з пробірками ставлять безпосередньо перед яскравою лампою, помістивши між ними судину з водою з плоскопаралельними стінками, щоб запобігти нагріванню розчинів.

Через 10—20 хв від початку експозиції в одній пробірці відбуваються зміни, і розчин знову набуває зеленого забарвлення, оскільки метиловий червоний відновлюється в лейкосполуку, і лише хлорофіл забезпечує зелене забарвлення розчину.

В решті варіантів досліду червоне і червоно-буре забарвлення не змінюються.

Завдання: замалювати пробірки в кінці досліду, після зміни забарвлення в одному з варіантів. Зробити висновки щодо фотосенсибілізуючої активності хлорофілу, ролі АК, МЧ і світла.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1.6.2 ІНТЕНСИВНІСТЬ ФОТОСИНТЕЗУ

### *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-холодильник; 4) піпетка; 5) пробкове свердло; 6) терези; 7) лампа для освітлення; 8) рослини герані, примули; 9)  $K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$ . Для виготовлення цього реактиву 19,614 г  $K_2Cr_2O_7$  розчиняють в дистильованій воді і доводять до 0,4 л. Переливають розчин в колбу на 1 л і тоненькою цівкою підливають до нього концентровану сірчану кислоту; 10) сіль Морю 0,2 н  $((NH_4)SO_2 \cdot FeSO_4 \cdot 6H_2O)$ . Відбирають тільки блакитно-зелені кристали, які не мають бурого нальоту. Зважують 80 г. Розчиняють в дистильованій воді, яка містить 20 мл концентрованої сірчаної кислоти на 1 л. Кислоту додають для того, щоб запобігти окисленню двовалентного заліза в тривалентне і утворенню при гідролізі основних солей заліза, які викликають помутніння розчину. Доводять дистильованою водою до 1 л. Нормальність солі Морю встановлюють за 0,1 н розчином біхромату калію. Для цього набирають піпеткою 15 мл 0,1 н розчину  $K_2Cr_2O_7$ , переносять в колбу для титрування, додають 5 мл концентрованої сірчаної кислоти, 3-5 мл фенолантранілової кислоти і титрують розчином солі Морю до переходу забарвлення з вишнево-фіолетового в зелене.

$$K = \frac{2,5 \times 0,1}{a} \quad (4.6.), \text{ де}$$

$K$  - нормальність розчину солі Морю;

$a$  - об'єм розчину солі Морю, витрачений при титруванні  $K_2Cr_2O_7$ . 11) фенолантранілова кислота. Розчинити 0,2 г кислоти в 100 мл 0,2% розчину соди (безводної). Для кращого змочування порошку наважку заздалегідь замісити в декількох мл 0,2% розчину соди у фарфоровій чашці скляною паличкою до сметаноподібного стану. Після цього додають залишок соди і ретельно перемішують.

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  $CO_2$ .



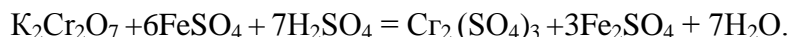
За кількістю використаного  $K_2Cr_2O_7$  розраховують кількість окисленого вуглецю.

Надлишкову кількість біхромату калію, яка була використана на



окислення органічних речовин, визначають титруванням 0,2 н розчином солі Мору  $(\text{NH}_4)\text{SO}_2 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

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 відрізними листям або ж з листям, яке не відокремлене від рослини.

Зробити висічки з однієї половини листа. Через 2 години знову визначити вміст вуглецю, зробивши висічки з другої половини листа. Визначення вуглецю проводиться таким чином: висічки помістити в конічні колби. При роботі з листям герані, примули беруть 6-8 см<sup>2</sup> листовій поверхні, дуба - близько 2 см<sup>2</sup>.

В колби з бюреток наливають 10 мл 0,4 н хромової суміші, яку випускають з бюретки поволі і з однаковою швидкістю. Для рівномірного кипіння опустити в рідину декілька скляних капілярів. Колби закривають маленькими скляними воронками або холодильниками і ставлять на азбестову сітку на заздалегідь розігріту електричну плитку. Можна користуватися і піщаною лазнею. 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 (або холодильник) мінімальною кількістю води, додають 3-5 крапель 0,2% розчину фенілантранілової кислоти і титрують сіллю Мора до переходу забарвлення з фіолетового в зелене.

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

Різниця в кількості солі Мору, яка пішла на титрування контрольної і дослідної 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 дослідів визначають титр солі Мору і враховують поправку до титру.

Вміст вуглецю в мг на 1 дм<sup>2</sup> листової поверхні розраховують за формулою:

$$X = \frac{(A - B) \times K \times 0,6 \times 100}{C} \quad (4.7.), \text{ де}$$

$X$  - вміст вуглецю;

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

$B$  - кількість (мл) солі Мору, яка пішла на титрування залишку хромової суміші після спалювання органічної речовини;

$K$  - поправка до титру солі Мору;

$C$  - площа листа в см<sup>2</sup>.

За різницею вмісту вуглецю в 1 дм<sup>2</sup> 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<sup>2</sup> за годину.

#### Колориметричне визначення

Зміни вмісту вуглецю при фотосинтезі можна визначити колориметрично. Для цього розчин після охолодження переносять кількісно в мірну колбу на 25 мл. Доводять об'єм до мітки дистильованою водою і перемішують. Оптичну густину визначають в кюветі 3 см на ФЕКі з жовтим світлофільтром. Показники ФЕКу переводять у величини концентрації глюкози за допомогою калібрувального графіка.

Таблиця 4.4.

Об'єкт	Час визначення	Взято K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> , мл		Пішло солі Мору, мл		Площа висічок, см <sup>2</sup>	Кількість вуглецю мг/дм <sup>2</sup>	Інтенсивність фотосинтезу, мг дм <sup>2</sup> /годину
		Контроль (а)	Дослід (в)	Контроль (а)	Дослід (в)			
	Початок дослідів							
	Через годину (світло)							
	Через годину (темрява)							

#### Побудова калібрувального графіка

В 10 мірних пробірок наливають відповідно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 до 1,0 мл стандартного розчину глюкози і доливають до 10 мл 0,4 н розчином хромової суміші. В одинадцяті колбу - тільки 10 мл хромової суміші. Вміст прокип'ятити протягом 5 хв. Після охолодження розчин переносять в мірні колби на 25 мл і доводять до мітки дистильованою водою. Вміст перемішують і виміряють оптичну густину. На осі абсцис відкладають концентрацію глюкози (мг/мл), на осі ординат - відповідні їм значення

оптичної густини. Будують калібрувальний графік. Знаючи співвідношення атомної (або молекулярної) маси, перераховують органічну речовину на вуглець ( $M_c$ ) або  $CO_2$  ( $M_{co}$ ):  $M_c - 0,4$  гл або  $M_{co} - 1,47$  гл.

$M_{гл}$  - кількість глюкози, відповідна вмісту органічної речовини і рослинному матеріалі, мг.

Завдання: записати отримані дані в таблицю 4.4.; розрахувати інтенсивність фотосинтезу; зробити висновок про вплив інтенсивності освітлення на інтенсивність фотосинтезу.

## РОЗДІЛ 5. ДИХАННЯ РОСЛИН.

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1.7.1 ФЕРМЕНТИ ДИХАННЯ

#### *Завдання 1. Вивчення ферментних систем дихання*

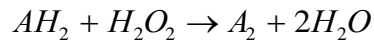
Процеси дихання в клітинах забезпечуються активністю що беруть участь в них ферментів – оксидоредуктаз. Ці ферменти каталізують реакції перенесення електронів від субстрату, який окислюється, – донора електронів до акцептора електронів. В багатьох реакціях електрон переноситься разом з протоном, тобто шляхом перенесення атомів водню від донора до акцептора. Оксидоредуктази, що каталізують перенесення водню, називають **дегідрогеназами**. Акцептором електронів може служити кисень або різні сполуки, так звані проміжні акцептори. Оксидоредуктази, які каталізують перенесення електронів на молекулярний кисень або на кисень пероксиду водню і органічних перекисів, називають **оксидазами**. В дихальному ланцюзі мітохондрій кінцевої (термінальної) оксидазою є цитохромоксидаза. Багато інших оксидаз каталізують реакції окислення, не пов'язані з дихальним ланцюгом мітохондрій. Вони завершують чисельні окислювальні процеси, які часто відбуваються зовні мітохондрій. Такі оксидази, як каталаза і пероксидаза, виконують функцію захисту клітини від сильних окислювачів — пероксидів водню, виникаючих в процесі метаболізму. Серед мітохондріальних оксидаз, не пов'язаних з електронтранспортним ланцюгом мітохондрій, виділяють групу цианідстійких оксидаз, що отримали назву альтернативних **оксидаз**.

Тканини рослини, відмінні інтенсивним метаболізмом, характеризуються інтенсивним диханням і високою активністю оксидоредуктаз. Активність цих ферментів розрізняється в тканинах, що виконують в рослині різні функції.

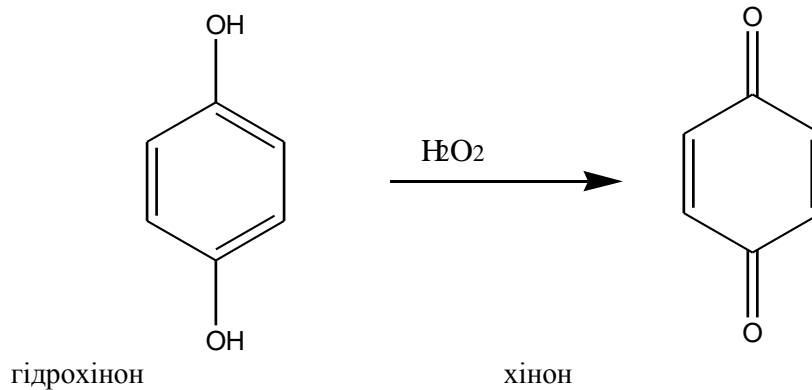
**Дегідрогенази** — ферменти, що каталізують дегідрирування дихального субстрату. Дихальний субстрат є донором водню. Активованій дегідрогеназами водень дихального субстрату передається ними на інший фермент — переносник водню. Цей фермент передає водень далі наступному ферменту — акцептору водню і так далі по дихальному ланцюгу.

**Оксидази.** Пероксидаза – захисний фермент рослин. Пероксидаза відіграє важливу роль в окислювально-відновних процесах в рослинному організмі. Цей фермент складається з активної групи і білка. Активна група представлена гемовою групою, яке складається з чотирьох пірольних кілець і атома заліза в центрі. Цей фермент разом з пероксидом водню утворює комплексну сполуку, внаслідок чого пероксид водню активується і набуває здатності діяти як акцептор водню.

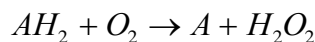
Пероксидаза каталізує наступну типову реакцію:



Пероксидаза каталізує окислення поліфенолів і деяких ароматичних амінів за допомогою кисню, перекису водню або органічних перекисів. Наприклад, при дії пероксидази на гідрохінон утворюється хінон:



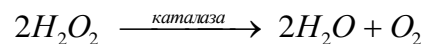
Пероксидаза каталізує також ряд реакцій прямого окислення:



У присутності  $Mn^{2+}$  і відповідного одноатомного фенолу (наприклад, резорцину) пероксидаза каталізуватиме окислення широкого ряду продуктів обміну речовин, наприклад, триптофану, щавелевооцтової кислоти та індолілоцтової кислоти.

Пероксидаза – термостабільний фермент, проте до надлишку перексиду водню вона чутлива. Оптимум рН для цього ферменту лежить в нейтральному або слаболужному середовищі.

**Каталаза** – захисний фермент рослин. В процесі дихання як побічний продукт окислення речовин утворюється перекис водню і органічні перекиси, які у великих концентраціях токсично діють на цитоплазму. Знешкодження перекисів здійснюється за участю ферменту каталази, яка розкладає їх на молекулярний кисень і воду:



Про активність каталази судять за об'ємом кисню, який виділився в результаті розкладання перекису водню.

Цей фермент має таку ж будову апоферменту як і пероксидаза.

## ***Завдання 2 Визначення активності каталази за допомогою каталазника***

Принцип методу полягає в тому, що при роботі каталази перексид водню розкладається з виділенням молекулярного кисню, об'єм якого визначається за допомогою каталазника.

Матеріали і обладнання: 1) проростки або листя рослин; 2) терези з наважками; 3) мірні циліндри на 25 мл; 4) бюретки; 5) піпетки на 5 мл; 6) фарфорові ступки; 7) пісок; 8) 3% розчин пероксиду водню; 9) каталазник; 10) пісочний годинник на 3 хвилини; 11) крейда.

#### Хід роботи

0,5 г листя або 2 г проростків (у останньому випадку крейду не додають) розтирають в ступці з додаванням піску і 0,5 г крейди для створення лужної реакції в розчині. Під час розтирання поступово вливають в ступку невеликими порціями 15 мл дистильованої води. Суміш вносять в одне коліно каталазника, а в інше – 5 мл 3 % розчину пероксиду водню. Закривають каталазник каучуковою пробкою з трубкою, не допускаючи змішування рідин.

Відкривають затиск і переміщенням воронки встановлюють рівень води в бюретці на нулі. Закривають затиск і швидким рухом каталазника змішують гомогенат і перекис водню, одночасно включаючи годинник. Каталазник періодично струшують і через 3 хвилини визначають кількість кисню, який виділився, за зниженням рівня води в бюретці.

Активність ферменту виражається в мл  $O_2$  за 1 годину у розрахунку на 1 г сирої ваги рослинного матеріалу. Результати досліду заносять в таблицю 1.3:

Таблиця 1.3

№ п/п	Вид рослини	Наважка,г	Виділилося кисню за 3 хв., мл	Активність каталази, мл / г година

Завдання: заповнити таблицю 1.3, розрахувати активність каталази за допомогою каталазника і порівняти дані по активності каталази, отримані титриметричним методом. Зробити висновок про зміну активності каталази у тих самих об'єктів, але вирощених за різних умов.

# ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1.7.2 ІНТЕНСИВНІСТЬ ДИХАННЯ

## *Визначення інтенсивності дихання*

Матеріали і обладнання: 1) проросле і непроросле насіння; 2) 0,1 н розчин  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ; 3) 0,025 н розчин соляної кислоти; 4) 1% 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 (рис.1.). Діоксид вуглецю, що виділяється в процесі дихання, реагує з лугом, внаслідок чого концентрація розчину зменшується:

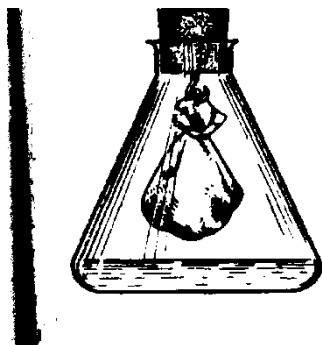
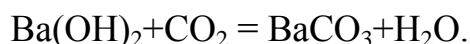
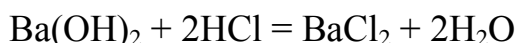


Рисунок. 1.1 Колба для визначення інтенсивності дихання

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  $\text{CO}_2$ , 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  $\text{CO}_2$ .

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  $\text{CO}_2$ . Бажано тому підібрати таку експозицію, щоб на зв'язування  $\text{CO}_2$  було витрачене 20 - 50% лугу (якщо, наприклад, на титрування бариту в контрольній колбі пішло 10 мл  $\text{HCl}$ , то на титрування розчину в дослідній колбі повинне піти не більше 8 і не менше 5 мл).

### Хід роботи

Помістити наважку дослідного матеріалу (5—10 г) в марлевий мішечок і прикріпити його до пробки гачком, вставленим в пробку.

Провести пробну збірку установки, перевіривши, чи вільно проходить мішечок з матеріалом через горло колби і чи не опускається він дуже низько. Внести в колбу 2—3 краплі фенолфталеїну і налити 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, 2—3 краплі фенолфталеїну 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  $\text{BaCO}_3$ , перешкоджаючи повноті поглинання  $\text{CO}_2$ , при цьому не допускати попадання жодної краплі розчину на мішечок з матеріалом.

Необхідно стежити за тим, щоб забарвлення розчину залишалось яскраво-рожевим. Якщо ж розчин обезбарвлюється, то це показує, що весь  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  витрачений на зв'язування  $\text{CO}_2$ . В цьому випадку потрібно негайно підлити з бюретки 5 мл розчину  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  і стільки ж — в контрольну колбу. Для отримання більш точних результатів слід повторити дослід, скоротивши експозицію.

Через 1—2 години вийняти матеріал, швидко закрити колбу пробкою і відмітити час закінчення досліду. Відтитрувати луг, що залишився, підливаючи через отвір в пробці 0,025 н розчин соляної кислоти до зникнення рожевого відтінку. Щоб уникнути зменшення концентрації розчину бариту через поглинання  $\text{CO}_2$  повітря, слід провести титрування, закривши колбу гумовою пробкою з двома отворами, одне з яких закрито трубкою з натронним вапном. Інше — щільно вставленим кінцем бюретки.

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

Результат записати в таблицю 1.4:



Таблиця 1.4

Об'єкт	Наважка, г	Об'єм Ва(ОН)2, мл	Час			Витрата соляної кислоти		Інтенсивність дихання, мг/г год
			Початок	Кінець	Експозиція	Контроль	Дослід	

Інтенсивність дихання обчислюють за формулою:

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

$a$  — результат титрування вмісту контрольної колби;

$b$  — результат титрування вмісту дослідної колби;

$0,55$  — кількість мг  $\text{CO}_2$ , еквівалентна 1 мл  $0,025$  н.  $\text{HCl}$ ;

$p$  — наважка, г;

$t$  — експозиція, год.

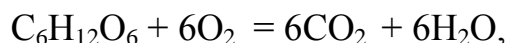
Завдання: зробити висновок, зіставив інтенсивність дихання різних об'єктів.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1.7.3 ДИХАЛЬНИЙ КОЕФІЦІЄНТ

### *Визначення дихального коефіцієнта*

**Дихальним коефіцієнтом (ДК)** називається відношення об'єму виділеного при диханні  $\text{CO}_2$  до об'єму поглиненого  $\text{O}_2$ . Величина цього відношення характеризує хімізм дихання і може змінюватися залежно від того, які органічні сполуки використовуються на дихання.

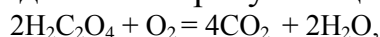
Якщо дихальним субстратом служать вуглеводи, реакція йде за рівнянням:



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

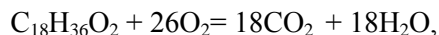
Якщо дихальним субстратом служать органічні кислоти, що містять більше кисню на 1 атом вуглецю, ніж вуглеводи, то дихальний коефіцієнт буде більше 1.

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 окисленні 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, тканини в глибині масивних органів) посилюється анаеробне дихання. При цьому окислення субстрату і виділення  $\text{CO}_2$  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) скляні 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. 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 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  $\text{CO}_2$  за даний проміжок часу. Другий відлік (В), у варіанті з лугом виражає собою об'єм тільки поглиненого кисню, оскільки виділений  $\text{CO}_2$  поглинається лугом.

Об'єм  $\text{CO}_2$  знаходять за різницею:

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

Звідси ДК:

$$\text{ДК} = \frac{B - A}{B}$$

Якщо 10 малих поділок на капілярній трубці дорівнює 1 мл газу, то за даними досліду можна обчислювати і інтенсивність дихання пророслого насіння в мл  $\text{O}_2$  або  $\text{CO}_2$  на 1 г насіння за 1 годину. В цьому випадку для розрахунку використовують формулу:

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

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

$I_d$  - інтенсивність дихання;

$M$  - вага насіння в досліді, г;

$n$  - інтервал часу вимірювання, хвилин

**Завдання:** замалювати систему для вимірювання інтенсивності дихання і ДК, розрахувати дихальний коефіцієнт і інтенсивність дихання за  $\text{O}_2$  і  $\text{CO}_2$ .

## АТЕСТАЦІЯ 2. МІНЕРАЛЬНЕ ЖИВЛЕННЯ. ФІЗІОЛОГІЯ РОСТУ ТА РОЗВИТКУ РОСЛИН. РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН. СТІЙКІСТЬ.

### РОЗДІЛ 6. МІКРО- ТА МАКРОЕЛЕМЕНТИ.

#### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2.1.1 ПІДГОТОВКА ДО ГІДРОПОНІКИ

##### Вирощування рослин у водній культурі на повній поживній суміші і з виключенням елементів

Забезпечення рослин необхідними елементами мінерального живлення є обов'язковою умовою її нормальної життєдіяльності. Воно багато в чому визначає спрямованість біохімічних перетворень, росту, розвитку, продуктивність рослин і якість урожаю.

Для вирішення найрізноманітніших питань фізіології рослинного організму широко застосовується **вегетаційний метод**, тобто вирощування рослин в штучних, строго контрольованих умовах навколишнього середовища.

Залежно від того, на якому субстраті (вода, пісок, ґрунт) вирощуються рослини, існує декілька основних модифікацій вегетаційного методу: **водні, піщані і ґрунтові культури**.

Доцільність тієї або іншої модифікації витікає із задач експерименту.

При рішенні чисто фізіологічних задач частіше за все використовуються водні культури, що дозволяють більш строго контролювати склад поживного середовища.

При розробці питань взаємодії рослин, ґрунту і внесення добрив, застосовуються ґрунтові культури, які ближче за все стоять до польового методу.

Особливістю методу водних культур є те, що всі необхідні елементи мінерального живлення даються у вигляді солей, добре розчинних у воді. Склад живильної суміші може бути змінений в будь-який період експерименту згідно схемі досвіду.

Існує безліч прописів живильних розчинів для вирощування різних рослин на водній культурі. В даній лабораторній роботі пропонується використовувати наступні: Розчин Кнопа, розчин Гельрігеля і розчин Хогглєнда.

Матеріали і обладнання: 1) насіння різних культурних рослин; 2) реактиви:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 3) мензурка на 100 мл; 4) мірна колба для розчинів на 1 літр (3 шт.); 5) маленькі екскатори для виготовлення вологої камери (для пророщування насіння); 6) чашки Петрі; 7) скальпель; 7) ножиці; 8) пінцети; 9) лінійка; 10)

білий папір; 11) чорні поліетиленові пакети; 12) марля; 13) нитки; 14) фільтрувальний папір; 15) судини для водних культур (банки ємністю 250 мл); 16) парафін; 16) піпетки на 10 і 20 мл; 17) гумові груші; 18) скляні палички.

### Хід роботи

#### ***Підготовча робота***

##### *1. Приготування розчинів для поживних сумішей*

Рецептів поживних сумішей дуже багато. В даній роботі ми пропонуємо використовувати три живильні суміші: розчин Кнопа (табл. 2.6), розчин Гельрігеля (табл. 2.7) і розчин Хогглєнда (табл. 2.8). Дослідження проводять на повних сумішах і з виключенням з їх складу елементів: калію, азоту і фосфору.

Таблиця 2.6 Склад поживного розчину Кнопа

№ п/п	Найменування солі	Формула солі	% солі в розчині
1.	Азотнокислий кальцій	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,1
2.	Калій фосфорнокислий, однозаміщений	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,025
3.	Сірчанокислий магній	$\text{MgSO}_4$	0,0125
4.	Нітрат калію	$\text{KNO}_3$	0,025
5.	Хлорне залізо	$\text{FeCl}_3$	0,00125

Таблиця 2.7 Склад поживного розчину Гельрігеля

№ п/п	Найменування солі	Формула солі	% солі в розчині
1.	Азотнокислий кальцій	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,0492
2.	Калій фосфорнокислий, однозаміщений	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,0136
3.	Сірчанокислий магній	$\text{MgSO}_4$	0,0060
4.	Хлорид калія	$\text{KCl}$	0,0075
5.	Хлорне залізо	$\text{FeCl}_3$	0,00125

Таблиця 2.8 Склад поживного розчину Хогглєнда

№ п/п	Найменування солі	Формула солі	% солі в розчині
1.	Азотнокислий кальцій	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,0821
2.	Калій фосфорнокислий, однозаміщений	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,0136
3.	Сірчанокислий магній	$\text{MgSO}_4$	0,0120
4.	Нітрат калію	$\text{KNO}_3$	0,05
5.	Хлорне залізо	$\text{FeCl}_3$	0,00125

При виключенні одного з елементів прагнуть замінити його еквівалентною кількістю іншого для збереження осмотичних властивостей. При цьому стежать, щоб другий компонент солі, що виключається, входив в нову в такій же кількості, і ефект дії був би тільки від виключення одного елемента.

Наведемо приклад розрахунку солей для приготування поживного розчину Кнопа.

**Повний розчин:** пропис приготування цього розчину приведений в таблиці 2.6.

Розчин з виключенням азоту: солі із змістом азоту замінюють на інші, які не містять азоту, зберігаючи при цьому еквівалентні частини решти елементів в цих солях.

В розчині Кнопа такими солями є  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  і  $\text{KNO}_3$ , в яких азот замінюють на сірку і хлор відповідно, при цьому зберігаючи еквівалентну кількість кальцію, кисню і калію.

Розрахунок заміни проводять таким чином: зіставляють молекулярні маси  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  і  $\text{Ca}$ , а також масу  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  в повному розчині Кнопа через пропорцію:

$$\frac{164 - 40}{1} = x \quad x = 40/164 = 0,244.$$

Звідси, ми можемо розрахувати кількість  $\text{CaSO}_4$ , необхідне для заміни 1 г  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Розрахунок проводять також через пропорцію

$$\frac{136 - 40}{x - 0,244} \quad x = \frac{136 \times 0,244}{40} = 0,829 \text{ р.}$$

Таким же чином розраховуємо заміну  $\text{KNO}_3$  на  $\text{KCl}$ : одержуємо, що на 1 літр розчину Кнопа нам потрібно взяти 0,167 г  $\text{KCl}$ .

Таким чином, розчин Кнопа з виключенням азоту ми готуємо, як описано в табл. 2.9:

Таблиця 2.9 Склад поживного розчину Кнопа з виключенням азоту

№ п/п	Найменування солі	Формула солі	% солі в розчині
1.	Сірчаноокислий кальцій	$\text{CaSO}_4$	0,0829
2.	Калій фосфорнокислий, однозаміщений	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,025
3.	Сірчаноокислий магній	$\text{MgSO}_4$	0,0125
4.	Хлорид калію	$\text{KCl}$	0,0167
5.	Хлорне залізо	$\text{FeCl}_3$	0,00125

**Розчин з виключенням фосфору:** для приготування цього поживного розчину  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  замінюють на  $\text{KCl}$ , зберігаючи при цьому еквівалентну кількість калію. Розрахунок кількості замінюваного елемента проводять як при приготуванні розчину з виключенням азоту.

За даними табл. 2.10 готують поживний розчин Кнопа з виключенням фосфору:

Таблиця 2.10 Склад поживного розчину Кнопа з виключенням фосфору

№ п/п	Найменування солі	Формула солі	% солі в розчині
1.	Азотнокислий кальцій	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,1

2.	Хлорид калія	KCl	0,0262
3.	Сірчаноокислий магній	MgSO <sub>4</sub>	0,0125
4.	Нітрат калія	KNO <sub>3</sub>	0,025
5.	Хлорне залізо	FeCl <sub>3</sub>	0,00125

**Розчин з виключенням калія:** для приготування цього поживного розчину КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> замінюють на NaH<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, а КНО<sub>3</sub> замінюють на NaNO<sub>3</sub>, зберігаючи при цьому еквівалентну кількість фосфору і азоту.

За табл. 2.11 готують поживний розчин Кнопа з виключенням фосфору:

При проведенні вегетаційного досліді поживні солі зручно вносити не за вагою, а у вигляді розчинів певної концентрації. Звичайно готують концентровані розчини солей з таким розрахунком, щоб в 5 або 10 мл розчину знаходилась кількість солі, необхідна для 1 л поживної суміші.

Таблиця 2.11 Склад поживного розчину Кнопа з виключенням калію

№ п/п	Найменування солі	Формула солі	% солі в розчині
1.	Азотноокислий кальцій	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,1
2.	Натрій фосфорноокислий, однозаміщений	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,022
3.	Сірчаноокислий магній	MgSO <sub>4</sub>	0,0125
4.	Нітрат натрію	NaNO <sub>3</sub>	0,0184
5.	Хлорне залізо	FeCl <sub>3</sub>	0,00125

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2.1.2 ЗАКЛАДКА ДОСЛІДУ

### *Закладка досліду вирощування рослин у водній культурі на повній поживній суміші і з виключенням елементів*

Провести монтування і заповнення судин, вирощування розсади, розрахунки і приготування розчинів для живильних сумішей.

#### *1 Монтування судин*

Для водних культур використовуються скляні банки місткістю до 3 літрів (в нашому випадку ми використовуємо банки на 250 мл). Горло банки закривається подвійним шаром марлі, яка сильно натягається і парафінується для додання їй твердості і запобігання розвитку цвілевих грибків і бактерій. Потім скляною трубкою або іншим гострим предметом робляться дрібні отвори по колу для рослин і одне велике для скляної трубки, через яку продувається повітря в розчин. Парафінування проводиться таким чином: парафін плавиться на водяній лазні, в нього занурюються банки з натягнутою марлею шийкою вниз на 1-2 хвилини. Після охолодження зайвий парафін з боків знімається, запарафінована марля акуратно відділяється від стінки банки.

Судини покриваються зверху матерчатими або паперовими чохлами, які оберігають кореневу систему від світла і перегріву. Для чохла відрізують дві однакові смужки з чорного і білого матеріалу або паперу розміром 12 × 20 см. Смужки склеюють у вигляді циліндра. Судина повинна вільно входити у футляр-чохол, щоб під час вирощування рослин можна було їх знімати і спостерігати за коренями рослини.

#### *2. Підготовка насіння і його пророщування*

Для досліду використовується чистосортне насіння з доброю схожістю, відбираючи однакові за розмірами і зовнішнім виглядом в кількості в 5-6 разів більше, ніж потрібен для досліду. Відібране насіння насипається тонким шаром в кристалізатор, заливаються водопровідною водою шаром 1-2 см. Після 4-12-годинного набухання насіння розкладається в чашки Петрі на вологому фільтрувальному папері. Чашку Петрі поміщають в імпровізовану вологу камеру, яка складається з ексікатора з притертою кришкою і чашки Петрі з насінням. На дно кристалізатора наливають дистильовану воду, щоб її рівень майже доходив до керамічної решітки. На останню ставлять чашку Петрі з насінням, яке знаходиться на фільтрувальному папері. Крім того, смужки фільтрувального паперу висовуються з чашки і опускаються в дистильовану воду, яка знаходиться на дні ексікатора (для того, щоб фільтрувальний папір в чашці Петрі не пересихав і не перезволожувався).

Коли у більшості насіння корені виростуть на 1,5-2 см, однакові проростки висаджують в отвори кришок судин. В судини за добу до висадження рослин наливають водопровідну воду, яка є фізіологічно урівноваженим розчином з невеликим вмістом солей.



Відразу висаджувати проростки на живильні суміші не рекомендується, оскільки молода коренева система дуже чутлива до підвищеної концентрації солей і може ушкодитися. Через 5-7 днів воду замінюють поживними розчинами по схемі досліду. Одночасно проводять вибраковування частини рослин, залишаючи в кожній судині однакове число близьких за зовнішнім виглядом проростків.

### ***Завдання 1 Закладка досліду***

Наливають в приготовані судини приготовані поживні розчини, аерують ці розчини грушею або компресором для насичення киснем, потім закривають парафіновими кришками з висадженими на них проростками. Щоб уникнути сольового отруєння, яке може спостерігатися в перші фази життя, рекомендується дослід з водною культурою проводити на розбавлених в 2 або 4 рази поживних розчинах.

Дуже часто невдачі досліду з водними культурами рослин обумовлені тим, в розчинах поживних солей встановлюється несприятлива для рослин реакція середовища. Особливо це може мати місце у варіантах з виключенням того або іншого елемента. Тому необхідно з самого початку дослідів стежити за тим, щоб значення рН було однаковим.

У разі потреби рН середовища доводять до заданої величини додаванням 5-10 % сірчаної кислоти або 5-10 % гідроокиси натрію; рН визначають за допомогою рН-метра або лакмусового папірця. Для різних культур необхідно готувати розчини з відповідними величинами рН:

Пшениця	6,5-7,6
Жито	5,0-6,0
Овес	5,0-6,0
Квасоля	6,7-7,4
Боби кінські	6,0-7,0
Капуста	5,0-6,0

### ***Завдання 2 Догляд і спостереження за рослинами***

Щодня протягом 5 хвилин розчин продувають повітрям. Цього часу достатньо для насичення суміші киснем. В жаркі дні доцільно продувати розчини двічі на добу. Для рівномірного збагачення киснем всіх варіантів досліду рекомендується одночасно продувати якомога більшу кількість судин, використовуючи для цієї мети гребінки або системи трійників. Під час продування стежать, щоб у всіх судинах швидкість струму повітря була однакою (2-3 пухирці в секунду), а скляні трубки доходили до дна судин. Струм пухирців повітря не повинен бути сильним, оскільки це може пошкодити ніжні частини коренів і привести до намокання кришок, що викличе ріст грибів і водоростей. Щодня в судини доливають дистильовану воду до первинного рівня. Якщо рослини вирощуються тривалий час, то

рекомендується через 2-4 тижні суміш в судинах міняти на свіжу. При зміні розчинів судини ретельно миють.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2.1.3 МІКРОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ЗОЛИ

### Мікрохімічний аналіз золи рослин

В основі мікрохімічного аналізу лежить властивість деяких солей утворювати характерної форми кристали, за якими можна судити про наявність у складі золи того або іншого елемента.

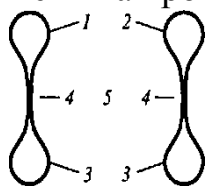
Матеріали і обладнання: 1) мікроскопи; 2) скляні тонкі палички з відтягнутими кінцями; 3) предметні скельця; 4) пробірки; 5) воронки; 6) паперові фільтри; 7) маркер для скла; 8) етанол; 9) дистильована вода; 10) 10%-вий розчин HCl; 11) 1 %-ні розчини кислот  $H_2SO_4$ ,  $HNO_3$ ,  $H_2C_2O_4$ ; 12) 1 %-ні розчини солей  $NaHC_4H_4O_6$ ,  $PtCl_4$ ,  $K_4[Fe(CN)_6]$ ,  $(NH_4)_2MoO_4$ ,  $(CH_3COO)_2Pb$ ,  $AgNO_3$ ,  $Na_2HPO_4$ ; 13) суміш наступного складу: 1 г  $Na_2HPO_4$ , 4 г  $NH_4Cl$ , 6 г  $NH_4OH$ , 2 г лимонної кислоти в 250 мл води (реактив на магній).

### Хід роботи

З рослинної золи готують в пробірках два розчини — водний для виявлення  $Cl^-$  і  $K^+$  і солянокислий для визначення всієї решти іонів. Одну другу частину золи заливають 3 мл дистильованої води, перемішують і фільтрують в чисту пробірку. До золи, що залишилася, додають 3 мл 10% HCl, перемішують і фільтрують розчин в чисту пробірку.

З розчинами проробляють всі якісні реакції. Поява типових кристалів показує наявність в золі відповідних елементів.

Техніка проведення реакції показана на малюнку 2.1



Мал. 2.1. Техніка проведення реакції:

1 — витяжка із золи; 2 — розчин, що містить елемент; 3 — реактив на елемент; 4 — «місток» між розчином і реактивом; 5 — предметне скло

Слід звернути увагу, що для збереження чистоти реактивів кожен з них беруть окремою скляною паличкою. Після використання палички слід ретельно мити. На різні кінці предметного скла розміщують по краплі необхідного реактиву на іон, який хочуть виявити. Поряд з однією з них наносять краплю якої-небудь солі, що містить даний іон (контроль), а з іншою — краплю солянокислого або водного екстракту золи.

Чистою скляною паличкою із загостреним кінцем дві сусідні краплі сполучають перемичками. В результаті взаємодії розчинів утворюються продукти реакції, які при повільному підсушуванні препарату випадатимуть в осад з утворенням характерних кристалів. Слід уникати повного перемішування крапель розчинів: найкрупніші і правильно сформовані кристали утворюються в тонких перемичках між краплями.

Дуже важливо правильно підсушити препарат. Для цього його тримають високо над полум'ям пальника і підігрівають до повного випаровування води, злегка переміщаючи з одного боку в інший. Підсушування припиняють, як тільки зникне остання крапля рідини. Кристали розглядають під мікроскопом на сухому препараті без покривного скла, замальовують і порівнюють з контрольним варіантом.

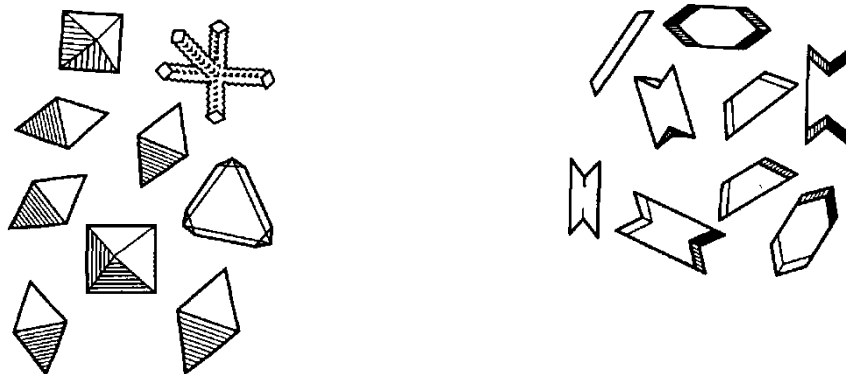
Проробляють всі якісні реакції з розчинами і з екстрактами золи. Поява типових кристалів показує наявність відповідних елементів в золі.

### **Завдання 1 Виявлення іонів калію:**

а) реактивом на іони калію може бути гідротартрат натрію  $\text{NaHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ , який з нейтральним розчином солей калію дає осад гідротартрату калію  $\text{KHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$  у вигляді крупних призм і пластинок (мал. 2.2).

Кристали гідротартрату добре розчиняються в кислотах і лугах, тому для визначення іона калію беруть водний екстракт;

б) іони калію можна знайти також за допомогою хлориду платини  $\text{PtCl}_4$ . В цьому випадку випадають кристали хлороплатинату калію  $\text{K}_2\text{PtCl}_6$  (див. мал. 2.2) у вигляді тетраедрів, октаедрів і кубів жовто-зеленуватого кольору.



а

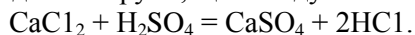
б

Мал. 2.2 Кристали гідротартрату калію (а) і хлороплатинату калію (б)

### **Завдання 2 Виявлення іонів кальцію:**

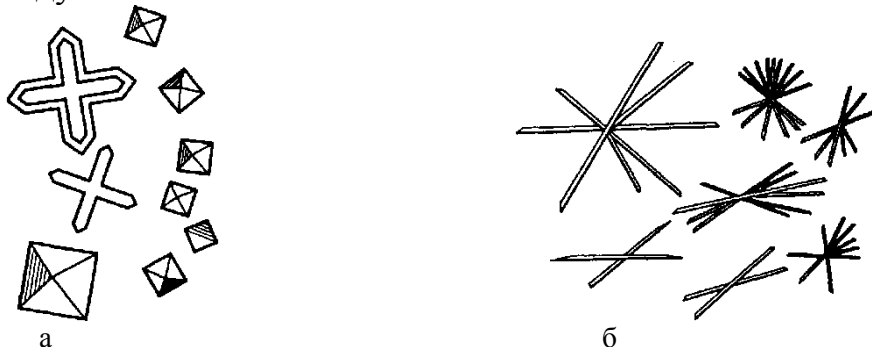
а) на предметному склі краплю дослідного розчину і контрольного розчину сполучають з краплями щавлевої кислоти. При повільному нагріванні випадають кристали оксалату кальцію  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  у вигляді октаедрів, кубів, іноді хрестів (мал. 2.3);

б) більш характерним реактивом на кальцій є сірчана кислота. В результаті цієї реакції при тій же техніці виконання випадають голчаті кристали гіпсу  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , які іноді мають свій в розпорядженні групи, що нагадують сніжинки;



### **Завдання 3 Виявлення іонів магнію.**

Краплі дослідного розчину і контрольної солі сполучають з реактивом, що складається з гідрофосфату натрію, хлориду амонію, лимонної кислоти і гідроксиду амонію.

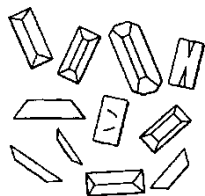


а

б

Рис.2.3 Кристали оксалату кальцію (а) і гіпсу (б)

При повільній кристалізації випадають кристали фосфату магнію-амонію у вигляді трапецій, призм і октаєдрів; при швидкій кристалізації — у вигляді зірок, хрестів і утворень, що гілкуються (мал. 2.4):



а



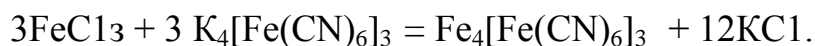
б

Мал. 2.4 Кристали фосфату магнію-амонію, отримані:  
а — при повільній, б — при швидкій кристалізації

#### **Задання 4 Виявлення іонів заліза.**

Присутність у витяжці іонів заліза  $\text{Fe}^{3+}$  знаходять при взаємодії з гексоціанофератом (II) калія  $\text{K}_4[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]$ . В результаті утворюється інтенсивно-синій осад гексоціаноферату (II) заліза  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ .

Заліза в деяких зразках золи мало, тому початкову витяжку слід нанести на скло кілька разів і упарити. Наявність іонів заліза виявляють за синім забарвленням:

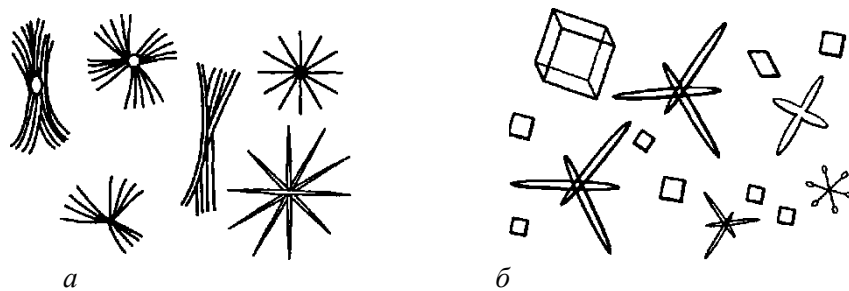


Реакцію на залізо можна проводити в пробірці з частиною солянокислого екстракту, до якого по краплях додають розчин гексоціаноферрату (II) калію.

#### **Завдання 5 Виявлення фосфору:**

а) іони  $\text{PO}_4^{3-}$  можна знайти в розчині при взаємодії з молібдатом амонію  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ . Краплю розчину фосфорної кислоти, злегка підкисляючи азотною кислотою, сполучають з краплею розчину молібдату амонію. В результаті випадають зеленувато-жовті дрібні кристали складної комплексної солі (мал. 2.5):



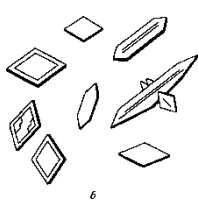


Мал. 2.5. Кристали фосфату ртуті (а) і фосфат-молібдату амонію (б)

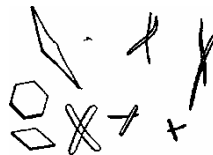
### **Завдання 6 Виявлення іонів $\text{SO}_4^{2-}$ :**

а) як реактив використовують розчин ацетату свинцю  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ . Випадають дуже дрібні кристали сульфату свинцю у вигляді довгих голок, зірок і ромбів;

б) у присутності нітрату срібла  $\text{AgNO}_3$  осідають кристали сульфату срібла  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  у формі витягнутих шестикутників і ромбів (мал. 2.6).



а



б

Мал. 2.6 Кристали сульфату свинцю (а) і сульфату срібла (б)

### **Завдання 7 Виявлення іонів хлору..**

Аніони хлору виявляють у водному розчині золи за допомогою нітрату срібла. При взаємодії хлору з цим реактивом випадає білий осад, який і служить доказом присутності іонів хлору в розчині.

Завдання: при оформленні роботи записати рівняння реакцій і замалювати характерні форми кристалів. У висновку відзначити, яка кількість золи у відсотках від сухої маси міститься в даному органі і які елементи знайдені в золі досліджених рослин

**Ліквідація дослідів вирощування рослин у водній культурі на повній поживній суміші і з виключенням елементів**

4	Без калію										
5	Без сірки										

Таблиця 2.14 Вплив недостатку елементів на ріст рослин при їх вирощуванні на живильному розчині Хогглєнда

Номер судини	Склад суміші	Об'єкт	Кількість рослин	Коренева система			Надземна маса			
				Об'єм, см <sup>2</sup>	Сира вага, г	Довжина	Кількість кореней	Сира вага, г	Число листя	Площа листя
1.	Повний									
2	Без азоту									
3	Без фосфору									
4	Без калію									
5	Без сірки									

Завдання: Розрахувати склад живильних розчинів Гельрігеля і Хогглєнда з виключенням калію, фосфору і азоту; Зобразити результати вегетаційного дослідження у вигляді графіків або діаграм, зробити висновок про вплив окремих елементів на ріст і розвиток рослин.



## РОЗДІЛ 7. МІНЕРАЛЬНЕ ЖИВЛЕННЯ.

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2.2 НІТРАТИ

#### Виявлення нітратів в рослинах

Інтенсифікація землеробства в ХХ в. породила нітратну проблему. Азотні добрива, що вносяться без дотримання дози і правил, призвели до збільшення змісту нітратів в рослинних продуктах до розмірів, що загрожують здоров'ю людини.

Попадання великої дози нітратів в організм загрожує гострим отруєнням. Нерідкі отруєння динями, кавунами і іншими продуктами з підвищеним вмістом нітратів; можливо отруєння питною водою за рахунок попадання підвищеної кількості добрив у водні джерела.

Гранично допустима доза нітратів для дорослої людини за добу складає 500 мг, токсична - 600 мг, для немовляти доза в 10 мг може бути смертельною. Відомості про вміст нітратів в овочах, їх розподілі по органах і тканинах дані в таблицях 2.7 і 2.8

Солі азотної кислоти, що поглинаються коренями з ґрунту, відновлюються в рослині до аміаку, який використовується для синтезу амінокислот і інших сполук. Для відновлення нітратів потрібен АТФ, що утворюється в процесі окислювального або фотосинтетичного фосфорилування.

При достатньому вмісті розчинних вуглеводів і високій активності відповідних ферментів перераховані біохімічні процеси відбуваються в клітинах кореня. Проте за несприятливих умов частина нітратів (нерідко вельми значна) може пройти через паренхіму кори кореня в незміненому вигляді. В цьому випадку нітрати потрапляють в судини ксилеми і підіймаються з висхідним струмом до листя, де і відбувається їх відновлення.

Визначення вмісту нітратів в соку, віджатому із стебел, черешків і пластинок листа, дозволяє судити про відновлення нітратів в коренях: чим менше в них виявляється нітрат-іонів, тим активніше відбувається цей процес в клітинах кореня. Зіставлення вмісту нітратів в різних органах рослини, наприклад в черешках, пластинках листа, коренях, дає уявлення про нітратредуктазну активність цих органів.

Для виявлення нітратів можна використовувати реактив з дифеніламіном, який у присутності іона  $\text{NO}_3^-$  дає синє забарвлення., за інтенсивністю якого можна судити про кількість нітратів в досліджуваному об'єкті.

Дані таблиці 2.1 дозволяють за допомогою цього реактиву оцінити кількість нітратів в рослині на різних стадіях розвитку і зробити висновок про необхідність азотної підкормки. Мала кількість нітратів на початку вегетації рослин означає нестачу азотного живлення. Така ж мала кількість їх у фазі цвітіння є нормою і не вимагає підкормки рослин.

У зв'язку з небезпекою, яку представляють нітрати для здоров'я людини, приводимо відомості про межі змісту їх в овочах і баштанних культурах (табл. 2.2), а також дані про розподіл нітратів по тканинах і органах зелених рослин (табл. 2.3). Ці відомості дозволять уникнути токсичних доз нітратів.

У столового буряка і редиски необхідно видаляти верхню і нижню частини коренеплоду. Використовувати в їжу редиску традиційних круглих сортів, оскільки в них нітратів значно менше ніж у сортів типу «Червоний велетень». В капусті найбільша кількість нітратів зосереджена у верхньому криючому листі і кочережці. Кабачки, огірки і патисони накопичують нітрати в шкірці і в частині, прилеглій до плодоніжки. Їх необхідно чистити і зрізати 2—3 см разом з плодоніжкою

Таблиця 2.1 Шкала для визначення нітратів в зрізах і соку рослин (за Церлінгом)

Бал	Забарвлення зрізу або соку	Необхідність в азотних добривах	
		На початку вегетації	У фазу цвітіння
0	Немає забарвлення	Дуже сильна (60 кг/га)	Середня (30 кг/га)
1	Блідо-голуба швидко зникає	Сильна (60 кг/га)	Слаба (30 кг/га)
2	Голуба провідних судин	Середня (30 кг/га)	Не мають потреби
3	Голуба, зникає через 2-3 хвилини	Слаба (30 кг/га)	Не мають потреби
4	Синя, зберігається декілька хвилин	Слаба (30 кг/га)	Не мають потреби
5	Темно-синя, зберігається якийсь час	Не мають потреби	Не мають потреби
6	Темно-синя, стійка	Надлишок нітратів	

В картоплі нітратів нагромаджується менше, проте його вживають частіше за інші овочі і у великій кількості. Для зниження кількості нітратів в картоплі його слід замочувати на ніч в розчині NaCl.

Мета роботи: познайомитися з простим і доступним засобом визначення нітратів в рослинній сировині і грамотно оцінити їх кількість. Це необхідне для визначення дози внесення азотних добрив в період вегетації рослин, а також для вивчення того, як локалізовані нітрати в різних частинах і органах рослини, і оцінки їх кількості в харчових продуктах.

Матеріали і обладнання: 1) розчин KNO<sub>3</sub> або NaNO<sub>3</sub> в концентраціях, мг/л: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 10 в невеликих склянках; 2) 1 %-ний розчин дифеніламіну в концентрованій H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в крапельниці (берегти в темряві на підставці); 3) пінцет; 4) скляні палички; 5) фарфорові випарювальні чашки; 6) шматок скла; 7) кольорові олівці; 8) фільтрувальний папір; 9) ножиці; 10) ніж; 11) скальпель; 12) бритва.

## Норми вмісту нітратів в продуктах

Міністерством охорони здоров'я встановлені наступні нормативи за змістом нітратів в сільськогосподарській продукції (в мг/кг по нітрат-іону). В чисельнику приводяться норми для ранніх і тепличних овочів, в знаменнику — для пізньої продукції відкритого ґрунту:

картопля — 250	огірки — 400/150
капуста — 900/500	кавуни — 60
морква — 400/250	дині — 90
томати — 300/150	перець солодкий — 200
лук ріповий — 80	кабачки — 400
лук-перо — 800/600	

Таблиця 2.2 Граничні кількості нітратів в овочах, мг/кг

Культура	Мінімум	Максимум	Культура	Мінімум	Максимум	Культура	Мінімум	Максимум
Кавуни	44	572	Перець солодкий	44	352	Крес-салат	320	4840
Баклажан и	88	264	Петрушка	1760	1892	Картопля	44	968
Бруква	398	528	Ревінь	1760	2420	Лук Зелен.	44	1320
Горошок зелений	22	88	Редька чорна	1540	1760	Лук	66	880
Гірчиця салатна	320	1760	Редиска	440	2640	Морква	176	2200
Дині	44	484	Ріпа	660	880	Огірки	88	528
Капуста біла	66	2860	Салат	396	2860	Патисон	176	880
Гарбуз	308	1320	Квасоля	22	880	Шпинат	660	3960
Кріп	396	2200	Часник	44	308	Щавел	264	396
Кабачки	196	704	Буряк	44	2640	Естрогон	1320	2200

### Хід роботи

На білу фарфорову поверхню випарювальної чашки або скляної пластинки наносять краплі контрольних розчинів  $KNO_3$  або  $NaNO_3$  і додають одну краплю дифеніламіну. Заповнюють концентраційну шкалу забарвлення, відповідну певному вмісту нітратів (табл. 2.4).

Таблиця 2.3 Вміст нітратів в різних органах зелених овочів, мг/кг

Орган	Культура		
	Шпинат	Коріанд	Кріп
Корінь	74	90	384
Стебло	833	163	487
Черешок листа	814	165	441
Пластинка	213	14	95

Таблиця 2.4 Концентраційна шкала забарвлення на нітрати

Концентрація KNO <sub>3</sub> , мг/л	Зображення кольору	Опис кольору
1		
1		
10		
50		
100		
200		
300		
400		
500		
600		
700		
800		
900		
1000		

За допомогою цієї шкали кількісно оцінюють вміст нітратів в рослинному матеріалі, порівнюючи з нею за кольором дослідну пробу.

Беруть наважку рослинного матеріалу (1 г), розтирають у випарювальній чашці у 1 мл дистильованої води, потім мезгу віджимають через декілька шарів марлі. У рідині визначають кількість нітратів за допомогою дифеніламіну.

Беруть дозатором 10 мкл екстракту та додають таку ж кількість розчину дифеніламіну. Оцінюють кількість нітратів згідно даним концентраційної шкали забарвлення (див. табл. 2.4), заносять результати їх вмісту в таблицю 2.5. Змиваючи після закінчення роботи тканини і сік, необхідно пам'ятати про властивості концентрованої сірчаної кислоти залишати опіки при попаданні на шкіру.

Таблиця 2.5 Вміст нітратів в рослинах

№ п/п	Вид рослини	Колір <i>забарвлення</i>	Кількість NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , мг/кг	Допустима кількість продукту, г на добу для людини

**Завдання:** в таблицю, оформлену по вищенаведеному зразку, записати результати аналізу тканин і органів досліджуваних рослин з урахуванням умов їх зростання. Зробити висновок про можливість вживання цих рослин в їжу і про необхідність внесення азотних добрив у фазі вегетації.

## РОЗДІЛ 8. РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН.

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2.3.1 НАСІННЯ

#### Розмноження рослин

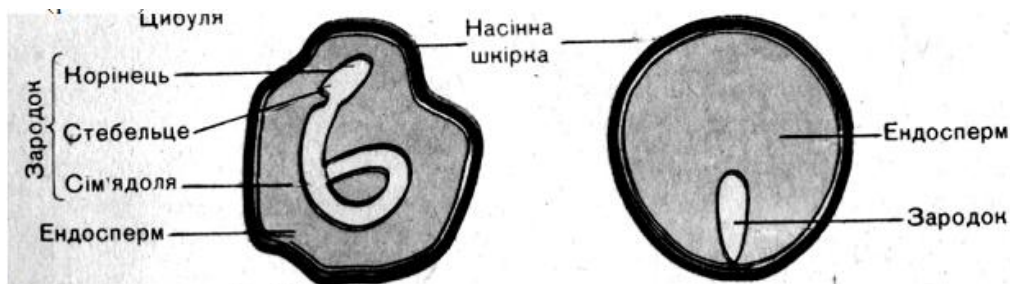
#### Матеріали та методи

- 1) Насіння різних культур
- 2) Чашки петрі
- 3) Секатор
- 4) Горщики для пророщування

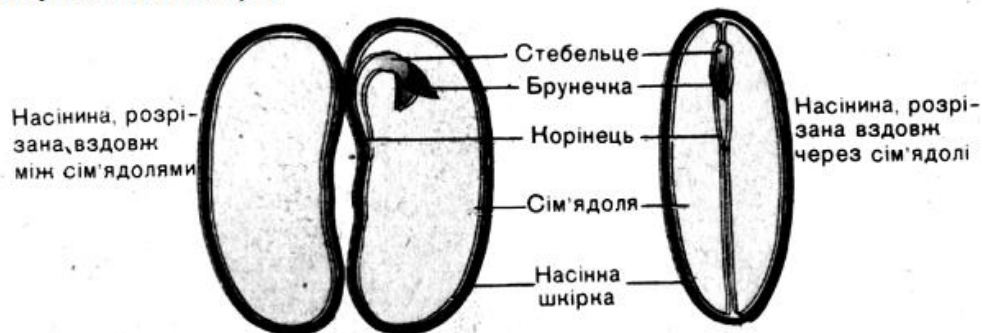
#### Завдання 1 Будова насіння

#### Хід роботи

Для вивчення будови насіння слід взяти по одній набубнявілій насінині огірка, томату, цибулі, квасолі, буряка, зняти з них шкірку і розчленити насінини на складові частини. Знайти у насінини огірка, квасолі сім'ядолі, корінець, бруньку; у томату, цибулі - ендосперм, у буряка - перисперм.



Розріз насінини цибулі



Розріз насінини квасолі

Анатомічна будова насіння одно- (цибуля) та дводольних (квасоля) овочевих культур

Завдання: замалювати будову насінин різних овочевих культур і позначити їхні складові частини

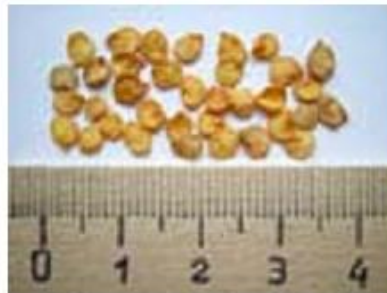
***Завдання 2. Визначати насіння овочевих культур за зовнішніми (морфологічними) ознаками його.***

У запропонованій колекції уважно розглянути насіння овочевих культур, згрупувати його за родинami і в межах родин визначити схожі морфологічні ознаки, звернувши увагу на розмір та форму насіння, забарвлення оболонки (шкіри), характер її поверхні, наявність опушення, запаху. Використовуючи наведені описи морфологічних ознак, розподілити запропоноване насіння за масою на групи: дуже велике, велике, середнє, дрібне, дуже дрібне.

Завдання: Одержаний кожним студентом пакетик із сумішшю насіння всіх культур необхідно висипати на розбірну дошку і за допомогою лупи та шпателя розібрати. Далі розпізнане насіння необхідно наклеїти на окремий листок паперу і зробити відповідні написи українською та латинською мовами згідно Таблиці.



Насіння пастернаку



Насіння перцю



Насіння ріпи





Насіння буряку  
столового



Насіння селери



Насіння томату



Насіння гарбуза крупно-  
плідного



Насіння кропу



Насіння щавлю





Насіння кавуна



Насіння баклажан



Насіння бобів



Насіння дині



Насіння капусти



Насіння цибулі







Насіння моркви



Насіння гороху



Насіння огірка



### Морфологічні ознаки насіння овочевих культур

#### Родина гарбузових (CUCURBITACEAE)

##### Гарбуз великоплідний

Насіння дуже велике (2-5 шт. в 1 г), плоске, овальне, трохи випукле. По краю насінини рубчика немає. Колір, залежно від сорту, буває молочно-білий або оранжево-білий.

##### Кавун

Насіння, залежно від сорту, велике або середнє (11-30 шт. в 1 г), плоске, округле або овальне, трохи видовжене до зародка. Колір кремовий, рудий, червонуватого або чорного відтінку, одноколірний або різноколірний.

##### Диня

Насіння середньовелике (20-30 шт. в 1 г), видовжене, випукле або трохи зігнуте, поверхня шкіряста, гладенька. Кінець, протилежний зародку, округлий. Колір білувато-кремовий або яскраво-оранжевий.

##### Огірок

Насіння середньо-велике (40-60 шт. в 1 г), овально-довгасте, випукле. Колір кремово-білий або слонової кістки.

#### Родина капустяних (BRASSICACEAE)

##### Капуста

Насіння культур родини капустяних дуже схоже, тому за зовнішніми ознаками визначити ці культури неможливо. Насіння різняться лише за анатомічною будовою оболонки, яку можна розглянути тільки під мікроскопом. Насіння середнє (250-300 шт. в 1 г), округле, кулясте. Колір - від рудувато-червонуватого до чорного з рудуватим відтінком.

#### Родина селерових (APIACEAE)

##### Морква

Насіння дрібне (800-900 шт. в 1 г), плоско-яйцеподібне. На спинному боці між реберцями має чотири ряди війчастого опушення. У добре обтертого насіння (підготовленого до посіву) війки відламані, але коротенька основа може бути тому на спинному боці виразно помітні три справжні реберця і чотири допоміжних з основами війок. Забарвлення руде з темно-зеленим відтінком. Смак не різкий, нагадує моркву.

### **Кріп**

Насіння дрібне (600-800 шт. в 1 г), плоске, овальне, із крилаткою навколо. Спинний бік випуклий, на ньому ясно видно п'ять реберець, забарвлення сіро-руде з більш світлими крилами. Смак не різкий, приємний.

### **Петрушка**

Насіння дрібне (850-900 шт. в 1 г), яйцеподібне, видовжене з "носи́ком". Черевний бік злегка увігнутий, спинний - опукло-вигнутий. Насіння лежить "на боку". На спинці має три реберця та два - по боках. Забарвлення сірувато-зелене. Смак не різкий, властивий петрушці

## **Родина бобових (FABACEAE)**

### **Квасоля звичайна**

Насіння дуже крупне (2-3 шт. в 1 г), кругле й опукле, ниркоподібне. Забарвлення, залежно від сорту, біле, чорне або кольорове (крім синьої), однотонне (суцільне або з розцвітками). Зародок міститься посередині одного з довгих боків. Насіння дуже крупне (2-4 шт. в 1 г), округло-плоске, ниркоподібне. Забарвлення біле. Зародок міститься посередині одного з довгих боків.

### **Горох**

Насіння дуже крупне (3-5 шт. в 1 г), округле та неправильно-округле. Поверхня гладенька або зморшкувата. Забарвлення, залежно від сорту, жовте або зелене.

### **Боби**

Насіння дуже крупне (4-9 шт. в 1 г), плоско-округло-ниркоподібне. Забарвлення, залежно від сорту, фіолетово-чорне або зеленувато-коричневе. Зародок міститься на одному з коротких боків.

## **Родина лободових (CHENOPODIACEAE)**

### **Буряк столовий**

Клубочки крупні (40-90 шт. в 1 г), неправильно-округлі. Забарвлення насіння світло-коричневе; форма овальна.

## **Родина цибулинні (ALLIACEAE)**

### **Цибуля ріпчаста**

Насіння середнє (250-300 шт. в 1 г), опукла грань середньо-зморшкувата, поверхня матова, колір чорний.

### **Часник**

Повітряні цибулинки, залежно від сорту, овально-довгасті, як вівсяне зерно, дрібні (від 20 до 100 шт. в 1 г), овально-округлі, злегка видовжені донизу, рожево-фіолетового забарвлення.

## **Родина тонконогових (POACEAE)**

### **Кукурудза цукрова**

Насіння крупне (3-10 шт. в 1 г), зубоподібне, плюскле. Забарвлення, залежно від сорту, жовте або біле, прозоре, склоподібне.

## **Родина спаржевих (ASPARAGACEAE)**

Спаржа Насіння середньокрупне (40-50 шт. в 1 г), округло-тригранне, майже кулеподібне. Дуже міцне, "кам'яне", поверхня шорстка, забарвлення сизувато-чорне.

## **Таблиця**

Зразок насіння	Опис насіння	Назва овочевої культури	
		українська	латинська

**Завдання 3 Ознайомитись і вивчити органи вегетативного розмноженням  
овочевих культур.**

Завдання: замалювати вегетативні органи розмноження овочевих культур та написати по 3 приклади рослин

Назва вегетативного органу	Малюнок	Овочева культура
Бульба		Картопля
Відсадки		Меліса
Зеленими живцями		Томат
Здерев'янілими живцями		Острогін
Цибулинами		Цибуля
Зубками		Часник
Поділом кореня		Хрін
Кореневищем		Ревінь

**Завдання 4 Визначити посівні якості насіння**

**Посівні якості насіння** – це чистота, маса, вологість, життєздатність, енергія проростання, схожість насіння, зараженість шкідниками і збудниками хвороб (характеризують придатність насіння до сівби). Визначають посівні якості насіння в лабораторіях інспекції з

визначення якості насіння за єдиною методикою. За посівними якостями насіння поділяють на перший і другий класи.

Розрізняють схожість: лабораторну, оранжерейну та польову.

**Схожість лабораторна** – це виражена у відсотках кількість нормально пророслих насінин при пророщуванні у визначених ДСТУ для кожної культури умовах.

**Схожість оранжерейна** – це виражена у відсотках кількість нормально пророслих насінин в умовах, наближених до польових. Для її визначення заготовляють ґрунт із тієї сівозмінної ділянки, де буде висіяна ця овочева культура. Цим ґрунтом заповнюють посудину заввишки та діаметром до 10 см. Насіння висівають на відповідній для культури глибини. Ґрунт у посудинах зволожують.

**Схожість польова** – це виражена у відсотках кількість пророслих у польових умовах насінин до загальної кількості висіяних.

**Енергія проростання** – це виражена у відсотках кількість насіння, що дало нормальні проростки у строки пророщування, зазначені у стандарті. Енергію проростання і схожість насіння визначають в одному аналізі за середнім зразком (для дрібнонасінних культур – 5-10 г, а крупнонасінних – 25-100 г).

**Чистота насіння** – це маса зовні повноцінних насінин, виражена у відсотках до загальної маси проби.

**Вологість насіння** – це уміст води в насінні, виражений у відсотках до

маси абсолютно сухого насіння. Визначають її шляхом висушуванням насіння в сушильних шафах, або за допомогою електровологомірів та спеціальних приладів.

**Життєздатність насіння** – це маса живого насіння в насіннєвому матеріалі, виражена у відсотках. Свіжозібране насіння деяких овочевих культур може мати знижену схожість, яка значно підвищується у процесі зберігання (післязбиральне дозрівання). Оцінюють таке насіння визначенням життєздатності. Для цього насіння намочують у воді до набубнявіння, відокремлюють від нього шкірку і забарвлюють 0,1 % розчином індигокарміну або кислого фуксину. Життєздатне насіння не забарвлюється.

**Сила росту насіння** визначається кількістю проростків (%), які пробилися крізь шар піску 2-3 см, а також надземною масою 100 рослин (г) через 10 днів після масового з'явлення сходів.

**Маса 1000 насінин** є ознакою його виповненості і ваговитості. Ваговите насіння з високим вмістом поживних речовин краще проростає, забезпечує інтенсивний ріст рослин після з'явлення сходів та підвищує їх продуктивність. Маса 1000 насінин залежить від особливостей культури: у бобових (гороху, квасолі), цукрової кукурудзи вона набагато більша, ніж у капустяних і селерових. На масу 1000 насінин помітно впливають умови вирощування. За недостатнього забезпечення рослин поживними речовинами і вологою утворюється дрібне насіння.

## Хід роботи

Чисте насіння слід використати для визначення енергії проростання та лабораторної схожості. У чашках Петрі чи горщиках (залежно від культури) висіяти по 10 насінин у трьох повтореннях.

Завдання: заповнити таблицю, зробити висновки.

Культура	енергії проростання			лабораторної схожості		
	3 доба	5 доба	10 доба	3 доба	5 доба	10 доба
1						
2						
3						
Середнє значення						

### *Завдання 4 Проростання пилку рослин*

Матеріали і реактиви: 20% розчин сахарози, борна кислота, ацетокармін, чашки Петрі, накривні і предметні скельця, мікроскопи, піпетки, препарувальні голки, термостат, пилки різних сортів томату.

Пилки і пилкові трубки являють собою мікрогаметофітну стадію життєвого циклу вищих рослин. Під час формування і проростання пилку відбувається процес мікрогаметогенезу – утворення чоловічих статевих гамет – спермійів (рис.1). На процес мікрогаметогенезу впливають спадкові фактори і середовище, знижуючи запліднюючу здатність пилку. Від фертильності пилку залежить успіх селекційної роботи, яка починається із схрещування вихідних форм і, звичайно, врожайність переважної більшості сільськогосподарських культур. При підборі сортів–запилювачів, вивченні гібридного покоління, нових сортів і взагалі при використанні пилку рекомендується перевіряти його життєздатність. Наприклад, більшість виробничих сортів картоплі мають стерильний пилки (80-90%), що ускладнює підбір компонентів для схрещування. Тому сорти-запилювачі картоплі підбирають за ознакою фертильності пилку із врахуванням, звичайно, господарсько-цінних ознак.

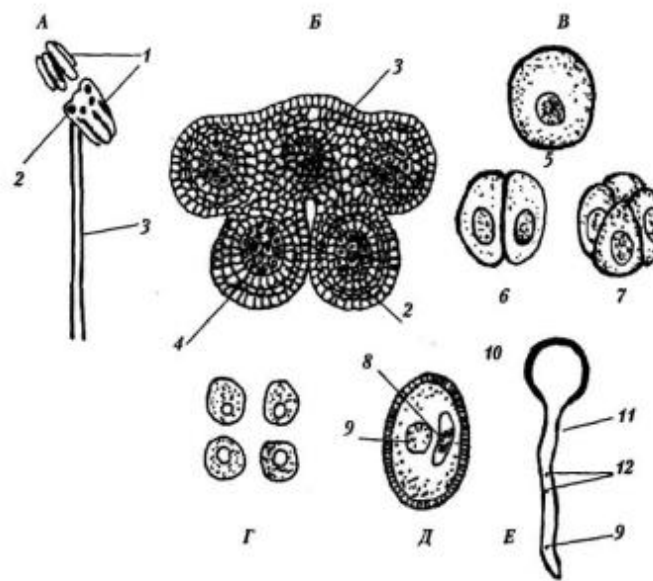


Рис.1. Розвиток пилку (від материнської клітини до пилкової трубки): А – пиляк; Б – поперечний розріз пиляка; В – стадії утворення тетради з материнської клітини пилку шляхом мейозу; Г – чотири мікроспори; Д – пилкове зерно; Е – проростання пилкового зерна у пилкову трубку; 1 – пиляк; 2 – пилковий мішок; 3 – тичинкова нитка; 4 – тапетум; 5 – материнська клітина пилку; 6 – діада; 7 – тетрада; 8 – генеративна клітина; 9 – вегетативне ядро (ядро трубки); 10 – старе пилкове зерно; 11 – пилкова трубка; 12 – генеративні ядра (спермії); (за Брігс, Ноулз, 1983)

Прийнято розрізняти терміни життєздатність пилку і запліднююча здатність пилку (фертильність). Життєздатність пилку визначають як здатність чоловічого гаметофіту до росту в тканинах маточки, а фертильність пилку – як здатність пилку до повного запліднення. Найбільш надійне визначення життєздатності і фертильності пилку дають методи *in vivo*. Для порівняльного оцінювання фертильності пилку використовують методи фарбування ацетокарміном або йодом, а життєздатності – пророщування пилку на штучних середовищах. У багатьох рослин пилок здатний проростати у вологій камері на водному розчині глюкози або сахарози. За методом Транковського, вологою камерою є чашка Петрі, в яку на дно кладуть кружечки фільтрувального паперу, змоченого у воді. В чашку поміщають предметні скельця із висіяним пилком. Для прискорення проростання пилку чашки поміщають в термостат з температурою 25-30°C. В якості середовища для проростання пилкових зерен звичайно використовують 1%-ий розчин агару на дистильованій воді із додаванням сахарози. Концентрація сахарози міняється від 5 до 40% в залежності від виду рослин: для пилку плодових культур – 5-15%- ий розчин, пилку

кукурудзи – 10-15%-ий, пилку картоплі – 20%-ий, пилку жита – 30-40%-ий тощо. Щоб наблизити штучне середовище до природних умов, в розчин іноді додають слідові кількості борної кислоти, тому що бор відіграє значну роль у розвитку і життєдіяльності репродуктивних органів (рис. 2а). Пилок картоплі, наприклад, не проростає на розчині сахарози без додавання борної кислоти. У селекційній роботі фертильність пилку визначають, як правило, за зафарбуванням ацетокарміном. Досліджуваний пилок висівають на предметне скло і наносять краплю ацетокарміну, накривають накривним скельцем і через 3-5 хвилин розглядають в 9 мікроскоп. Ядра фертильних пилових зерен зафарбовуються ацетокарміном в темно-червоний колір, а цитоплазма – у рожевий.

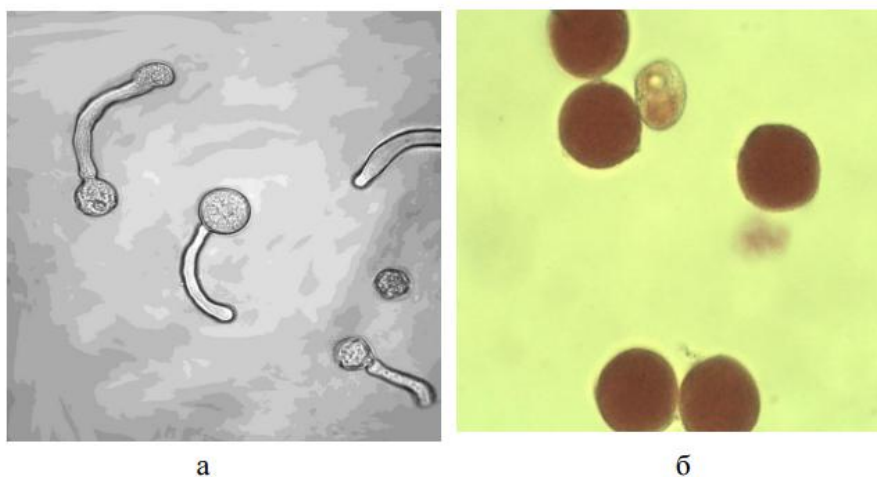


Рис. 2. а – Проростання пилку томату на 20%-му розчині сахарози у 0,006%-му розчині борної кислоти, б – Фертильний і стерильний пилок конюшини лучної *Trifolium pratense*, зафарбування ацетокарміном.

Стерильний пилок переважно не зафарбовується, а також відрізняється за формою і розміром (рис. 2б).

Для деяких культур, пилок яких має товсту екзину (4,5 мкм) і зернисту структуру, ацетокарміновий метод зафарбування є неефективним. При визначенні фертильності такого пилку використовують розчин йоду у йодиді калію. Цей метод полягає у визначенні крохмалю: фертильний пилок відрізняється від стерильного вмістом значної кількості крохмалю.

#### Хід роботи

1. Приготувати 20%-ий розчин сахарози у 0,006%-му розчині борної кислоти на дистильованій воді. Нанести на предметні скельця 10 по три краплі розчину сахарози. За допомогою препарувальної голки розсіяти по поверхні крапель пилок від квітучих рослин різних сортів томату. Пиляки попередньо підсушити протягом трьох годин. Помістити

предметні скельця у вологу камеру: на дно чашки Петрі із зволженим фільтрувальним папером.

2. Перенести чашки Петрі із пилком у термостат з температурою 25°C на дві години. Дістати чашки Петрі, підрахувати життєздатність пилку як відсоток пилку, що проріс, до загальної кількості пилку (обрахувати 300 пилкових зерен) у трьох повторностях (краплях). Пророслим вважати пилки з довжиною пилкової трубки, що перевищує діаметр пилкового зерна. Обрахувати середнє значення життєздатності пилку у відсотках і похибку середнього значення за формулами:

$$p = \frac{n_{\phi}}{n_{\text{заг}}} \cdot 100\%; \quad s_p = \sqrt{\frac{p \cdot (100 - p)}{n}};$$

де  $p$  – середнє значення життєздатності пилку однієї рослини,  $n_{\phi}$  – кількість пророслого пилку,  $n_{\text{заг}}$  – загальна кількість дослідженого пилку,  $s_p$  – похибка середнього значення. 3. Порівняти життєздатність різних сортів томату за  $t$ -критерієм Стюдента за формулою:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s_{x_1} + s_{x_2}}}$$

Нанести на предметне скло три краплі ацетокарміну і за допомогою препарувальної голки розсіяти по поверхні краплі пилки. Через 2 хвилини накрити препарат накривним скельцем, підрахувати під мікроскопом загальну кількість пилкових зерен у випадково 11 вибраних полях зору (обрахувати 300 зерен) і кількість зафарбованих (фертильних) пилкових зерен у трьох повторностях (краплях). Підрахувати середню фертильність пилку у відсотках за формулами:



## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2.3.2 ЩЕПЛЕННЯ

### *Завдання 1 Вегетативного розмноження рослин щепленням*

Завдання: Освоїти техніку щеплення деревних рослин

**Щеплення** - це спосіб розмноження дерев і кущів за допомогою штучного зрощування частини однієї рослини (прищепи) з іншим (підщепою).

Щеплення дозволяє:

- отримати культурну рослину з кореневої порослі або сіянців;
- сформувати бажану крону дерев;
- замінити один сорт на інший без викорчовування рослини;
- омолодити дерево при старінні;
- підвищити імунітет рослини, його врожайність, опірність складним кліматичним умовам і хворобам.

**Прищеп** - завжди культурний (сортний) побіг або брунька. **Підщепою** ж може виступати старе дерево, сіянець (в т.ч. дичка), коренева поросль.

Способи проведення щеплення:

**1. Окуліровка.** Метод, що дозволяє прищеплювати сплячу бруньку під кору молодого побігу (не більше 1 см завтовшки). Прищеп повинен бути в довжину не менше 3 см і обов'язково захоплювати «п'яту» - деревину.

**2. Копуліровка.** Для щеплення однакових по товщині прищепи та підщепи використовують цей метод. Зрощувальні частини щільно прикладають один до одного зрізами.

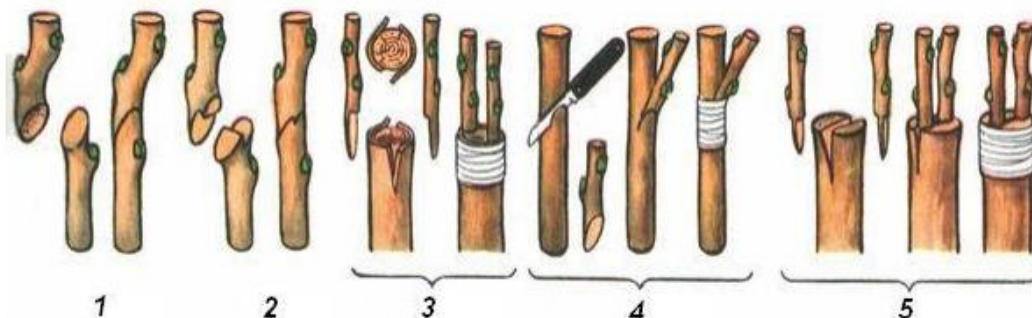
**3. За кору.** Живці щепи вставляють під кору підщепи, зазвичай це скелетна гілка або стовбур старого дерева. Товщина підщепи в цьому випадку кратно перевищує товщину щепи.

**4. В розріз.** Держак щепи повинен мати меншу товщину, ніж підщеп. Прищеплювану гілку, заточену в формі клина, вставляють в бічний розріз, поєднуючи тканини.

**5. В розщеп.** Для заміни або відновлення крони плодового дерева підщепу розщеплюють на 2 або 4 частини і вставляють в розщеп аналогічне число живців прищепи.

**6. Зближення.** Найменш відомий спосіб, який застосовується для гілок або стовбурів, що перетинаються або дотичних один з одним. У кожному конкретному

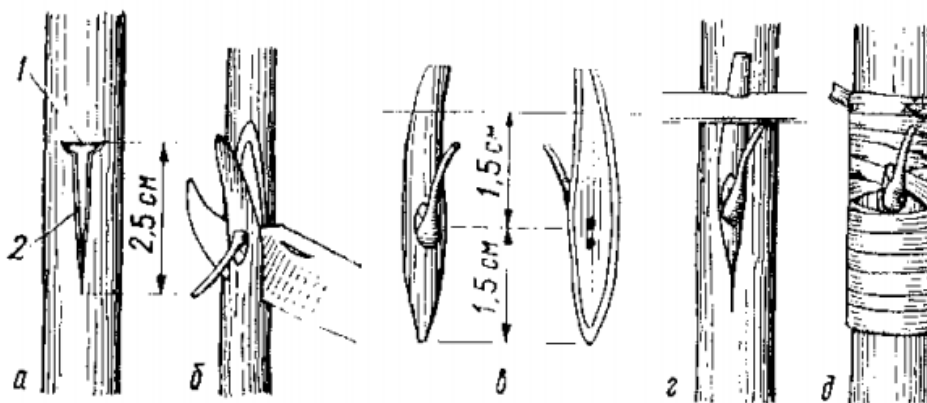
випадку садівник повинен підбирати відповідний для нього спосіб щеплення в залежності від наявного для роботи прищепного матеріалу.



**Малюнок 4. Різні способи щеплення живцями:** 1, 2 - вприклад; 3, 4 - за кору; 5 - у розчип

#### Хід роботи

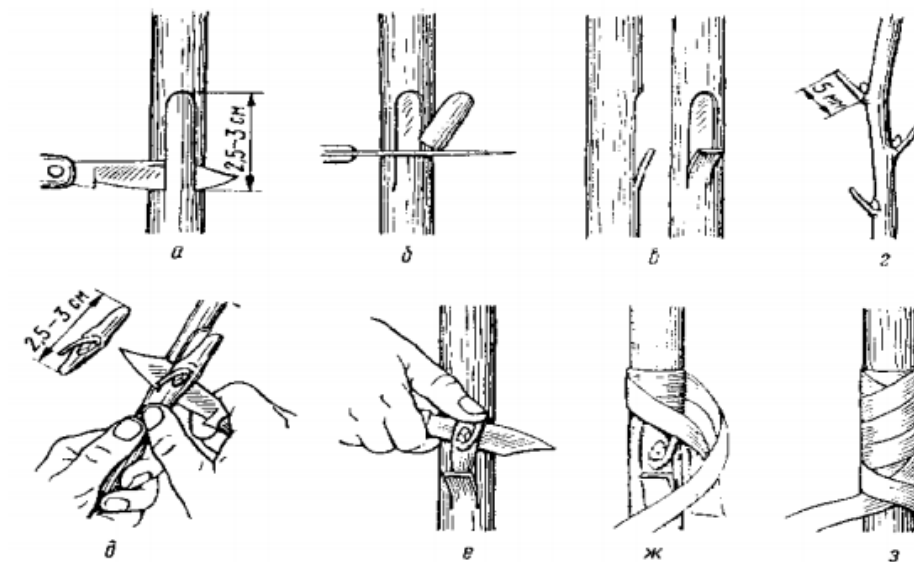
Щеплення проводять на штамбиках з північного боку, щоб запобігти перегріванню, і з боку рядка, щоб уникнути полумів пагонів-окулянтів під час механізованого обробітку ґрунту. Т-подібний надріз на підщепі роблять у два прийоми, спочатку поперечний, а потім подовжній. Поперечний розріз кори шириною в 1/3 окружності стволика роблять центральною частиною клинка під кутом 45° до подовжньої вісі штамбика, що полегшує вставку щитка під кору, а подовжній розріз закругленою частиною клинка довжиною рівною або ледве менше довжини щитка.



Малюнок 1 – Послідовність прийомів Т-подібного окулірування щитком: а - на підщепі роблять горизонтальний (1) і вертикальний (2) розрізи кори; б – на живці зрізують щиток; в – правильно зрізаний щиток; г – на підщепі в розріз кори вставляють щиток і відтинають його зайву верхню частину; д – місце окулірування знизу вгору щільно обв'язують плівкою.

Подовжній розріз закінчують розведенням леза ножа в різні боки для відважування країв розрізу кори на підщепі і наступній вставці туди щитків прямо з ножа. Живець прищепи при цьому беруть у ліву руку більш товстим кінцем від себе. Щиток зрізають. Після цього нижній кінець щитка підносять до розрізу кори на підщепі і рухом великого пальця правої руки зверху вниз знімають його з ножа і вставляють у розріз до кінця. Якщо щиток ввійшов у розріз кори не цілком, вставляють його за допомогою кісточки, а зайву частину відрізають ножом по горизонтальному розрізу кори підщепи. Техніка виконання окулірування “вприклад” проводиться в такому порядку. На підщепі роблять неглибокий поперечний надріз кори до деревини під кутом 45°. Потім на 1,5-2,0 см вище надрізу рухом ножа зверху вниз знімають смужку кори з тонким прошарком деревини. Загальна довжина зрізаної смужки кори повинна бути 2,5-3,0 см, тобто нижче поперечного надрізу утвориться «кишеню», у яку вставляють щиток прищепи. Бажано, щоб конфігурація і розміри щитка та оголеної частини стволика співпали, але щиток може бути коротший і вузьчий. В останньому випадку його треба зрушити вліво або вправо, щоб сполучити комбінальні прошарки підщепи і прищепи.

Окулірування “вприклад” простіше окулірування за кору і продуктивніше її приблизно на 20-25%. При поганому відділенні кори в підщеп швидкість виконання щеплення збільшується, зрощення підщепи з прищепою пришвидшується і поліпшується. Заокуліровані “вприклад” бруньки не «запливають», таким засобом можна окулірувати тонкі підщепи. Але після припинення активного розподілу клітин, окулірування “вприклад” так само неефективно, як і окулірування за кору. Відразу ж після вставки щитка місце щеплення обв'язують. Цю роботу виконує обв'язчик, що працює в парі з окуліровщиком. Щоб не припускати підсихання щитків, обв'язчик повинен відставати від окуліровщика не більше, ніж на 5-6 щеплень. Для обв'язування застосовують стрічки поліетиленової або полівінілхлоридної плівки товщиною 80-120 мк, довжиною 25-30 см і шириною біля 0,8-1 см. Беруть стрічку в праву руку приблизно на відстані 5 см від кінця, накладають на поперечний розтин підщепи і першим коловим рухом закріплюють її короткий кінець. Витки накладають по спіралі дуже щільно і так, щоб вони перекривали один одного. Наприкінці операції утворюють петлю, у неї просмикують вільний кінець і затягують його. У кісточкових порід бруньку лишають вільною, тому що при суцільному обв'язуванні вона здавлюється і часто гине.



Малюнок 2 – Окулірування щитком “ вприклад ”: а, б, в – у підщепі на рівному міжвузлі зрізають щиток кори; г – на живці відокремлюють прилистки і листки, залишаючи живці довжиною 5 мм; д – зрізають щиток з живця, тримаючи його верхівкою до себе; е – на підщепі під язичок внизу зрізу вставляють щиток з брунькою рухом «з ножа»; ж, з – прикладений до підщепи щиток з брунькою щільно обв’язують плівкою зверху вниз (восени плівку знімають).

## РОЗДІЛ 9. СТІЙКІСТЬ РОСЛИННОГО ОРГАНІЗМУ.

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2.4 СТІЙКІСТЬ

**Стійкість рослин** — це їх здатність адаптуватися до несприятливої дії зовнішнього середовища, зберігаючи стабільність всіх фізіологічних процесів. Чим менше відхилення якого-небудь процесу або реакції від норми в результаті дії екстремального чинника і чим швидше вони повертаються до норми, тим вище стійкість рослин. Механізми досягнення стійкості у них різні і можуть відбуватися як на генетичному, так і на фізіолого-біохімічному і морфологічному рівнях.

При стресовому впливі на тканині, наприклад при підвищенні температури, мембрани клітини, у тому числі і мембрани хлоропластів, втрачають властивість напівпроникності. Внаслідок цього іони водню, присутні в клітині, заміщають іон  $Mg^{2+}$  в молекулі хлорофілу, який перетворюється у феофітин, що має бурий колір. Чим більше хлорофілоносних клітин пошкоджено, тим більша площа листа буріє.

#### ***Завдання 1 Вплив кріопротекторів на життєздатність клітин рослинних тканин при заморожуванні.***

Метод заснований на тому, що при пошкодженні клітин їх вміст (цитоплазма і сік вакуолі) виходить назовні. А якщо у вакуолі міститься багато пігментів, наприклад, антоціанів, як в коренеплоді столового буряка, то по інтенсивності забарвлення розчину можна встановити ступінь пошкодження клітин, а отже і стійкість.

**Матеріали і обладнання:** 1) кристалізатор; 2) ніж; 3) бритви; 4) термометр з шкалою від -50 до +50 °С; 5) водяна лазня; 6) електроплитка, 7) пробірки; 8) штатив для пробірок; 9) хімічні стакани; 10) лінійки; 11) пробкове свердло великого діаметра (8—10 мм); 12) NaCl; 13) сніг або кубики льоду; 14) 12%-вий розчин гліцерину; 15) 2М розчин сахарози; 16) піпетки на 5 – 10 мл.

#### Хід роботи

З коренеплоду столового буряка пробковим свердлом діаметром 8 - 10 мм вирізають циліндр і розрізають його на диски завтовшки 2 - 3 мм. Всі диски (загальне їх число 35) повинні бути однаковими. Потім їх поміщають в хімічний стакан і ретельно промивають водою, щоб видалити клітинний сік, що витікає з пошкоджених клітин.

Відмиті кружечки по 5 штук поміщають в 7 пробірок, в кожній з яких знаходиться по 5 мл наступних рідин: дистильованої води; 2М розчину сахарози; 1М розчину сахарози; 12 % розчину гліцерину; 12 % розчину гліцерину і 2 М розчину сахарози в співвідношенні 1:1 (по 2,5 мл); 12 % розчину гліцерину і 1 М розчину сахарози в співвідношенні 1:1 (по 2,5 мл); 12 % розчину гліцерину і 0,5 М розчину сахарози в співвідношенні 1:1 (по 2,5 мл).

Склад сумішей розчинів сахарози і гліцерину можна міняти (у такому разі заповнюють додаткові пробірки), що може бути особливо необхідний при зміні об'єкту, оскільки кожний новий об'єкт вимагає індивідуального підбору кріопротекторів і їх сумішей.

Всі пробірки поміщають в охолоджуючу суміш, що складається з трьох частин снігу і однієї частини сухої кухонної солі (температура – 21 °С). Пробірки витримують в ній до повного замерзання вмісту.

Після цього пробірки розморожують при кімнатній температурі. Після відтаювання розчини ретельно перемішують і порівнюють інтенсивність їх забарвлення візуально (за 7-бальною системою – 1 – розчин з найсильнішими кріопротекторними властивостями, а 7 – з найслабшими) та за допомогою ФЕКу.

За отриманими результатами заповнюють таблицю 6.1:

Таблиця 6.1

№ п/п	Склад розчину	Забарвлення розчину після розмороження	Оптична густина розчину	Відносна кріопротекторна здатність розчинів
1.	Дистильована вода			
2.	2 М розчин сахарози			
3.	1 М розчин сахарози			
4.	12 % розчин гліцерину			
5.	2 М розчин сахарози : 12 % розчин гліцерину = 1 : 1			
6.	1 М розчин сахарози : 12 % розчин гліцерину = 1 : 1			
7.	0,5 М розчин сахарози : 12 % розчин гліцерину			

Завдання: розташувати пробірки в ряд за збільшенням інтенсивності забарвлення розчинів. Встановити зв'язок між інтенсивністю забарвлення розчинів і складом сумішей, що знаходяться в цих пробірках. Зробити висновки про роль кріопротекторів (сахарози і гліцерину) і їх сумішей в збереженні життєздатності клітин рослинних тканин при їх заморожуванні

### ***Завдання 2 Визначення жаростійкості за Мацковим***

Матеріали і обладнання: 1) водяна лазня; 2) плитка; 3) термометр; 4) кристалізатори; 5) біла пластикова пластина; 6) 0,2 М розчин HCl; 7) рослини різних екологічних груп (огірки, полин, кульбаба, кислиця, лобода і ін.); 8) листя різних ярусів.

#### Хід роботи

У водяній лазні підтримують температуру 40 °С. У воду опускають листя рослин, узятих для дослідів. Заздалегідь до їх черешків прикріплюють етикетки з вказівкою максимальної температури, при якій це листя витримуватиметься. Першу пробу витягують з лазні через 30 мін і тимчасово переносять в кристалізатор з водою кімнатної температури. Потім температуру в лазні піднімають на 5 °С.

Через 10 хв з неї витягують другу пробу листя, їх також переносять в кристалізатор з водою. Поступово температуру води в лазні доводять до 60°С, забираючи проби кожні 10 хв після збільшення температури в лазні на кожні 5 °С. Потім листя витягують з води кімнатної температури і заливають розчином 0,2М HCl, в якому листя набуває буре забарвлення (якщо у рослин клітинний сік кислий, то листя буріє вже у воді).

Час перебування в кислоті повинен бути однаковим для всього листя.

Через 10—20 хв листя витягують з розчину соляної кислоти, переносять у воду, промивають і розкладають на білій пластиковій пластині в порядку збільшення площі бурого забарвлення.

Завдання: порівняти ступінь пошкодження листя при різній температурі у різних рослин. Листя замальовати і розфарбувати пошкоджені ділянки.

## РОЗДІЛ 10. РІСТ ТА РОЗВИТОК РОСЛИН.

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2.5.1 РІСТ. ТРОПІЗМИ

**Ріст та розвиток** — це процеси новоутворення структурних елементів організму. В ці поняття входять як розуміння виникнення нових органів, тканин, клітин, органів, так і необоротне збільшення їх розмірів, тобто набуття якісних і кількісних відмінностей від попередніх онтогенетичних стадій.

#### *Завдання 1 Скарифікація насіння*

У ряді випадків спокій і непроростання насіння залежить від слабого проникнення покривів для води. Для прискорення проростання твердого насіння з метою руйнування насінних покривів або підвищення проникності шкірки насіння застосовують різні методи його механічної обробки, хімічні (обробка сірчаною або іншими кислотами) або фізичні (обшпарювання, прогрівання). Пошкодження покривів насіння для прискорення проростання насіння називають *скарифікацією*.

Матеріали і обладнання. 1) насіння гледичії; 2) сірчана кислота; 3) кипляча вода; 4) чашки Петрі; 5) фільтрувальний папір.

#### Хід роботи.

Для досліду беруть по 20 штук насіння гледичії на кожний варіант. Варіанти досліду: 1) непошкоджене насіння; 2) насіння з пошкодженою шкіркою; 3) насіння, яке занурюють на 10 с в киплячу воду; 4) насіння, яке обробляють протягом 30 хв концентрованою сірчаною кислотою, а потім ретельно відмивають водою; 5) насіння, яке протягом 30 хв струшують.

Після впливу перерахованих чинників насіння пророщують в чашках Петрі на вологому фільтрувальному папері у вологій камері. Через певну кількість днів обчислюють кількість насіння, яке проросло.

Завдання: в кінці досліду кількість насіння, яка проросло у варіантах, виражають у відсотках до кількості пророслого в контролі. Роблять висновок про вплив різних методів пошкодження шкірки насіння на його проростання.

#### *Завдання 2. Тропізми рослин*

**Тропізми** - ростові рухи (вигини) органу рослин, які виникають під дією односторонніх фізичних, хімічних і інших подразників. Тропізми точно орієнтовані по відношенню до напрямку дії подразників.

Розрізняють такі види тропізмів: фототропізм, викликаний одностороннім освітленням; геотропізм, який виявляється під дією сили земного тяжіння, і відповідно з іншими подразниками - *гідро-, аеро-, хемо-, травмо-, електро- і магніотропізм*.

Поява тропізмів залежить не тільки від подразника, але і від життєдіяльності рослини (фізіологічного стану органів і концентрацій фітогормонів в них). Порушення життєдіяльності рослини ослаблює реакції на подразнення, порушує його тропізми.

Завдання: навести приклади до різних видів тропізмів

#### *Завдання 3. Дослідження геотропізму*

Властивість органів рослини займати певне положення по відношенню до центру Землі називають геотропізмом. Для коренів властивий позитивний геотропізм. Завдяки цьому при проростанні насіння вони завжди занурюються в ґрунт. Стебло має негативний

геотропізм. Завдяки негативному геотропізму різні рослини при виляганні під впливом будь-якої механічної сили (вітру, дощу, граду) через деякий час підіймаються. Таке явище надзвичайно цінне для збереження врожаю. Воно можливе завдяки своєрідній будові стебла злаків (соломини), у вузлах якого (або над вузлом) тривалий час зберігається меристематична тканина, і тому може утворитися згин і рослина підіймається.

Геотропічні вигини, як і взагалі все тропізми, відбуваються лише в ростучих частинах стебла або кореня. Стебло або корінь прагнуть зайняти вертикальне положення щодо центру Землі. Таке положення називають *ортотропним*, а ці органи ортотропними. Проте не всі гілки і не всі корені характеризуються строго ортотропним положенням. Багато хто з них розташований під певним кутом до вертикальної осі. При цьому ті, що розташовуються під прямим кутом до неї, називають *діатропними*, а ті, що розташовані під тупим або гострим кутом - *плагіотропними*. Листя, бічні гілки і корінці займають одне з цих двох положень.

Геотропізм - важлива властивість рослин, яка виробилася в них в процесі історичного розвитку на самих ранніх етапах еволюції. Вже деяким водоростям властивий геотропізм.

Матеріали і обладнання. 1) насіння льону; 2) відрізок скла для закриття банки; 3) скляна пластинка, яка легко входить в банку; 4) темний м'який обгортувальний папір; 5) банки.

#### Хід роботи

Обгорнути скляну пластину папером і прикріпити до неї коренями вниз 5-8 насінин, які вже почали проростати. Поставити її вертикально в банці, на дно якої налити небагато води. Банку зверху закрити склом. Коли корінці виростуть на 5-10 мм, пластинку з насінням повернути на 90°, а на другий день на 180°. Спостерігати геотропічні вигини коренів, а потім і стебел.

Завдання: зробити висновок про вплив земного тяжіння на ріст коренів.

### ***Завдання 4 Гідротропізм***

Для коренів властивий гідротропізм. З його допомогою вони завжди ростуть у напрямку до більш зволоженої ділянки ґрунту. Гідротропічна чутливість рослин, як і геотропічна, зосереджена на кінці кореня.

Матеріали і обладнання. 1) насіння льону або гірчиці; 2) скляні пластинки; 3) шматок скла, не набагато більший отвори банки; 4) фільтрувальний папір; 5) банки.

#### Хід роботи.

В обидві банки наливають воду завтовшки приблизно 5 см, скляні пластинки обертають фільтрувальним папером, зволожують його і на одній із сторін розкладають в рядках сухе насіння льону або гірчиці. Стикаючись з вологою, насіння змочується і прилипає до паперу. Пластинку ставлять похило в банку, так, щоб насіння опинилось на нижній стороні пластинки. Одну банку накривають шматком скла, іншу залишають відкритою. Обидві банки ставлять в темне місце. В першій банці, де вологість рівномірна, корені будуть направлені вертикально до поверхні води по напрямку сили земного тяжіння. У відкритій банці, в якій верхні пласти повітря менш вологі, корені ростуть у напрямку до більшої вологості і стеляться по вологому фільтрувальному паперу.

Завдання: зробити висновки про причину росту кореня у певному напрямку.



### ***Завдання 5 Значення листа для вкорінення живців (за Руге)***

Матеріали і обладнання: 1) традесканція; 2) стакани фаянсові або скляні, обгорнуті чорним папером; 3) лезо бритви.

Ауксини утворюються у верхівкових меристемах стебел, в зародках, що ростуть, у верхівках колеоптилів, а також в листі, причому з листа вони транспортуються в стебла, де і можуть викликати утворення додаткових коренів. Порівняно небагато рослин (тополя, деякі види верби) містять в стеблах великий запас ауксинів і здатні до вкорінення безлистих живців. Для вегетативного розмноження більшості рослин використовують зелені (облиственні) живці.

#### ***Хід роботи***

Зрізати шість по можливості однакових живців традесканції з 5—6 листками. У двох живців видалити все листя, у двох інших залишити два верхні листи, у третьої пари залишити всі листки. Поставити живці в стакани з водопровідною водою і виставити на світло (у зв'язку з тим, що світло гальмує коренеутворення, потрібно використовувати фаянсові стакани або обернути скляні стакани чорним папером).

Завдання: через 1—2 тижні оглянути і замалювати рослини. Зробити висновок про значення листа для утворення додаткових коренів.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2.5.2 РОЗВИТОК. АНАЛІЗ ДОСЛІДУ.

### *Завдання 1 Скарифікація насіння*

Варіант досліджу	% пророслого насіння
1) непошкоджене насіння; 2) насіння з пошкодженою шкіркою; 3) насіння, яке занурюють на 10 с в киплячу воду; 4) насіння, яке обробляють протягом 30 хв концентрованою сірчаною кислотою, а потім ретельно відмивають водою; 5) насіння, яке протягом 30 хв струшують.	

*Завдання 2 Проаналізувати особливості розвитку (фази) 5 культур  
Льону, соняшнику, пшениці, сосни, яблуні.*

### *Завдання 3. Дослідження геотропізму*

Замалювати дві склянки (на початку досліджу та вкінці)

### *Завдання 4 Гідротропізм*

Замалювати дві склянки (на початку досліджу та вкінці)

### *Завдання 5 Значення листя для вкорінення живців (за Руге)*

Замалювати дві склянки (на початку досліджу та вкінці)

Завдання: Провести аналіз результатів робіт, які були розпочаті на лабораторній роботі 2.5.1 зробити малюнки та висновки.