

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ,  
НАУКИ И КАДРОВОЙ ПОЛИТИКИ

Учреждение образования  
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ  
ОРДЕНОВ ОКТЯБРЬСКОЙ РЕВОЛЮЦИИ  
И ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

В. П. Моисеев, Н. А. Дуктова, А. И. Мыхлык

# ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

## ПРАКТИКУМ

*Рекомендовано учебно-методическим объединением  
по образованию в области сельского хозяйства  
в качестве учебно-методического пособия  
для студентов учреждений, обеспечивающих получение  
общего высшего образования по специальностям  
6-05-0811-01 Производство продукции растительного  
происхождения, 6-05-0811-05 Защита растений и карантин*

Горки  
БГСХА  
2023

УДК 581.19(075.8)

ББК 28.57я73

М74

*Рекомендовано методической комиссией  
агротехнологического факультета 26.09.2023 (протокол № 1)  
и Научно-методическим советом БГСХА  
27.09.2023 (протокол № 1)*

Авторы:

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *В. П. Моисеев*;  
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *Н. А. Дуктова*;  
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *А. И. Мыхлык*

Рецензенты:

доктор сельскохозяйственных наук, профессор,  
член-корреспондент НАН Беларуси *Э. П. Урбан*;  
кандидат биологических наук, доцент *И. А. Жарина*

**Моисеев, В. П.**

М74

Физиология и биохимия растений. Практикум : учебно-методическое пособие / В. П. Моисеев, Н. А. Дуктова, А. И. Мыхлык. – Горки : БГСХА, 2023. – 189 с.  
ISBN 978-985-882-443-3.

Практикум включает материал, необходимый для изучения физиологических процессов растений, освоения методов химического анализа растительных тканей и органов, оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. Практикум состоит из 8 разделов, соответствующих разделам учебной программы курса «Физиология и биохимия растений» для агрономических специальностей. Каждый раздел имеет теоретическую часть и ряд лабораторных работ. Лабораторные работы включают краткое теоретическое обоснование, цель и ход выполнения работ, формы систематизации полученных результатов, материалы и оборудование, необходимые для выполнения работ, а также вопросы для самостоятельного контроля знаний. Теоретическое обоснование разделов и лабораторных работ дополнено и скорректировано в соответствии с современными представлениями о физиологических процессах. Методики работ составлены с учетом имеющихся на кафедре приборов и оборудования.

Для студентов учреждений, обеспечивающих получение общего высшего образования по специальностям 6-05-0811-01 Производство продукции растительного происхождения, 6-05-0811-05 Защита растений и карантин.

УДК 581.19(075.8)

ББК 28.57я73

**ISBN 978-985-882-443-3**

© УО «Белорусская государственная  
сельскохозяйственная академия», 2023

## ВВЕДЕНИЕ

Лабораторные занятия являются важным звеном в системе практического обучения студентов агрономических специальностей. Они позволяют закрепить полученные теоретические знания, способствуют развитию самостоятельной и творческой работы. На лабораторных занятиях студенты изучают методы физиолого-биохимических исследований, приобретают навыки практической работы с приборами и оборудованием, планируют и выполняют эксперименты, учатся систематизировать и анализировать полученные результаты, представлять их в виде графиков и диаграмм, выявлять закономерности и делать выводы. Полученный опыт пригодится будущим специалистам-агрономам при оценке химического состава и качества продукции растениеводства, при диагностике физиологического состояния растений, определении темпов их роста и развития, оценке устойчивости к неблагоприятным факторам среды.

Лабораторные занятия проводятся в лаборатории физиологии и биохимии растений, оснащенной соответствующими приборами и оборудованием.

Перед началом занятий дежурный, назначаемый старостой группы, получает у лаборанта кафедры практикум для всех студентов группы (подгруппы) и материалы, необходимые для проведения занятий.

Группа (подгруппа) студентов делится на 3...4 бригады. Каждая бригада выполняет отдельный вариант опыта. Полученные результаты систематизируются в таблицах, представляются в виде графиков и рисунков, затем анализируются. По каждой работе студенты делают выводы.

Выполненные лабораторные работы оформляются студентами в рабочих тетрадях по определенным правилам: указываются номер и название работы, записываются краткое теоретическое обоснование, цель работы, ход ее выполнения, результаты опытов (таблицы, рисунки, графики), выводы, вопросы для самоконтроля знаний.

Каждую работу студент сдает преподавателю (устно, письменно или путем компьютерного тестирования).

Важнейшее требование, предъявляемое к студентам при выполнении лабораторных работ, – соблюдение правил техники безопасности.

## Раздел 1. ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Растительная клетка является элементарной структурной и функциональной единицей растительного организма, так как все его ткани и органы состоят из клеток, в клетке протекают все физиологические процессы, характерные для организма в целом. Клетка – открытая биологическая система, обменивающаяся с внешней средой веществом, энергией и информацией. Единство этих процессов составляет сущность жизни.

Растительная клетка состоит из клеточной стенки и протопласта. В состав протопласта входят цитоплазма и органоиды, которые выполняют специфические функции: ядро – хранение и передача наследственной информации, регулирование всей жизнедеятельности клетки; хлоропласты – фотосинтез; митохондрии – дыхание; рибосомы – синтез белка; лизосомы – расщепление сложных органических веществ; аппарат Гольджи – синтез полисахаридов, белков и липидов, необходимых для построения мембран и оболочки (секреторная функция); пероксисомы – фотодыхание; глиоксисомы – превращение жиров в углеводы; эндоплазматическая сеть связывает между собой все органоиды, она выполняет транспортную, сигнальную и синтетическую функции. Цитоплазма всех клеток ткани, соединенная плазмодесмами, называется *симпластом*.

До 90 % объема взрослой клетки занимает вакуоль. Она заполнена клеточным соком – водным раствором минеральных и органических веществ (солей, сахаров, органических кислот, аминокислот, белков, пигментов, алкалоидов, гликозидов и др.). Вакуоли определяют осмотические свойства растительных клеток – их способность поглощать и выделять воду. Благодаря поступлению воды в вакуоль в клетках поддерживается тургорное давление, определяющее прочность и упругость растительных тканей.

*Клеточная стенка* выполняет опорную, защитную и транспортную функции. Основными ее химическими компонентами являются углеводы: целлюлоза (прочная арматура), пектиновые вещества и гемцеллюлоза (полужидкий матрикс). Клеточная стенка обладает прочностью, эластичностью, ограниченной растяжимостью, высокой адсорбирующей способностью, хорошей проницаемостью для воды, минеральных и органических веществ. Совокупность клеточных стенок и межклетников растительных тканей называют *апопластом*.

Основной принцип структурной организации клетки – мембранный. На долю мембран приходится более 50 % сухой массы протоплазмы. Важнейшим свойством мембран является их избирательная проницаемость (работы 1 и 2).

Основными химическими компонентами клетки являются углеводы, липиды и белки, а также (вещества первичного происхождения).

**Углеводы** – класс органических соединений, включающий моно-, олиго- и полисахариды. Углеводы являются первыми продуктами фотосинтеза, структурными и запасными веществами клетки, основными субстратами дыхания.

**Моносахариды** являются производными многоатомных спиртов, имеющих альдегидную (у альдоз) или кетонную (у кетоз) группу и 3...7 атомов углерода (триозы, тетрозы, пентозы, гексозы, гептозы). Триозы – *глицериновый альдегид* и *диоксиацетон*, тетрозы – *эритроза*, пентозы – *рибоза*, *рибулоза*, *ксилоза* и *ксилулоза* – являются промежуточными веществами синтеза и распада углеводов (циклы Кальвина, Кребса, пентозофосфатный, глиоксилатный). Пентозы – *рибоза* и *дезоксирибоза* входят в состав нуклеиновых кислот (РНК, ДНК). Рибоза входит также в состав макроэргических соединений (АТФ), коферментов дегидрогеназ (НАД, НАДФ, ФАД) и некоторых витаминов (В<sub>2</sub>). Гексозы – *глюкоза*, *фруктоза*, *галактоза*, *манноза* – являются транспортными и запасными веществами. Пентозы и гексозы входят в состав многих олиго- и полисахаридов.

**Олигосахариды** состоят из 2...10 остатков моносахаридов. Наиболее распространенными являются **дисахариды** (*сахароза* – состоит из остатков глюкозы и фруктозы, *мальтоза* – состоит из двух остатков глюкозы) и **трисахариды** (*раффиноза* – состоит из остатков галактозы, глюкозы и фруктозы).

Моно- и олигосахариды (сахара) – кристаллические, растворимые в воде вещества, имеющие сладкий вкус. Многие из них обладают восстанавливающими (редуцирующими) свойствами (см. работу 3).

**Полисахариды** – полимеры, состоящие из десятков или сотен остатков моносахаридов. Как правило, они в воде не растворяются, или образуют вязкие растворы. Полисахариды являются веществами структурными (*целлюлоза*, *гемиллюлоза*, *пектиновые вещества*) или запасными (*крахмал*, *инулин*). Крахмал – запасной полисахарид многих растений (злаков, бобовых, картофеля и других культур), откладывается в виде крахмальных зерен различных размеров и формы. При прорастании семян крахмал гидролизует с участием ферментов амилаз до мальтозы и глюкозы (см. работу 9).

**Липиды** – это жиры и жироподобные вещества (липоиды). Растительные *жиры* являются, как правило, запасными веществами. К *липоидам* относят фосфолипиды и гликолипиды (структурные компоненты мембран и цитоплазмы), воска (защитные вещества), стероиды (физиологически активные вещества). По химической природе липиды – простые или сложные эфиры спиртов (одно- или многоатомных) и высокомолекулярных карбоновых (жирных) кислот. Наиболее распространенными у растительных жиров *предельными* (ненасыщенными водородом) жирными кислотами являются пальмитиновая и стеариновая, к *непредельным* (ненасыщенным водородом, имеющим двойные связи) относятся олеиновая, линолевая, линоленовая. Свойства липидов характеризуют константы: температура плавления, кислотное число (см. работу 4), число омыления, йодное число (см. работу 46).

**Белки** – высокомолекулярные полимерные азотсодержащие неразветвленные соединения, состоящие из аминокислот. Белки имеют сложное строение, которое характеризуют четыре вида структур – первичная, вторичная, третичная и четвертичная. Белки классифицируют по строению (простые и сложные) и растворимости (водорастворимые, солерастворимые, щелочерастворимые, спирторастворимые). Простые белки (*протеины*) состоят только из аминокислот. Сложные белки (*протеиды*) – это белки, в состав которых, кроме аминокислот входят другие соединения – углеводы (у гликопротеидов), липиды (у липопротеидов), нуклеиновые кислоты (у нуклеопротеидов), металлы (у металлопротеидов). Белки, растворимые в воде, называют *альбуминами*, растворимые в слабых растворах солей – *глобулинами*, растворимые в слабых растворах щелочей – *глотелинами*, растворимые в этиловом спирте – *проламинами*).

Важнейшими свойствами белков являются амфотерность, заряд (см. работу 5), низкая диффузионная подвижность, высокая реакционная способность, чувствительность к различным факторам, способность к самоорганизации и специфическому взаимодействию по принципу комплементарности, способность катализировать химические реакции. Белки выполняют в клетках различные функции: структурную, запасную, транспортную, сигнальную, защитную, регуляторную, ферментативную (или каталитическую).

**Ферменты** – это биокатализаторы белковой природы, регулирующие скорость и направленность биохимических реакций, протекающих в клетках всех живых организмов.

По строению ферменты подразделяют на однокомпонентные и двухкомпонентные. *Однокомпонентные* ферменты состоят только из белка, *двухкомпонентные* – из белковой части (*апофермента*) и небелковой части (*кофермента* или *простетической группы*). В состав небелковой части могут входить *нуклеотиды* (НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>, ФАД, КоА), *витамины* (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, РР и др.) или их производные, *микроэлементы* (Fe, Cu, Zn, М) или другие вещества.

Каждый фермент имеет *активный центр*, в котором происходит связывание и превращение субстрата.

Некоторые ферменты имеют *аллостерический центр*, к которому могут присоединяться вещества-эффекторы, изменяющие структуру активного центра и повышающие или понижающие активность ферментов.

От неорганических катализаторов ферменты отличаются: *высокой каталитической активностью* – небольшое количество фермента может превращать большое количество субстрата; *специфичностью действия* – ферменты катализируют строго определенные химические реакции; *лабильностью* – их активность зависит от условий среды, кислотности (см. работу 7), температуры (см. работу 9), активаторов и ингибиторов, концентрации фермента и субстрата; *обратимостью действия* – ферменты могут катализировать как прямые, так и обратные реакции; *имеют 100%-ный выход конечных продуктов реакции* – не дают побочных продуктов реакции.

Все ферменты в зависимости от характера катализируемых реакций подразделяют на шесть классов:

1. *Оксидоредуктазы* катализируют окислительно-восстановительные реакции (*дегидрогеназы* (см. работу 6) – отнятие или присоединение водорода, *оксидазы* – присоединение кислорода, *цитохромы* – отнятие или присоединение электронов).

2. *Трансферазы* катализируют реакции переноса различных радикалов или молекул (*гликозилтрансферазы* – переносят остатки моносахаридов, *ацилтрансферазы* – переносят остатки жирных кислот, *аминотрансферазы* – переносят остатки аминокислот).

3. *Гидролазы* катализируют реакции гидролиза сложных органических соединений на простые (*эстеразы* – гидролизуют сложные эфиры, *карбогидразы* – углеводы, *протеазы* – белки).

4. *Лиазы* катализируют реакции негидролитического расщепления веществ (*C-C-лиазы*, *C-N-лиазы*, *C-S-лиазы*), при этом образуются непредельные соединения, имеющие двойные связи.

5. *Изомеразы* катализируют реакции изомеризации (рецемазы, эписимеразы).

6. *Лигазы* (синтегазы) катализируют реакции синтеза сложных органических веществ путем образования новых связей между атомами (C-C-лигазы, C-N-лигазы, C-S-лигазы).

**Вещества вторичного происхождения** являются промежуточными или конечными веществами обмена углеводов, липидов, азотистых соединений. К ним относятся органические кислоты (работа 47), алкалоиды (работа 48), дубильные вещества (работа 49), гликозиды, эфирные масла и смолы, фитонциды и др.

Методы их количественного и качественного определения изучаются в разделе 8 «Физиология и биохимия формирования качества урожая сельскохозяйственных культур».

### **Работа 1. Проницаемость живой и мертвой протоплазмы**

Под *проницаемостью протоплазмы* понимают ее способность пропускать через себя вещества. При полной проницаемости, которая характерна для поврежденных и мертвых клеток, все вещества свободно поступают в клетки и выделяются из них.

Протоплазма живых клеток обладает *избирательной* проницаемостью, т. е. способна пропускать в клетку лишь определенные, как правило, необходимые для жизнедеятельности вещества и выделять во внешнюю среду продукты жизнедеятельности. Благодаря избирательной проницаемости в клетке поддерживается *гомеостаз* – постоянство химического состава и стабильность всех биохимических и физиологических параметров. Избирательная проницаемость обусловлена всей совокупностью физико-химических свойств цитоплазмы и мембран.

**Цитоплазма** (гиалоплазма или цитозоль) – относительно однородная коллоидная субстанция, содержащая белки, липиды, нуклеиновые кислоты, полисахариды, минеральные вещества. Цитоплазма способна изменять свою вязкость, переходя из золя в гель и обратно. Это позволяет регулировать транспорт веществ и функциональную активность отдельных клеточных органелл в меняющихся условиях среды.

**Мембраны** – ультратонкие структуры, окружающие цитоплазму и органоиды клетки (кроме рибосом). Внешняя цитоплазматическая мембрана (*плазмолемма*) отделяет цитоплазму от клеточной стенки, а внутренняя (*тонопласт*) – от вакуоли. Некоторые органоиды имеют внутренние мембранные структуры, увеличивающие их внутреннюю



поверхность: хлоропласты – ламеллы гран, митохондрии – кристы, аппарат Гольджи – диктиосомы и везикулы.

Мембраны (рис. 1.1) состоят из двух мономолекулярных слоев, *периферических белков*, между которыми расположен один бимолекулярный слой *фосфолипидов*. В мембранах имеются также *интегральные белки* (пронизывают мембраны насквозь, выполняют функции ионных насосов или каналов, пропускающих гидрофильные вещества) и *полуинтегральные белки* (частично погружены в мембрану, выполняют роль катализаторов или рецепторов).

Фосфолипиды имеют жидкую консистенцию и образуют непроницаемый для гидрофильных веществ слой. Молекулы воды благодаря малым размерам проходят через мембраны свободно. Гидрофобные вещества растворяются в липидах мембран и проходят через них легче, чем гидрофильные, размеры которых больше, так как они окружены гидратными оболочками. Ионы проходят через мембраны, как правило, активно – с затратами энергии, при участии ионных насосов.

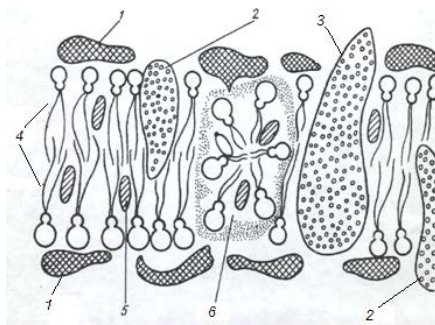


Рис. 1.1. Схема строения элементарной клеточной мембраны:

- 1 – мономолекулярные слои периферических белков;
- 2 – полуинтегральные белки;
- 3 – интегральные белки;
- 4 – бимолекулярный слой фосфолипидов;
- 5 – молекулы нейтральных липидов;
- 6 – липидная мицелла

Основные *свойства* мембран: избирательная проницаемость, жидкая консистенция, динамичность, асимметричность.

Мембраны органоидов выполняют различные *функции*: энергетическую (митохондрий, хлоропластов), синтетическую (аппарата Гольджи, эндоплазматической сети), рецепторную, сигнальную, барьерную (плазмолемма), интегральную (эндоплазматической сети).

Структура, свойства и проницаемость мембран и цитоплазмы изменяются под действием различных факторов: температуры, водобеспеченности, кислотности среды, возраста, физиологического состояния растений и других факторов. Так, при низких положительных температурах вязкость цитоплазмы повышается, а ее проницаемость

для воды, минеральных веществ и продуктов обмена снижается, что является причиной повреждения и гибели теплолюбивых растений. Высокие температуры, кислоты, щелочи, механическое действие вызывают денатурацию белков. Органические растворители (спирт, бензин, ацетон) вымывают из клеток гидрофобные вещества (жиры, некоторые белки). Нарушение структуры мембран и цитоплазмы ведет к частичной или полной потере избирательной проницаемости. При этом вещества, содержащиеся в цитоплазме и вакуолях (соли, сахара, кислоты, пигменты), свободно диффундируют из клеток, а вещества, находящиеся за ее пределами, свободно проникают в клетки.

Интенсивность выхода веществ из клеток является показателем степени их повреждения. Визуально *степень нарушения избирательной проницаемости можно определить по выходу из клеток пигментов*, которые окрашивают раствор или воду, в которых находятся.

В живых клетках, протоплазма которых обладает избирательной проницаемостью, могут проявляться осмотические явления (см. работу 12). В данной работе для определения жизнеспособности клеток используется явление *плазмолиза*. Для этого тонкие срезы растительных тканей погружают в солевой раствор, концентрация которого выше концентрации клеточного сока (гипертонический), и в микроскоп наблюдают за изменениями, возникающими в клетках. В живых клетках возникает явление *плазмолиза – цитоплазма отделяется от клеточных стенок* сначала по уголкам, а затем по всей окружности.

Указанные выше особенности проницаемости живых и поврежденных клеток лежат в основе различных физиологических методов определения жизнеспособности растений или их органов (меристем, семян и т. д.).

**Цель работы:** установить влияние высокой температуры, хлороформа, уксусной кислоты и спирта на проницаемость протоплазмы.

**Ход работы.** Из корнеплода столовой свеклы пробочным сверлом делают пять высечек, помещают их на стеклянные пластинки и из средней части вырезают лезвием бритвы или ланцетом кусочки длиной 2 см, которые сначала промывают в проточной воде, а затем для полного удаления клеточного сока из порезанных клеток на 5...10 мин помещают в фарфоровые чашки с водопроводной водой.

Промытые высечки переносят в пять пробирок. В две из них наливают по 10 мл воды, одну оставляют в качестве контроля, а другую кипятят с кусочком свеклы в течение 3 мин, затем горячую воду сливают и наливают снова 10 мл холодной воды.

В третью пробирку наливают 0,5 мл хлороформа и 9,5 мл воды, в четвертую – 10 мл 30%-ного раствора уксусной кислоты, в пятую – 10 мл 50%-ного раствора этилового спирта.

Через час жидкости в пробирках перемешивают и сравнивают их окраску.

Для определения жизнеспособности клеток по осмотическим свойствам кусочки свеклы вынимают из пробирок, делают тонкие, пригодные для микроскопии срезы, помещают их на предметные стекла в каплю 1,0 М раствора NaCl, покрывают покровными стеклами и рассматривают под микроскопом при малом увеличении (объективы  $\times 8$ ,  $\times 10$ ).

Результаты наблюдений заносят в табл. 1.1.

Таблица 1.1. **Влияние различных факторов на проницаемость протоплазмы**

Вариант опыта	Степень окраски растворов (сильная, слабая)	Наличие плазмолиза (есть, нет)	Состояние протоплазмы клеток (живая, поврежденная)
Высокая температура			
Хлороформ			
Уксусная кислота			
Спирт			
Вода (контроль)			

На основании полученных результатов делают выводы о влиянии изучаемых факторов на проницаемость протоплазмы и жизнеспособность клеток.

**Материалы и оборудование:** корнеплод столовой свеклы, 30%-ный раствор уксусной кислоты, хлороформ, 50%-ный раствор этилового спирта, пробирки, мерные цилиндры на 10 мл, пипетки, лезвия или ланцеты, пробочные сверла (внутренний диаметр 8...10 мм), препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, фарфоровые чашки, микроскопы.

### Контрольные вопросы

1. Что понимают под проницаемостью протоплазмы (избирательной, полной)?
2. Чем обусловлена избирательная проницаемость протоплазмы и какое значение она имеет для клетки?

3. Какими свойствами обладает цитоплазма? Как изменяется проницаемость цитоплазмы при ее переходе из состояния золя в гель и обратно?

4. Какое строение имеют мембраны клеток? Назовите их свойства и функции.

5. На чем основаны методы определения жизнеспособности клеток в данной работе?

6. Как влияют условия среды (высокие температуры, органические растворители, кислоты, хлороформ) на проницаемость протоплазмы и жизнеспособность клеток? Каков механизм повреждающего действия этих факторов?

## **Работа 2. Влияние ионов калия и кальция на состояние протоплазмы**

Наибольшее влияние на состояние протоплазмы, ее вязкость и проницаемость оказывает ионный состав среды. Характер действия одно- и двухвалентных катионов различен. Одновалентные ионы понижают вязкость протоплазмы, а двухвалентные – повышают.

В данной работе о влиянии одно- и двухвалентных катионов на вязкость протоплазмы судят по форме плазмолиза, возникающего в клетках, погруженных в растворы различных солей. При высокой вязкости протоплазмы возникает *уголковый* плазмолиз – цитоплазма сначала отделяется в уголках клеток, затем он переходит в *вогнутый* – цитоплазма отделяется от клеточных стенок в других местах, или *судорожный* – цитоплазма сильно сжимается, но в некоторых местах не отделяется от клеточных стенок. При низкой вязкости протоплазмы наблюдается *выпуклый* плазмолиз – цитоплазма быстро отделяется по всей длине клеточных стенок и приобретает шаровидную форму (рис. 12.1, работа 12).

**Цель работы:** изучить влияние одно- и двухвалентных катионов на состояние (вязкость) протоплазмы.

**Ход работы.** На предметное стекло наносят каплю 1,0 М  $\text{KNO}_3$ , помещают в нее кусочек эпидермиса чешуи лука или листочек элодеи и накрывают покровным стеклом.

Препарат помещают на предметный столик микроскопа и рассматривают при малом увеличении объектива ( $\times 8$ ,  $\times 10$ ), наблюдают за скоростью отделения цитоплазмы от клеточной стенки, определяют форму плазмолиза и делают зарисовки клеток.

Аналогичным образом готовят другой препарат, помещая объект в 0,7 М  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .

После сравнения рисунков делают выводы о влиянии одно- и двухвалентных катионов на состояние (вязкость) протоплазмы.

Результаты наблюдений заносят в табл. 2.1.

Таблица 2.1. Влияние ионов калия и кальция на форму плазмоллиза

Вариант (концентрация, соль)	Рисунки клеток	Форма плазмоллиза	Вязкость протоплазмы
1,0 М $\text{KNO}_3$			
0,7 М $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$			

**Материалы и оборудование:** луковица лука, элодея; 1,0 М раствор  $\text{KNO}_3$ , 0,7 М раствор  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; лезвия, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, стеклянные палочки, микроскопы.

### Контрольные вопросы

1. Какое влияние на состояние протоплазмы оказывает ионный состав среды?
2. На чем основан метод определения влияния одно- и двухвалентных катионов на вязкость протоплазмы?
3. Почему в растворах одно- и двухвалентных катионов наблюдается различная форма плазмоллиза?

### Работа 3. Обнаружение редуцирующих сахаров в репродуктивных органах растений

*Редуцирующие сахара* – это углеводы, обладающие восстанавливающими свойствами. Редуцирующие сахара способны отдавать водород, т. е. восстанавливать более окисленные соединения, например, окиси металлов. Редуцирующие сахара при этом окисляются до соответствующих кислот и фрагментируются (распадаются).

Редуцирующими свойствами обладают как открытые (*цепные*) формы моносахаридов, имеющие свободную альдегидную группу (альдозы) – *глюкоза, манноза, галактоза, рибоза, ксилоза*, или кетонную группу (кетозы) – *фруктоза, рибулоза, ксилулоза*, так и циклические (или *кольчатые*) формы (*фуранозы и пиранозы*), имеющие свободный *гликозидный* гидроксил (рис. 3.1 и 3.2).

Редуцирующими свойствами обладают и некоторые олигосахариды, например, мальтоза, состоящая из двух остатков  $\alpha$ -D-глюкопира-

нозы, соединенных  $\alpha(1\rightarrow4)$ -связью, так как у одного остатка глюкозы гликозидный гидроксил остается свободным.

Сахароза и полисахариды восстанавливающими (редуцирующими) свойствами не обладают, так как гликозидные гидроксилы моносахаридов, входящие в их состав, участвуют в образовании гликозидных связей между ними (рис. 3.3).

Органы растений отличаются как по содержанию, так и составу сахаров. Например, в корнеплодах сахарной свеклы содержится 15...20 % сахаров, представленных главным образом сахарозой. В корнеплодах моркови содержится около 8 % сахаров, из которых 7 % – фруктоза. Ягоды винограда содержат 15...25 % сахаров, состоящих из примерно равного количества глюкозы и фруктозы.

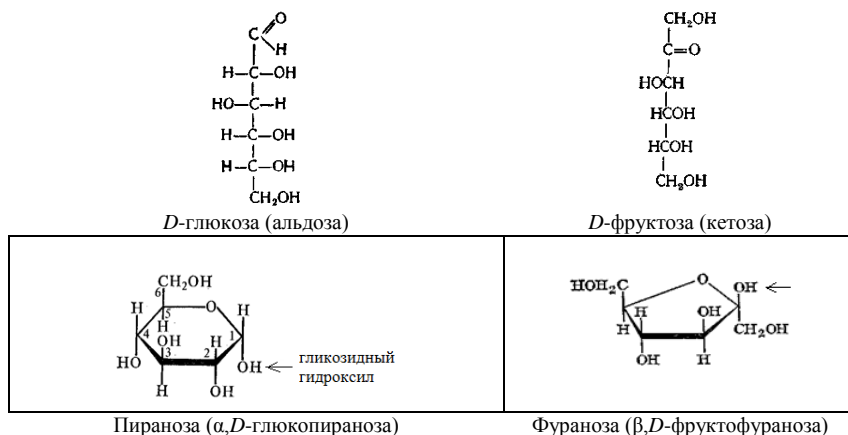


Рис. 3.1. Цепные и кольчатые формы глюкозы и фруктозы



Рис. 3.2. Циклизация глюкозы

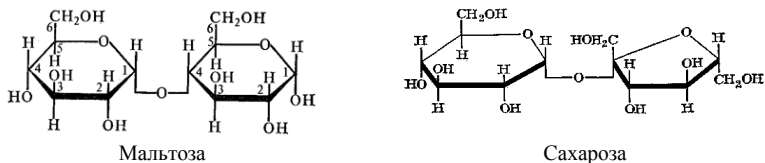


Рис. 3.3. Структура дисахаридов мальтозы и сахарозы

В клубнях картофеля содержится незначительное количество редуцирующих сахаров (глюкоза и фруктоза), а основным запасным углеводом является крахмал, содержание которого составляет 20...25 %. Картофель с высоким содержанием редуцирующих сахаров нежелательно использовать для производства картофельных чипсов (происходит потемнение продукта).

Редуцирующие свойства сахаров используются при их количественном и качественном определении в растительных тканях или растворах. Так, в щелочной среде редуцирующие сахара способны восстанавливать окиси металлов. Например, окись меди в присутствии редуцирующих сахаров восстанавливается до закиси меди, а окись серебра – до металлического серебра, выпадающего в осадок.

В работе для обнаружения редуцирующих сахаров в водных экстрактах растений используется реактив Фелинга (фелингова жидкость) – раствор  $\text{CuSO}_4$  и тартрата калия-натрия в 10%-ном растворе  $\text{NaOH}$ .

Смесь из равных частей растительных экстрактов и фелинговой жидкости нагревают до кипения, и в присутствии редуцирующих сахаров осаждаются оксид или гидроксид меди. Цвет осадка от желтого до красного, иногда зеленого в зависимости от степени дисперсности и размера его частиц.

**Цель работы:** определить наличие редуцирующих сахаров в корнеплодах моркови и свеклы, клубнях картофеля, ягодах, плодах или других объектах.

**Ход работы.** Для получения водной вытяжки редуцирующих сахаров берут по 5 г растительного материала, помещают в фарфоровые ступки и растирают пестиком до однородного состояния. Затем в ступки приливают по 15 мл дистиллированной воды, содержимое перемешивают и переносят через воронки в колбочки на 50 мл. Ступки и пестики ополаскивают 5 мл воды, которую сливают в те же колбочки.

Для экстракции сахаров содержимое колб нагревают в водяной бане или термостате при температуре 50 °С в течение 10 мин, а затем

фильтруют через ватный фильтр в чистые пробирки. *Нагревание мезги из клубней картофеля при более высоких температурах приведет к образованию крахмального клейстера, который не фильтруется!*

По 2 мл фильтрата переносят в чистые пробирки для обнаружения редуцирующих сахаров. В качестве контроля используют 2 мл 1%-ного раствора глюкозы или фруктозы (редуцирующие сахара) и 2 мл 1%-ного раствора крахмального клейстера (не обладает редуцирующими свойствами). Во все пробирки наливают по 2 мл реактива Фелинга и содержимое пробирок осторожно доводят до кипения на пламени газовых горелок. Изменение синей окраски на желтую или оранжевую, или выпадение красно-коричневого осадка закиси меди свидетельствует о наличии редуцирующих сахаров.

Нельзя прерывать ход определения, его нужно доводить до конца, иначе осадок закиси меди может частично окислиться и тем самым исказить результаты анализа. Прокипяченную пробу с реактивом Фелинга нельзя оставлять на воздухе продолжительное время (на 30 мин и более), так как реактивы при длительном нахождении в смеси и соприкосновении с воздухом могут образовывать некоторое количество закиси меди, что также искажает результаты анализа.

Результаты опыта заносят в табл. 3.1, анализируют и указывают причину изменения окраски или выпадения осадка.

Таблица 3.1. Схема опыта и результаты

Вариант опыта	Результат реакции с жидкостью Фелинга (изменение окраски, выпадение осадка)	Объяснение результатов
Вытяжка из корнеплода моркови		
Вытяжка из корнеплода свеклы		
Вытяжка из плодов (яблоко, груша)		
Вытяжка из клубня картофеля		
Раствор глюкозы или фруктозы (контроль 1)		Глюкоза (фруктоза) обладает редуцирующими свойствами
Раствор крахмального клейстера (контроль 2)		Крахмал не обладает редуцирующими свойствами

**Материалы и оборудование:** корнеплоды (морковь, сахарная или кормовая свекла), клубни (картофель), плоды (яблоки, груши), 1%-ный



крахмальный клейстер, 1%-ный раствор глюкозы или фруктозы, реактив Фелинга, пробирки, держатели пробирок, колбочки на 50 мл, воронки, вата, мерные пипетки на 10...20 мл, терка, ножи.

### Контрольные вопросы

1. Как классифицируют углеводы, какое строение они имеют, какую роль выполняют в растениях? Назовите представителей и свойства углеводов (см. стр. 5).
2. Какими свойствами обладают редуцирующие сахара, какое строение они имеют, какое влияние оказывают на технологические качества продукции растениеводства?
3. На чем основаны методы качественного и количественного определения редуцирующих сахаров? Какой метод используется в данной работе, в чем заключается его сущность?
4. Объясните результаты опытов.

### Работа 4. Определение кислотного числа жиров

Жиры и липоиды (жироподобные вещества) относятся к липидам.

Жиры являются основными запасными веществами растений, они в большом количестве накапливаются в семенах масличных культур (до 35...60 %). Липоиды (фосфолипиды, гликолипиды, воска, стероиды) выполняют в основном структурную и защитную функции.

Жиры – это сложные эфиры высокомолекулярных карбоновых кислот (жирных кислот) и трехатомного спирта глицерина.

Свойства жиров характеризуют ряд показателей (констант) – температура плавления, йодное число, число омыления, кислотное число.

**Температура плавления** – это температура перехода жира из твердого состояния в жидкое. Чем ниже молекулярная масса и тем выше степень неопределенности жирных кислот, входящих в состав жира, тем ниже температура плавления. Растительные жиры имеют более низкую температуру плавления – плавятся, как правило, при отрицательных температурах. При плюсовых температурах они имеют жидкую консистенцию и поэтому называются маслами.

**Йодное число** – это количество граммов галогена (в пересчете на йод), которое способно присоединяться к 100 г жира. Йодное число характеризует степень неопределенности жирных кислот, входящих в состав жира (работа 46).

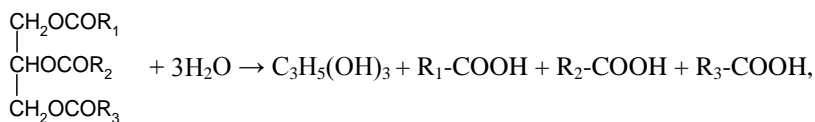
**Число омыления** – количество миллиграммов гидроксида калия, необходимое для нейтрализации свободных и связанных в виде ацилглицеринов кислот, содержащихся в 1 г жира. Число омыления характеризует среднюю величину молекулярной массы ацилглицеринов, которые входят в состав жиров.

**Кислотное число жира** определяется количеством миллиграммов гидроксида калия, которое необходимо для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира. т. е., кислотное число характеризует содержание в жирах свободных жирных кислот.

Величина этого показателя изменяется при созревании, хранении и прорастании семян различных культур, а также хранении пищевых жиров.

В процессе созревания семян кислотное число жира снижается, так как жирные кислоты связываются с глицерином и образуются триацилглицерины (жиры). При прорастании семян кислотное число жира повышается, так как жиры гидролизуются с образованием глицерина и свободных жирных кислот. При длительном хранении жиры гидролизуются и окисляются с образованием жирных кислот, альдегидов и кетонов, придающих жирам неприятный запах и вкус (прогоркают). Чем выше кислотное число пищевого жира, тем ниже его качество.

Гидролиз жира происходит по схеме:



где  $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$  – глицерин,  $\text{R-COOH}$  – остатки жирных кислот.

Наиболее распространенными жирными кислотами растительных жиров являются пальмитиновая, стеариновая, арахиновая (предельные или насыщенные водородом) и олеиновая, линолевая, линоленовая, эруковая (непредельные или ненасыщенные водородом).

В основе метода определения кислотного числа жиров лежит способность свободных жирных кислот реагировать со щелочами.

Сначала жир растворяют в смеси спирта с эфиром, а затем титруют 0,1 н. гидроксидом калия в присутствии индикатора фенолфталеина до появления розовой окраски.

**Цель работы:** определить кислотное число жиров различного происхождения и срока хранения (подсолнечного, рапсового, оливкового, льняного, маргарина, сливочного масла и др.).

**Ход работы.** На аналитических весах взвешивают чистую сухую колбу на 50 мл, вносят в нее около 1 г жира (масла) и снова взвешивают. Точную навеску жира (масла) определяют по разности между весом колбы с жиром и весом пустой колбы.

Затем в колбу с жиром приливают 30 мл нейтрализованной смеси спирта с эфиром, закрывают корковой пробкой и перемешивают до полного растворения жира. Затем к раствору жира прибавляют 4...5 капель 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н. водным раствором КОН до розовой окраски.

До или после титрования опытного раствора проводят контрольное титрование: в присутствии фенолфталеина титруют 30 мл смеси спирта с эфиром.

При анализе темноокрашенного масла используют 1%-ный спиртовой раствор тимолфталеина и титруют до появления синей окраски.

Кислотное число жира вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 5,61}{H},$$

где  $X$  – кислотное число, мг/г;

$a$  – объем 0,1 н. раствора КОН, пошедшего на титрование навески жира, мл;

$b$  – объем 0,1 н. раствора КОН, пошедшего на контрольное титрование, мл;

$T$  – поправка к титру КОН;

$H$  – масса навески жира, г;

5,61 – 0,1 молекулярной массы КОН.

Полученные результаты заносят в табл. 4.1 и делают выводы.

Таблица 4.1. **Определение кислотного числа жиров**

Вид жира	Срок хранения	Навеска, г	Количество мл КОН, пошедшее на титрование		Кислотное число жира
			опытной пробы	контрольной пробы	

**Материалы и оборудование:** растительные масла, животный жир, маргарин, сливочное масло (разных сроков хранения), нейтрализованная смесь 96%-ного этилового спирта с серным эфиром (1:2), 0,1 н. водный раствор КОН (5,61 г КОН растворяют в 1 л воды), 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина и 1%-ный спиртовой раствор тимолфталеина, мерные цилиндры на 50 мл, конические колбы на 100 мл, аналитические весы, титровальные бюретки.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие вещества относят к липидам, какие функции они выполняют в растениях?
2. Какое строение имеют жиры? Какие жирные кислоты входят в состав растительных жиров? Почему растительные жиры называют маслами?
3. Дайте определение констант жиров (температура плавления, йодное число, кислотное число, число омыления). Объясните, какие свойства жиров они характеризуют.
4. На чем основан метод определения кислотного числа жира в работе?
5. Укажите значения кислотного числа жиров различного происхождения. Как изменяется кислотное число жиров при созревании и прорастании семян, а также при хранении пищевых жиров (масел)?

### **Работа 5. Определение изоэлектрической точки белка**

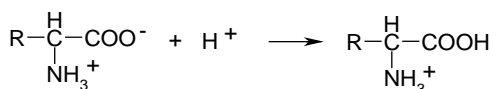
Важнейшими *физико-химическими свойствами* белков являются амфотерность, заряд, низкая диффузионная подвижность, способность изменять структуру (денатурация).

Специфическими *биологическими свойствами* белков являются их способность к самоорганизации (образование вторичной, третичной и четвертичной структур) и специфическому взаимодействию по принципу комплементарности, а также способность регулировать скорость биохимических реакций (свойства катализатора).

Мономерами белков являются аминокислоты – производные органических кислот, имеющие свободные карбоксильные и аминогруппы. Аминокислоты в белках соединяются ковалентными пептидными связями, возникающими при взаимодействии аминогруппы одной аминокислоты с карбоксильной группой другой аминокислоты. Свободные

амино- и карбоксильные группы диаминомонокарбоновых и моноаминодикарбоновых аминокислот и другие боковые радикалы белков определяют их *амфотерность* (кислотно-основные свойства) и заряд. Проявление этих свойств зависит от кислотности среды.

В водных растворах аминокислоты существуют в виде биполярных ионов – с диссоциированной карбоксильной группой ( $-\text{COO}^- + \text{H}^+$ ) и протонированной амина группой ( $-\text{NH}_2 + \text{H}^+ = -\text{NH}_3^+$ ). В кислой среде, в результате подавления диссоциации свободных карбоксильных групп, аминокислоты и белки проявляют свойства оснований, заряжаются положительно, т. е. становятся катионами:



В щелочной среде подавляется диссоциация свободных аминогрупп, поэтому молекулы аминокислот и белков проявляют свойства кислот, заряжаются отрицательно и ведут себя как анионы:



Таким образом, изменение кислотности среды приводит к изменению характера диссоциации свободных радикалов, перераспределению зарядов на поверхности белковых молекул, следствием чего являются изменения пространственной структуры белков и степени их биологической активности.

**Кислотность среды (pH), при которой в белке устанавливается равенство положительных и отрицательных зарядов, и он становится электронейтральным, называется *изоэлектрической точкой (ИЭТ)*.**

Белки, у которых ИЭТ находится в кислой среде, называются *кислыми* (преобладают моноаминодикарбоновые аминокислоты). Белки, у которых ИЭТ находится в щелочной среде (преобладают диаминомонокарбоновые аминокислоты), называются *основными*. У большинства растительных белков ИЭТ находится в слабокислой среде.

Используемый в работе метод определения ИЭТ белков основан на их свойстве снижать свою растворимость в растворах, кислотность которых близка к значению ИЭТ. При этом раствор белка мутнеет или белок выпадает в осадок. Этот процесс ускоряется при воздействиях,

снижающих гидратацию молекул белка (добавлении органических растворителей или растворов солей).

Для определения ИЭТ белка готовят растворы с известными значениями кислотности (рН), приливают к ним белок и органический растворитель, перемешивают и оставляют на определенное время. ИЭТ белка будет равна рН раствора, в котором интенсивность помутнения раствора наибольшая, либо, где выпадает больше осадка.

**Цель работы:** определить значения ИЭТ белков различного происхождения и фракционного состава (альбумина куриного яйца, глобулинов, глютелинов, проламинов семян различных культур).

**Ход работы.** В восемь пронумерованных пробирок приливают воду и растворы 0,01 н. или 0,1 н. уксусной кислоты в количествах, указанных в табл. 5.1. Затем их тщательно перемешивают, получая растворы с различными значениями рН.

Таблица 5.1. Схема приготовления растворов с различными значениями рН и результаты опыта

Номер пробирки	Внесено в пробирки, мл			рН	Помутнение (+), осадок (++) отсутствие осадка (-)
	воды	0,01 н. CH <sub>3</sub> COOH	0,1 н. CH <sub>3</sub> COOH		
1	8,40	0,60	–	5,9	
2	7,75	1,25	–	5,6	
3	8,75	–	0,25	5,3	
4	8,5	–	0,50	5,0	
5	8,0	–	1,0	4,7	
6	7,0	–	2,0	4,4	
7	5,0	–	4,0	4,1	
8	1,0	–	8,0	3,8	

После этого в каждую пробирку приливают по 1 мл раствора белка и содержимое пробирку перемешивают.

Затем в пробирки добавляют по 2 мл ацетона или спирта, содержимое пробирок снова перемешивают и оставляют на 30...40 мин при комнатной температуре. При значении рН, равном или близком к ИЭТ белка, раствор мутнеет или из него выпадает осадок. В табл. 5.1 отмечают интенсивность помутнения раствора (+), выпадение осадка (++) или (+++) или их отсутствие (-).

После выполнения работы сравнивают значения изоэлектрических точек анализируемых белков и делают выводы об их аминокислотном составе и свойствах.

**Материалы и оборудование:** растворы белков или белковых фракций семян зерновых и зернобобовых культур (1,0 г белка раство-

ряют в 20 мл 0,5 н. раствора  $\text{CH}_3\text{COONa}$  при нагревании на водяной бане, объем доводят водой до 100 мл), белок куриного яйца (разбавляют в 10 раз водой и фильтруют через два слоя марли), 0,1 н. раствор  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (6 мл ледяной уксусной кислоты разбавляют водой до литра), 0,01 н. раствор  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (0,1 н. раствор  $\text{CH}_3\text{COOH}$  разбавляют в 10 раз), этиловый спирт или ацетон, пробирки, штативы.

### Контрольные вопросы

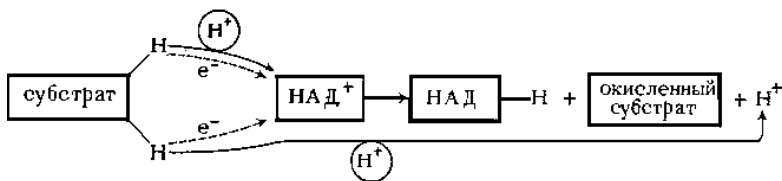
1. Какие принципы заложены в основу классификации белков? Какое строение они имеют, какими свойствами обладают и какие функции выполняют (см. стр. 6)?
2. Какое строение имеют аминокислоты, в каком виде они существуют в водных растворах? Как изменяются кислотно-основные свойства аминокислот и белков при изменении кислотности среды?
3. Что понимают под ИЭТ белка? На чем основан метод определения ИЭТ белка в работе?
4. Укажите значения ИЭТ анализируемых белков?

### Работа 6. Обнаружение дегидрогеназ в растительных тканях

**Дегидрогеназы** – ферменты класса Оксидоредуктазы. При их участии протекают окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе таких процессов, как фотосинтез, дыхание, синтез и распад аминокислот, жиров, полифенолов и других веществ.

Дегидрогеназы – ферменты двухкомпонентные (рис. 6.1), коферментами которых являются соединения нуклеотидного типа:  $\text{НАД}^+$  и  $\text{НАДФ}^+$  (пиридиновые), ФАД и ФМН (флавиновые).

В реакциях окисления (дегидрирования) коферменты дегидрогеназ ( $\text{НАД}^+$ ,  $\text{НАДФ}^+$ , ФАД) отнимают протоны водорода ( $\text{H}^+$ ) и электроны ( $\text{e}^-$ ) от окисляемых веществ, а сами восстанавливаются (до  $\text{НАД}\cdot\text{H}$ ,  $\text{НАДФ}\cdot\text{H}$ ,  $\text{ФАД}\cdot\text{H}_2$ ) по схеме:



В реакциях восстановления (гидрирования) водород от восстановленных коферментов (НАД·Н, НАДФ·Н, ФАД·Н<sub>2</sub>) передается на другие вещества.

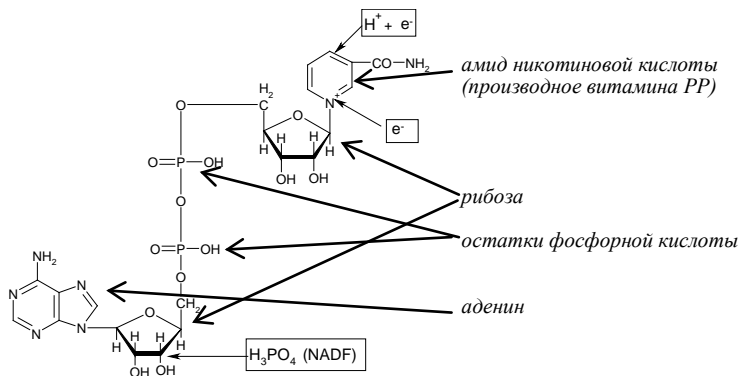


Рис. 6.1. Схема строения кофермента НАД<sup>+</sup> (никотинамидадениндинуклеотид)

Дегидрогеназы подразделяют на *анаэробные* и *аэробные*. Аэробные дегидрогеназы переносят водород на кислород воздуха, а анаэробные – на промежуточные переносчики.

Аэробными дегидрогеназами являются альдегидоксидаза (окисляет уксусный альдегид) и *лактатоксидаза* (окисляет молочную кислоту).

Анаэробными дегидрогеназами являются ферменты цикла Кребса: *изоцитратдегидрогеназа* (окисляет изолимонную кислоту до α-кетоглутаровой), *сукцинатдегидрогеназа* (окисляет янтарную кислоту до фумаровой), *малатдегидрогеназа* (окисляет яблочную кислоту до щавелево-уксусной), а также фермент спиртового брожения *алкогольдегидрогеназа* (окисляет этиловый спирт до уксусного альдегида).

В основе метода обнаружения дегидрогеназ лежит их способность отнимать водород от окисляемых веществ и присоединять его к метиленовой сини, которая при этом восстанавливается до бесцветной лейкоформы (обесцвечивается).

**Цель работы:** обнаружить действие и активность анаэробных дегидрогеназ в прорастающих семенах бобовых культур или других растительных объектах.

**Ход работы. I. Обнаружение дегидрогеназ.** С 10...20 набухших семян бобовых культур снимают кожуру, каждое семя делят на две семядоли, помещая их в две разные пробирки. В одной пробирке семе-



на заливают водопроводной водой и кипятят 5 мин, после кипячения горячую воду сливают. Затем семена в обеих пробирках заливают раствором метиленовой сини, которая адсорбируется на их поверхности. Через 10 мин синьку сливают, окрашенные семена промывают водопроводной водой. Для создания анаэробных условий семена в пробирках до верха заливают дистиллированной водой (или кипяченой охлажденной), удаляют застрявшие в семенах пузырьки воздуха путем встряхивания пробирок (или путем удара по ним рукой) и плотно закрывают резиновыми пробками, выдавливая излишки воды над раковиной. Затем пробирки помещают на 0,5...1,0 ч в водяную баню, или термостат с температурой 30...40 °С. В течение опыта наблюдают за окраской семян, изменение которой связано с действием анаэробных дегидрогеназ.

В живых семенах дегидрогеназы отнимают водород от окисляемых веществ и передают его метиленовой сини, адсорбированной на их поверхности. Метиленовая синь при этом восстанавливается и переходит в бесцветную лейкоформу. По окончании опыта воду из пробирок сливают, а семена высыпают в фарфоровые чашки. На воздухе обесцвеченные живые семена снова приобретают синюю окраску.

**II. Определение активности дегидрогеназ.** Отвешивают 1 г растительного материала (проросших семян, клубня картофеля, корнеплода редьки) и растирают в ступке, приливая 5 мл раствора  $K_2HPO_4$ . Растертую массу переносят в пробирки, добавляют 1 мл раствора метиленовой сини и хорошо перемешивают. Для создания анаэробных условий поверхность пробирок заливают тонким слоем растительного масла. Подготовленные пробирки помещают в водяную баню или термостат с температурой 30 °С, отмечая время начала опыта. В течение опыта наблюдают за изменением окраски растительного материала и определяют время, в течение которого произойдет его полное обесцвечивание.

Полученные данные заносят в табл. 6.1 и определяют активность дегидрогеназ.

Таблица 6.1. Активность дегидрогеназ

Исследуемый объект	Время проведения опыта, ч:мин		Период времени, за который происходит обесцвечивание тканей, мин	Активность дегидрогеназ (высокая, низкая)
	Начало	Окончание		

Полученные результаты анализируют и делают выводы.

**Материалы и оборудование:** набухшие и проросшие семена гороха, фасоли, люпина, клубни картофеля, корнеплоды редьки, 0,005%-ный раствор метиленовой сини, пробирки с пробками, штативы, весы, водяная баня, термометры, препаровальные иглы, пипетки.

### Контрольные вопросы

1. Какую роль выполняют ферменты в клетках живых организмов? Назовите их свойства. Опишите строение одно- и двухкомпонентных ферментов. Какова химическая природа апоферментов и коферментов? Какие функции выполняют активные и аллостерические центры ферментов? Назовите классы ферментов, дайте краткую характеристику каждому классу, назовите представителей (см. стр. 7).

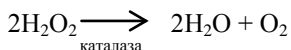
2. Какие реакции катализируют дегидрогеназы, к какому классу они относятся, какое строение имеют?

3. Назовите ферменты, катализирующие окисление этилового спирта, яблочной, янтарной, изолимонной кислот.

4. На чем основан метод обнаружения анаэробных дегидрогеназ в семенах бобовых культур в данной работе? Объясните причину потери активности ферментов при воздействии на них высокими температурами.

### Работа 7. Газометрическое определение активности каталазы

В процессе окисления ряда веществ в растениях под действием ферментов оксида образуется пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), повышенная концентрация которого токсична для клеток. Под действием фермента *каталазы* происходит его обезвреживание путем разложения на воду и молекулярный кислород. Реакция идет по уравнению:



Каталаза содержится в живых клетках всех организмов, кроме облигатных анаэробов.

Каталаза – двухкомпонентный фермент класса Оксидоредуктазы, состоящий из железопорфирина (гема), связанного с белком. Гем (простетическая группа) состоит из четырех пиррольных колец, образующих порфириновое ядро, в центре которого находится атом железа (рис. 7.1).

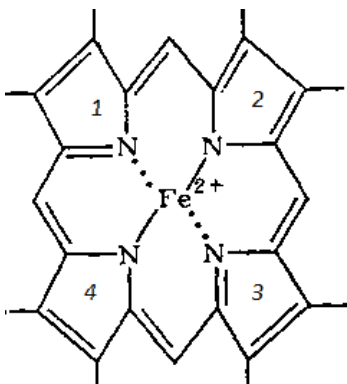


Рис. 7.1. Строение порфиринового ядра протетической группы каталазы:  
1, 2, 3, 4 – пиррольные кольца

Газометрический метод определения активности каталазы основан на учете объема кислорода, выделившегося при воздействии на пероксид водорода водными экстрактами растительных тканей, содержащих этот фермент.

Определение проводят на специальном приборе – *каталазнике* (рис. 7.2), состоящем из конической колбочки 1, в которую помещают растительный материал, содержащий фермент каталазу, пробирку с боковым отверстием 2, в которую вливают пероксид водорода, бюретку 3 на 50 мл, в которой налита вода. Пробирка соединяется с бюреткой газоотводной трубкой. Вода из бюретки может перетекать в стеклянную грушу 5 по другой трубке. Бюретка имеет кран или зажим 4, через который обеспечивается ее соединение с атмосферой. Когда пробирка вставляется в коническую колбу и пероксид водорода выливается через боковое отверстие на растительный материал, содержащий каталазу, начинается реакция. Выделяемый при этом кислород поступает по газоотводной трубке и вытесняет воду из бюретки в грушу. Таким образом, количество вытесненной воды будет равно количеству выделяемого в ходе реакции кислорода. Чем больше выделяется кислорода, тем выше активность каталазы.

Каталазник КАТ-1 (рис. 7.3) отличается тем, что вместо конической колбочки и пробирки с боковым отверстием используется пробирка-каталазник 1, имеющая два колена, в одно из них вливается перекись водорода, в другое – растительный экстракт, содержащий фермент каталазу. Пробирка-каталазник закрывается резиновой пробкой 2, закрепленной на конце эластичной газоотводной трубки 3. Реакция начинается при наклоне пробирки в одну из сторон и смешивании растительного экстракта с перекисью водорода.

**Цель работы:**

1. Определить активность каталазы в различных растительных объектах (корнеплодах, клубнях, листьях, проросших семенах).

2. Определить влияние кислотности среды на активность каталазы, установить оптимум pH фермента.

**Ход работы.** Отвешивают 1,0 г растительного материала, измельчают ножом или ножницами, помещают в фарфоровую ступку, добавляют для нейтрализации естественной кислотности 0,5 г  $\text{CaCO}_3$  и тщательно растирают. Затем в ступку прибавляют 5 мл воды и продолжают растирать до однородного состояния. После этого содержимое ступки аккуратно, без потерь, используя стеклянную палочку, переносят в коническую колбочку прибора.

Ступку и пестик трижды обмывают водой, приливая каждый раз по 5 мл воды, сливая их в колбу. Притертую поверхность конической колбочки тщательно очищают от растительного материала влажной фильтровальной бумагой.

В пробирку прибора через боковое отверстие мерным цилиндром или пипеткой вливают 5 мл 3%-ного раствора перекиси водорода. Затем прибор проверяют на герметичность.

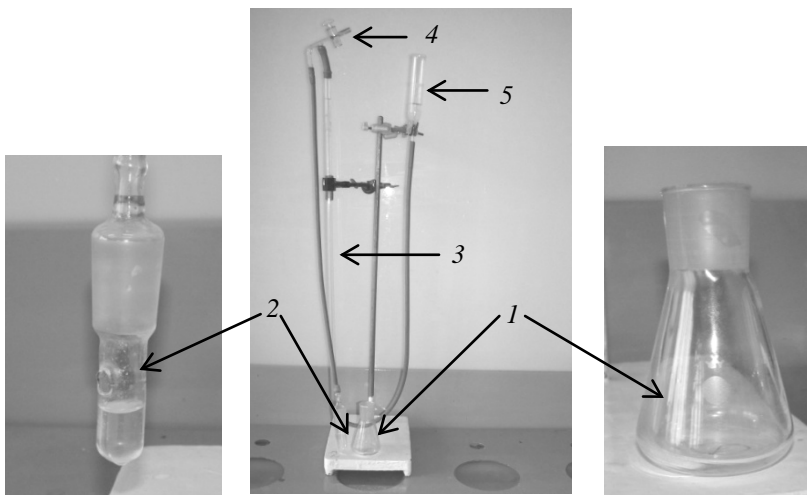


Рис. 7.2. Прибор для определения активности каталазы

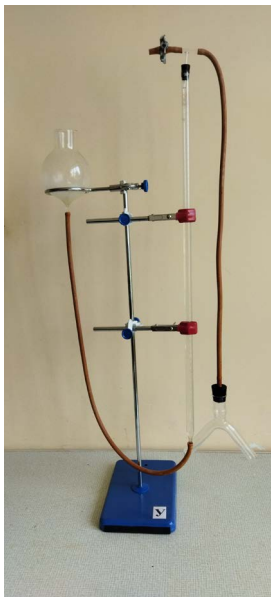


Рис. 7.3. Прибор для определения активности каталазы КАТ-1

В приборе КАТ-1 растертый растительный материал, содержащий каталазу, переносят в одно колено пробирки-каталазника, а перекись водорода вливают в другое колено.

***Проверка герметичности прибора.***

1. Установить уровень воды в бюретке на ноль путем передвижения вверх или вниз по штативу держателя со стеклянной грушей.

2. Закрывать кран (зажим) бюретки и вставить пробирку в коническую колбу с растертым материалом (в приборе КАТ-1 следует закрыть резиновой пробкой, насаженной на конец газоотводной трубки, пробирку-каталазник). При этом уровень воды в бюретке снизится и, если все соединения прибора герметичны, установится на некоторой отметке.

3. При отсутствии герметичности уровень воды в бюретке будет медленно повышаться. В последнем случае нужно устранить причину негерметичности прибора (повреждение трубок, несоответствие пробирки и колбы, наличие остатков растительного материала на притертой поверхности пробирки или колбы).

### ***Определение активности каталазы.***

1. После проверки герметичности прибора нужно открыть кран (зажим) на бюретке. При этом уровень воды в бюретке должен установиться на нулевое значение. После этого кран следует снова закрыть.

2. Снять грушу со штатива и удерживать ее в положении, при котором уровень воды в бюретке будет оставаться на исходном (нулевом) значении.

3. Наклонить коническую колбу и через боковое отверстие в пробирке вылить перекись водорода в колбу с растертым растительным материалом, содержащим фермент каталазу (в приборе КАТ-1 смешивание производится путем переливания содержимого одного колена в другое). Это время начала реакции расщепления перекиси водорода, которое следует отметить по часам или таймеру.

4. Содержимое колбы (в приборе КАТ-1 – пробирки), непрерывно перемешивают в течение всего опыта. Выделяющийся при реакции кислород вытесняет воду из бюретки в грушу. Для устранения противодавления воды, грушу следует перемещать вниз, следя за тем, чтобы уровень воды в груше и бюретке был на одном уровне.

5. Объем выделяемого за каждую минуту кислорода записывают в табл. 7.1. Опыт выполняют в течение 3 мин.

### ***Влияние кислотности среды на активность каталазы.***

Влияние кислотности среды на скорость ферментативных реакций объясняется действием водородных ионов на степень ионизации субстрата и ферментативного белка, а также на свойства каталитического центра, от которого зависит образование фермент-субстратного комплекса.

Каждый фермент проявляет наибольшую активность только в определенном, характерном для него интервале кислотности (оптимум рН фермента). Например, оптимум рН уреазы – 7,3...7,9, амилазы картофеля – 6,7, аргиназы – 9,5...9,9, пепсина – 1,5...2,0. При отклонении кислотности среды в любую сторону от оптимальной активность фермента снижается.

1. Берут три навески хорошо проросших семян по 1 г, помещают их в три разные ступки и растирают до однородного состояния.

2. Во все ступки приливают по 5 мл дистиллированной воды.

3. Для сохранения естественной (слабокислой) реакции среды в одну ступку больше ничего не добавляют.

4. Для создания слабощелочной среды в другую ступку добавляют 0,5 г  $\text{CaCO}_3$ .

5. Для создания кислой среды в третью ступку добавляют 1...2 капли 10%-ного раствора  $H_2SO_4$ .

6. Содержимое ступок переносят в конические колбочки приборов (в КАТ-1 – в одно из колен пробирки-катализника), трижды ополаскивая ступки и пестики водой (при каждом ополаскивании используют по 5 мл воды).

7. Перекись водорода (5 мл) вливают в пробирку через боковое отверстие (в КАТ-1 – в другое колено пробирки-катализника).

8. Опыт выполняют, как описано выше. Полученные результаты заносят в табл. 7.1.

Таблица 7.1. Результаты определения активности каталазы

Исследуемый материал	Кислотность среды (кислая, слабокислая, слабощелочная)	Выделилось мл $O_2$ за			Активность каталазы	
		1 мин	2 мин	3 мин	мл $O_2$ /(г/мин)	высокая, низкая

После окончания опытов делают выводы об активности ферментов в различных растительных объектах, а также зависимости активности каталазы от кислотности среды.

**Материалы и оборудование:** растительный материал (листья, клубни картофеля, проросшие семена злаков или др.), 3%-ный раствор  $H_2O_2$ ,  $CaCO_3$ , 10%-ный раствор  $H_2SO_4$ , приборы для определения активности каталазы, ступки с пестиками, весы, стеклянные палочки, мерные цилиндры.

### Контрольные вопросы

1. К какому классу ферментов относится каталаза? Укажите особенности ее строения и роль.

2. Как и почему кислотность среды влияет на активность ферментов? Укажите оптимум рН ферментов каталазы, уреазы, амилазы, аргиназы, пепсина.

3. На чем основан метод определения активности каталазы в данной работе? Изложите методику выполнения опытов?

## Работа 8. Обнаружение пероксидазы у растений

Фермент *пероксидаза* относится к группе оксидаз класса Оксидоредуктазы. Пероксидаза, как и каталаза, имеет железопорфириновую простетическую группу (гем). Пероксидаза катализирует окисление полифенолов, алифатических и ароматических аминов, а также жирных кислот с помощью пероксида водорода или других органических пероксидов.

Особенно легко пероксидаза окисляет полифенолы:



Для обнаружения пероксидазы в данной работе используется *гидрохинон*, который под действием фермента окисляется в *хинон*. Хинон с избытком гидрохинона дает двойное соединение – *хингидрон*, выпадающий в виде темно-фиолетовых игл большей или меньшей длины. Потемнение раствора гидрохинона и выпадение игл хингидрона в присутствии пероксида водорода указывает на присутствие фермента пероксидазы. Для обнаружения пероксидазы можно также использовать *гваякол*, который в присутствии пероксида водорода окисляется пероксидазой с образованием окрашенных соединений.

**Цель работы:** обнаружить пероксидазу в различных растительных объектах и сравнить ее активность.

**Ход работы.**

**Приготовление ферментативных вытяжек.**

1. Отвешивают 5 г проросших семян, растирают в ступке, приливают 15 мл воды и настаивают 5...7 мин. Затем растертую массу фильтруют через вату, вытяжку переливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают в чистую сухую пробирку и используют для опыта.

2. Клубни картофеля измельчают на терке, отжимают сок через марлю, переливают его в центрифужные пробирки, центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин, надосадочную жидкость используют для анализа.



3. Корнеплоды редьки, репы, хрена измельчают на терке, отвешивают 5 г измельченной массы, добавляют 15 мл воды и настаивают 10...20 мин. Затем массу фильтруют через вату и вытяжку используют для анализа.

**Опыт 1** (с гидрохиноном). В две пробирки наливают по 2 мл подготовленной вытяжки из проросших семян (1-й вариант), клубня картофеля (2-й вариант) или корнеплода (3-й вариант). В одной пробирке вытяжку кипятят для инактивации ферментов, затем охлаждают до комнатной температуры. В каждом варианте в качестве контроля используют третью пробирку, в которую наливают 2 мл воды.

Затем во все пробирки приливают по 1 мл гидрохинона и по 3 капли пероксида водорода. Содержимое пробирок перемешивают и помещают в водяную баню при температуре 30 °С. В течение опыта наблюдают за изменениями, происходящими в растворах (изменение окраски, выпадение игл). Данные заносят в табл. 8.1.

Таблица 8.1. Активность пероксидазы

Исследуемый материал	Вариант опыта (вытяжка активная, вытяжка кипяченая, вода)	Наличие (+) или отсутствие (–)		Активность пероксидазы (высокая, низкая)
		окраски	игл	

**Опыт 2** (с гваяколом). В две пробирки наливают по 2 мл подготовленной вытяжки из проросших семян (1-й вариант), клубня картофеля (2-й вариант) или корнеплода (3-й вариант). В одной пробирке вытяжку кипятят для инактивации ферментов, затем охлаждают до комнатной температуры. В каждом варианте в качестве контроля используют третью пробирку, в которую наливают 2 мл воды.

В каждую пробирку приливают по 1 мл 1%-ного раствора гваякола и по 3 капли пероксида водорода.

Пробирки встряхивают для перемешивания содержимого и помещают в водяную баню с температурой 30 °С. В пробирках с активной вытяжкой изменяется окраска раствора.

Результаты наблюдений заносят в табл. 8.1.

**Материалы и оборудование:** 5%-ный раствор гидрохинона, 1%-ный раствор гваякола, 3%-ный раствор пероксида водорода (готовится из 30%-ного пергидроля в день определения), растительный материал, центрифуга, водяная баня, пробирки, воронки, ступки с пестиком, пипетки, вата, марля.

## Контрольные вопросы

1. Какие реакции катализирует пероксидаза?
2. На чем основан метод обнаружения пероксидазы в экстрактах растительных тканей.
3. В каких растительных объектах пероксидаза имеет высокую активность?

## Работа 9. Влияние температуры на гидролиз крахмала амилазами

Ферментативные реакции очень чувствительны к температуре. Активность ферментов и скорость ферментативных реакций возрастает при повышении температуры от минимальной (температура, при которой реакция начинается) до оптимальной (температура, при которой наблюдается максимальная скорость реакции). При повышении температуры от оптимальной до максимальной (температура, при которой течение реакции прекращается) происходит снижение активности ферментов. Это объясняется тем, что при высоких температурах происходит денатурация ферментативного белка.

Влияние температуры на активность ферментов и скорость ферментативных реакций можно изучить на примере *амилаз*, гидролизующих крахмал.

Крахмал – запасной углевод растений (семян, клубней), гомополисахарид, состоящий из остатков  $\alpha$ ,*D*-глюкозы. Крахмал – неоднородное вещество, состоящее из двух компонентов – амилозы и амилопектина. У разных растений в крахмале содержится 10...30 % амилозы и 70...90 % амилопектина. У восковидных сортов ячменя, кукурузы и риса крахмал состоит только из амилопектина, а у некоторых гибридов кукурузы и в мозговом горохе содержание амилозы может достигать 50...80 %.

*Амилоза* – линейный спиралевидный полимер, у которого остатки  $\alpha$ ,*D*-глюкозы (глюкопиранозы) соединены  $\alpha(1\rightarrow4)$ -связями. Амилоза йодом окрашивается в синий цвет, в горячей воде хорошо растворяется, не образуя клейстера.

*Амилопектин* имеет разветвленную структуру – через 10...12 глюкозных остатков происходит ветвление молекул. В точках ветвления остатки  $\alpha$ ,*D*-глюкозы соединены  $\alpha(1\rightarrow6)$ -связями. Амилопектин в го-

рячей воде набухает с образованием крахмального клейстера, йодом окрашивается в фиолетовый цвет.

*Амилазы* – ферменты класса Гидролазы, подкласса гидролазы гликозильных соединений. К амилазам относятся несколько ферментов, различающихся по характеру действия.

Фермент  *$\alpha$ -амилаза* расщепляет  $\alpha(1\rightarrow4)$ -связи внутри молекулы крахмала без определенной закономерности, при этом образуются декстрины, состоящие из нескольких десятков или сотней глюкозных остатков, и незначительное количество мальтозы и глюкозы.

Фермент  *$\beta$ -амилаза* расщепляет вторую от конца молекулы крахмала  $\alpha(1\rightarrow4)$ -связь, при этом образуется дисахарид мальтоза.

Фермент *глюкоамилаза* расщепляет последнюю от конца молекулы крахмала  $\alpha(1\rightarrow4)$ -связь с образованием глюкозы.

Фермент *амилопектин-1,6-глюкозидаза* расщепляет  $\alpha(1\rightarrow6)$ -связи в молекулах амилопектина с образованием декстринов (рис. 9.1).

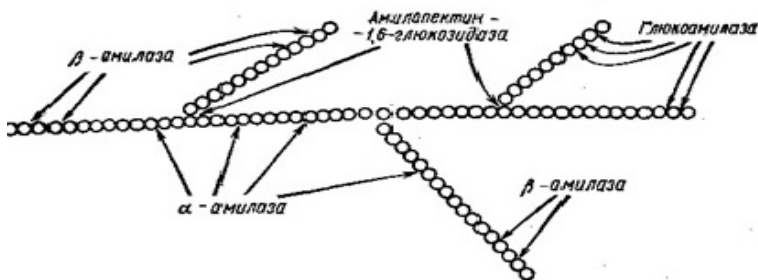


Рис. 9.1. Схема действия амилаз на молекулу крахмала

Таким образом, под действием амилаз гидролиз крахмала идет по схеме:



Активность ферментов обычно выражают или количеством субстрата, вступившего в реакцию, или количеством образующихся конечных продуктов реакции.

В данной работе **активность амилаз** выражают количеством крахмального клейстера, которое может быть гидролизовано 1 мл ферментативной вытяжки за 1 ч. Ее рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{10 \cdot 60}{T},$$

где  $X$  – количество миллилитров крахмального клейстера, гидролизованного 1 мл вытяжки амилаз за 1 ч, мл/(мл·ч);

10 – количество крахмального клейстера, используемого при проведении опыта, мл;

60 – коэффициент перевода минут в часы;

$T$  – продолжительность реакции гидролиза 10 мл крахмального клейстера при заданной температуре, мин.

В приведенной выше формуле неизвестно время ( $T$ ) гидролиза 10 мл крахмального клейстера при заданной температуре. Для его определения в пробирке смешивают 10 мл крахмального клейстера и 1 мл вытяжки амилаз и отмечают *время начала реакции*.

О протекании реакции судят по изменению окраски индикаторных растворов, содержащих йод, куда через определенный промежуток времени вносят несколько капель смеси крахмала с вытяжкой амилаз. Негидролизанный крахмал окрашивает индикаторный раствор в синий или фиолетовый цвет, декстрины (промежуточные продукты гидролиза крахмала) окрашивают его в розовый цвет, а мальтоза и глюкоза (конечные продукты реакции) не изменяют окраски индикаторного раствора. При этом отмечается *время окончания реакции*.

**Цель работы:** определить активность амилаз у проросших семян злаков (ячменя, пшеницы) при различных температурах (10...80 °С).

**Ход работы.**

**Приготовление вытяжки, содержащей амилазы.** Ферментативную вытяжку амилаз для всех вариантов опыта получают из одной навески проросших семян злаков. Для этого 5 г семян помещают в ступку и растирают пестиком в течение 2...3 мин. Затем в ступку приливают 15...20 мл воды, и семена продолжают растирать до однородного состояния. Полученную массу фильтруют через ватный фильтр в чистую сухую пробирку. Фильтрат из стеклянной пробирки переносят в две пластмассовые центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 3...4 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают в чистую сухую стеклянную пробирку и используют для опытов.

**Приготовление индикаторных растворов.** В 10 пробирок наливают по 10 мл воды и в каждую добавляют по 3 капли раствора йода в йодиде калия.

**Определение продолжительности гидролиза крахмала.** Каждая бригада студентов проводит опыт при определенной температуре. Для поддержания температуры лучше использовать электрическую водяную баню, в которой автоматически поддерживается заданная температура. Водяную баню можно приготовить в фарфоровом или стеклянном стакане емкостью 1 л, в которые по мере снижения температуры следует приливать горячую воду. *Температура воды в водяной бане должна оставаться стабильной в течение всего опыта!*

Для определения продолжительности гидролиза крахмала в одну чистую сухую пробирку наливают 10 мл 2%-ного раствора крахмального клейстера, а в другую – 1 мл вытяжки амилаз. Обе пробирки помещают в водяную баню с заданной температурой на 10 мин. Через 10 мин крахмальный клейстер быстро вливают в пробирку с ферментативной вытяжкой, содержимое перемешивают и пробирку со смесью опять помещают в водяную баню, отмечая *время начала гидролиза крахмала*.

Сразу после смешивания крахмала и вытяжки берут первую пробу на крахмал. Для этого пипеткой отбирают 3...4 капли смеси и вносят их в первую пробирку с индикаторным раствором, содержащим йод. После перемешивания окраска индикаторного раствора, как правило, становится синей или фиолетовой.

Последующие пробы на крахмал вносят в другие индикаторные пробирки через определенный интервал времени, зависящий от температуры, при которой проходит реакция: через 5 мин – при температуре 10 и 80 °С, через 3 мин – при температуре 20 °С, через 2 мин – при температуре 30 и 70 °С, через 1 мин – при температуре 40, 50 и 60 °С. По мере гидролиза крахмала окраска индикаторных растворов при добавлении в них смеси крахмального клейстера и ферментативной вытяжки изменяется от синей до розовой. Конечные продукты реакции – мальтоза и глюкоза – не дают реакции на йод (окраска остается слабозелтой). После этого отмечают *время окончания гидролиза крахмала* и определяют продолжительность реакции при данной температуре ( $T$ ).

Активность амилаз рассчитывают по приведенной выше формуле. Полученные результаты заносят в табл. 9.1.

Таблица 9.1. **Время гидролиза крахмала и активность амилаз при различных температурах**

Температура, °С	Продолжительность гидролиза крахмала, мин	Активность амилаз (мл крахмала/(мл·ч))
10		
20		
И т. д.		

На основании полученных результатов строят график зависимости активности амилаз от температуры (рис. 9.2) и делают выводы.



Рис. 9.2. Зависимость активности амилаз от температуры

**Материалы и оборудование:** проросшие семена пшеницы, ячменя или других культур, 2%-ный раствор крахмального клейстера, 0,3%-ный раствор йода в 3%-ном растворе йодида калия, ступки с пестиками, штативы с 12 пробирками, воронки, вата, центрифуга, фарфоровые стаканы на 0,5...1 л, пипетки мерные на 10 мл, пипетки глазные, весы, термометры, водяная баня, термостат.

### Контрольные вопросы

1. Какое строение имеет крахмал, из каких компонентов он состоит? Укажите особенности строения и свойства компонентов крахмала.
2. Какие ферменты гидролизуют крахмал (класс, подкласс, характер действия, продукты реакции)?
3. На чем основан метод определения активности амилаз в данной работе? Изложите методику выделения ферментов из проросших семян и определения их активности.
4. Как и почему температура влияет на активность ферментов?

## Раздел 2. ВОДНЫЙ ОБМЕН РАСТЕНИЙ

Растительные ткани содержат большое количество воды (в среднем 75...90 % от массы растения). Особенно богаты водой сочные плоды, молодые корни и молодые листья. Активное проявление жизнедеятельности без воды вообще невозможно. Это объясняется свойствами и ролью воды в живых клетках (см. работу 10).

Вода в растениях находится как в свободном (с неизменными физико-химическими свойствами), так и связанном (с измененными физико-химическими свойствами) состоянии. *Свободная* вода содержится в клеточных стенках и проводящей системе растений. *Связанная* вода составляет 10...15 % общего ее содержания. Различают следующие виды связанной воды: *осмотически связанная* – содержится в вакуолях клеток, *коллоидно связанная* – в цитоплазме, *капиллярно связанная* – в проводящих тканях (ксилеме, флоэме).

Водный обмен растений включает процессы *поглощения, передвижения и испарения* воды.

Основным механизмом поглощения воды клетками является осмос (см. работы 11). Благодаря осмосу в клетках поддерживается тургорное давление, возникают другие осмотические явления (см. работу 12).

Важнейшим термодинамическим показателем, характеризующим состояние воды в растениях, является *водный потенциал* (см. работу 13), который является алгебраической суммой четырех компонентов – осмотического (см. работу 14), матричного, гидростатического и гравитационного потенциалов. Градиент водного потенциала определяет направление транспорта воды в клетках, тканях и системе «почва – растения – атмосфера».

Функцию поглощения воды выполняет корневая система. Погложительная способность корней зависит от их ростовой активности, степени ветвления, общей и рабочей адсорбирующей поверхности (см. работу 29), обеспеченности органическими веществами. Основными внешними факторами, влияющими на поглощение воды корнями, являются температура и аэрация почвы.

Восходящий транспорт воды в растениях осуществляется под действием двух *концевых двигателей*: нижнего (корневое давление) и верхнего (транспирация). Вода передвигается как по живым клеткам (радиальный транспорт в корне, транспорт по клеткам листа), так и по проводящей системе (ксилеме). Направленный транспорт воды от корневых волосков к сосудам (радиальный транспорт в корне) способ-

ствует возникновению *корневого давления* – силы, обуславливающей движение водного раствора в живых клетках корня и выделение его в сосуды. Проявлением корневого давления являются *плач* растений – вытекание ксилемного сока из поврежденных стеблей или веток – и *гуттация* – выделение капельножидкой влаги через гидатоды, расположенные на кончиках или зубчиках листа в условиях высокой влажности воздуха.

Процесс испарения воды растениями называется *транспирацией*. Главным органом транспирации является лист. Для количественной характеристики водообмена используется ряд показателей: *интенсивность транспирации* (см. работы 15, 16, 18), *относительная транспирация* (см. работу 17), *продуктивность транспирации*, *транспирационный коэффициент*, *водный дефицит* (см. работу 19). В посевах сельскохозяйственных культур эффективность использования воды характеризует *эвапотранспирационный коэффициент*, или коэффициент водопотребления, который рассчитывается как отношение эвапотранспирации (суммарного расхода воды за вегетацию с 1 га посева или насаждения) к созданной биомассе или хозяйственно полезному урожаю.

Регуляция водообмена растений является одним из условий оптимизации их роста, развития и повышения продуктивности.

## **Работа 10. Определение содержания воды и сухого вещества в растительном материале**

Содержание воды и сухого вещества в тканях и органах растений зависит от их физиологического состояния и видовой принадлежности. Много воды содержится в молодых формирующихся органах растений – листьях, корнях, сочных плодах и ягодах, овощах. В период созревания семян и при переходе в состояние покоя содержание воды в них сильно снижается.

Высокое содержание воды в тканях растений связано с важными для процессов жизнедеятельности ее свойствами, которые способствуют выполнению определенных *функций*: высокие теплопроводность, теплоемкость и теплота парообразования *обеспечивают поддержание относительно постоянной температуры растений*; с высокой растворяющей способностью воды связана *функция транспорта газов, минеральных и органических веществ*; с полярностью воды свя-



зана ее способность гидратировать белки, полисахариды, фосфолипиды, биоколлоиды, влиять на их пространственную ориентацию в клеточных структурах; благодаря высокой реакционной способности вода участвует в окислительно-восстановительных реакциях, гидролизе сложных органических соединений; с электропроводностью воды связаны электрофизиологические свойства клеток.

Содержание сухого вещества находится в обратной зависимости от содержания воды и обычно учитывается при оценке качества продукции растениеводства – плодов, ягод, овощей, семян. Чем больше сухого вещества в продукции, тем выше выход полезных веществ при ее переработке.

**Цель работы:** определить содержание воды и сухого вещества в различных растительных объектах – листьях, стеблях, семенах, клубнях, корнеплодах, плодах, ягодах, овощах.

**Ход работы.**

1. Подбирают бюксы соответствующих размеров: для легких и объемных материалов (листья растений) берут бюксы большего объема, для тяжелых и плотных материалов (не проросшие семена, клубни, корнеплоды) можно использовать бюксы меньших размеров.

2. Бюксы очищают от растительных остатков или моют, а затем высушивают с крышками в сушильном шкафу при температуре 105 °С до постоянной массы.

3. Бюксы с крышками взвешивание на аналитических весах. Массу и номера бюксов записывают в табл. 10.2.

4. Растительный материал измельчают с помощью ножа, ножниц или ланцета.

5. Берут 2 или 3 навески, каждую навеску помещают в отдельные бюксы, заполняя его до половины, рыхло ( $\approx 3 \dots 5$  г).

6. Бюксы закрывают крышками и взвешивают, массу записывают в таблицу 10.2.

7. Затем крышки снимают, ставят на них бюксы и помещают в сушильный шкаф.

8. Растительный материал высушивают до постоянной массы, проверяя ее путем повторных взвешиваний через 20...30 мин. Время и результаты взвешивания отмечают в таблице 10.1. Первое взвешивание рекомендуется проводить после 1 ч сушки или позднее (определяется органолептически).

Таблица 10.1. Изменение массы бюксов с растительным материалом в процессе высушивания (№ бюкса \_\_\_)

№ взвешивания	Время взвешивания	Масса бюкса
1		
2		
И т. д.		

9. Горячие бюксы вынимают из сушильного шкафа с помощью специальных щипцов и ставят для охлаждения в эксикатор (стеклянный сосуд с притертой крышкой, содержащий адсорбент влаги).

10. После охлаждения бюксы вынимают из эксикатора, закрывают крышками и взвешивают.

11. Масса бюкса с навеской после окончательного высушивания и результаты расчетов влажности и сухой массы материала заносится в табл. 10.2.

Содержание воды в материале (влажность) рассчитывают по формуле

$$W = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100 \%,$$

где  $W$  – влажность материала, %;

$m_2 - m_3$  – содержание воды в сырой навеске (разница между массой бюкса с материалом до высушивания и массой бюкса с материалом после высушивания), г;

$m_2 - m_1$  – сырая навеска (разница между массой бюкса с материалом до высушивания и массой пустого бюкса), г.

Содержание сухого вещества в материале или его сухую массу рассчитывают по следующей формуле:

$$M = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \cdot 100 \%,$$

где  $M$  – содержание сухого вещества в материале, %;

$m_3 - m_1$  – сухая навеска (разница между массой бюкса с материалом после высушивания и массой пустого бюкса), г;

$m_2 - m_1$  – сырая навеска (разница между массой бюкса с материалом до высушивания и массой пустого бюкса), г.

Содержание сухого вещества можно также рассчитать по формуле

$$M = 100 \% - W \%$$

Таблица 10.2. **Определение содержания воды и сухого вещества в растительном материале**

Исследуемый материал	Номер бюкса (крышки)	Масса до высушивания, г			Масса бюкса с навеской после высушивания, г	Содержание воды		Содержание сухого вещества	
		пустого бюкса	бюкса с навеской	сырой навески		г	%	г	%

Для сушки материала в бюксах лучше использовать сушильный шкаф СЭШ-3М (рис. 10.1). Сушка материала в таком шкафу ускоряется за счет принудительной вентиляции горячего воздуха. Бюксы постоянно встряхиваются, что обеспечивает равномерное высушивание материала и предотвращает его пригорание к стенкам бюкса. Шкаф имеет два режима сушки: на первом режиме при более низкой температуре материал медленно подсушивается и не пригорает, на втором – при более высокой температуре материал высушивается полностью.

Сушильные шкафы типа ES-4610 (рис. 10.2) необходимо предварительно нагреть до 105 °С. Бюксы в них нельзя ставить близко к стенкам, где температура может быть выше 105 °С, что может привести к пригоранию растительного материала. Бюксы в таких шкафах следует периодически менять местами для обеспечения одинаковых условий сушки.



Рис. 10.1. Сушильный шкаф СЭШ-3М



Рис. 10.2. Сушильный шкаф ES-4610

Результаты расчетов заносят в сводную таблицу (табл. 10.3) и делают выводы.

Таблица 10.3. Содержание воды и сухого вещества в растительном материале

Исследуемый материал	Содержание воды, %			Среднее	Содержание сухого вещества, %			Среднее
	повторения				повторения			
	1	2	3		1	2	3	

**Материалы и оборудование:** листья, стебли, корни растений, семена, клубни, корнеплоды, плоды, ягоды, овощи, аналитические весы, бюксы с крышками, ножницы, ножи, сушильный шкаф, щипцы, эксикатор.

### Контрольные вопросы

1. Какими важными для процессов жизнедеятельности растений свойствами обладает вода, какую роль она выполняет в растениях?
2. Опишите методику определения влажности и сухой массы растительного материала.
3. Какие существуют типы сушильных шкафов, их конструктивные отличия и особенности работы с ними?
4. Укажите содержание воды и сухого вещества в различных растительных объектах?

### Работа 11. Получение полупроницаемой перепонки и наблюдение явлений осмоса

Осмоз является основным процессом, лежащим в основе поглощения и выделения воды в клетках растений. Этот процесс можно наблюдать и в искусственных системах.

**Осмоз** – это процесс диффузии растворителя (воды) через полупроницаемые мембраны.

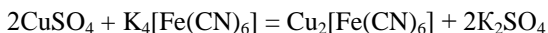
**Полупроницаемость** – это свойство различных структур (мембран, пленок) пропускать одни вещества и задерживать другие. Полупроницаемые мембраны имеют поры малого диаметра, через них могут проходить только небольшие молекулы, например, молекулы растворителя (воды), а молекулы растворенных веществ не проходят.

Осмоз может протекать только в *осмотических системах*, т. е. системах, состоящих из двух или более растворов разной концентрации, разделенных полупроницаемой мембраной.

*Осмоз* всегда *направлен* в сторону раствора, концентрация которого выше (концентрация воды в таком растворе ниже). В результате осмоса объем этого раствора увеличивается, а концентрация снижается, в нем возникает дополнительное гидростатическое давление, которое передается на стенки сосуда.

Осмоз, направленный внутрь какой-либо системы (клетки), называют *эндосмосом*, а осмос, направленный из системы, – *экзосмосом*.

Осмоз можно наблюдать в искусственных осмотических системах. Например, если в раствор сульфата меди ( $\text{CuSO}_4$ ) внести каплю желтой кровяной соли (гексацианоферрат калия –  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), при этом на поверхности капли в результате химической реакции образуется полупроницаемая пленка из гексацианоферрата (II) меди ( $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), формируется мешочек или так называемая искусственная «клеточка Траубе». Реакция идет по уравнению:



В зависимости от того, в «клетке» или за ее пределами, концентрация будет выше, можно наблюдать эндо- или экзосмос.

**Цель работы:** 1) получить искусственную «клеточку Траубе» путем внесения капли 1,0 М и 0,1 М раствора  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  в раствор  $\text{CuSO}_4$  и наблюдать эндо- и экзосмос; 2) с помощью стереоскопического микроскопа провести наблюдение за образованием полупроницаемой перепонки вокруг кристаллика соли  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , погружаемого в 0,5 М раствор  $\text{CuSO}_4$ .

#### **Ход работы.**

**Наблюдение эндосмоса.** В стаканчик на 50 мл наливают больше половины 0,5 М раствора  $\text{CuSO}_4$  и пипеткой осторожно вносят 1...2 капли 1,0 М раствора  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . При этом в результате реакции на границе растворов образуется полупроницаемая перепонка, формируется искусственная «клеточка Траубе». Так как концентрация раствора желтой кровяной соли внутри «клеточки» выше, чем в окружающем ее растворе сульфата меди, вода устремится внутрь «клеточки» (эндосмос). Вследствие этого, ее объем будет увеличиваться.

При внимательном наблюдении можно заметить, что по мере увеличения «клеточки» происходит перемещение струек жидкости в растворе  $\text{CuSO}_4$  от поверхности «клеточки» вниз. Объясните это явление.

**Наблюдение экзосмоса.** В пробирке готовят 0,1 М раствор  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  путем 10-кратного разбавления 1,0 М раствора (1 мл 1,0 М раствора  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  + 9 мл  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Несколько капель этого раствора пипеткой вносят в стаканчик с 0,5М раствором  $\text{CuSO}_4$ . Так как концентрация раствора внутри образующихся «клеточек» будет меньше, чем в окружающем их растворе, вода будет устремляться наружу (экзоосмос), а «клеточки» будут сжиматься, превращаясь в сдутики пленок из гексацианоферрата меди.

**Наблюдение эндосмоса с помощью стереоскопического микроскопа.** В фарфоровую чашку наливают 5...10 мл 0,1 М раствора  $\text{CuSO}_4$ , помещают в него кристаллик  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  и рассматривают его в микроскоп. Вода растворяет кристаллическую соль и на поверхности раствора образуется мешочек, стенками которого является пленка из гексацианоферрата меди.

Так как концентрация раствора вокруг кристалла будет выше, происходит постепенное увеличение объема мешочка с раствором за счет эндосмоса. Пленка из гексацианоферрата меди непрочная, поэтому под давлением воды, поступающей в мешочек, происходит ее разрыв. В месте разрыва образуется новая пленка. В результате этого увеличение объема мешочка будет пульсирующим.

После выполнения работы делают зарисовки и пояснения к ним.

**Материалы и оборудование:** 0,5 М раствор сульфата меди ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 1,0 М раствор и кристаллы гексацианоферрата калия ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), стаканы на 50 мл, фарфоровые чашки, пробирки, мерные пипетки на 5 и 10 мл, глазные пипетки, стереоскопический микроскоп.

### Контрольные вопросы

1. Что такое осмос, эндо- и экзоосмос, полупроницаемость, осмотическая система? Куда направлен осмос в осмотических системах?

2. Как можно получить искусственную «клетку» и наблюдать эндо- и экзоосмос?

### Работа 12. Явления плазмолиза и деплазмолиза в растительной клетке

Поглощение и выделение воды растительными клетками может происходить за счет *набухания* и отбухания коллоидов цитоплазмы (в клетках сухих семян), *диффузии* (в клеточных стенках, в цитоплазме), *осмоса* (в клетках, имеющих вакуоли).

Основным механизмом поглощения и выделения воды сформированными клетками растений является осмос (см. работу 11).

Растительная клетка – своеобразная микроосмотическая система, у которой роль одного раствора выполняет *клеточный сок*, содержащийся в вакуолях, роль второго раствора выполняет *раствор, содержащийся в клеточных стенках* (апопласте), роль полупроницаемой перепонки выполняет *протопласт* живой клетки, обладающий *избирательной* проницаемостью (см. работу 1).

Так как осмос всегда направлен в сторону раствора с более высокой концентрацией, вода будет поступать в клетки (*эндоосмос*), если концентрация клеточного сока будет выше концентрации раствора в апопласте. При этом объем вакуолей будет увеличиваться, в них возникает дополнительное гидростатическое давление, которое передается через цитоплазму на клеточную стенку. *Давление цитоплазмы на клеточную стенку называют тургорным.*

При нормальном водоснабжении растений в клетках всегда поддерживается тургорное давление, которое обеспечивает упругость и механическую прочность растительных тканей. Однако при высоком тургорном давлении клеток (рано утром, поздно вечером) возрастает ломкость травянистых частей растений, что нужно учитывать при выборе сроков проведения междурядных обработок пропашных культур, уборки овощей, скашивания трав. Изменение тургорного давления в клетках лежит в основе тропизма (движения) растений.

В клетках будет проходить *экзоосмос* (выделение воды), если концентрация раствора в апопласте станет выше концентрации клеточного сока. В естественных условиях это происходит при интенсивной транспирации (в жаркое полуденное время), при высокой концентрации почвенного раствора, связанной с недостатком воды в почве (засуха) или при внесении высоких доз минеральных удобрений.

В этих условиях за счет экзосмоса объем вакуолей уменьшается, снижается тургорное давление. При дальнейшем выделении воды из клеток может наблюдаться *циторриз*, когда объем вакуолей и цитоплазмы уменьшается, но *цитоплазма не отделяется от клеточной стенки, а тянет ее за собой*, при этом *поверхность клеточной стенки становится волнообразной*. У растений такое состояние может проявляться в виде *завядания*.

В состоянии циторриза возрастает водоудерживающая и водопоглотельная способность клеток.

При погружении растительных клеток в *гипертонический* раствор (раствор, концентрация которого выше концентрации клеточного сока), за счет экзосмоса объем вакуолей и цитоплазмы уменьшается, и возникает *плазмолиз* – *отставание цитоплазмы от клеточной стенки*

(рис. 12.1). Пространство между клеточной стенкой и цитоплазмой заполняет гипертонический раствор. Это доказывает, что клеточная стенка не обладает свойством полупроницаемости.

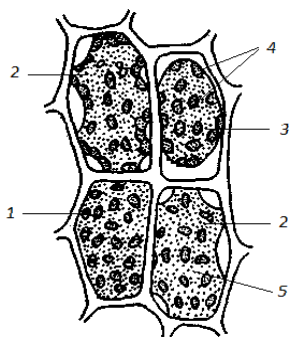


Рис. 12.1. Плазмолиз в клетках листа:

- 1 – плазмолиз отсутствует (тургор);
- 2 – начальный плазмолиз;
- 3 – умеренный выпуклый плазмолиз;
- 4 – хлоропласты;
- 5 – цитоплазма

Так как плазмолиз может протекать только в живых клетках, с его помощью можно определять жизнеспособность клеток, тканей и органов растений (см. работу 1). Однако длительное пребывание клеток в состоянии плазмолиза может привести к их гибели.

По форме плазмолиза (выпуклый, вогнутый, судорожный) можно судить о вязкости цитоплазмы (см. работу 2). Явление плазмолиза можно использовать для определения концентрации клеточного сока (см. работу 14).

*Переход клеток из состояния плазмолиза в состояние тургора называется деплазмолизом.* Этот процесс можно наблюдать, если клетки, находящиеся в состоянии плазмолиза, перенести в чистую воду или гипотонический раствор (раствор, концентрация которого меньше концентрации клеточного сока). При этом вода начнет поступать в вакуоли и в клетках восстановится тургорное давление.

В *изотоническом* растворе (раствор, концентрация которого равна концентрации клеточного сока) осмос не происходит – вода не поглощается и не выделяется клетками.

**Цель работы:** наблюдать осмотические явления в клетках – тургор, плазмолиз, деплазмолиз.

**Ход работы.** Удобным объектом для наблюдения осмотических явлений являются эпидермис чешуи лука и листочки водного растения элодеи.

У луковицы лука нужно отделить одну из чешуй и на ее вогнутой поверхности острым лезвием сделать несколько неглубоких попереч-



ных и продольных надрезов на расстоянии около 0,5 см друг от друга. Затем с помощью препаровальной иглы следует снять кусочек эпидермиса и использовать его для наблюдения осмотических явлений.

**Наблюдение тургора.** Кусочек эпидермиса чешуи лука или листок элодеи помещают на предметное стекло в каплю воды, покрывают покровным стеклом и рассматривают в микроскоп при малом увеличении объектива ( $\times 8$ ,  $\times 9$ ,  $\times 10$ ).

Так как концентрация клеточного сока будет выше концентрации окружающего раствора, вода будет поступать в вакуоли (эндосмос) и в клетках будет возникать тургор.

После наблюдений нужно сделать зарисовки клеток (табл. 12.1).

**Наблюдение плазмолиза.** Готовят новый препарат используя эпидермис чешуи лука или листочек элодеи, помещая их в каплю 1 М раствора NaCl или KNO<sub>3</sub>, покрывают покровным стеклом и рассматривают в микроскоп.

Можно также использовать препараты, приготовленные для наблюдения тургора. В этом случае воду заменяют раствором соли. Для этого на предметное стекло, рядом с покровным стеклом, наносят несколько капель раствора соли, а с противоположной стороны к покровному стеклу прижимают полоску фильтровальной бумаги, впитывающую воду. Кусочки фильтровальной бумаги несколько раз меняют для полного удаления воды и замены ее раствором соли.

Так как концентрация внешнего раствора будет больше концентрации клеточного сока, вода начнет выходить из вакуолей (экзоосмос), а цитоплазма отделяться от клеточных стенок сначала в уголках (*уголковый* или *вогнутый* плазмолиз), а затем на всем ее протяжении, принимая округлую форму (*сильный* или *выпуклый* плазмолиз).

После наблюдений в табл. 12.1 делают зарисовки клеток с различной степенью плазмолиза.

**Наблюдение деплазмолиза.** На препаратах с хорошо выраженным плазмолизом заменяют раствор соли покровным стеклом на воду описанным выше приемом и наблюдают переход клеток из плазмолиза в тургорное состояние – деплазмолиз.

Таблица 12.1. Наблюдение осмотических явлений в клетках

Вариант	Рисунки	Наблюдаемые явления
1. В воде		
2. В 1 М растворе NaCl (или KNO <sub>3</sub> )		
3. Замена 1 М раствора NaCl на воду		

**Материалы и оборудование:** луковицы лука, элодея, предметные и покровные стекла, 1 М раствор NaCl или KNO<sub>3</sub>, препаровальные иглы, лезвия, микроскопы, полоски фильтровальной бумаги.

### Контрольные вопросы

1. Какие процессы лежат в основе поглощения и выделения воды клетками растений?
2. Что такое осмос, осмотическая система? Почему растительные клетки можно считать осмотическими системами? При каком условии в клетках происходит эндосмос и экзоосмос?
3. Что такое тургорное давление, почему оно возникает, какое значение имеет для растений?
4. Что такое плазмолиз и циторриз? В каких условиях они возникают и какое значение имеют для растений?

### Работа 13. Определение водного потенциала растительных тканей с помощью рефрактометра (по Н. А. Максимова и Н. С. Петинова)

*Водный потенциал* – термодинамический показатель состояния воды в системе. Водный потенциал является производным двух других термодинамических показателей – активности и химического потенциала воды.

*Активность* ( $a_w$ ) молекул чистой воды самая высокая, ее водный потенциал максимальный и равен нулю. В почве, растении, атмосфере активность воды снижается за счет взаимодействия с растворенными веществами – ионами солей, сахарами, полярными и ионизированными группами органических веществ. Поэтому в этих системах водный потенциал ниже нуля, т. е. имеет отрицательное значение.

*Химический потенциал воды* ( $\mu_w$ ) выражает максимальное количество внутренней энергии молекул воды, которое может быть превращено в работу. Он рассчитывается по уравнению:

$$\mu_w = \mu_w^0 + R \cdot T \cdot \ln a_w,$$

где  $\mu_w^0$  – химический потенциал чистой воды (= 0);

$R$  – газовая постоянная;

$T$  – абсолютная температура;

$a_w$  – активность воды в системе.

*Водный потенциал* ( $\Psi$ ) выражает способность воды в данной системе совершить работу по сравнению с той, которую при тех же условиях совершила бы чистая вода.

Водный потенциал рассчитывается по уравнению:

$$\Psi = \mu_w - \mu_w^0 / V_w,$$

где  $\mu_w$  и  $\mu_w^0$  – химические потенциалы воды в системе и чистой воды;

$V_w$  – парциальный мольный объем воды (для чистой воды и разбавленных растворов принимают равным  $18 \text{ см}^3/\text{моль}$ ).

Транспорт (передвижение) воды в растениях и системе «почва – растение – атмосфера» осуществляется по градиенту водного потенциала (от большего значения к меньшему). Наибольшая величина водного потенциала характерна для почвы, несколько ниже – для клеток корня, еще ниже – для клеток листа и наиболее низкая – для воздуха. Например, если водный потенциал хорошо увлажненной почвы составляет  $-50 \text{ кПа}$ , в корне небольшого дерева он может быть равен около  $-200 \text{ кПа}$ , в листьях  $-1500 \text{ кПа}$ , то в воздухе при относительной влажности около  $50 \%$  и температуре  $22 \text{ }^\circ\text{C} \approx -100000 \text{ кПа}$  ( $-1000 \text{ атм}$ ).

Водный потенциал ( $\Psi$ ) клеток или тканей растения является алгебраической суммой четырех компонентов: осмотического потенциала ( $\Psi_\pi$ ), матричного потенциала ( $\Psi_m$ ), гидростатического потенциала ( $\Psi_p$ ), гравитационного потенциала ( $\Psi_g$ ):

$$\Psi = \Psi_\pi + \Psi_m + \Psi_p + \Psi_g.$$

**Осмотический потенциал** ( $\Psi_\pi$ ) – компонент водного потенциала, характеризующий снижение активности воды осмотически активными веществами. Осмотический потенциал всегда остается величиной отрицательной. В клетке его величина зависит от концентрации клеточного сока и рассчитывается по уравнению Вант-Гоффа (см. работу 14).

**Матричный потенциал** ( $\Psi_m$ ) – характеризует снижение активности воды за счет гидратации коллоидных веществ и адсорбции на границе раздела фаз. Матричное связывание воды сопровождается увеличением объема и называется набуханием. Оно характерно для биokolлоидов цитоплазмы.

**Гидростатический потенциал** ( $\Psi_p$ ), или потенциал давления, – компонент водного потенциала, обусловленный внутриклеточным давлением. С повышением тургорного давления активность воды возрастает, поэтому гидростатический потенциал является величиной положительной.

**Гравитационный потенциал** ( $\Psi_g$ ) – отражает влияние на активность воды силы тяжести и заметно сказывается только при поднятии воды на относительно большую высоту.

Водный потенциал определяют для того, чтобы вовремя заметить признаки обезвоживания растений и правильно определить сроки орошения.

Используемый в работе метод определения водного потенциала основан на изменении концентрации внешнего раствора после пребывания в нем исследуемой ткани. Если раствор имеет меньший водный потенциал, чем водный потенциал ткани, то вода из ткани устремляется в раствор, и он разбавляется, соответственно в нем уменьшается процент сухих веществ или показатель преломления.

Из раствора, имеющего больший водный потенциал, чем водный потенциал ткани, вода устремляется в ткань. Это ведет к увеличению концентрации раствора (процента сухих веществ или показателя преломления).

Раствор, у которого при конечном исследовании (после пребывания ткани) концентрация не изменилась, имеет водный потенциал, равный водному потенциалу ткани, т. е. является изотоническим.

Водный потенциал чистого раствора соли определяется величиной его осмотического потенциала, который рассчитывается по уравнению Вант-Гоффа. Таким образом, величина осмотического потенциала изотонического раствора будет равна величине водного потенциала ткани.

**Цель работы:** определить водный потенциал клеток клубней картофеля, корнеплодов сахарной свеклы, редьки, моркови, листьев.

**Ход работы.** В пробирках готовят растворы NaCl или сахарозы убывающей концентрации от 1,0 до 0,1 М.

Наиболее удобно готовить по 10 мл каждого раствора, наливая соответствующее количество 1 М раствора и воды, пользуясь схемой, приведенной в табл. 13.1.

Таблица 13.1. Схема приготовления растворов NaCl различной концентрации

Концентрация растворов, моль	Взято миллилитров	
	1 М раствора	воды
1,0	10	–
0,8	8	2
0,6	6	4
0,4	4	6
0,2	2	8
0,1	1	9

Перемешав растворы, отливают по 1 мл каждого из них в сухие пробирки меньших размеров, начиная с наименьшей концентрации.

Из корнеплода свеклы, редьки, моркови или клубня картофеля пробочным сверлом диаметром 0,5...0,8 мм делают по 6 высечек длиной 1 см. Из листьев делают 20...30 высечек недалеко от средней жилки. Все высечки должны быть совершенно одинаковые. По одной высечке корнеплода (клубня) или по 6...8 высечек листьев помещают в маленькие пробирки с растворами и оставляют на 30...40 мин. В течение этого времени пробирки с высечками периодически встряхивают.

Сразу после помещения высечек в малые пробирки определяют показатель преломления (или процентное содержание сухих веществ) в исходных растворах (растворы в больших пробирках) с помощью рефрактометра. Начинать определение следует с растворов меньшей концентрации. Результаты заносят в табл. 13.2.

По истечении 30...40 мин определяют показатель преломления (или процентное содержание сухих веществ) конечных растворов, т. е. после пребывания в них исследуемых объектов (растворы в маленьких пробирках). Результаты заносят в табл. 13.2.

Таблица 13.2. **Определение концентрации изотонического раствора по рефрактометру**

Концентрация растворов, моль	Показатель преломления (процентное содержание сухих веществ) растворов		Концентрация изотонического раствора, моль	Водный потенциал ткани, кПа (атм)
	исходного	конечного		
1,0				
0,8				
0,6				
0,4				
0,2				
0,1				

Сравнивая начальный и конечный показатели преломления (или процентное содержание сухих веществ) в каждом растворе, находят концентрацию изотонического раствора. В случае если не наблюдается равенства исходных и конечных показателей ни у одного из исследуемых растворов, то концентрацию изотонического раствора рассчитывают как среднее арифметическое из концентраций двух соседних растворов, у одного из которых показатель преломления (или процентное содержание сухих веществ) уменьшается, а у другого – увеличивается.

Определив концентрацию изотонического раствора, рассчитывают его осмотический потенциал по уравнению Вант-Гоффа:

$$\Psi = \Psi_{\pi} = -R \cdot T \cdot C \cdot i \cdot 101,3,$$

где  $\Psi$  – водный потенциал, кПа;

$\Psi_{\pi}$  – осмотический потенциал, кПа;

$R$  – универсальная газовая постоянная (0,082 л · атм/(град·моль));

$T$  – абсолютная температура (273 °K + t °C);

$C$  – концентрация изотонического раствора (в молях);

$i$  – коэффициент Вант-Гоффа, характеризующий ионизацию раствора (табл. 13.3); для неэлектролитов (сахарозы)  $i = 1$ ;

101,3 – коэффициент перевода атмосфер в кПа.

Значение изотонического коэффициента ( $i$ ) находят по табл. 13.3.

Таблица 13.3. Значение  $i$  для растворов NaCl

Концентрация раствора, моль	1,0	0,8	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Значение $i$	1,62	1,64	1,68	1,70	1,73	1,75	1,78	1,83

**Устройство рефрактометра ИРФ-454 Б2М** (рис. 13.1). Рефрактометр – оптический прибор, с помощью которого можно определять показатель преломления и среднюю дисперсию жидких и твердых сред, а также процентное содержание сухих веществ в растворах.

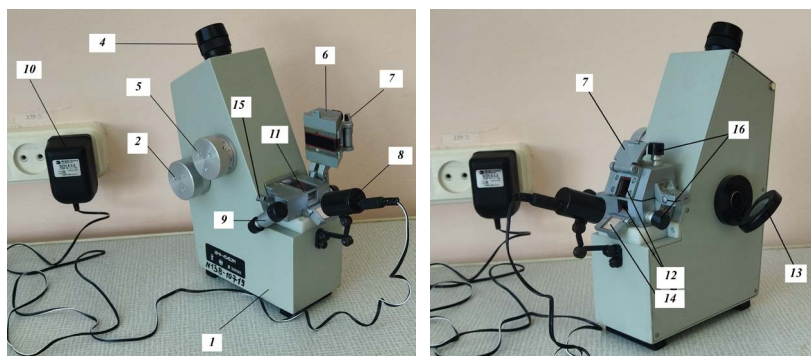


Рис. 13.1. Рефрактометр лабораторный ИРФ-454 Б2М:

1 – корпус; 2 – маховик; 3 – заглушка; 4 – окуляр; 5 – маховик компенсатора; 6 – оправа осветительной призмы; 7 – заслонка; 8 – осветитель; 9 – оправа термометра; 10 – блок питания; 11 – оправа измерительной призмы; 12 – окна осветительной и измерительной призм, 13 – поворотное зеркало освещения измерительных шкал; 14 – зеркало для подсвечивания измерительной призмы; 15 – застёжка; 16 – штупсер ультратермостата

Прибор имеет металлический *корпус 1* (рис. 13.1), на его верхней части закреплен окуляр *4*. Окуляр путем вращения может перемещаться вдоль оптической оси для установления резкости.

С правой стороны корпуса расположены *маховик 2* для перемещения изображения границы светотени (света и тени), и *маховик 5* компенсатора для устранения окрашенности границы светотени.

На корпусе неподвижно закреплена *оправа 11* с *измерительной* призмой и *оправой термометра 9*, а также *подвижная оправа 6* с *осветительной* призмой и *заслонкой 7*. Измерительная и осветительная призмы в оправках составляют рефрактометрический блок.

Со стороны окон *12* оправ осветительной и измерительной призм на корпусе установлен съемный *осветитель 8*, соединенный проводом с *блоком питания 10*.

С левой стороны на крышке корпуса укреплено *поворотное зеркало 13* для подсвечивания шкал.

Для подсвечивания измерительной призмы со стороны нижней грани на ее оправе установлено *откидное зеркало 14*.

На *маховике 4* компенсатора имеется *нониус* для определения дисперсии показателя преломления исследуемого вещества.

Для термостатирования к рефрактометру через штучера *16* можно подключить жидкостный ультратермостат с температурой жидкости  $20 \pm 0,2$  °С (так как показатель преломления в значительной степени зависит от температуры).

**Подготовка рефрактометра к работе и установка освещения.** Источником света может служить дневной свет. При слабой освещенности рабочего места следует использовать входящий в комплект прибора осветитель *8*. Для этого блок питания осветителя *10* нужно подключить к сети переменного тока (220 Вт), осветитель с помощью винта установить так, чтобы свет падал на входное окно осветительной призмы *12* или на зеркало *14*, которым свет направляется во входное окно вдоль рабочей грани измерительной призмы *11*.

**Установка окуляра.** Вывинтить окуляр *4* до упора. Затем повернуть его по часовой стрелке до тех пор, пока перекрестие в верхней части освещенного поля зрения не будет видно резко. Одновременно окуляр фокусируется на резкость изображения шкалы в нижней части поля зрения.

**Подготовка рефрактометрического блока.** Открыть верхнюю осветительную призму *6*. Поверхности осветительной и измерительной

призм промыть эфиром или спиртом и протереть чистой мягкой салфеткой, оставшиеся мелкие пылинки смахнуть мягкой кисточкой.

На чистую полированную поверхность измерительной призмы стеклянной палочкой или пипеткой осторожно **нанести, не касаясь призмы, 2...3 капли** исследуемой жидкости. Опустить осветительную призму 6 и прижать ее застёжкой 15.

Измерения прозрачных жидкостей следует проводить в проходящем свете (свет проходит через открытое окно осветительной призмы 6, *окно измерительной призмы закрывают зеркалом 14!*).

Измерения окрашенных и мутных проб проводят в отраженном свете. Для этого нужно закрыть заслонку 7 и откинуть зеркало 14, с помощью которого свет направляется в измерительную призму 11, при этом темное и светлое поля меняются местами.

***Измерение показателя преломления и определение процентного содержания сухих веществ.***

1. Наблюдая в окуляр 4, настроить четкую видимость перекрестия визирных штрихов (рис. 13.2, *a* и *b*).

2. Поворотом зеркала 13, расположенного с левой стороны корпуса прибора, добиться наилучшей освещенности измерительных шкал (рис. 13.2, *c*).

3. Вращением маховика 2 ввести границу светотени в поле зрения окуляра (рис. 13.2, *a*).

4. Вращением маховика 5 компенсатора устранить радужную окраску граничной линии светотени.

5. Наблюдая в окуляр, вращая маховик 2 вывести границу светотени **точно на перекрестие** визирных штрихов (рис. 13.2, *b*).

6. Снять отсчет по шкале показателей преломления или по шкале процентного содержания сухих веществ (рис. 13.2, *c*). Индексом для отсчета служит неподвижный вертикальный штрих призмы (рис. 13.2, *c*). Цена деления шкалы показателей преломления – 0,0005. Целые, десятые, сотые и тысячные доли показателей преломления определяют по шкале, а десятитысячные доли оценивают на глаз.

Цена деления шкалы процентного содержания сухих веществ – 0,2 %.



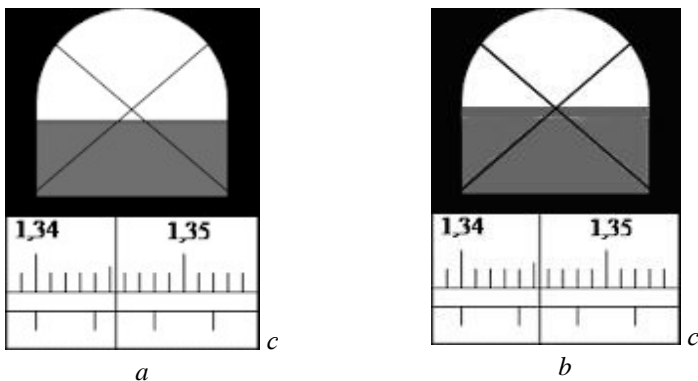


Рис. 13.2. Схема поля зрения объектива в рефрактометре:  
*a* – граница светотени ниже перекрестия визирных штрихов;  
*b* – граница светотени на перекрестии визирных штрихов;  
*c* – измерительная шкала с вертикальным штрихом

**Материалы и оборудование:** клубни картофеля, корнеплоды сахарной свеклы, редьки или моркови, листья растений, рефрактометр, 1,0 М раствор NaCl или сахарозы, мерные пипетки на 1 и 10 мл, штативы с пробирками на 20 мл и 10 мл, лезвия, стеклянные палочки, спирт, вата, фильтровальная бумага.

### Контрольные вопросы

1. Что понимают под водным потенциалом, активностью и химическим потенциалом воды?
2. Назовите величины водного потенциала почвы, растений, атмосферы. В каком направлении осуществляется передвижение воды?
3. Назовите компоненты водного потенциала растений, дайте им характеристику.
4. Объясните, на чем основан принцип метода определения водного потенциала растений в данной работе. Изложите методику его определения.
5. Для чего определяют водный потенциал растений?

## Работа 14. Определение осмотического потенциала клеточного сока методом плазмолиза

**Осмотический потенциал** – компонент водного потенциала, характеризующий снижение активности воды частицами растворенных осмотически активных веществ. Осмотически активными веществами в клетке являются соли, сахара, аминокислоты, органические кислоты и другие низкомолекулярные полярные соединения, содержащиеся в клеточном соке.

Осмотический потенциал клеточного сока определяет максимальную способность клетки поглощать воду. Его величина зависит от вида растений, условий их выращивания и является показателем их приспособленности к условиям произрастания.

Осмотический потенциал можно рассчитать по уравнению Вант-Гоффа:

$$\Psi_{\pi} = -R \cdot T \cdot C \cdot i \cdot 101,3,$$

где  $\Psi_{\pi}$  – осмотический потенциал, кПа;

$R$  – универсальная газовая постоянная (0,082 л · атм / (град·моль));

$T$  – абсолютная температура (273 °K +  $t$  °C);

$C$  – концентрация клеточного сока (в молях);

$i$  – коэффициент Вант-Гоффа, характеризующий ионизацию раствора (значение  $i$  приведено в табл. 13.3);

101,3 – коэффициент перевода атмосфер в кПа.

В приведенном уравнении неизвестна концентрация клеточного сока. В работе используется плазмолитический метод ее определения. Для этого готовят несколько растворов соли или сахара известной концентрации и находят среди них, как описано ниже, изотонический раствор, т. е. раствор, концентрация которого равна концентрации клеточного сока.

Погружая последовательно кусочки ткани, пригодные для микроскопии, в приготовленные растворы и просматривая их в микроскоп, находят два таких раствора, в одном из которых наблюдается начальный плазмолиз (этот раствор будет гипертоническим – его концентрация выше концентрации клеточного сока), а во втором, соседнем, с более низкой концентрацией, плазмолиз отсутствует (этот раствор будет гипотоническим – его концентрация ниже концентрации клеточного сока).

Следовательно, концентрация изотонического раствора будет равна среднему арифметическому из концентраций этих двух растворов.

**Цель работы:** определить осмотический потенциал клеточного сока эпидермиса чешуи лука, листьев наземных или водных растений (элодея).

**Ход работы.** В шести фарфоровых чашечках готовят растворы солей ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KNO}_3$ ) или сахарозы убывающей концентрации от 1,0 до 0,1 М путем смешивания 1,0 М раствора и дистиллированной воды. Схема приготовления растворов приведена в табл. 13.3 (см. работу 13).

Кусочки эпидермиса чешуи лука или целые листочки элодеи помещают последовательно в чашки с приготовленными растворами, начиная с наибольшей концентрации.

В растворах  $\text{NaCl}$  или  $\text{KNO}_3$  препараты выдерживают 2...3 мин, а в растворах сахарозы – 15...20 мин. Так как минеральные соли более легко проникают через протоплазму в клеточный сок, эпидермис или листочки элодеи в растворах солей нужно выдерживать строго определенное время, иначе позднее плазмолиз в клетках исчезает. Растворы сахарозы медленнее проникают через протоплазму, поэтому плазмолиз в них сохраняется длительное время.

По истечении указанного времени чистой сухой стеклянной палочкой переносят несколько капель раствора из чашечки на предметное стекло. Таким же образом из чашечки извлекают исследуемый объект и переносят на стекло в каплю раствора, покрывают его тонким покровным стеклом и рассматривают в микроскоп при малом увеличении. После каждого раствора палочку тщательно вытирают сухой фильтровальной бумагой. В каждом препарате определяют степень плазмолиза, характерную для большинства его клеток. Результаты наблюдений заносят в табл. 14.1 и зарисовывают клетки.

Таблица 14.1. **Определение осмотического потенциала**

Концентрация растворов, моль	Рисунки клеток	Степень плазмолиза (сильный, умеренный, начальный, отсутствует)	Концентрация изотонического раствора (клеточного сока), моль	Осмотический потенциал, кПа (атм)
1,0				
0,8				
0,6				
0,4				
0,2				
0,1				

Не следует помещать исследуемые объекты во все растворы одновременно. В каждый последующий раствор материал помещают после просмотра и зарисовки клеток в предыдущем.

На основании полученных данных определяют концентрацию изотонического раствора, как описано выше (она будет равна концентрации клеточного сока).

Осмотический потенциал клеточного сока рассчитывают по уравнению Вант-Гоффа, приведенному выше.

При исследовании различных объектов составляется сводная таблица полученных результатов и делаются выводы.

**Материалы и оборудование:** луковицы лука, элодея, 1,0 М раствор NaCl, KNO<sub>3</sub> или сахарозы, предметные и покровные стекла, фарфоровые чашки, мерные пипетки на 1 мл, 5 мл и 10 мл, лезвия бритвы, препаровальные иглы, кусочки фильтровальной бумаги, стеклянные палочки, микроскопы.

### Контрольные вопросы

1. Дайте определение осмотического потенциала, укажите его роль в поглощении воды клетками.
2. Назовите величину осмотического потенциала различных органов растений и растений различных экологических групп.
3. Напишите уравнение Вант-Гофа и укажите, какая переменная величина в нем неизвестна. Объясните сущность плазмолитического метода определения концентрации клеточного сока.
4. Опишите методику проведения опыта в данной работе.

### Работа 15. Влияние света и влажности воздуха на транспирацию

**Транспирация** – это процесс испарения воды растениями. Основным органом транспирации является лист. Транспирация осуществляется как через устьица (их суммарная поверхность составляет около 1 % площади листа) – *устьичная* транспирация, так и с поверхности кутикулы, покрывающей эпидермис листа – *кутикулярная* транспирация. Выделяют также *перидермальную* транспирацию – испарение воды через разрывы в перидерме или чечевички, расположенные на поверхности молодых побегов древесных растений и клубней. В процессе транспирации растения теряют более 99 % поглощенной воды.

Транспирация имеет важное значение в жизнедеятельности растений: обеспечивает их охлаждение, способствует газообмену и передвижению минеральных веществ от корней в наземные органы, является верхним концевым двигателем восходящего тока.

Основным показателем транспирации является **интенсивность транспирации** – количество воды, испаренной с единицы листовой поверхности за единицу времени. Обычно ее выражают в граммах испаренной воды за 1 ч с 1 м<sup>2</sup> листовой поверхности (г/(м<sup>2</sup>·ч)).

Интенсивность транспирации зависит как от внутренних факторов (вида растений, особенностей строения листьев, возраста), так и условий среды (света, влажности воздуха, температуры, силы ветра и др.).

Существуют различные методы определения интенсивности транспирации: *весовые* – основаны на уменьшении веса листа, ветки или целого растения, помещенных в сосуд с водой; *объемные* – основаны на определении объема воды, поглощенной листом или веткой растения из какого-либо измерительного устройства, например, мерного цилиндра; *газометрические* – основаны на изменении влажности воздуха, прокачиваемого через сосуд с транспирирующим растением.

В данной работе используется *весовой метод* определения интенсивности транспирации. Для этого с растений срезают листья, определяют их площадь, помещают в колбы с водой и взвешивают. Через определенное время колбы с листьями снова взвешивают и определяют убыль массы (количество испаренной влаги). Интенсивность транспирации рассчитывают по формуле

$$T = \frac{A \cdot 60 \cdot 10000}{B \cdot S},$$

где  $T$  – интенсивность транспирации, г/(м<sup>2</sup>·ч);

$A$  – количество испаренной воды (убыль массы колб с листьями), г;

$B$  – продолжительность опыта, мин;

$S$  – площадь листа, см<sup>2</sup>;

60 – коэффициент перевода минут в часы;

10000 – коэффициент перевода сантиметров квадратных в метры квадратные.

**Цель работы:** определить интенсивность транспирации у листьев растений в различных условиях освещенности и влажности воздуха.

**Ход работы.** В три колбочки объемом 100 мл наливают из одного стакана водопроводную воду комнатной температуры (уровень воды должен быть ниже верхнего края колб на 1...2 см). Следует избегать попадания воды на внешнюю поверхность колб, мокрые колбы нужно тщательно вытереть досуха фильтровальной бумагой.

Затем с одного и того же растения срезают три листа одинакового возраста или яруса с черешками длиной не менее 5...6 см. Для опреде-

ления площади листовых пластинок их контуры точно обводят карандашом или ручкой на бумаге. После этого в фарфоровые чашки наливают водопроводную воду, черешки листьев погружают в воду и под водой острыми лезвиями обновляют срезы черешков. Срезы черешков обновляют для того, чтобы не было закупоривания сосудов ксилемы воздухом. Затем листья быстро переносят в колбочки с водой, погружая в воду черешки листьев.

Для того чтобы не было испарения воды из колбочек, в них поверх воды наливают тонкий слой растительного масла.

Колбы с листьями взвешивают на аналитических весах, массу и время взвешивания записывают в табл. 15.1.

Таблица 15.1. Результаты определения интенсивности транспирации

Название растения	Вариант опыта (на свету, в темноте, при повышенной влажности)	Время начала опыта, ч, мин	Время окончания опыта, ч, мин	Продолжительность опыта, мин	Масса колбы с листом, г		Кол-во испаренной воды (убыль массы колбы с листом), г	Площадь листа, см <sup>2</sup>	Интенсивность транспирации, г/(м <sup>2</sup> ·ч)
					в начале опыта	в конце опыта			

Колбочки ставят в разные условия: одну – на освещенное место (на солнце или под электрическую лампу), вторую – в темное место (шкаф), третью – под стеклянный колпак с повышенной влажностью воздуха (для этого стенки колпака изнутри обтирают мокрой фильтровальной бумагой) и одинаковые с первой колбочкой условия освещения.

В опыт можно включать и другие варианты, например, разные температуры воздуха или условия освещения (естественное, электрической лампы).

Пока идет опыт, определяют площадь листовых пластинок весовым методом, который основан на прямой пропорциональности между массой и площадью бумаги, вырезанной по контуру листа растения. Для этого обведенные на бумаге контуры листа вырезают и взвешивают на аналитических весах. Из той же бумаги вырезают квадраты или прямоугольники известной площади (50 или 100 см<sup>2</sup>), и тоже взвешивают. Площадь листовых пластинок вычисляют по формуле:

$$S = \frac{M_1 \cdot S_1}{M_2},$$

где  $S$  – площадь листовых пластинок,  $\text{см}^2$ ;

$M_1$  – масса вырезанных из бумаги контуров листьев, г;

$S_1$  – площадь вырезанных из бумаги квадратов или прямоугольников, 50 или  $100 \text{ см}^2$ ;

$M_2$  – масса вырезанных из бумаги квадратов или прямоугольников, г.

Через определенный промежуток времени (2...3 ч) колбочки с листьями снова взвешивают. Находят разницу между результатами первого и второго взвешиваний. Уменьшение массы колбочек будет соответствовать количеству испаренной листом воды за время опыта.

Полученные результаты заносят в табл. 15.1 и рассчитывают интенсивность транспирации по приведенной выше формуле.

Затем составляют сводную табл. 15.2, анализируют полученные результаты и делают выводы о влиянии света, влажности воздуха и других факторов на транспирацию.

Таблица 15.2. Интенсивность транспирации растений в различных условиях освещения и влажности воздуха

Название растения	Интенсивность транспирации, $\text{г}/(\text{м}^2 \cdot \text{ч})$			
	на свету	в темноте	при повышенной влажности	при повышенной температуре

**Материалы и оборудование:** колбочки на 100 мл, аналитические весы, ножницы, лезвия, линейки, фарфоровые стаканы и чашки, стеклянный колпак, растительное масло, фильтровальная бумага, бумага для определения площади листьев.

### Контрольные вопросы

1. Что такое транспирация? Назовите ее виды и укажите роль.
2. Что понимают под интенсивностью транспирации, какие существуют методы ее определения?
3. Какой метод определения интенсивности транспирации используется в работе, в чем его сущность? Изложите методику выполнения опыта.
4. Какой метод определения площади листьев используется в работе, в чем его сущность?
5. Как влияет свет и влажность воздуха на транспирацию? Объясните причины повышения или снижения интенсивности транспирации в этих условиях.

## Работа 16. Определение интенсивности транспирации по методу Л. А. Иванова (с помощью торсионных весов)

В работе используется весовой метод определения интенсивности транспирации, разработанный Л. А. Ивановым. Метод основан на учете изменения массы листа, срезанного с растения, за короткий промежуток времени. Измерения проводят с помощью торсионных весов до тех пор, пока масса листа не перестает изменяться, т. е. когда происходит закрытие устьиц и начинается его завядание. Так как интенсивность транспирации определяется при естественной насыщенности листа водой, данный метод лучше использовать в полевых условиях.

**Цель работы:** определить интенсивность транспирации у листьев разного возраста и при различных условиях освещенности.

**Ход работы.** Перед взвешиванием торсионные весы (рис. 16.1) устанавливают в горизонтальное положение по сферическому уровню 2, вмонтированному в треножник корпуса, вращением установочных винтов 1. На крючок 9 коромысла весов 8 подвешивают чашечку 10. Передвижением вправо рычага арретира 3 включают весы. Передвижением ручки поводка 6 устанавливают отсчетную стрелку 5 на нулевое деление шкалы циферблата 11. Вращением тарировочной ручки, расположенной на тыльной стороне весов, совмещают контрольную стрелку 4 с контрольным штрихом циферблата.

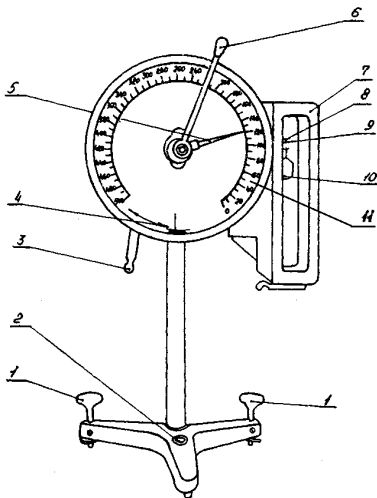


Рис. 16.1. Весы торсионные ВТ-500:

- 1 – винт;
- 2 – уровень сферический;
- 3 – рычаг арретира;
- 4 – стрелка контрольная;
- 5 – стрелка отсчетная;
- 6 – поводок;
- 7 – крышка;
- 8 – коромысло;
- 9 – крючок;
- 10 – чашечка;
- 11 – циферблат



После установки весов с растения срезают лист массой не более 400...500 мг. Лист кладут на бумагу и точно обводят карандашом или ручкой его контур для последующего определения площади.

Лист помещают на чашечку весов и периодически (через 1...2 мин) взвешивают. Результаты заносят в табл. 16.1.

Таблица 16.1. Результаты определения интенсивности транспирации

Исследуемое растение	Вариант опыта	Время взвешивания, ч:мин	Масса листа, мг	Убыль массы листа, мг	Интенсивность транспирации, г/(м <sup>2</sup> ·ч)

Наблюдения можно производить в течение 5...15 мин после среза листа. В дальнейшем в связи с отсутствием возмещения испаренной воды устьица начинают закрываться, и транспирация заметно уменьшается.

Окончив опыт, находят среднюю убыль массы листа за 1...2 мин или за все время наблюдения до прекращения транспирации.

Площадь листовой пластинки и интенсивность транспирации рассчитывают, как указано в работе 15.

После выполнения работы составляют сводную таблицу значений интенсивности транспирации у всех проанализированных растений и делают выводы.

**Материалы и оборудование:** растения злаков, зернобобовых, овощных культур, комнатные цветочные растения, торсионные весы, ланцеты или лезвия, ножницы, линейки, бумага для определения площади листьев.

### Контрольные вопросы

1. На чем основан используемый в работе метод определения интенсивности транспирации? Укажите его достоинства и недостатки.
2. Изложите методику выполнения работы.
3. Какие закономерности транспирации выявлены в результате выполнения работы?

## Работа 17. Определение интенсивности транспирации объемным методом (в модификации В. П. Моисеева)

Основным достоинством данного метода являются его точность, наглядность, возможность изучения динамики транспирации при изменении условий среды. Для выполнения работы не требуется сложной измерительной техники.

Принцип метода определения интенсивности транспирации состоит в том, что лист растения соединяется с помощью эластичной трубки с микропипеткой, предварительно заполненной водой. По мере транспирации объем воды в пипетке уменьшается. Зная площадь листа, интервал времени и количество испаренной влаги, можно рассчитать интенсивность транспирации.

**Цель работы:** изучить влияние света, температуры, влажности воздуха, силы ветра, вида или возраста растений на транспирацию.

**Ход работы.** Берут микропипетку с ценой деления шкалы 0,001...0,002 мл и присоединяют к ней тонкую эластичную трубку.

С растения срезают лист с черешком длиной 2...5 см желательного круглого сечения (*толщина черешка должна быть немного больше внутреннего диаметра трубки!*). Контур листа точно обводят на бумаге для последующего определения его площади весовым методом.

В микропипетку с помощью груши засасывают водопроводную воду. Обновляют острым лезвием бритвы срез черешка под водой и черешок листа вводят в свободный конец эластичной трубки (*в пипетке и трубке не должно быть пузырьков воздуха!*).

Проверяют герметичность соединения трубки с черешком. Для этого пипетку удерживают в вертикальном положении (листом вниз) и убеждаются, что вода не просачивается между черешком и стенкой трубки. При отсутствии герметичности необходимо срезать новый лист с черешком большего диаметра.

В течение опыта микропипетка с листом должна находиться в заданных условиях и располагаться в горизонтальном положении. Пипетку можно закрепить с помощью зажимов на штативе (рис. 17.1).

Учет количества поглощенной листом воды из пипетки следует вести через определенный интервал времени (1...5 мин). Отсчет и время записывают в табл. 17.1.

Таблица 17.1. Результаты определения интенсивности транспирации

название растения						
Вариант опыта	Отсчет, мл	Время отсчета, мин	Поглощено воды, мл	Интервал время, мин	Площадь листа, см <sup>2</sup>	Интенсивность транспирации, г/(м <sup>2</sup> ·ч)

Площадь листовой пластинки и интенсивность транспирации рассчитывают, как описано в работе 15.

**Опыт 1. Влияние света на транспирацию.** Микропипетку с листом помещают вблизи источника света или в темноту (закрывают темной бумагой). Интенсивность освещения регулируют путем увеличения или сокращения расстояния между листом и источником света или путем включения дополнительного освещения. Интенсивность освещения измеряют люксметром и записывают в колонку «вариант опыта». По окончании опыта рассчитывают интенсивность транспирации и строят график ее зависимости от интенсивности освещения.

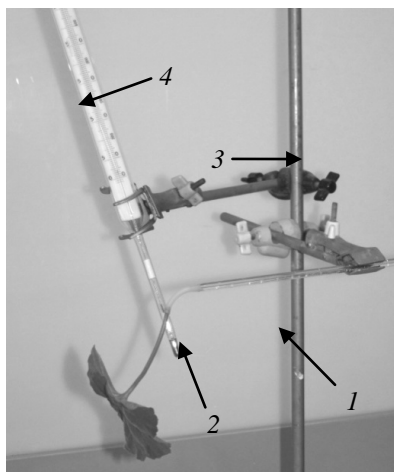


Рис. 17.1. Прибор для определения интенсивности транспирации объемным методом:  
 1 – микропипетка; 2 – эластичная трубка;  
 3 – штатив; 4 – термометр

**Опыт 2. Влияние температуры на транспирацию.** Микропипетку с листом закрепляют на штативе. На одном уровне с листом устанавливают термометр. Нагревательный прибор (электроплитку) подводят под лист. Температуру воздуха увеличивают путем сокращения расстояния между листом и нагревательным прибором или путем установки его переключателя на большую мощность. Во избежание колебаний температуры за счет перемещения воздуха следует применять защитные экраны. Температуру воздуха записывают в колонку «вариант опыта». По окончании опыта делают расчеты интенсивности транспирации и строят график ее зависимости от температуры.

**Опыт 3. Влияние ветра на транспирацию.** Изучать влияние ветра на транспирацию можно в естественных условиях или в лаборатории, используя вентилятор. Силу ветра следует измерять с помощью анемометра. Его показания записывают в колонку «вариант опыта». По окончании опыта производят расчеты интенсивности транспирации и строят график ее зависимости от силы ветра.

**Опыт 4. Влияние влажности воздуха на транспирацию.** Микропипетку с листом устанавливают в стеклянной камере или под стеклянным колпаком. Влажность воздуха повышают путем увлажнения стенок камеры. По окончании опыта рассчитывают интенсивность транспирации и делают выводы.

**Материалы и оборудование:** микропипетки с ценой деления шкалы 0,001...0,002 мл, эластичные трубки, штативы, электроплитка, термометр, вентилятор, стеклянный колпак, фарфоровые чашки, ножницы, лезвия, бумага для определения площади листьев.

### **Контрольные вопросы**

1. В чем сущность и достоинства используемого в работе метода определения интенсивности транспирации?
2. Какие закономерности установлены в опытах?

## Работа 18. Определение относительной транспирации

**Относительная транспирация** – это отношение интенсивности транспирации растения к интенсивности испарения воды с открытой водной поверхности. Она показывает, как идет испарение воды листом по сравнению с испарением со свободной водной поверхности. Относительная транспирация характеризует способность листа снижать потери воды за счет физиологических или морфологических приспособлений (количества и расположения устьиц, кутикулы, опушения).

Относительная транспирация выражается обычно величинами порядка 0,1...0,5, достигая иногда 0,9 и снижаясь у некоторых, хорошо защищенных от потери воды растений, до 0,01 и ниже.

Для расчета относительной транспирации одновременно определяют интенсивность транспирации растения весовым методом и интенсивность испарения воды со свободной водной поверхности.

**Цель работы:** определить относительную транспирацию у листьев различных сельскохозяйственных культур или комнатных растений.

**Ход работы.** Интенсивность транспирации опытных растений определяют, как описано в работе 15.

Для определения интенсивности испарения воды с открытой водной поверхности берут чашку Петри, наполняют ее на 1/3 водой, измеряют диаметр по внутренним краям, взвешивают на весах и ставят в одинаковые условия с растением. За время опыта определяют площадь листьев (как описано в работе 15) и площадь открытой водной поверхности в чашке Петри (по формуле  $S = \pi r^2$ ).

Через 1...2 ч снова взвешивают колбочку с растением и чашку с водой. Результаты заносят в табл. 18.1 и 18.2.

Таблица 18.1. Определение интенсивности транспирации

Название растения	Масса колбы с листом, г		Время начала опыта, ч.мин	Время окончания опыта, ч.мин	Продолжительность опыта, мин	Количество испаренной воды (убыль массы колбы с листом), г	Площадь листа, см <sup>2</sup>	Интенсивность транспирации, г/(м <sup>2</sup> ·ч)
	в начале опыта	в конце опыта						

Таблица 18.2. **Определение интенсивности испарения воды с открытой водной поверхности**

Масса чашки с водой, г		Время начала опыта, ч:мин	Время окончания опыта, ч:мин	Продолжительность опыта, мин	Количество испаренной воды, г	Площадь открытой водной поверхности, см <sup>2</sup>	Интенсивность испарения с открытой водной поверхности, г/(м <sup>2</sup> ·ч)
начальная	конечная						

Интенсивность транспирации листа ( $T$ ) и интенсивность испарения воды со свободной водной поверхности ( $E$ ) рассчитывают по формуле:

$$T \text{ или } E = \frac{A \cdot 60 \cdot 10000}{B \cdot S},$$

где  $T$  – интенсивность транспирации листа, г/(м<sup>2</sup>·ч);

$E$  – интенсивность испарения воды со свободной водной поверхности, г/(м<sup>2</sup>·ч);

$A$  – уменьшение массы колбочки с листом или кристаллизатора с водой (количество испаренной воды), г;

$B$  – время опыта, мин;

$S$  – площадь листа или открытой водной поверхности, см<sup>2</sup>.

Зная интенсивность транспирации листа и интенсивность испарения воды со свободной водной поверхности, вычисляют относительную транспирацию по формуле:

$$OT = \frac{T}{E},$$

где  $OT$  – относительная транспирация;

$T$  – интенсивность транспирации листа, г/(м<sup>2</sup>·ч);

$E$  – интенсивность испарения воды с открытой водной поверхности, г/(м<sup>2</sup>·ч).

Результаты заносят в сводную таблицу и делают выводы.

**Материалы и оборудование:** растения злаков, зернобобовых, овощных культур, комнатные растения, аналитические весы, лезвия или ланцеты, ножницы, растительное масло, колбочки на 100 мл, чашки Петри, линейки, бумага для определения площади листьев.

## Контрольные вопросы

1. Что понимают под относительной транспирацией, в каких пределах изменяется ее величина и от чего она зависит?
2. Как можно объяснить низкие величины относительной транспирации у некоторых растений?
3. Изложите методику определения относительной транспирации.

## Работа 19. Определение водного дефицита растений

В процессе транспирации растения теряют значительное количество воды. Пополнение запасов влаги осуществляется из почвы благодаря корневой системе. Если расход воды соответствует ее поступлению, складывается благоприятный *водный баланс*. Однако в естественных условиях полного насыщения листьев водой практически не бывает. Чаще у растений наблюдается водный дефицит.

*Водный дефицит* – это количество воды, недостающее до полного насыщения тканей растения, выраженное в процентах, относительно количества воды, содержащейся при их полном насыщении.

Водный дефицит особенно сильно возрастает в жаркую погоду, в связи с повышением интенсивности транспирации, а также при засухе и недостатке воды в почве.

Водный дефицит, не превышающий 10 %, представляет собой нормальное явление, не причиняющее растению вреда. Водный дефицит, достигающий 25 % и более, приводит к закрыванию устьиц, завяданию листьев, снижению роста и фотосинтеза, нарушению энергетического обмена и синтетической деятельности клеток.

Показателем, противоположным водному дефициту, является относительная тургесцентность.

*Относительная тургесцентность* – это величина, показывающая, какую долю в процентах составляет количество воды, содержащейся в листьях, от ее содержания, обеспечивающего полный тургор.

Для определения водного дефицита с растений срезают листья, взвешивают на аналитических весах, затем помещают в воду для полного насыщения, снова взвешивают и высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 105 °С.

Затем рассчитывают содержание влаги в листьях в естественном состоянии (до насыщения водой) и после полного насыщения водой.

Водный дефицит и относительную тургисцентность тканей рассчитывают по формулам, приведенным ниже.

**Цель работы:** определить величину водного дефицита растений, произрастающих в различных условиях водообеспеченности.

**Ход работы.** У растений, имеющих небольшой размер листьев, срезают 5...10 листочков, быстро взвешивают их на аналитических весах и результат ( $m_1$ ) заносят в табл. 19.1.

Затем листья помещают в чашки Петри, заполненные на 1/3 водой, закрывают их крышками и оставляют для полного насыщения на 2 ч. У растений, имеющих крупные листья, срезают 2...3 листа и пробочным сверлом диаметром 8...10 мм делают 20...30 высечек, при этом стараются не попадать на крупные жилки листа. С высечками делают то же, что и с целыми листьями.

Через 2 ч листья (или высечки) вынимают из чашек, осторожно и быстро обсушивают снаружи фильтровальной бумагой и взвешивают. Для контроля полноты насыщения листья (высечки) снова помещают в чашки с водой. Через 30 мин их вынимают, обсушивают и снова взвешивают. Если масса не изменилась, значит, листья полностью насыщены водой. Результат ( $m_2$ ) заносят в табл. 19.1.

После этого листья (высечки) помещают во взвешенные бюксы и высушивают в сушильном шкафу при температуре 105 °С до постоянной массы ( $m_3$ ) (см. работу 10). Затем рассчитывают содержание воды в листьях до насыщения ( $m_1 - m_3$ ), после насыщения ( $m_2 - m_3$ ) и количество воды, недостающее до полного насыщения ( $m_2 - m_3$ ) - ( $m_1 - m_3$ ). Результаты заносят в табл. 19.1.

Таблица 19.1. Результаты определения водного дефицита листьев

Название растения	Масса листьев (высечек) до насыщения водой, г	Масса листьев (высечек) после насыщения, г	Масса абсолютно сухих листьев (высечек), г	Исходное содержание воды в листьях, г	Количество воды в листьях при полном насыщении, г	Водный дефицит, %	Относительная тургисцентность, %
	$m_1$	$m_2$	$m_3$	$m_1 - m_3$	$m_2 - m_3$	$W_g$	$O_T$

Водный дефицит растений рассчитывают по формуле:

$$W_g = \frac{(m_2 - m_3) - (m_1 - m_3)}{m_2 - m_3} \cdot 100 \%,$$



где  $W_g$  – водный дефицит, %;

$m_1$  – масса сырых высечек до насыщения водой, г;

$m_2$  – масса высечек после насыщения водой, г;

$m_3$  – масса абсолютно сухих высечек, г;

$(m_2 - m_3) - (m_1 - m_3)$  – количество воды, недостающее до полного насыщения, г;

$m_2 - m_3$  – содержание воды в листьях при полном насыщении, г.

Относительную тургесцентность рассчитывают по формуле:

$$O_T = \frac{m_1 - m_3}{m_2 - m_3} \cdot 100 \%,$$

где  $O_T$  – относительная тургесцентность, %;

$m_1$  – масса сырых высечек до насыщения водой, г;

$m_2$  – масса высечек после насыщения водой, г;

$m_3$  – масса абсолютно сухих высечек, г;

$m_1 - m_3$  – количество воды в листьях в естественном состоянии, г;

$m_2 - m_3$  – количество воды в листьях при полном насыщении, г.

**Материалы и оборудование:** растения, бюксы, аналитические весы, сушильный шкаф, эксикатор, ножницы, пробочные сверла диаметром 8...10 мм, чашки Петри, фильтровальная бумага.

### Контрольные вопросы

1. Что понимают под водным балансом и водным дефицитом растений?
2. В каких условиях возникает значительный водный дефицит и какое влияние он оказывает на растения?
3. Опишите методику определения водного дефицита растений.

### Раздел 3. ФОТОСИНТЕЗ

**Фотосинтез** – это процесс, в результате которого из углекислого газа и воды за счет электромагнитной энергии света синтезируются органические вещества. Продукты фотосинтеза – углеводы – используются для формирования клеточных структур, откладываются в запасяющих органах растений, являются основными субстратами дыхания. Таким образом, при фотосинтезе создается основная масса сухого вещества растений, что определяет ведущую роль этого процесса в формировании урожая. Органические вещества, образующиеся при фотосинтезе, используются гетеротрофными организмами как источник энергии и пластических веществ в процессе их жизнедеятельности.

Фотосинтез протекает во всех зеленых частях растений, но основным органом фотосинтеза является лист. Лист имеет плоскую, тонкую, хорошо просвечиваемую структуру. Он приспособлен для эффективного улавливания света, газообмена, притока воды и минеральных веществ и оттока продуктов фотосинтеза. Лист имеет два вида фотосинтетической ткани – столбчатую и губчатую хлоренхиму.

Фотосинтезирующими органоидами клеток являются *хлоропласты*. Они имеют линзовидную форму, способны передвигаться в клетках, размножаются путем деления, заполнены полужидким матриксом – *стромой*, в строме содержатся мембранные структуры – *тилакоиды* и *граны*.

Лист имеет два вида фотосинтетической ткани – столбчатую и губчатую хлоренхиму. Клетки столбчатой паренхимы содержат больше хлоропластов и специализируются на поглощении света и синтезе органических веществ. Клетки губчатой ткани содержат меньше хлоропластов. Губчатая ткань имеет крупные межклетники и участвует в фотосинтезе, газообмене и транспирации.

Фотосинтез включает две фазы – световую и темновую.

**Световая фаза** протекает на мембранах (ламеллах) тилакоидов. Ее сущность заключается в трансформации световой (электромагнитной) энергии в химическую. Функцию *поглощения света* выполняют пигменты *светособирающего комплекса* («антенны») – хлорофиллы и каротиноиды (работы 19...21). Поглощенная ими энергия методом индуктивного резонанса передается на хлорофилл *реакционных центров*. *Возбуждение хлорофилла* реакционных центров сопровождается переходом электрона на энергетически более высокую орбиту. Возбужденный хлорофилл становится активным восстановителем – способен передавать электрон другим веществам – акцепторам электрона.

Последовательный переход электрона по цепи переносчиков (компоненты электрон-транспортной цепи – ЭТЦ) сопровождается освобождением энергии, которая используется для синтеза АТФ. Этот процесс называется *фотосинтетическим фосфорилированием*.

Теряя электроны, хлорофилл реакционных центров становится активным окислителем – отнимает электроны у воды, что приводит к ее разложению на кислород и водород (*фотолиз воды*). Кислород выделяется в атмосферу, а водород участвует в восстановлении коферментов дегидрогеназ – НАД(Ф)<sup>+</sup> восстанавливается до НАД(Ф)·Н.

Таким образом, конечными продуктами световой фазы являются АТФ и НАД(Ф)·Н.

**Темновая фаза** фотосинтеза протекает в строме хлоропластов. Темновая фаза – это совокупность биохимических ферментативных реакций, в ходе которых происходит включение СО<sub>2</sub> в состав органических соединений и их восстановление до уровня углеводов с участием продуктов световой фазы (АТФ и НАД(Ф)·Н). Для темновых реакций характерна *цикличность, разветвленность и множественность путей ассимиляции СО<sub>2</sub>*.

У растений средней и северной полосы (пшеница, рожь, ячмень, горох, люпин, картофель, свекла и др.) первыми стабильными продуктами фотосинтеза являются трехуглеродные соединения – фосfogлицериновый альдегид и фосфодиоксиацетон, поэтому их называют **С<sub>3</sub>-растениями**. Для них характерно высокое *фотодыхание* – распад готовых продуктов фотосинтеза с выделением СО<sub>2</sub> при высокой интенсивности освещения. Эти растения имеют более низкую продуктивность и засухоустойчивость.

У растений южного происхождения (кукуруза, просо, сорго, сахарный тростник) первыми стабильными продуктами фотосинтеза являются четырехуглеродные соединения – щавелево-уксусная, яблочная и аспарагиновая кислоты, поэтому их называют **С<sub>4</sub>-растениями**. Они отличаются более высокой продуктивностью и засухоустойчивостью, так как имеют низкое фотодыхание, а в жаркое полуденное время, когда устьица закрываются, необходимый для фотосинтеза СО<sub>2</sub> образуется в результате декарбоксилирования накопленных в клеточном соке яблочной и аспарагиновой кислот. При закрытии устьиц у растений также снижается расход воды.

Основными показателями, характеризующими фотосинтетическую активность растений, являются интенсивность фотосинтеза (работа 23) и продуктивность фотосинтеза (работа 24).

На фотосинтез влияют как эндогенные (проводимость листа, донорно-акцепторные отношения, биофизическое и биохимическое лимитирование, возраст листа и растения), так и экологические (интенсивность и спектральный состав света, температура, водообеспеченность, газовый состав атмосферы, элементы минерального питания) факторы. Например, обеспеченность растений элементами минерального питания влияет на образование хлорофилла (содержит азот, магний), синтез АТФ при фотосинтетическом фосфорилировании (необходимы азот, фосфор, железо, медь), отток продуктов фотосинтеза (влияет калий).

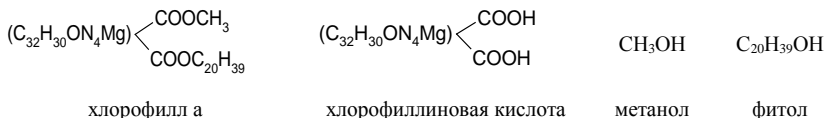
Таким образом, знание основных закономерностей фотосинтеза позволяет управлять продукционным процессом культурных растений – повышать урожайность и качество продукции.

## Работа 20. Строение и химические свойства пигментов зеленого листа

В основе фотосинтеза лежит поглощение света пигментами хлоропластов. В хлоропластах высших растений содержатся две группы пигментов: *хлорофиллы* и *каротиноиды*.

**Хлорофиллы** – зеленые пигменты, локализованные в фотосинтетических мембранах хлоропластов – ламеллах тилакоидов. У высших растений содержатся *хлорофилл а* ( $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ ), имеющий синеватый оттенок, и *хлорофилл b* ( $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ ), имеющий желтоватый оттенок. Хлорофиллы светособирающего комплекса («антенны») выполняют функцию поглощения света, а хлорофиллы реакционных центров участвуют в первичных фотохимических реакциях.

Хлорофиллы – сложные эфиры дикарбоновой кислоты хлорофиллина и двух спиртов – метанола и фитола:



Хлорофиллиновая кислота состоит из четырех *пиррольных* азотсодержащих колец, соединенных между собой метиновыми (=СН–) связями (рис. 20.1). При замыкании пиррольных колец в тетрапиррольную структуру образуется *порфириновое ядро* – сложная система из десяти

пар конъюгированных (сопряженных) чередующихся двойных и одинарных связей с общим  $\pi$ -электронным облаком.

В центре порфиринового ядра находится *магний*, соединенный координационными связями с атомами азота пиррольных колец (магний определяет гидрофильные свойства хлорофилла). К третьему пиррольному кольцу примыкает пятое *изопентановое* кольцо, к которому присоединяется остаток спирта метанола. К четвертому пиррольному кольцу присоединяется остаток спирта фитола (определяет гидрофобные свойства хлорофилла).

Зарисуйте структурную формулу молекулы хлорофилла, обозначьте порфириновое ядро, пиррольные кольца, остатки спиртов метанола и фитола.

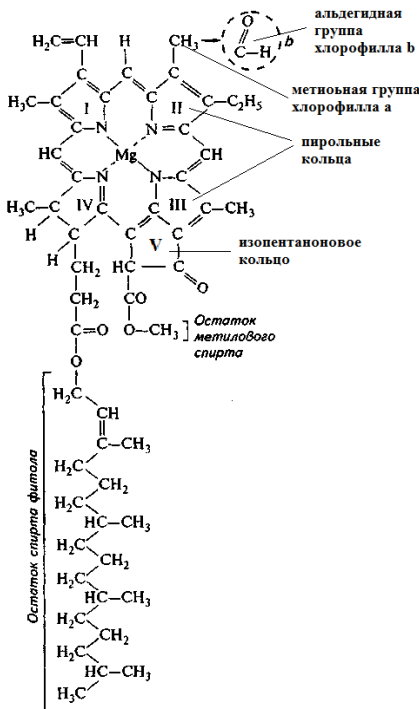


Рис. 20.1. Структурная формула хлорофиллов

**Каротиноиды** – пигменты желтого, оранжевого и красного цвета. К ним относятся *каротины* ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -каротины и ликопин) и *ксантофиллы* (зеаксантин, криптоксантин, виолаксантин, лютеин).

Каротиноиды локализованы в ламеллах хлоропластов, они участвуют в поглощении света и передаче поглощенной энергии на хлорофилл реакционных центров, защищают хлорофилл от фотоокисления.

Каротиноиды могут накапливаться в хромопластах корнеплодов (морковь), плодов, ягод, овощей.

Каротиноиды являются ациклическими, моноциклическими и бициклическими терпеноидами (рис. 20.2).

В хлоропластах высших растений содержатся  $\alpha$ - и  $\beta$ -каротин ( $C_{40}H_{56}$ ).  $\beta$ -каротин имеет два  $\beta$ -иононовых кольца, при его гидролизе образуется две молекулы витамина А (ретинола).

Ксантофиллы – кислородсодержащие производные каротина ( $C_{40}H_{54}(OH)_2$ ). Лютеин – производное  $\alpha$ -каротина. Зеаксантин (пигмент зерновок кукурузы) – производное  $\beta$ -каротина. Вилоксантин (пигмент цветков фиалки) образуется при окислении зеаксантина.

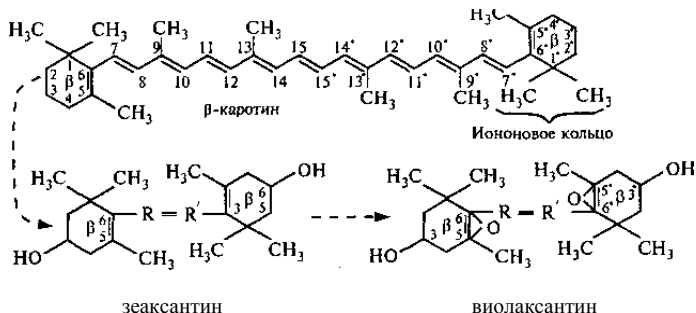


Рис. 20.2. Структурная формула  $\beta$ -каротина и последовательность его превращений в ксантофиллы

Зарисуйте структурную формулу  $\beta$ -каротина, обозначьте иононовые кольца.

**Цель работы:** выделить пигменты хлоропластов, произвести их разделение, изучить строение и химические свойства.

**Ход работы.**

**1. Выделение пигментов.** Хлорофиллы и каротиноиды – гидрофобные вещества, они не растворяются в воде, но хорошо растворяются в органических растворителях (спирте, бензине, ацетоне).

В данной работе пигменты экстрагируют (выделяют) спиртом. Для этого взвешивают 4...5 г свежих или 0,5...1 г сухих листьев, помещают их в фарфоровую ступку, прибавляют около 1 г  $\text{CaCO}_3$ . Листья тщательно растирают пестиком, затем в ступку добавляют около 10 мл 96%-ного этилового спирта и продолжают растирание до получения темно-зеленой вытяжки.

Затем в чистую пробирку вставляют воронку, вкладывают в нее бумажный складчатый фильтр и вытяжку по стеклянной палочке переливают на фильтр. Полученный фильтрат используют для разделения и изучения физико-химических свойств пигментов.

**2. Разделение пигментов по Краусу.** Метод Крауса основан на различной растворимости пигментов в спирте и бензине.

Для разделения пигментов в сухую пробирку наливают около 3...4 мл полученной спиртовой вытяжки. Затем в пробирку приливают полторный объем бензина. Если вытяжка получена из сухих листьев, в нее пипеткой добавляют 3...5 капель воды. Пробирку закрывают резиновой пробкой и несколько раз встряхивают, а затем оставляют на 1...2 мин для отстаивания. При этом в пробирке образуется два слоя: верхний бензиновый – зеленого цвета и нижний спиртовой – желтого цвета. Если расслоение не происходит, в пробирку нужно добавить еще несколько капель воды. Если вода прибавлена в избытке, спиртовой слой мутнеет. В этом случае в пробирку необходимо добавить немного спирта.

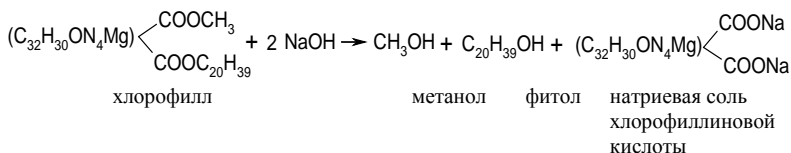
После разбавления спирта водой растворимость в нем каротина (непредельные углеводороды, обладающие высокой гидрофобностью) и хлорофиллов (бифильные вещества с преобладанием гидрофобных свойств) ухудшается, и они переходят в верхний бензиновый слой.

Ксантофилл, будучи двухосновным спиртом, слабо растворим в бензине и поэтому остается в нижнем спиртовом слое.

После опыта делают зарисовки пробирок цветными карандашами, указывая расположение в них бензина и спирта (с одной стороны пробирки) и пигментов – хлорофиллов, каротинов и ксантофиллов (с другой стороны пробирки).

**3. Действие щелочи на хлорофилл.** В пробирку наливают 3...4 мл спиртовой вытяжки, содержащей хлорофилл. Затем к вытяжке прибавляют 1...2 измельченных кусочка  $\text{NaOH}$  или  $\text{KOH}$ , пробирку закрывают резиновой пробкой и взбалтывают в течение 3...5 мин. При этом происходит омыление хлорофилла – эфирные связи разрываются и

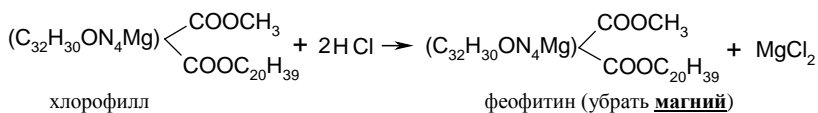
образуются свободные спирты (метанол и фитол) и соль хлорофиллиновой кислоты. Реакция идет по уравнению



После окончания реакции в пробирку приливают такой же объем бензина и несколько капель воды. Пробирку закрывают пробкой, несколько раз встряхивают и дают отстояться. Продукты омыления хлорофилла, а также каротин и ксантофилл имеют разную растворимость в спирте и бензине. В верхний бензиновый слой перейдет каротин, а в нижнем спиртовом слое остаются ксантофилл (спирт) и продукты омыления хлорофилла – метанол и фитол (спирты) и натриевая соль хлорофиллиновой кислоты. Спиртовой слой будет иметь зеленую окраску, так как порфириновое ядро в молекуле соли хлорофиллиновой кислоты остается неразрушенным (оно определяет зеленую окраску хлорофилла).

Зарисуйте цветными карандашами слои в пробирке и дайте пояснения.

**4. Действие кислот на хлорофилл.** При действии кислот на хлорофилл магний в порфириновом ядре молекулы заменяется на водород, при этом образуется феофитин, вещество бурого цвета. Реакция идет по уравнению:



В две пробирки наливают по 2...3 мл спиртовой вытяжки пигментов и добавляют по 3...4 капли 10%-ного раствора соляной кислоты. Раствор становится бурым вследствие образования *феофитина*.

Затем в одну из пробирок с побуревшей от кислоты вытяжкой прибавляют несколько кристаллов уксуснокислого цинка или уксуснокислой меди и осторожно нагревают до кипения. При вскипании бурый цвет раствора сменится на ярко-зеленый, так как атом цинка или меди становится на место водорода в молекуле феофитина, восстанавливая при этом зеленую окраску.



Обратите внимание, что зеленый цвет хлорофилла связан с наличием в его порфириновом ядре двухвалентного металла магния. На это указывает восстановление зеленой окраски при действии на феофитин других уксусноокислых солей двухвалентных металлов (меди, цинка, железа).

Зарисуйте пробирки цветными карандашами. Сделайте выводы по результатам опытов.

**Материалы и оборудование:** свежие или сухие листья, 96%-ный этиловый спирт, бензин, кристаллический NaOH или KOH, 10%-ный раствор HCl, кристаллический уксусноокислый цинк или уксусноокислая медь, CaCO<sub>3</sub>, ступки с пестиком, воронки, штативы с пробирками, мерные цилиндры на 10 или 20 мл, спички, бумажные фильтры, цветные карандаши, стеклянные палочки для переноса вытяжки.

### Контрольные вопросы

1. Что такое фотосинтез и в чем заключается его значение? Что представляют собой световая и темновая фазы фотосинтеза? (см. стр. 74).

2. Какие пигменты содержатся в хлоропластах клеток растений? Какова их химическая природа и функции?

3. Как можно выделить и разделить пигменты?

4. Что происходит при взаимодействии хлорофилла со щелочью и кислотой?

### Работа 21. Оптические свойства пигментов

Важнейшим оптическим свойством пигментов является их способность поглощать свет *избирательно*. Светопоглощение пигментов можно наблюдать с помощью *спектроскопа* – прибора, основным элементом которого является стеклянная трехгранная призма (рис. 21.1, а). При прохождении света через призму происходит его разложение на несколько монохроматических (одноцветных) участков (рис. 21.1, б). Спектральный состав света можно наблюдать в окуляр зрительной трубы спектрокопа.

Если на пути света (солнечного или лампы накаливания) установить пробирку с раствором какого-либо пигмента, то в спектре на месте поглощенных лучей появляются темные полосы.

Поглощение лучей пигментами зависит от их концентрации в растворе. В слабых растворах они поглощают только узкие участки спектра. По мере увеличения концентрации полосы поглощения расширяются, захватывая все больше и больше спектральных участков.

Хлорофилл в растворе обладает другим оптическим свойством – *флуоресценцией* – способностью излучать поглощенную энергию в виде света, имеющего вишнево-красный цвет.

В основе флуоресценции лежит способность хлорофилла при поглощении квантов света переходить в возбужденное состояние, связанное с переходом электрона на более удаленную от ядра орбиту. Возбужденная молекула хлорофилла переходит в стабильное состояние путем возвращения электрона на исходную орбиту. При этом поглощенная энергия может выделяться не только в виде теплоты, но и в виде света (флуоресценции). Лучи флуоресценции всегда имеют большую длину волны (но энергия квантов ниже), чем поглощенные лучи, так как часть энергии при переходе молекулы из возбужденного состояния в исходное теряется в виде теплоты. Наибольшую длину волны имеет красный свет.

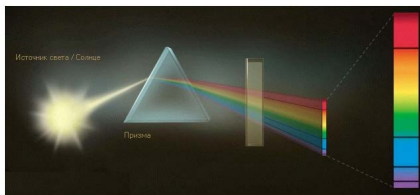
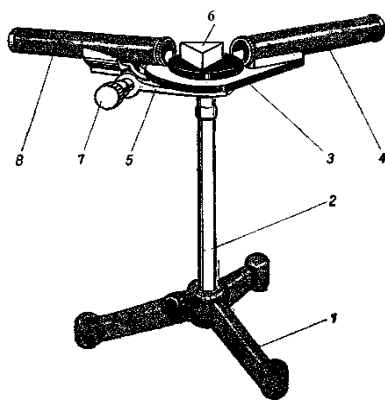


Рис. 21.1. Спектроскоп (а) и принцип его работы (б):

1 – треножная подставка; 2 – стойка; 3 – столик; 4 – коллиматорная труба; 5 – подвижный кронштейн; 6 – призма; 7 – винтовой микровинт; 8 – зрительная труба

### **Цель работы:**

1. Изучить светопоглонительную способность пигментов с помощью спектроскопа, зарисовать спектры поглощения пигментов.

2. Провести наблюдения за явлением флуоресценции хлорофилла.

**Ход работы.** Для изучения оптических свойств хлорофиллов и каротиноидов используют пробирки с растворами пигментов, полученные в работе 19: разделение пигментов по Краусу (хлорофиллы находятся в верхнем бензиновом слое, ксантофиллы – в нижнем спиртовом слое); реакция омыления хлорофилла щелочью (каротины находятся в верхнем бензиновом слое), а также спиртовые вытяжки пигментов различной концентрации.

#### **1. Изучение светопоглонительной способности пигментов.**

Источник света устанавливают в одной горизонтальной плоскости и на одной оси с коллиматорной трубой спектроскопа. Регулируют расстояние от спектроскопа до источника света и ширину щели коллиматорной трубы так, чтобы видимый в окуляр зрительной трубы спектр получился достаточно ярким. Четкость спектра регулируют перемещением подвижного окуляра зрительной трубы. Если видны не все участки спектра (красный, оранжевый, желтый, зеленый, голубой, синий, фиолетовый), следует снять крышку призмы и, отвернув два стопорных винта оправы призмы, повернуть призму вправо или влево. Винтовой микрометр позволяет определять относительное положение полос в спектре исследуемого вещества.

Пробирку с вытяжкой, содержащей определенный пигмент, помещают перед щелью коллиматорной трубы спектроскопа и отмечают положение темных полос в спектре. Темные полосы соответствуют участкам спектра, которые поглощаются пигментами. Лучи, которые не поглощаются пигментом, остаются в спектре без изменения интенсивности и цвета.

Зарисуйте спектр видимого (белого) света, спектры поглощения хлорофилла, каротина, ксантофилла, а также спектры поглощения концентрированной и разбавленной спиртовой вытяжки.

Сделайте выводы о светопоглонительной способности хлорофиллов и каротиноидов.

**2. Наблюдение флуоресценции хлорофилла.** Пробирку с концентрированной спиртовой вытяжкой пигментов сначала рассматривают в проходящих лучах, располагая напротив источника света. При этом она имеет изумрудно-зеленый цвет, так как зеленый свет пигментами не поглощается.

Для наблюдения флуоресценции пробирку с вытяжкой хлорофилла располагают на фоне темного экрана (черная матовая бумага). Темный экран поглощает все проходящие лучи (зеленые, желтые, оранжевые), поэтому они не будут отражаться экраном, но можно увидеть свет, излучаемый пигментами. При освещении пробирки светом электрической лампы цвет вытяжки меняется на темно-красный (вишнево-красный) – перемена окраски обусловлена флуоресценцией.

Опишите природу флуоресценции и объясните, как можно наблюдать это явление.

**Материалы и оборудование:** пробирки с растворами пигментов, полученные в работе 19, спектроскоп, 96%-ный этиловый спирт, настольная электролампа, цветные карандаши.

### Контрольные вопросы

1. Какими оптическими свойствами обладают пигменты хлоропластов?
2. С помощью какого прибора и как можно определить светопоглощательную способность пигментов?
3. Какие лучи поглощают хлорофиллы и каротиноиды?
4. Что такое флуоресценция, какова ее природа? Как можно наблюдать это явление?

### Работа 22. Количественное определение пигментов в листьях растений

Содержание пигментов в листьях зависит от вида, сорта и возраста растений, а также от условий освещения, минерального питания, водобеспеченности и других факторов.

Среднее содержание хлорофиллов в листьях составляет около 1 % сухой массы, а в хлоропластах – около 5...6 %. Существует положительная корреляционная зависимость между содержанием пигментов в листьях и поглощением лучистой энергии. Этим объясняется необходимость повышения содержания хлорофилла в растениях путем оптимизации структуры посева, внесения необходимых элементов минерального питания, регулирования водного режима.

Для определения суммарного содержания хлорофиллов *a* и *b* сначала их экстрагируют (выделяют) из материала чистым ацетоном. Затем с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) определяют оптиче-

скую плотность полученного раствора. После этого находят концентрацию хлорофиллов в исследуемом растворе, используя график, построенный по растворам хлорофиллов с известными значениями концентрации и их оптической плотности.

Для количественного определения отдельных пигментов определяют оптическую плотность ацетоновой вытяжки на спектрофотометре при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофилла *a* (663 нм), хлорофилла *b* (645 нм) и каротиноидов (440,5 нм), с последующим расчетом концентрации пигментов по уравнениям Ветштейна и Хольма для 100%-ного ацетона по формулам, приведенным ниже.

Зная концентрации пигментов в растворе и его объем, рассчитывают содержание пигментов в растворе, а затем и в исследуемом материале по приведенным ниже формулам.

#### **Цель работы:**

1. Определить суммарное содержание хлорофиллов *a* и *b* в листьях светолюбивых и теневыносливых (комнатных) растений, листьях разного возраста, вегетативных органах различных культур.

2. Определить содержание хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и каротина в листьях растений.

#### **Ход работы.**

**1. Определение суммарного содержания хлорофиллов *a* и *b*.** Берут две навески свежих листьев или вегетативной массы (при анализе кормовых трав). Одну навеску массой 4...5 г высушивают в бюксах при температуре 105 °С до постоянной массы для определения процента сухого вещества (см. работу 10).

Вторую навеску массой 1...3 г используют для количественного определения пигментов. Навеску помещают в фарфоровую ступку и растирают с небольшим количеством ацетона и кварцевого песка в присутствии CaCO<sub>3</sub>. Затем в ступку приливают еще примерно 3...4 мл ацетона и продолжают растирание до получения темно-зеленой вытяжки, которую после отстаивания (1...3 мин) фильтруют.

Для этого в мерный цилиндр на 25...50 мл вставляют воронку, в нее вкладывают сухой бумажный складчатый фильтр (края фильтра должны быть ниже края воронки на 0,5...1 см). Вытяжку отбирают специальной пипеткой, имеющей расширение в средней части, не захватывая растертую массу, и переносят, не допуская потерь, на фильтр.

*В более точных анализах рекомендуется использовать стеклянный фильтр № 3 или воронку Бюхнера. Вытяжку фильтруют в колбу Бунзена, соединенную с водоструйным насосом.*

Затем к оставшейся в ступке массе приливают новую порцию чистого ацетона (1...3 мл) и снова растирают. После отстаивания вытяжку также переносят на фильтр.

Извлечение пигментов производят небольшими порциями ацетона до полного обесцвечивания растительного материала. После этого ступку, пестик и фильтр обмывают небольшими порциями ацетона до полного исчезновения зеленой окраски, пользуясь той же пипеткой.

Объем вытяжки доводят чистым ацетоном до 25...30 мл. Объем полученной вытяжки заносят в табл. 22.1. Вытяжку хранят до последующего анализа в темном месте.

Определение оптической плотности полученного раствора производят на колориметре ФЭК-56М, КФК-2 (рис. 22.1) или другого типа, используя светло-красный светофильтр.

Измерения оптической плотности раствора производят спустя 15 мин после включения прибора в сеть.

На колориметре фотоэлектрическом концентрационном (КФК-2) ручку управления светофильтрами 1 устанавливают напротив цифры «670», отмеченной на лицевой панели колориметра красным цветом, а ручку 2 ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ устанавливают в одно из положений «1», «2», «3», отмеченных на лицевой панели также красным цветом. Ручку 3 УСТАНОВКА 100 поворачивают в крайнее левое положение.

В одну из прилагаемых к прибору кювет наливают до метки чистый ацетон, во вторую кювету – вытяжку пигментов. Обе кюветы устанавливают в кюветодержатель 8 напротив друг друга.

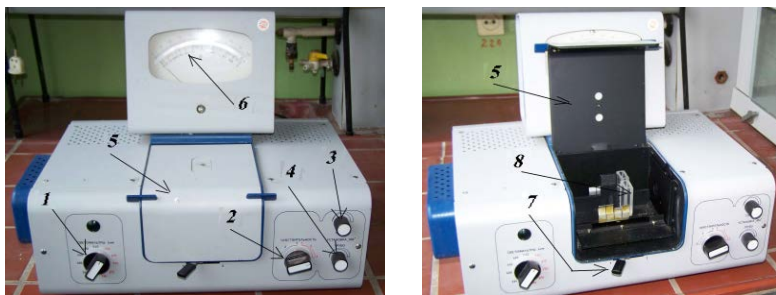


Рис. 22.1. Колориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2

При установке кювет в кюветодержатель нельзя касаться пальцами рабочих участков поверхностей (ниже уровня жидкости в кювете). Рабочие поверхности кювет должны перед каждым измерением тщательно протираться спиртоэфирной смесью.

Сначала в световой пучок, поворотом ручки 7, вводят кювету с растворителем, закрывают крышку кюветного отделения 5, и ручками ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ и УСТАНОВКА 100 ГРУБО и ТОЧНО устанавливают стрелку гальванометра 6 на отсчет 100.

Затем поворотом ручки 7 в световой пучок вводят кювету с вытяжкой пигментов.

Оптическую плотность исследуемого раствора определяют по нижней шкале гальванометра.

Измерения проводят на менее трех раз и рассчитывают среднее арифметическое из полученных показаний.

Наиболее точные результаты получают при значениях оптической плотности в пределах от 0,1 до 0,4. Если оптическая плотность больше 0,5, вытяжку следует разбавить в два раза. Если показания оптической плотности окажутся ниже 0,08, необходимо выполнить всю работу сначала, взяв большую навеску материала.

Зная величину оптической плотности, определяют концентрацию хлорофилла в ацетоновом растворе по калибровочной кривой.

Полученные данные заносят в табл. 22.1.

Таблица 22.1. Определение суммарного содержания хлорофиллов

Объект (вариант опыта)	Навеска для определения процента сухого вещества			Навеска для определения количества хлорофилла		Оптическая плотность раствора	Концентрация хлорофиллов, мг/л	Содержание хлорофиллов в полученном объеме вытяжки, мг	Содержание хлорофиллов в % на сухую или сырую массу
	сырая, г	сухая, г	содержание сухого вещества, %	сырая, мг	сухая, мг				
	$m$	$m_1$	$s = \frac{m}{m_1} \cdot 100$	$H$	$H_s = H \cdot s$				
						$D_{670}$	$C$	$P$	$X$

Содержание хлорофилла в полученном объеме вытяжки по рассчитывают формуле

$$P = \frac{C \cdot V}{1000},$$

где  $P$  – содержание хлорофиллов в полученном объеме вытяжки, мг;

$C$  – концентрация хлорофиллов в растворе, мг/л;

$V$  – объем полученной вытяжки, мл.

Содержание хлорофиллов в процентах на сухое или сырое вещество в исследуемом объекте вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{P \cdot 100}{H},$$

где  $X$  – содержание хлорофиллов на сухое или сырое вещество, %;

$P$  – содержание хлорофиллов в полученном объеме вытяжки, мг;

$H$  – масса навески для определения количества хлорофилла (сухой, или сырой), мг.

После выполнения расчетов по всем вариантам опыта составляют сводную таблицу и делают выводы.

**2. Определение содержания хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и каротиноидов.** Из листьев или вегетативной массы растений получают, как описано выше, ацетоновую вытяжку.

Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре СФ-26, ПЭ-54ВИ/УФ или другого типа при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофилла *a* (663 нм), хлорофилла *b* (645 нм) и каротиноидов (440,5 нм).

Спектрофотометр ПЭ-54ВИ/УФ (рис. 22.2, *a*) включают в сеть с помощью сетевого выключателя, расположенного на задней панели прибора. *Крышка кюветного отделения должна быть закрыта, в кюветном отделении на пути светового пучка ничего не должно быть установлено!*

После завершения процедуры самодиагностики, отображаемой на дисплее, начинается прогрев прибора. По истечении времени прогрева (20 мин) или при нажатии любой кнопки на дисплее восстанавливаются настройки, действующие в момент выключения прибора. Затем спектрофотометр переходит в режим измерения и автоматически выполняет процедуру калибровки нуля (0,000 А / 100,0 % Т).

Измерение оптической плотности растворов производят в следующей последовательности:



1. Переключают спектрофотометр в режим измерения оптической плотности (А), используя кнопку РЕЖИМ и кнопки  $\wedge$ ,  $\vee$  на панели управления (рис. 22.2, б).

2. Вытяжку пигментов перемешивают и наливают в одну или три кюветы (повторения), придерживаясь описанных выше правил.

3. В одну кювету наливают раствор сравнения (чистый ацетон).

4. Открывают крышку кюветного отделения и кюветы устанавливают в ячейки кюветодержателя, после этого крышку закрывают.

5. Не открывая крышки кюветного отделения, ручкой для перемещения кюветодержателя вводят в рабочую зону (на пути светового пучка) кювету с раствором сравнения.

6. Устанавливают рабочую длину волны для определения оптической плотности раствора (663 нм для хлорофилла *a*, 645 нм – для хлорофилла *b*, 440,5 нм – для каротиноидов). Для этого нажимают кнопку ПЕРЕХОД  $\lambda$ . Ввод значения длины волны осуществляется изменением значения каждого знакоместа числа с помощью кнопок  $< \lambda$  (МЕНЮ),  $\lambda >$  (НОЛЬ),  $\wedge$ ,  $\vee$ . Для установки введенного значения длины волны нажимают кнопку ВВОД/СТАРТ.

7. Нажатием кнопки НОЛЬ калибруют нулевое значение оптической плотности по раствору сравнения (чистый ацетон). Если отображаемое значение отличается от величины 0,000 более чем на 0,001, обнуление повторяют.

8. Не открывая кюветного отделения, ручкой для перемещения кюветодержателя подводят в рабочую зону кювету с исследуемым раствором и фиксируют отображаемое на дисплее значение оптической плотности в табл. 22.2.



*а*



*б*

Рис. 22.2. Спектрофотометр ПЭ-54ВИ/УФ: *а* – вид прибора; *б* – панель управления

Кюветное отделение имеет четыре ячейки, что позволяет одновременно проводить измерение одной кюветы с раствором сравнения и до трех кювет с исследуемыми растворами.

Таблица 22.2. Определение содержания хлорофиллов *a*, *b* и каротина

Пигмент	Спектральный диапазон измерений, нм	Оптическая плотность раствора <i>D</i>	Концентрация пигментов <i>C</i> , мг/л	Содержание пигментов в полученном объеме вытяжки <i>P</i> , мг	Содержание пигментов в материале, %
Хлорофилл <i>a</i>	662				
Хлорофилл <i>b</i>	644				
Каротин	440,5				

Расчет концентрации пигментов (мг/л) производят по следующим формулам:

$$\begin{aligned}
 C_a &= 9,784D_{662} - 0,99D_{644}; \\
 C_b &= 21,426D_{644} - 4,650D_{662}; \\
 C_a + C_b &= 5,134D_{662} + 20,436D_{644}; \\
 C_{\text{кар}} &= 4,695D_{440,5} - 0,268(C_a + C_b),
 \end{aligned}$$

где  $C_a$  – концентрация хлорофилла *a*, мг/л;  
 $C_b$  – концентрация хлорофилла *b*, мг/л;  
 $C_{\text{кар}}$  – концентрация каротиноидов, мг/л.

Расчеты содержания пигментов в полученном объеме вытяжки и растительном материале производят по приведенным выше формулам.

Если оптическая плотность раствора превышает значение 0,8, вытяжку разбавляют чистым растворителем так, чтобы оптическая плотность разбавленных растворов находилась в пределах от 0,1 до 0,8. Содержание пигментов в этом случае рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V \cdot V_2}{H \cdot V_1 \cdot 10},$$

где  $X$  – содержание пигментов в растительном материале, %;  
 $C$  – концентрация пигмента, мг/л;  
 $V$  – объем исходной вытяжки, мл;  
 $V_1$  – объем исходной вытяжки, взятой для разбавления, мл;  
 $V_2$  – объем разбавленной вытяжки, мл;

$H$  – масса навески (сухой или сырой) для определения количества хлорофилла, мг;

10 – кратность разбавления.

Результаты заносят в табл. 22.2.

**Материалы и оборудование:** листья или зеленая масса разных растений, фотоэлектроколориметр, спектрофотометр, электронные весы, ацетон, сушильный шкаф,  $\text{CaCO}_3$ , кварцевый песок, мерные цилиндры на 25 или 50 мл, ступки с пестиком, бумажные фильтры, воронки, ножницы, пипетки для переноса вытяжки.

### Контрольные вопросы

1. В каких пределах изменяется содержание хлорофилла в листьях и хлоропластах растений и от чего оно зависит?

2. Назовите основные этапы работы по определению суммарного содержания хлорофиллов  $a$  и  $b$  в листьях растений. Почему на ФЭК при определении оптической плотности вытяжки хлорофилла устанавливают светло-красный светофильтр?

3. Изложите методику количественного определения хлорофиллов  $a$ ,  $b$  и каротина? Какие длины волн устанавливают на спектрофотометре при их определении и почему?

4. Какие закономерности в содержании пигментов выявлены в опытах?

### Работа 23. Определение интенсивности видимого и истинного фотосинтеза

Различают фотосинтез истинный (гросс-фотосинтез) и видимый (нетто-фотосинтез). *Истинный* фотосинтез – это общее количество органического вещества, образующегося в листьях, включая отток в другие органы, расход на дыхание и накопление в листьях. *Видимый* фотосинтез – это то количество органических веществ, которое остается (накапливается) в листьях и обнаруживается по изменению их сухой массы.

Под **интенсивностью фотосинтеза** понимают количество органического вещества, синтезируемое или накапливаемое единицей листовой поверхности за единицу времени.

Для определения интенсивности фотосинтеза используют различные методы. *Весовые* методы основаны на изменении сухой массы единицы площади листа. *Газометрические* методы основаны на учете количества поглощаемого  $\text{CO}_2$  или выделяемого  $\text{O}_2$ . *Радиометрические* методы основаны на учете количества изотопа  $^{14}\text{C}$  включаемого в состав органических веществ. *Микрометеорологические* методы основаны на одновременном учете концентрации  $\text{CO}_2$  и скорости потока воздуха над посевом. *Химические* методы основаны на определении количества углерода, ассимилированного в органическое вещество (крахмал, сахарозу, глюкозу, фруктозу).

В данной работе используется *весовой метод* определения интенсивности фотосинтеза, предложенный Саксом. Его сущность заключается в том, что сначала на одной половинке листа, имеющего симметричное строение, берут высежки определенной площади и определяют в них содержание сухого вещества. Затем через определенный промежуток времени на второй половинке листа на равном расстоянии от средней жилки берут равные по площади высежки и тоже определяют в них содержание сухого вещества. Зная изменение массы, площадь высежек и время опыта, можно рассчитать интенсивность фотосинтеза.

Если оставленная для последующего определения половинка листа освещается, в листе определяют *интенсивность видимого фотосинтеза*. Если ее закрывают темной бумагой, в листе определяют *интенсивность расхода органических веществ на дыхание и отток в другие органы*. *Интенсивность истинного фотосинтеза* будет равна сумме интенсивности видимого фотосинтеза и интенсивности расхода органических веществ на дыхание и оттока в другие органы.

Так как колебание содержания воды в листе маскирует изменение сухой массы, делать высежки нужно при одинаковой (полной) насыщенности их водой.

**Цель работы:** определить интенсивность видимого и истинного фотосинтеза в листьях растений различного возраста, светолюбивых и теневыносливых, мезофитов и ксерофитов.

**Ход работы.** В учебных целях (для изучения методики определения интенсивности фотосинтеза) лучше использовать растения, имеющие листовые пластинки большой площади (около  $100 \text{ см}^2$ ). На таком растении выбирают два листа одинакового возраста и симметричного строения. Один лист используют для определения интенсивности

видимого фотосинтеза, а второй – для определения интенсивности расхода органических веществ на дыхание и отток в другие органы.

Если листовые пластинки исследуемых растений имеют небольшую площадь, для определения обоих показателей используют по 2...5 листьев разного возраста.

У листьев, используемых для определения интенсивности видимого фотосинтеза, срезают половинки листовых пластинок до средней жилки, **вторые половинки этих листьев с черешками остаются на растении в условиях освещения для того, чтобы в них проходил фотосинтез.** Время срезания половинок листьев – время начала опыта записывают в табл. 23.1.

Срезанные половинки листьев помещают на 30 мин в чашки Петри с водой для их полного насыщения (*на учебных занятиях насыщение листьев водой можно не проводить!*).

У листьев, которые используют для определения интенсивности расхода органических веществ на дыхание и отток в другие органы, также отрезают половинки листовых пластинок до средней жилки. Время начала опыта записывают в табл. 23.2. Оставшиеся на растении половинки этих листьев закрывают с двух сторон черной, а поверх белой бумагой, чтобы исключить фотосинтез и перегрев листа, и закрепляют скрепками.

Если определение содержания сухого вещества в листьях проводят при их полном насыщении водой, срезанные половинки этих листьев также помещают на 30 мин в чашки Петри с водой. Через 30 мин половинки листьев извлекают из воды и обсушивают фильтровальной бумагой.

Затем половинки листьев помещают на гладкий картон и острым пробочным сверлом диаметром 8...10 мм делают по 30...40 высечек. Высечки из листьев, в которых определяют интенсивность видимого фотосинтеза, помещают в один бюкс, а высечки из листьев, в которых определяют интенсивность расхода органических веществ на дыхание и отток в другие органы, – в другой бюкс. Бюксы с высечками помещают в сушильный шкаф с температурой 105 °С для их высушивания и определения сухой массы.

После постановки бюксов в сушильный шкаф определяют суммарную площадь взятых высечек ( $S$ ) путем умножения количества высечек ( $n$ ) на площадь одной высечки ( $\pi R^2$ ).

Через 3...5 ч оставленные на растениях половинки листьев срезают. Записывают время окончания опытов в табл. 23.1 и 23.2. *В точных опытах срезаемые половинки листьев насыщают водой.* Затем пробочным сверлом делают высечки (такое же количество, как и в начале опыта), помещают их в бюксы и также высушивают в сушильном шкафу до постоянной массы. Результаты заносят в табл. 23.1 и 23.2.

Опыт можно проводить и на целых половинках, т. е. не делая высечек. В этом случае площадь половинок листа определяется планиметром или весовым методом (как в работе 15), а изменение сухой массы приводят к одинаковой площади.

Таблица 23.1. **Определение интенсивности видимого фотосинтеза**

Масса сухих высечек, г		Кол-во высечек, шт.	Общая площадь высечек, см <sup>2</sup>	Время, ч:мин		Продолжительность опыта, мин	Интенсивность видимого фотосинтеза, г/(дм <sup>2</sup> ·ч)
в начале опыта (1-я половинка листа)	в конце опыта (2-я половинка – на свету)			начала опыта	окончания опыта		
$m_1$	$m_2$	$n$	$S$	–	–	$T$	$P_{\text{вид}}$

На основании полученных данных рассчитывают интенсивность видимого фотосинтеза по формуле:

$$P_{\text{вид}} = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 60 \cdot 100}{S \cdot T},$$

где  $P_{\text{вид}}$  – интенсивность видимого фотосинтеза, г/(дм<sup>2</sup>·ч);

$m_2 - m_1$  – увеличение сухой массы листа, г;

$S$  – площадь взятых высечек, см<sup>2</sup>;

$T$  – время опыта, мин;

60 – коэффициент перевода минут в часы;

100 – коэффициент перевода сантиметров квадратных в дециметры квадратные.

Если расход органических веществ на дыхание и отток в другие органы превышает истинный фотосинтез (например, при низкой освещенности или низкой температуре воздуха), интенсивность видимого фотосинтеза *может иметь отрицательную величину.*

Интенсивность расхода органических веществ на дыхание и отток в другие органы рассчитывают по формуле

$$A = \frac{(m_3 - m_4) \cdot 60 \cdot 100}{S \cdot T},$$

где  $A$  – интенсивность расхода органических веществ на дыхание и отток в другие органы, г/(дм<sup>2</sup>·ч);

$m_3 - m_4$  – уменьшение сухой массы листа, г;

$S$  – площадь взятых высечек, см<sup>2</sup>;

$T$  – время опыта, мин;

60 – коэффициент перевода минут в часы;

100 – коэффициент перевода сантиметров квадратных в дециметры квадратные.

Таблица 23.2. **Определение интенсивности расхода органических веществ на дыхание и отток в другие органы**

Масса сухих высечек, г		Количество высечек, шт.	Общая площадь высечек, см <sup>2</sup>	Время, ч:мин		Продолжительность опыта, мин	Интенсивность расхода органических веществ на дыхание и отток, г/(дм <sup>2</sup> ·ч)
в начале опыта (1-я половинка листа)	в конце опыта (2-я половинка – затененная)			начала опыта	окончания опыта		
$m_3$	$m_4$	$n$	$S$	–	–	$T$	$A$

Интенсивность истинного фотосинтеза ( $P_{\text{ист}}$ ) определяют как сумму интенсивности видимого фотосинтеза ( $P_{\text{вид}}$ ) и интенсивности расхода органических веществ на дыхание и отток в другие органы ( $A$ ):

$$P_{\text{ист}} = P_{\text{вид}} + A.$$

На основании полученных данных составляют сводную таблицу, в которую вносят результаты определения интенсивности видимого и истинного фотосинтеза у различных растений или растений, находящихся в различных условиях (освещения или температуры), и делают выводы.

**Материалы и оборудование:** растения различных культур или комнатные, аналитические весы, сушильный шкаф, бюксы, пробочные сверла, гладкий картон, скрепки, черная и белая бумага, чашки Петри, фильтровальная бумага, ножницы.

## Контрольные вопросы

1. Что понимают под истинным и видимым фотосинтезом?
2. Что такое интенсивность фотосинтеза? Назовите методы определения интенсивности фотосинтеза, поясните, на чем они основаны.
3. В чем заключается сущность метода определения интенсивности фотосинтеза по Саксу? Изложите методику проведения опыта.
4. Как рассчитать интенсивность видимого фотосинтеза, интенсивность расхода органических веществ на дыхание и отток в другие органы и интенсивность истинного фотосинтеза.
5. Какие факторы влияют на интенсивность фотосинтеза?

### Работа 24. Определение чистой продуктивности фотосинтеза

Около 95 % сухой биомассы растений приходится на долю органических веществ, образованных в процессе фотосинтеза. Поэтому увеличение сухой массы растений может довольно объективно отражать фотосинтетическую активность и продуктивность посевов.

Одним из показателей, характеризующих продукционный процесс растений в посевах, является *чистая продуктивность фотосинтеза* (ЧПФ). Этот показатель часто используется в научных исследованиях при определении фотосинтетической активности посевов.

Основными составляющими ЧПФ являются фотосинтез, в ходе которого синтезируются органические вещества, и дыхание, в ходе которого органические вещества расходуются.

***Чистая продуктивность фотосинтеза*** – это количество сухого вещества в граммах, накопленного 1 м<sup>2</sup> листовой поверхности за одни сутки.

Величина этого показателя для различных сельскохозяйственных культур колеблется в пределах 1...20 г/(м<sup>2</sup>·сут). ЧПФ в значительной степени зависит от возраста листьев и их фотосинтетической активности. Однако она не учитывает вклад в фотосинтез других органов растений (стеблей, колосьев, чешуй, остей и др.).

Для определения чистой продуктивности фотосинтеза в посевах через определенный промежуток времени, например, в начале и конце определенной фазы развития (или через 7...10 дней, или другой период), берут пробы растений, в которых определяют сухую биомассу и площадь живых листьев.



Чистую продуктивность фотосинтеза рассчитывают по формуле:

$$\text{ЧПФ} = \frac{(B_2 - B_1)}{0,5 \cdot (L_2 + L_1) \cdot n},$$

где ЧПФ – чистая продуктивность фотосинтеза, г/(м<sup>2</sup>·сут);

$B_2$  – сухая биомасса растений в конце учетного периода, г;

$B_1$  – сухая биомасса растений в начале учетного периода, г;

$B_2 - B_1$  – прирост сухой массы за учетный период, г;

$L_1, L_2$  – площадь листьев в начале и в конце учетного периода, м<sup>2</sup>;

$0,5 \cdot (L_1 + L_2)$  – средняя площадь листьев за время опыта, м<sup>2</sup>;

$n$  – число дней в учетном периоде.

**Цель работы:** определить чистую продуктивность фотосинтеза в посевах различных сельскохозяйственных культур в определенные фазы их развития.

**Ход работы.** На опытных посевах отбирают в 3...4-кратной повторности по 10...20 растений, наиболее типичных для данной фазы развития. Растения срезают у самой поверхности почвы или выкапывают с корнями, не допуская их обрыва. *Обычно массу корней учитывают в точных вегетационных опытах (водная, песчаная или почвенная культуры).* В последнем случае корни осторожно отмывают водой от субстрата. В пробу включают все опавшие и засохшие листья и побеги. Затем растения помещают в полиэтиленовые пакеты и переносят в лабораторию, в которой окончательно формируют пробы. При этом растения освобождают от посторонних примесей, а корни дополнительно промывают водой для того, чтобы отделить раскустившиеся растения друг от друга.

Затем в каждой пробе определяют сначала сырую, а затем сухую массу всех частей растений, а также площадь всех живых листьев.

После окончательной подготовки проб дальнейшую работу выполняют в следующей последовательности:

1. Растения в каждой пробе (повторности) с помощью лезвий или ножниц *расчленяют на части* (листья, стебли, корни, колосья, зерно, полова), помещая их в отдельные бумажные коробки (пакеты). *Пожелтевшие и отмершие листья учитывают отдельно.*

2. Все части растений *взвешивают* на технических весах, результаты заносят в табл. 24.1 (показатель 1).

Таблица 24.1. Результаты учета сырой и сухой биомассы растений \_\_\_\_\_ культура

Номер показателя	Съем № _____, дата _____, количество растений в пробе _____					
	Показатели	Повторности				Среднее
1		2	3	4		
1	Сырая биомасса _____ растений, г: число					
	листья живые					
	листья мертвые					
	стебли					
	колосья (зерно, солома)					
2	Сырая масса 10...20 листьев, г					—
3	Площадь 10...20 листьев, м <sup>2</sup>					—
4	Масса 1 м <sup>2</sup> листьев, г					
5	Площадь всех живых листьев с _____ растений, м <sup>2</sup> число					
6	Навески сырой биомассы для определения процента сухого вещества, г: листья живые					—
	листья мертвые					—
	стебли					—
	колосья (зерно, солома)					—
	7	Вес биомассы после высушивания, г: листья живые				
листья мертвые					—	
стебли					—	
колосья (зерно, солома)					—	
8	Содержание сухого вещества, %: листья живые					
	листья мертвые					
	стебли					
	колосья (зерно, солома)					
	9	Сухая биомасса _____ растений, г: число				
листья живые					—	
листья мертвые					—	
стебли					—	
колосья (зерно, солома)					—	
10	Общая сухая биомасса _____ растений, г число					

3. Для определения площади всех живых листьев сначала методом случайной выборки *отбирают 10...20 зеленых листьев и взвешивают их* (показатель 2).

4. Затем *измеряют длину и наибольшую ширину каждого взятого листа* (у злаков). Результаты заносят в табл. 24.2.

Таблица 24.2. **Определение площади** \_\_\_\_\_ **листьев** \_\_\_\_\_  
число культура

Номер листа	Съем № _____, дата _____		
	Длина листа, см	Ширина листа, см	Площадь листьев, см <sup>2</sup>
1			–
2			–
И т. д.			–
Среднее	$L_{\text{ср}}$	$H_{\text{ср}}$	$S = L_{\text{ср}} \cdot H_{\text{ср}} \cdot 0,7 \cdot n$

5. *Рассчитывают суммарную площадь 10...20 измеренных листьев* (показатель 3) по формуле:

$$S = L_{\text{ср}} \cdot H_{\text{ср}} \cdot 0,7 \cdot n,$$

где  $S$  – площадь 10...20 листьев, см<sup>2</sup>;

$L_{\text{ср}}$  – средняя длина измеренных листьев, см;

$H_{\text{ср}}$  – средняя ширина измеренных листьев, см;

$n$  – число измеренных листьев;

0,7 – коэффициент для расчета площади листьев злаковых культур.

Площадь листьев двудольных растений определяют весовым методом (см. работу 15).

6. *Рассчитывают вес 1 м<sup>2</sup> листьев* (показатель 4). Для этого массу измеренных 10...20 листьев (показатель 2) делят на их площадь (показатель 3), выраженную в метрах квадратных.

7. *Рассчитывают площадь всех живых листьев* анализируемых растений в пробе (показатель 5). Для этого массу всех живых листьев (показатель 1) делят на массу 1 м<sup>2</sup> листьев (показатель 4).

8. Для определения процентного содержания сухого вещества *берут навески* каждой части растения *по 5...10 г* (показатель 6), тщательно измельчают их ножницами, помещают в бумажные пакеты и *высушивают* в сушильном шкафу при температуре 105 °С до постоянной массы (показатель 7).

9. *Рассчитывают процентное содержание сухого вещества* в каждой части растений – листьях, стеблях, колосьях, зерне (показатель 8).

10. *Рассчитывают сухую биомассу каждой части растений* (показатель 9), умножая сырую массу этих частей растений (показатель 1) на процентное содержание в них сухого вещества (показатель 8) и деля на 100.

11. *Рассчитывают общую сухую биомассу* растений по каждой пробе (показатель 10), суммируя сухую массу отдельных частей растений (показатель 9).

Для расчета ЧПФ необходимо выполнить два или более определений сухой массы и площади листьев в посевах. Результаты второго и последующих определений заносят в табл. 24.1 и 24.2, указывая номер и даты отбора проб. Результаты определения сухой биомассы и площади листьев по всем сѐмам заносят в табл. 24.3.

Таблица 24.3. **Результаты определения чистой продуктивности фотосинтеза в посевах** \_\_\_\_\_ культура

Показатель	1-й сѐм	2-й сѐм	2-й сѐм	3-й сѐм
Количество дней в учетном периоде $n$				
Общая сухая биомасса _____ растений, г				
Прирост сухой биомассы _____ растений за учетный период, г				
Общая площадь листьев с _____ растений, $m^2$				
Средняя площадь листьев с _____ растений за учетный период, $m^2$				
ЧПФ, г/( $m^2 \cdot \text{сут}$ )				

На основании полученных результатов делают выводы об интенсивности накопления органических веществ у различных сельскохозяйственных культур или ее изменении в процессе онтогенеза.

**Материалы и оборудование:** копачи, пакеты целлофановые, ножицы, линейки, весы, сушильный шкаф, бюксы или бумажные пакеты.

### Контрольные вопросы

1. Что понимают под чистой продуктивностью фотосинтеза, в каких пределах изменяется ее величина, от каких процессов зависит, с какой целью ее определяют?

2. Изложите методику отбора проб, определения площади листьев, определения сухой биомассы, расчета ЧПФ.

## Раздел 4. ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ

*Дыхание* – это окислительный распад органических веществ, в результате которого выделяется энергия, необходимая для протекания процессов жизнедеятельности, и образуются химически активные метаболиты, используемые для синтеза новых компонентов протоплазмы.

Энергия дыхания используется для выполнения различных видов внутриклеточной работы: движения цитоплазмы и органоидов, активного транспорта веществ через мембраны, создания мембранного потенциала, протекания биосинтетических реакций и др. Часть энергии дыхания выделяется в виде *теплоты*, что приводит к повышению температуры растительных тканей.

Дыхание имеет значение для жизнедеятельности организма не только как источник энергии, но и как источник различных соединений, необходимых для многочисленных синтетических реакций. При дыхании образуются различные промежуточные продукты окисления, химически активные метаболиты – альдегиды, кетоны, органические кислоты, низкомолекулярные углеводы, которые используются для синтеза более сложных органических веществ – *аминокислот, белков, липидов, углеводов, коферментов, нуклеотидов, фитогормонов* и др.

Основными *субстратами дыхания* (веществами, которые подвергаются окислению) являются свободные моносахариды или моносахариды, образующиеся при гидролизе олиго- и полисахаридов, а также липиды, белки и органические кислоты. Специализированными органами дыхания являются *митохондрии*.

В присутствии кислорода протекает *аэробное дыхание* – органические вещества окисляются с образованием углекислого газа и воды:



При отсутствии или недостатке кислорода происходит *анаэробное дыхание* (по типу брожения).

Всем типам дыхания предшествует общий анаэробный этап – *гликолиз*, в результате которого фруктоза или глюкоза расщепляются на две молекулы пировиноградной кислоты (ПВК).

В аэробных условиях ПВК включается в **цикл Кребса**, в котором образующиеся ди- и трикарбоновые органические кислоты окисляются путем *дегидрирования* и *декарбоксилируются* с выделением  $\text{CO}_2$ .

В анаэробных условиях ПВК декарбоксилируется и окисляется с образованием этилового спирта, уксусной, молочной или масляной кислот. Анаэробное дыхание наблюдается при затоплении растений водой, образовании в зимний период на поверхности растений ледяной корки, хранении продукции высокими насыпями или в плохо вентилируемых помещениях. Продукты анаэробного дыхания в больших количествах токсичны и приводят к повреждению и гибели растений или их органов, снижению всхожести семян, ухудшению качества продукции растениеводства при хранении.

Окислительный распад углеводов, включающий гликолиз и цикл Кребса, называют *дихотомическим окислением*.

Углеводы могут подвергаться преобразованиям и в окислительном **пентозофосфатном цикле**, который называют *апотомическим окислением*. Его продуктами являются пятиуглеродные сахара (рибоза, рибулоза, ксилоза, ксилулоза), используемые в реакциях синтеза нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), макроэргических соединений (АТФ), коферментов (НАД, ФАД), витаминов ( $\text{B}_2$ ), компонентов клеточных стенок (пентозанов, гемицеллюлоз).

Окислительный распад жиров и их превращение в углеводы осуществляется в **глиоксилатном цикле**, который является видоизменённым циклом Кребса.

Дыхание представляет собой комплекс сопряженных окислительно-восстановительных реакций, катализируемых ферментами класса Оксидоредуктазы. Основным типом окислительной реакции является *дегидрирование* – отнятие водорода от окисляемых веществ. Эти реакции катализируют ферменты *дегидрогеназы* (см. работу 6). Водород от окисляемых веществ переносится на коферменты дегидрогеназ –  $\text{НАД(Ф)}^+$  или ФАД, которые восстанавливаются до  $\text{НАД(Ф)·Н}$  и  $\text{ФАД·Н}_2$ . Восстановленные коферменты являются высокоэнергетическими веществами, при их окислении – переносе водорода и электронов на кислород воздуха – выделяется энергия, которая трансформируется в энергию макроэргических связей АТФ. Процесс синтеза АТФ, сопряженный с окислением восстановленных коферментов дегидрогеназ, называется *окислительным фосфорилированием*.

Основными количественными показателями дыхания являются дыхательный коэффициент и интенсивность дыхания.

Величина *дыхательного коэффициента* зависит от субстрата дыхания (работа 27).

*Интенсивность дыхания* характеризует скорость окисления субстрата дыхания. Интенсивность дыхания можно определить различными методами.

Так как при дыхании происходит окисление органических веществ, идет поглощение кислорода и выделение углекислого газа и энергии, все методы определения интенсивности дыхания можно разделить на четыре группы:

1. Определение убыли сухой массы (работа 25).
2. Определение количества поглощенного кислорода (работа 26).
3. Определение количества выделенного углекислого газа (работа 27).
4. Определение количества выделенной энергии.

Интенсивность дыхания зависит как от внутренних (субстрата дыхания, органа растения, его возраста), так и внешних (температуры, газового состава атмосферы, водообеспеченности, элементов минерального питания и др.) факторов.

Регулируя условия среды, изменяя интенсивность дыхания, можно влиять на продуктивность растений и сохранность продукции растениеводства.

### **Работа 25. Определение интенсивности дыхания семян по расходу органических веществ**

В процессе дыхания происходит окисление органических веществ. Основными субстратами дыхания являются углеводы. Конечными продуктами окисления являются углекислый газ и вода. Но так как дыхание тесно связано с биосинтетическими процессами, протекающими в клетке, промежуточные продукты окисления (альдегиды, кетоны, органические кислоты) используются для синтеза более сложных органических веществ (аминокислот, спиртов, жирных кислот, липидов, нуклеотидов и др.). Таким образом, в процессе дыхания одна часть органических веществ полностью окисляется, вследствие этого уменьшается сухая масса растений, а другая часть включается во вновь образующуюся биомассу.

Дыхание наиболее активно проходит в прорастающих семенах, цветках, молодых и активно растущих органах растений.

В работе для определения интенсивности дыхания используется метод, основанный на учете расхода органических веществ. Для этого сравнивают сухую массу семян и выращенных из них проростков.

**Интенсивность дыхания** семян выражают количеством сухого вещества, расходуемого 1 г семян за одни сутки (г/(г·сут)), а также процентом расхода сухой массы в расчете на 1 г семян за одни сутки (%/(г·сут)).

**Цель работы:** определить интенсивность дыхания прорастающих семян злаков (пшеница, тритикале, ячмень, овес), бобовых (горох, люпин, фасоль) или масличных (лен, рапс, подсолнечник) культур.

**Ход работы.** В чашки Петри насыпают влажные пропаренные опилки и высаживают в них по 55...60 сухих или наклонувшихся семян различных культур. Чашки с семенами помещают для роста растений в темное место, чтобы исключить образование органических веществ за счет фотосинтеза. Через 10...14 дней проростки вместе с субстратом (опилками) осторожно (чтобы не обрывать корни) извлекают из чашек Петри и отмывают сначала в больших фарфоровых или стеклянных чашках с водой. Затем из них отбирают по 25 этилированных проростков вместе с корневой системой и остатками зерен. Корни проростков дополнительно отмывают от приставших опилок под слабой струей водопроводной воды. После этого проростки обсушивают фильтровальной бумагой и помещают в бумажные пакеты или коробки.

Одновременно отбирают по 25 хорошо выполненных воздушно-сухих семян из тех, что брали для проращивания, и помещают их в бюксы. Проростки и непроросшие семена высушивают в сушильном шкафу при температуре 105 °С до постоянной массы. Опыт проводят в 3- или 4-кратной повторности. Результаты заносят в табл. 25.1.

Таблица 25.1. Расход органических веществ на дыхание прорастающих семян \_\_\_\_\_ культура

Сухая масса, г		Убыль сухой массы у проростков		Продолжительность роста проростков в темноте, дн.	Интенсивность дыхания	
не проросших семян	проростков	г	% от массы семян		г/(г·сут)	%/(г·сут)
$m_1$	$m_2$	$m_3 = m_1 - m_2$	$\% m_3 = (m_3/m_1) \cdot 100 \%$	$T$	$m_3/(m_1 \cdot T)$	$\% m_3/(m_1 \cdot T)$



Количество органических веществ, расходуемых на дыхание за весь период прорастания семян ( $m_3$ ), определяют как разницу между сухой массой семян ( $m_1$ ) и проростков ( $m_2$ ). Затем рассчитывают величину убыли сухой массы в процентах относительно сухой массы не проросших семян (%  $m_3$ ).

Интенсивность дыхания рассчитывают путем деления убыли сухой массы у проростков в граммах ( $m_3$ ) и процентах (%  $m_3$ ) на сухую массу не проросших семян ( $m_1$ ) и время проращивания в сутках ( $T$ ).

**Материалы и оборудование:** этиолированные проростки злаков, масличных, овощных культур, сухие не проросшие семена этих культур, сушильный шкаф, весы, фарфоровые чашки, бюксы, бумажные пакеты, фильтровальная бумага.

### Контрольные вопросы

1. Что такое дыхание, какова его роль в жизнедеятельности растений? Какие существуют типы дыхания? Назовите конечные продукты аэробного и анаэробного дыхания. Каковы последствия анаэробного дыхания для растений? См. стр. 102.

2. Назовите методы определения интенсивности дыхания (стр. 102). Какой метод используется в работе, в чем заключается его сущность? Изложите методику постановки опыта.

3. Что понимают под интенсивностью дыхания в данной работе, в каких единицах она измеряется и как рассчитывается?

4. Какова интенсивность дыхания прорастающих семян различных культур?

### Работа 26. Влияние температуры на интенсивность дыхания

Дыхание, как и другие биологические процессы, зависит от температуры. С повышением температуры до определенного предела интенсивность дыхания увеличивается. Дальнейшее повышение температуры угнетает дыхание. В основе этой закономерности лежит зависимость от температуры активности ферментов, катализирующих реакции окисления.

При определении интенсивности дыхания чаще используются газометрические методы, основанные на учете количества поглощенного кислорода или выделенного углекислого газа.

В данной работе используется метод, основанный на учете объема кислорода, поглощенного растительным материалом в процессе дыхания. Для этого исследуемый материал помещают в сосуд, в который предварительно вносят щелочь. Сосуд закрывают пробкой, в которую вмонтирована изогнутая газоотводная проградуйрованная трубка, конец которой погружают в подкрашенную воду. В процессе дыхания растительный материал выделяет углекислый газ, который поглощается щелочью, объем воздуха из-за этого в сосуде не изменяется. Одновременно растительный материал поглощает кислород, в результате этого объем воздуха в сосуде уменьшается, и вода поднимается по газоотводной проградуйрованной трубке. Объем засасываемой в трубку воды будет соответствовать объему кислорода, поглощенного растительным материалом.

*Интенсивность дыхания* выражается количеством кислорода, поглощенного 1 г исследуемого материала за 1 ч.

В работе используют прибор, состоящий из термоса 8, в который наливают воду заданной температуры, пробирки 4, в которую помещается растительный материал 1, резиновой пробки 5 с отверстием, в которую вмонтирована стеклянная изогнутая газоотводная трубка 6, градуированная с точностью до 0,01...0,02 мл, стаканчика 9 с подкрашенной водой (рис. 26.1).

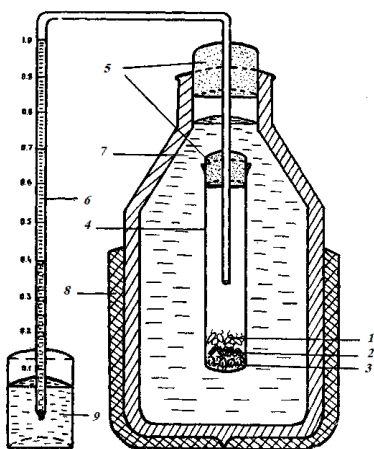


Рис. 26.1. Прибор для газометрического определения интенсивности дыхания:

- 1 – проросшие семена;
- 2 – обрезки трубок;
- 3 – вата, пропитанная щелочью;
- 4 – пробирка;
- 5 – резиновые пробки;
- 6 – газоотводная проградуйрованная трубка;
- 7 – вода;
- 8 – термос;
- 9 – стакан с подкрашенной водой

**Цель работы:** установить зависимость интенсивности дыхания прорастающих семян различных культур от температуры (10...70 °С).

**Ход работы.** В термос наливают воду заданной температуры. На дно конической пробирки помещают небольшой ватный тампон, на который пипеткой осторожно накапывают 15...20 капель 10%-ного раствора щелочи, не допуская ее попадания на стенки пробирки. Поверх тампона кладут несколько обрезков пластмассовых или стеклянных трубок так, чтобы они полностью закрывали смоченную щелочью вату.

В пробирку помещают 2...3 г проросших семян или другого материала. Пробирку закрывают резиновой пробкой с газоотводной трубкой и погружают в термос с водой. Под конец газоотводной трубки подставляют стаканчик емкостью 50 мл, в который наливают подкрашенной синькой воды столько, чтобы трубка была погружена в нее на 0,5...1,0 см.

*Если интенсивность дыхания определяют при температуре ниже комнатной (10...15 °С), вскоре после постановки опыта наблюдается быстрое засасывание воды в градуированную трубку, что никак не связано с дыханием и объясняется сжатием воздуха в пробирке при его охлаждении.*

*Если интенсивность дыхания определяют при температуре выше комнатной (30...70 °С), сразу после постановки опыта наблюдается выделение пузырьков воздуха из трубки в стаканчик, что обусловлено расширением воздуха в пробирке в результате его нагревания. Таким образом, в вариантах опыта, в которых температура воды в термосе отличается от комнатной, отсчеты начинают фиксировать через 10...15 мин после постановки опыта, т. е. когда температура воздуха в пробирке стабилизируется и растительные ткани адаптируются к температуре в термосе.*

*При температурах, близких к комнатной (20...25 °С), отсчеты можно фиксировать сразу после поднятия жидкости до первого нижнего деления градуированной трубки.*

Во время опыта производят отсчет уровня воды в трубке через равные промежутки времени: при температурах 10...20 °С – через 3 мин, при 30 и 70 °С – через 2 мин, при 40...60 °С – через 1 мин. Опыт продолжают в течение 15...20 мин. Результаты заносят в табл. 26.1.

Таблица 26.1. Результаты определения интенсивности дыхания семян \_\_\_\_\_ при температуре \_\_\_\_°С  
культура

Номер отсчета	Отсчет уровня воды, мл	Поглощено мл O <sub>2</sub> за _____ мин _____ г семян n t	Интенсивность дыхания, мл O <sub>2</sub> /(г·ч)
1		–	$V \cdot 60 / n \cdot t$
2			
И т. д.			
Среднее (V)			

Разность между двумя соседними отсчетами показывает количество кислорода, поглощенное навеской материала за установленный интервал времени.

Из полученных результатов находят среднее количество кислорода ( $V$ ), поглощенное навеской семян за установленный интервал времени, и рассчитывают интенсивность дыхания по формуле:

$$ИД = V \cdot 60 / n \cdot m,$$

где  $ИД$  – интенсивность дыхания, мл  $O_2$  / (г · ч);

$V$  – среднее количество кислорода, поглощенное навеской семян за установленный интервал времени, мл;

$n$  – интервал времени между отсчетами, мин;

$m$  – масса навески семян, г;

60 – коэффициент перевода минут в часы.

Результаты определения интенсивности дыхания при различных температурах заносят в табл. 26.2.

Таблица 26.2. Интенсивность дыхания семян при различных температурах

Температура, °С	Интенсивность дыхания, мл $O_2$ / (г·ч)
10	
20	
.....	
70	

На основании полученных данных строят график зависимости интенсивности дыхания от температуры (рис. 26.2) и делают выводы.

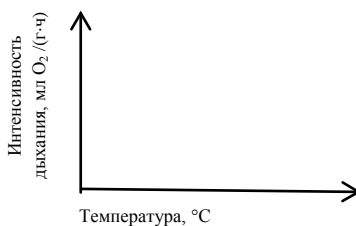


Рис. 26.2. Зависимость интенсивности дыхания семян от температуры

**Материалы и оборудование:** проросшие семена (пшеницы, тритикале, ячменя, люпина, льна), листья или цветки различных растений, термосы со встроенными в пробки газоотводными трубками, весы, конические пробирки, вата, обрезки пластмассовых или стеклянных трубок, 10%-ный раствор NaOH или KOH, глазные пипетки, термометры (10...100 °С), стаканы вместимостью 50 мл, подкрашенная метиленовой синькой вода.

### Контрольные вопросы

1. Назовите методы определения интенсивности дыхания. На чем основан метод определения интенсивности дыхания в данной работе? Изложите методику постановки опыта.

2. От каких факторов зависит интенсивность дыхания? Как температура влияет на дыхание, как объяснить эту зависимость?

3. Назовите температурный оптимум дыхания прорастающих семян исследуемой культуры.

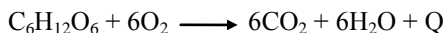
4. Какой должна быть температура при росте растений и хранении продукции растениеводства?

### Работа 27. Определение величины дыхательного коэффициента семян зерновых и масличных культур

В процессе дыхания происходит окисление органических веществ – субстратов дыхания. Основными субстратами дыхания в клетках растений являются углеводы, липиды, белки и органические кислоты. О природе субстрата дыхания можно судить по величине дыхательного коэффициента ( $K_d$ ).

**Дыхательный коэффициент** рассчитывается как *отношение объема выделенного углекислого газа к объему поглощенного кислорода*.

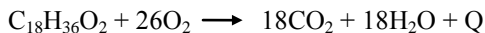
Если субстратом дыхания служат углеводы (моно- или полисахариды), то дыхательный коэффициент при всех других благоприятных условиях будет равен единице:



$$K_d = \frac{VCO_2}{VO_2} = \frac{6}{6} = 1.$$

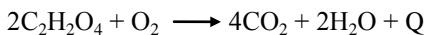
Если в процессе дыхания окисляются жиры, более восстановленные соединения по сравнению с углеводами, кислорода поглощается

больше, чем выделяется углекислого газа, и дыхательный коэффициент будет меньше единицы. Например, при окислении стеариновой кислоты реакция идет по следующему уравнению:



$$\text{Соответственно, } K_d = \frac{VCO_2}{VO_2} = \frac{18}{26} = 0,69.$$

При использовании на дыхание органических кислот, соединений более окисленных, чем углеводы, величина дыхательного коэффициента будет больше единицы. Например, при окислении щавелевой кислоты реакция идет по уравнению



$$\text{Соответственно, } K_d = \frac{VCO_2}{VO_2} = \frac{4}{1} = 4.$$

Величина дыхательного коэффициента зависит также от физиологического состояния тканей и внешних факторов. В молодых и растущих тканях и органах растений, в которых интенсивно идут процессы синтеза органических веществ из промежуточных продуктов дыхания, углекислого газа – конечного продукта дыхания – выделяется меньше, в связи с этим величина дыхательного коэффициента снижается.

При высоких температурах ухудшается растворимость кислорода в водной среде и уменьшается его поглощение клетками, поэтому величина дыхательного коэффициента возрастает. Такое же изменение величины дыхательного коэффициента происходит при недостатке кислорода в атмосфере, когда клетки переходят на анаэробное дыхание.

Для определения величины дыхательного коэффициента проводят два опыта: в первом – определяют объем поглощенного семенами кислорода (как в работе 26), во втором – определяют разницу между объемом поглощенного кислорода и выделенным углекислым газом (для этого в пробирку с семенами щелочь не вносят). Для расчета объема выделенного углекислого газа от объема поглощенного кислорода (результат первого опыта) отнимают разницу между объемом поглощенного кислорода и выделенным углекислым газом (результат второго опыта). Дыхательный коэффициент рассчитывают по приведенной выше формуле.

**Цель работы:** определить величину дыхательного коэффициента у прорастающих семян злаков, бобовых и масличных культур.

**Ход работы.** Для определения величины дыхательного коэффициента используют прибор, описанный в работе 26. Опыты проводят при температуре воды в термосе 25 °С и с навеской семян массой 3 г.

В первом опыте определяют объем поглощенного кислорода. Для этого прибор собирают точно так, как описано в работе 26: в пробирку помещают ватный тампон, наносят на него 15...20 капель щелочи, поверх помещают обрезки трубок и навеску семян, пробирку закрывают пробкой с газоотводной трубкой и погружают в термос с водой. Конец газоотводной трубки опускают в подкрашенную воду. Когда жидкость поднимется до первого деления газоотводной трубки, засекают время и делают четыре отсчета через каждые 5 мин. Результаты заносят в табл. 27.1.

Таблица 27.1. Результаты определения дыхательного коэффициента семян

Номер отсчета	Опыт первый (со щелочью)		Опыт второй (без щелочи)		Выделено CO <sub>2</sub> 3 г семян за 5 мин, мл	Дыхательный коэффициент
	Отсчет, мл	Поглощено O <sub>2</sub> за 5 мин 3 г семян, мл	Отсчет, мл	Разница между объемами поглощенного O <sub>2</sub> и выделенного CO <sub>2</sub> за 5 мин, мл		
1		–		–	–	–
2					–	–
И т. д.					–	–
Среднее	–	<i>A</i>	–	<i>B</i>	$C = A - B$	$K_d = C / A$

Разница между двумя соседними отсчетами показывает количество кислорода, поглощенного навеской семян за 5 мин. Из полученных результатов находят среднее значение (*A*).

Во втором опыте в чистую пробирку помещают лишь навеску семян, а щелочь не вносят. Пробирку закрывают пробкой с газоотводной трубкой и погружают в термос. Конец газоотводной трубки опускают в подкрашенную воду.

Если вода не поднимается по градуированной трубке в течение длительного времени (15...30 мин), это означает, что объем поглощенного кислорода равен объему выделенного углекислого газа, а  $K_d = 1$ .

Если вода поднимается по трубке, кислорода поглощается больше, чем выделяется углекислого газа, т. е. количество засасываемой в трубку воды будет соответствовать разнице между объемом поглощенного кислорода и объемом выделенного углекислого газа. Из результатов второго опыта также находят среднее значение (*B*).

Чтобы рассчитать количество углекислого газа ( $C$ ), выделенного навеской семян за 5 мин, от объема поглощенного кислорода ( $A$ ) вычитают разницу между объемом поглощенного кислорода и объемом выделенного углекислого газа ( $B$ ).

Дыхательный коэффициент рассчитывают по приведенной выше формуле.

Для получения более точных результатов каждый опыт проводят в 2...3-кратной повторности с новыми навесками. Результаты, полученные в каждом повторении, заносят в табл. 27.2.

Затем рассчитывают средние значения дыхательного коэффициента и делают выводы о природе субстратов дыхания у семян различных культур.

Таблица 27.2. Дыхательный коэффициент семян различных культур

Культура	Величина дыхательного коэффициента				Субстрат дыхания
	1-е повторение	2-е повторение	3-е повторение	Среднее	
Пшеница					
Ячмень					
Лен					
Подсолнечник					

**Материалы и оборудование:** проросшие семена льна, пшеницы, ячменя, люпина, фасоли или других культур, термосы с встроенными в крышки газоотводными трубками, весы, конические пробирки, вата, обрезки пластмассовых или стеклянных трубок, 10%-ный раствор NaOH или KOH, глазные пипетки, термометры, стаканчики вместимостью 50 мл, подкрашенная метиленовой синькой вода.

### Контрольные вопросы

1. Что такое дыхательный коэффициент, от чего зависит его величина? Как изменяется величина дыхательного коэффициента при использовании в процессе дыхания различных субстратов и изменении температуры?
2. Как определить количество поглощаемого растительным материалом кислорода и выделяемого углекислого газа?
3. Почему фактическая величина дыхательного коэффициента обычно меньше теоретического значения?



## Раздел 5. МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ РАСТЕНИЙ

Растения являются автотрофными организмами, способными синтезировать все необходимые им органические вещества из неорганических. Около 95 % сухой массы растений составляют четыре элемента: С – 45 %, О – 42 %, Н – 6,5 %, N – 1,5 %. Их называют *органогенами*, так как они входят в состав почти всех органических соединений. Органогены (за исключением азота) поглощаются в процессе воздушного (СО<sub>2</sub>) и водного (Н<sub>2</sub>О) питания. При сжигании растительных тканей органогены превращаются в углекислый газ, водяной пар и аммиак.

Остальные 5 % сухой массы растений – *зольные* элементы, при сжигании растений они остаются в золе. Зольные элементы относятся к *элементам минерального питания*, они поглощаются из почвы в виде ионов.

В растениях содержатся почти все химические элементы, содержащиеся в окружающей среде. Однако точными вегетационными опытами установлено, что для нормальной жизнедеятельности растений требуется лишь *19 элементов*, которые называют *питательными*.

Элементы минерального питания в зависимости от их содержания в растениях подразделяют на *макроэлементы* (N, P, S, K, Ca, Mg, S), содержание которых колеблется от целых до сотых долей процента, и *микроэлементы* (Fe, Mn, Cu, Zn, B, Mo), содержание которых колеблется от тысячных до сотых долей процента.

Физиологическая роль элементов минерального питания определяется, в первую очередь, ролью веществ, в состав которых они входят, а также их влиянием на физико-химические свойства протоплазмы. *Азот*, например, входит в состав белков, хлорофилла, ДНК, РНК, АТФ, ферментов, витаминов, фитогормонов и других веществ. *Фосфор* входит в состав фосфопротеидов, фосфолипидов, фосфорных эфиров сахаров, нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), нуклеотидов (АТФ, НАД, ФАД), витаминов. *Калий* оказывает влияние на вязкость цитоплазмы, водоудерживающую способность биокolloидов протоплазмы, величину мембранного потенциала, активность ферментов, транспорт углеводов, устойчивость растений к неблагоприятным условиям среды.

Микроэлементы, как правило, принимают участие в регуляторных системах клетки. Они входят в состав ферментов или являются их активаторами, принимают участие в окислительно-восстановительных реакциях, азотном и углеводном обменах, повышают устойчивость растений к болезням и неблагоприятным условиям среды. Недостаток

микроэлементов приводит к снижению качества продукции, а нередко и накоплению токсичных для человека и животных веществ. Например, недостаток молибдена приводит к накоплению в продукции растениеводства нитратов, обладающих канцерогенным действием.

Растения поглощают элементы минерального питания как из почвенного раствора, так и почвенно-поглощающего комплекса. В основе поглощения минеральных веществ лежит механизм обменной адсорбции – в клеточной стенке происходит обмен ионов, выделяемых клетками ( $\text{H}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ), на ионы окружающей среды ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ).

Поглощение ионов происходит, как правило, избирательно и активно. Активные механизмы поглощения функционируют за счет энергии, выделяемой при дыхании клеток корней. Поэтому поглощательная способность корней зависит от их обеспеченности органическими веществами (субстраты дыхания), температуры, аэрации, соотношения ионов в питательном растворе (см. работу 28), мощности развития корней, их общей и рабочей адсорбирующей поверхности (работа 29), кислотности почвы, концентрации солей (работа 30).

Регулирование минерального питания растений является основой технологии возделывания любой культуры. Недостаток элементов в почве устраняется внесением минеральных удобрений. При этом системы удобрений разрабатываются исходя из физиологических особенностей растений, свойств удобрений и почвы, уровня планируемой урожайности.

### **Работа 28. Влияние отдельных элементов минерального питания на рост и развитие растений**

Для выявления степени обеспеченности растений минеральными веществами (*диагностики минерального питания*) используют различные методы. **Почвенная диагностика** проводится путем агрохимического анализа почвы и сопоставления полученных данных с установленными нормативами. **Растительная диагностика** является более объективной, так как индикатором являются сами растения. Выделяют несколько видов растительной диагностики. **Визуальная диагностика** основана на выявлении видимых признаков недостатка элементов питания – изменение окраски, морфологии и анатомии листьев, появление на листьях и стеблях пятен, полос, некрозов и т. д. **Химическая диагностика** основана на определении содержания в растительных тканях определенных элементов с использованием набора специаль-

ных химических реактивов. Метод *инъекций* или *опрыскивания* основан на введении в ткани какого-либо элемента путем инъекций либо опрыскивания и наблюдении за внешними признаками растений. *Морфобиометрическая* диагностика основана на определении прироста массы, изменения числа и размеров органов, величины и структуры урожая.

В физиологических исследованиях для изучения роли элементов минерального питания используют **вегетационный метод** – растения выращивают в водных питательных растворах (*водная культура*), не содержащих некоторых элементов. В течение опыта наблюдают за растениями, отмечая особенности их роста и развития.

В качестве питательных растворов можно использовать смеси Кнопа, Гельригеля, Прянишникова.

В данной работе для постановки опыта используется питательная смесь Кнопа, имеющая следующий состав:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  – 1,00 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,25 г,  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,25 г,  $\text{KCl}$  – 0,125 г,  $\text{FeCl}_3$  – 0,025 г (на 1 л воды).

**Цель работы:** изучить влияние на рост и развитие растений недостатка азота, фосфора, калия, кальция, магния, серы, железа или других макро- или микроэлементов в водной культуре.

#### **Ход работы:**

**1. Подготовка опыта** включает проращивание семян опытных растений. Для этого хорошо выполненные и одинаковые по величине семена помещают на влажную фильтровальную бумагу и проращивают в термостате при температуре 20...25 °С.

Когда корешки проростков будут иметь длину 1,5...2 см, их переносят для дальнейшего роста на разбавленный питательный раствор или дистиллированную воду (в опытах с микроэлементами). Раствор или воду наливают в стеклянные банки вместимостью 0,5 л, банки накрывают пропитанной парафином марлей с отверстиями, в которые высаживают проростки так, чтобы корешки находились в растворе.

Одинаковые и здоровые проростки в фазе 2...3-х листьев используют для постановки опыта.

**2. Постановка опыта** включает приготовление водных питательных смесей и закрепление в специальных крышках проростков.

Возможные варианты опыта указаны в табл. 28.1.

При составлении питательных смесей с исключением отдельных элементов минерального питания следует придерживаться следующих принципов:

1. При исключении из питательной смеси какого-либо одного элемента соотношение всех остальных элементов должно оставаться неизменным.

2. Если исключаемый элемент входит одновременно в состав катиона и аниона одной соли (например, азот входит в состав катиона  $\text{NH}_4^+$  и аниона  $\text{NO}_3^-$  соли  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), такую соль исключают из состава смеси, а все остальные вносят в прежнем количестве.

3. Если исключаемый элемент входит в состав только аниона или только катиона одной соли, ее заменяют другой солью, в состав аниона или катиона которой входит другой элемент, имеющий близкие физико-химические свойства. В этом случае выполняют расчеты, в которых сначала определяют содержание в навеске заменяемой соли *элемента, связанного с исключаемым*. Затем рассчитывают, сколько нужно взять соли-заменителя, чтобы в ней содержалось равное количество этого элемента. Пример расчета таких смесей приведен ниже.

**Расчет питательной смеси с исключением магния.**

Магний входит в состав соли  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Эта соль заменяется на соль  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Mg и Ca – двухвалентные металлы с близкими свойствами). С магнием в соли  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  связана *серы*, которую необходимо сохранить в эквивалентном (неизменном) количестве.

Расчеты выполняют в следующей последовательности:

1. Определяют количество *серы* в 0,25 г соли  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , вносимых по рецепту (питательная смесь Кнопа), исходя из того, что в грамм-молекуле  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (156,36 г) содержится 32,06 г этого элемента:

**156,36 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  содержит 32,06 г серы (S),  
0,25 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  содержит  $X_1$  г серы (S),**

$$\text{откуда } X_1 = \frac{0,25 \cdot 32,06}{156} = 0,051 \text{ г.}$$

2. Определяют количество *соли-заменителя* –  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , которое необходимо внести в питательную смесь, чтобы в ней содержалось 0,051 г серы, исходя из того, что в грамм-молекуле соли  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (172,14 г) содержится 32,06 г серы:

172,14 г  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  содержит 32,06 г S,  
 $X_2$  г  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  должно содержать 0,051 г S,

$$\text{откуда } X_2 = \frac{172,14 \cdot 0,051}{32,06} = 0,27 \text{ г.}$$

Следовательно, при исключении магния вместо 0,25 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  следует внести 0,27 г  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Аналогичным образом производят расчеты при исключении из питательных смесей других элементов минерального питания.

**Варианты замещения** солей в питательной смеси Кнопа: при исключении **азота** соль  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  заменяется солью  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; при исключении **фосфора** соль  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  заменяется солью  $\text{KCl}$ ; при исключении **калия** соль  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  заменяют на  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , а соль  $\text{KCl}$  – на  $\text{NaCl}$ ; при исключении **кальция** соль  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  заменяется солью  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; при исключении **магния** соль  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  заменяется солью  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; при исключении **серы** соль  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  заменяется солью  $\text{MgCO}_3$  или  $\text{MgCl}_2$ ; при исключении **железа** соль  $\text{FeCl}_3$  не вносят.

При приготовлении питательных смесей целесообразно придерживаться определенной **последовательности растворения** солей в воде. Например, при приготовлении питательной смеси Кнопа сначала в 0,5 л воды растворяют  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , затем  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , далее при помешивании –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , в конце вносят 3...5 капель раствора  $\text{FeCl}_3$ . Такая последовательность растворения солей сводит образование осадка в растворе к минимуму. Далее объем раствора доводят водой до 1 л.

Для постановки опыта используют стеклянные банки вместимостью 0,75 или 1,0 л. Банки обворачивают светонепроницаемой бумагой в два слоя, сверху перевязывают шпагатом, края бумаги сбоку и снизу склеивают.

На этикетках, приклеиваемых на банки, указывают *название растений, вариант опыта* (полная смесь, без азота, без фосфора и т. д.), *содержание солей, фамилии исполнителей и дату* постановки опыта.

Опытные растения, 2...3 проростка, обворачивают на уровне корневой шейки ватой и высаживают в центральное отверстие специальных деревянных пробок, которые предварительно парафинируют для предотвращения смачивания их питательным раствором и роста водорослей и грибов. В банки вливают приготовленный питательный раствор. Банки закрывают пробками с высаженными растениями, корни

растений должны быть погружены в питательный раствор (пробки не должны касаться раствора).

**3. Наблюдения и уход за растениями.** Опыт длится от 8 до 10 недель. Уход за растениями сводится прежде всего к периодической смене питательных растворов, так как pH, количество и соотношение солей в них изменяется. Периодичность смены растворов устанавливают в зависимости от объема питательного раствора и скорости роста растений. В банках емкостью 1 л растворы меняют каждые 14 дней.

Так как корневая система растений в водной среде испытывает недостаток кислорода, необходимо периодически, например, через день, прокачивать через раствор воздух с помощью специального насоса или резиновой груши. Насыщение раствора кислородом можно осуществлять путем его переливания из банки в банку или сильным взбалтыванием в сосуде большего объема.

Когда высота растений достигает 20 см, их подвязывают к стеклянной или деревянной палочке, установленной в одно из отверстий пробки.

На протяжении всего опыта ведут наблюдения за ростом и развитием растений, данные заносят в табл. 28.1.

Таблица 28.1. Наблюдения за ростом и развитием растений  
вариант опыта: \_\_\_\_\_

культура, смесь

Показатели	Дата					
1. Фаза развития						
2. Высота растений, см						
3. Число стеблей, шт.						
4. Толщина стебля, см						
5. Количество листьев, шт.						
6. Размер листьев (длина и ширина), см						
7. Длина корней, см						
8. Окраска корней						
9. Характерные признаки растений (окраска листьев и стеблей, проявление хлороза или некроза, деформация листьев и др.)						
10. Кислотность раствора, pH						

**4. Съем опыта.** По окончании опыта заполняют таблицу наблюдений. Проводят визуальную оценку состояния растений и делают предварительные выводы о влиянии отдельных элементов минерального питания на рост и развитие растений.

Затем растения аккуратно вынимают из отверстий крышек, освобождают от ваты, определяют *кустистость общую* (общее количество стеблей на одном растении) и *продуктивную* (количество стеблей, имеющих колос с зерном). Результаты заносят в табл. 28.2.

После этого корни отделяют от надземной части и оставляют их в банке с раствором, а стебли и листья разрезают на части, взвешивают и помещают для высушивания в нагретый до 105 °С сушильный шкаф для определения сухой массы.

Корни извлекают из питательного раствора, помещают на фильтровальную бумагу (*нельзя отжимать!*) и замеряют максимальную длину. Затем корни просушивают на воздухе, взвешивают и приступают к определению объема и адсорбирующей поверхности корневой системы (см. работу 29).

После определения адсорбирующей поверхности корней их промывают водой, обсушивают фильтровальной бумагой и помещают в сушильный шкаф для высушивания. Высушенную надземную часть и корни взвешивают. Результаты заносят в табл. 28.2.

Таблица 28.2. Влияние элементов минерального питания на рост растений

Состав питательной смеси	Кустистость, шт.		Длина, см		Масса надземной части, г		Масса корней, г		Отношение массы надземной части к массе корней		Объем корневой системы, мл	Адсорбирующая поверхность корней, м <sup>2</sup>		
	общая	продуктивная	надземной части	корней	сырая	сухая	сырая	сухая	сырой	сухой		общая	рабочая	недействительная
Полная (1-й контроль)														
Без N														
Без P														
Без K														
Без Ca														
Без Mg														
И т. д.														
Вода (2-й контроль)														

После заполнения таблицы анализируют полученные данные и делают выводы о влиянии отдельных элементов питания на рост и развитие растений.

**Материалы и оборудование:** зерно злаков (пшеницы, ячменя, фа-соли, кукурузы), проращиватели, соли ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{MgCO}_3$  или  $\text{MgCl}_2$ ), стеклянные палочки, мерные цилиндры на 1 л, банки для водных культур на 0,75...1 л, оберточная и фильтровальная бумага, деревянные пропарафиненные пробки к банкам, линейки, резиновые груши для покачивания воздуха, индикаторная бумага для определения pH, сушильный шкаф, весы.

### Контрольные вопросы

1. Назовите методы диагностики дефицита элементов минерального питания в растениях.
2. Какие элементы относят к органогенам, макро- и микроэлементам?
3. Назовите питательные смеси для водных культур. Какие элементы и соли входят в их состав?
4. Какие принципы следует соблюдать при составлении питательных смесей, не содержащих отдельных элементов минерального питания? Какова последовательность расчетов при определении количества солей-заменителей таких смесей?
5. Опишите методику подготовки, постановки, наблюдений, ухода за растениями и съема опытов с водной культурой.
6. Какова физиологическая роль азота, фосфора, калия, серы, других элементов? Назовите характерные признаки их недостатка у растений.

### Работа 29. Определение общей и рабочей адсорбирующей поверхности корней методом Д. А. Сабинина и И. И. Колосова

Поглотительная способность корней зависит от степени ее развития (длины, разветвленности, ростовой активности), возраста, а также соотношения деятельной и недейтельной поверхности.

К *деятельной* (или рабочей) адсорбирующей поверхности относят поверхность молодых корней и корневых волосков, интенсивно поглощающие воду и элементы минерального питания.

К *недейтельной* относят поверхность старых корней, лишенных корневых волосков и покрытых пробкой, они не участвуют или слабо участвуют в процессах поглощения воды и минеральных элементов.



У более продуктивных растений формируется большая общая поверхность корней и, что особенно важно, имеющая большую рабочую поверхность. Путем сравнения величины адсорбирующей поверхности корней у различных сортов и гибридов можно выделить из них перспективные формы для конкретных условий произрастания.

**Метод Д. А. Сабина и И. И. Колосова** основан на представлении об адсорбционном характере начального этапа поглощения веществ корнями. В качестве адсорбируемого вещества используется метиленовая синь, поглощение которой корнями из раствора можно определить по уменьшению концентрации этого раствора. Допуская, что ионы и молекулы при адсорбционном насыщении поверхности корней располагаются в один слой, можно определить площадь, на которой они адсорбируются.

Установлено, что *при двукратном 1,5-минутном погружении* корневой системы в раствор метиленовой сини происходит адсорбционное насыщение всей поверхности корней (деятельной и недейтальной), *при третьем погружении* метиленовая синь поглощается только деятельной поверхностью, которая за этот промежуток времени десорбировала поглощенную ранее синьку внутрь корня.

Установлено также, что 1 мг метиленовой сини покрывает  $1,1 \text{ м}^2$  поверхности адсорбента. Поэтому, умножив количество миллиграммов поглощенной корнями метиленовой сини за два 1,5-минутных погружения на  $1,1 \text{ м}^2$ , можно рассчитать общую адсорбирующую поверхность корней, а умножив количество поглощенной метиленовой сини корнями при третьем 1,5-минутном погружении на  $1,1 \text{ м}^2$ , можно рассчитать рабочую адсорбирующую поверхность корней.

**Цель работы:** определить общую, рабочую и недейтальную поверхность корневой системы у растений различных сельскохозяйственных культур, или растений, выращенных на искусственных питательных смесях (см. работу 28).

**Ход работы.** Вначале определяют объем корневой системы. Для этого в мерный цилиндр наливают определенный объем воды и погружают в нее корни, предварительно обсушенные сначала фильтровальной бумагой, а затем на воздухе. Объем вытесненной воды будет соответствовать объему корневой системы.

Для определения адсорбирующей поверхности корней в три пронумерованных стакана наливают 0,0002 н. раствор метиленовой сини (0,064 мг/мл) в количестве, превышающем объем корневой системы в 10 раз. Корни последовательно погружают на 1,5 мин в каждый стакан. При этом растворы в стаканах постоянно перемешивают путем их кру-

гового вращения. После каждого погружения дают возможность синьке стечь с корней в тот же стакан, в котором они находились.

Окрашенные корни после извлечения их из третьего стакана промывают водой и помещают в стакан с раствором хлорида кальция, в котором наблюдают десорбцию метиленовой сини из корней, что указывает на наличие обменной адсорбции.

Затем опытные растворы разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:9. Для этого по 1 мл раствора из каждого стакана переносят в малые стаканчики на 50 мл с аналогичным номером и добавляют в них по 9 мл воды. Одновременно с опытными растворами разбавляют исходный стандартный раствор метиленовой сини (используют 4-й стаканчик). После этого определяют оптическую плотность разбавленных растворов на фотоэлектроколориметре (ФЭК, КФК).

При работе на фотоэлектроколориметре используют желтый светофильтр. Без разбавления растворы нельзя колориметрировать, так как их оптическая плотность очень высокая.

Концентрацию метиленовой сини в первом, втором и третьем опытных стаканах, после погружения в них корней, рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{E \cdot C_k}{E_k},$$

где  $C$  – концентрация метиленовой сини в опытных растворах, мг/мл;

$C_k$  – концентрация метиленовой сини в исходном растворе (0,064 мг/мл);

$E_k$  – оптическая плотность исходного раствора метиленовой сини (раствор в 4-м стаканчике);

$E$  – оптическая плотность метиленовой сини в опытных растворах (1, 2, 3-м стаканчиках).

Результаты определения оптической плотности растворов на фотоэлектроколориметре и результаты расчета концентрации растворов по формулам заносят в табл. 29.1.

Таблица 29.1. Результаты определения концентрации метиленовой сини

Анализируемое растение, вариант опыта	Объем корневой системы, мл	Показание оптической плотности метиленовой сини в стаканах				Концентрация метиленовой сини в стаканах, мг		
		1-м ( $E_1$ )	2-м ( $E_2$ )	3-м ( $E_3$ )	4-м ( $E_k$ )	1-м ( $C_1$ )	2-м ( $C_2$ )	3-м ( $C_3$ )

Концентрацию растворов в стаканах можно определить другим способом – по графику. Для этого определяют оптическую плотность нескольких растворов метиленовой сини известной концентрации и по полученным данным строят график. Зная оптическую плотность исследуемых растворов, находят их концентрации по графику и полученный результат умножают на 10 (с учетом 10-кратного разбавления).

Адсорбирующую поверхность корневой системы рассчитывают, используя формулы, приведенные в табл. 29.2.

Таблица 29.2. Расчет адсорбирующей поверхности корневой системы

Вариант опыта	Объем раствора метиленовой сини в стакане, мг	Начальное содержание метиленовой сини в стакане, мг	Осталось метиленовой сини в стаканах после погружения в них корней, мг			Поглощено корнями метиленовой сини из растворов в стаканах, мг				Адсорбирующая поверхность корней, м <sup>2</sup>			Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /мл	
			в первом	во втором	в третьем	из первого	из второго	из первого и второго вместе	из третьего	общая	рабочая	недействительная	общая	рабочая
	$V$	$A = V \cdot C_k$	$A_1 = V \cdot C_1$	$A_2 = V \cdot C_2$	$A_3 = V \cdot C_3$	$B_1 = A - A_1$	$B_2 = A - A_2$	$B_3 = B_1 + B_2$	$C = A - A_3$	$D = B_3 \cdot 1,1$	$D_1 = C \cdot 1,1$	$D_2 = D - D_1$	$D/V \cdot 10$	$D_1/V \cdot 10$

Исходное содержание метиленовой сини в растворе определяют путем умножения концентрации исходного раствора ( $C_k$ ) на объем раствора в стакане ( $V$ ).

Количество оставшейся в стаканах метиленовой сини после 1,5-минутного погружения корней определяют путем умножения концентраций этих растворов ( $C_1, C_2, C_3$ ) на их объем ( $V$ ).

Количество поглощенной метиленовой сини из каждого стакана определяют как разницу между исходным содержанием и количеством оставшейся краски после погружения корней.

Умножая число миллиграммов метиленовой сини, поглощенной из первого и второго стаканов ( $B_3$ ), на 1,1 м<sup>2</sup> получают величину *общей адсорбирующей поверхности* корней.

Умножением количество миллиграммов краски, поглощенной из третьего стакана ( $C$ ), на  $1,1 \text{ м}^2$  находят величину *рабочей адсорбирующей поверхности*.

Разница между величинами общей и рабочей адсорбирующей поверхности будет соответствовать величине *недействительной поверхности* корней.

*Удельную адсорбирующую поверхность* корней находят путем деления величин общей и рабочей поверхности на объем корней.

Результаты опыта анализируют и делают выводы.

**Материалы и оборудование:** 0,0002 н. раствор метиленовой сини (64 мг в 1 л дистиллированной воды), стаканы на 100...1000 мл (по 3 шт. на один вариант опыта), стаканчики на 50 мл (по 4 шт. на один вариант опыта), мерные цилиндры для определения объема корней на 10...50 мл, фильтровальная бумага, фотоэлектроколориметр, хлорид кальция.

### Контрольные вопросы

1. Что понимают под общей, рабочей и недействительной адсорбирующей поверхностью корней?

2. На чем основан метод определения адсорбирующей поверхности корней в данной работе? Изложите основные этапы ее выполнения.

3. Как определить объем корневой системы, рассчитать концентрации, исходное и конечное содержание метиленовой сини в опытных стаканах, количество поглощенной из них краски корнями, общую, рабочую и удельную адсорбирующую поверхность корней?

4. Как влияет недостаток отдельных элементов минерального питания на поглотительную способность корней?

### Работа 30. Влияние концентрации раствора нитрата аммония на прорастание семян

Растения выносят из почвы с урожаем значительное количество питательных веществ. Например, на формирование 1 т зерна и соответствующего количества побочной продукции зерновыми культурами используется 30...32 кг азота, 10...12 кг фосфора и 15...18 кг калия. Вынос питательных веществ с урожаем должен возмещаться внесением удобрений. Однако внесение большого количества удобрений может привести к снижению урожайности и даже гибели растений. Это связано с повышением концентрации почвенного раствора, снижением его осмотического потенциала и, как следствие этого, ухудшением водоснабжения растений. Так, осмотический потенциал клеточного сока растений пшеницы обычно не превышает  $-20$  атм, а у моло-

дых проростков он колеблется в пределах  $-5 \dots -10$  атм. Осмотический потенциал 1 М раствора  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  равен  $-36,14$  атм.

Если осмотический потенциал питательного (или почвенного) раствора окажется ниже, чем осмотический потенциал клеточного сока клеток зародыша, вода не будет поступать в семена, и они не прорастут. У вегетирующих растений в этих условиях листья будут увядать и засыхать, что может привести к гибели растений.

В работе для изучения влияния концентрации раствора на прорастание семян и рост проростков используют 1,0 М, 0,1 М и 0,01 М растворы  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (действующее вещество аммиачной селитры). В качестве контроля используют воду.

Аммиачная селитра – наиболее ценное азотное удобрение, содержащее усвояемый азот в двух формах – аммонийной ( $\text{NH}_4^+$ ) и нитратной ( $\text{NO}_3^-$ ), что обеспечивает более равномерную нагрузку по метаболизации азота между корнями и наземными органами.

**Цель работы:** установить влияние концентрации раствора нитрата аммония на прорастание семян и рост растений различных сельскохозяйственных культур.

**Ход работы.** В четыре чашки Петри помещают кружки фильтровальной бумаги, на которых шариковой ручкой или карандашом записывают фамилии исполнителей и концентрации опытных растворов: на 1-м – 1,0 М  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , на 2-м – 0,1 М  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , на 3-м – 0,01 М  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , на 4-м –  $\text{H}_2\text{O}$ .

В первую чашку вливают 9 мл готового 1,0 М раствора  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Раствор с концентрацией 0,1 М готовят в малом стаканчике, в который вливают 1 мл 1,0 М раствора  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и 9 мл водопроводной воды. После тщательного перемешивания 1 мл этого раствора отбирают мерной пипеткой и переносят в другой пустой малый стаканчик, а оставшиеся 9 мл выливают в другую чашку.

Для приготовления 0,01 М раствора  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  к 1 мл 0,1 М раствора во втором стаканчике приливают 9 мл воды, перемешивают, 1 мл удаляют, а оставшиеся 9 мл вливают в третью чашку.

В четвертую чашку вливают 9 мл водопроводной воды.

В каждую чашку помещают по 10 одинаковых, хорошо выполненных семян с неповрежденными зародышами, раскладывая их равномерно по поверхности фильтровальной бумаги, закрывают крышками и ставят в темное место для прорастивания.

Через 7...14 дней в каждом варианте подсчитывают количество проросших семян, измеряют длину ростков и наибольшую длину корней у каждого проросшего зерна. Затем рассчитывают средние значения этих показателей по каждому варианту в отдельности. Результаты заносят в табл. 30.1.

Таблица 30.1. Влияние концентрации раствора  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  на прорастание семян, рост ростков и корешков

Название растения	Вариант опыта	Осмотический потенциал растворов, атм	Количество проросших семян, шт.	Средняя длина, см	
				ростков	корешков
	1,0 М $\text{NH}_4\text{NO}_3$	-36,14			
	0,1 М $\text{NH}_4\text{NO}_3$	-3,61			
	0,01М $\text{NH}_4\text{NO}_3$	-0,36			
	$\text{H}_2\text{O}$	0,0			

Полученные результаты анализируют и делают выводы о влиянии концентрации раствора  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  на прорастание семян, рост ростков и корешков исследуемых растений. На основании выводов составляют рекомендации по использованию удобрений.

**Материалы и оборудование:** семена злаков, бобовых или других культур, чашки Петри, кружки фильтровальной бумаги, 1 М  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , стаканчики на 50 мл, мерные пипетки на 1 и 10 мл, линейки.

### Контрольные вопросы

1. Почему высокая концентрация минеральных удобрений может привести к снижению всхожести семян или вызвать гибель растений?
2. Почему аммиачная селитра считается одним из лучших азотных минеральных удобрений?
3. Какие результаты получены в опыте, какие выводы сделаны?
4. Почему дробный и локальный способы внесения удобрений более эффективны по сравнению с однократным и поверхностным? Какими свойствами должны обладать удобрения, вносимые в рядки при посеве? Почему не желателен прямой контакт удобрений с семенами?

### Работа 31. Антагонизм ионов

При выращивании растений на растворах, содержащих какую-либо одну чистую соль, даже слабой концентрации, наблюдается резкое угнетение роста растений. Токсическое действие чистых солей снимается при добавлении к раствору ионов других солей той же или другой валентности. Это обусловлено явлением, получившим название «антагонизм ионов».

*Антагонизм – это такое взаимодействие ионов, при котором физиологический эффект (токсичность) смеси солей ниже, чем действие каждой соли в отдельности.*

Антагонизм ионов обусловлен различным их влиянием на физико-химические свойства протоплазмы и физиологические процессы.

Подбирая различные концентрации отдельных ионов, можно составить такую комбинацию, при которой растения будут развиваться

лучше всего. Растворы, в которых не проявляется токсическое действие солей, называются **физиологически уравновешенными**. В таких растворах растения хорошо растут и дают высокий урожай. Примером физиологически уравновешенного раствора являются морская вода, питательные растворы, используемые в водной культуре (гидропонике).

Для изучения антагонизма ионов проростки злаков выращивают на односолевых растворах NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, а также смеси этих солей.

**Цель работы:** определить влияние на растения растворов чистых солей и их смеси.

**Ход работы.** В три стаканчика наливают по 100 мл растворов химически чистых солей NaCl, KCl и CaCl<sub>2</sub> 0,12 н. концентрации.

В четвертый стакан наливают смесь этих трех солей в количестве 103,2 мл (100 мл NaCl + 1 мл CaCl<sub>2</sub> + 2,2 мл KCl).

Стаканчики закрывают кружками марли, в которых сделаны отверстия для посадки проростков. Одинаковые проростки злаков 4...5-дневного возраста высаживают на марлю по 5...10 шт. на стаканчик.

Спустя 1...2 недели у каждого проростка измеряют длину надземной части, а также количество и длину корней.

Затем рассчитывают среднее значение всех показателей по каждому варианту. Результаты заносят в табл. 31.1 и делают выводы.

Таблица 31.1. Действие чистых солей и их смеси на рост растений

Номер стакана	Вариант опыта	Количество раствора, мл	Длина надземной части, см	Количество корней, шт.	Длина корней, см
1	0,12 н. NaCl	100			
2	0,12 н. KCl	100			
3	0,12 н. CaCl <sub>2</sub>	100			
4	NaCl + CaCl <sub>2</sub> + KCl	100 + 1,0 + 2,2			

**Материалы и оборудование:** проросшие семена злаков, 0,12 н. растворы химически чистых солей KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, стаканчики на 100 мл, пропитанная расплавленным парафином марля, мерные пипетки на 1 и 5 мл, мерные цилиндры на 100 мл, линейки.

### Контрольные вопросы

1. Что понимают под антагонизмом и синергизмом ионов?
2. Какие растворы называют физиологически уравновешенными? Приведите примеры физиологически уравновешенных растворов. Где их можно использовать?
3. Изложите методику постановки опыта и его результаты.

## Раздел 6. РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ

В процессе онтогенеза происходит рост и развитие растений.

**Онтогенез** – это комплекс последовательных и необратимых изменений структуры и функций растений от возникновения из оплодотворенной яйцеклетки, зачаточной или вегетативной почки до естественной смерти.

**Рост** – это необратимое увеличение размеров и массы организма или отдельных его частей – клеток, тканей и органов. Показателями роста являются увеличение массы, объема, площади, числа органов растений.

В основе роста растений лежит рост клеток, тканей и органов. Каждая клетка растения проходит четыре фазы своего роста и развития: деления (эмбриональная фаза), растяжения, дифференциации, старения.

Ростовые процессы локализованы в меристемах. Различают *апикальные, интеркалярные* и *латеральные* меристемы. За счет апикальных (верхушечных) меристем происходит увеличение длины стеблей, боковых побегов и корней растений. Интеркалярные (вставочные) меристемы обеспечивают рост листьев и междоузлий однодольных растений. Латеральные меристемы находятся под корой (камбий, прокамбий, феллоген) и обеспечивают рост стеблей в толщину.

Общий закон роста растений – его неравномерность, впервые был отмечен Ю. Саксом. Установленная им закономерность получила название «*Закон большого периода роста*». Графически она отображается в виде сигмоидальной кривой, в которой выделяют фазы: 1) начальная, или лаг-фаза, характеризующаяся отсутствием видимого роста; 2) логарифмическая фаза, в которой происходит интенсивный рост (*большой период роста*); 3) фаза замедленного роста; 4) стационарная фаза, в которой рост прекращается. Растения наиболее отзывчивы на применение удобрений, орошения и других стимулирующих факторов в логарифмической фазе роста.

Неравномерность роста различных частей растений или тканей определяет их способность к движению. Движения растений, вызванные односторонне действующими факторами, называют *тропизмами* (фото-, хемо-, гидро-, геотропизмы). Примером фототропизма является поворот листьев к свету, геотропизма – направленный к центру земли рост корней. Движения растений, вызванные диффузно действующим фактором, называют *настиями*. Примером настий являются открытие



и закрытие цветков (термонастии), «сон» растений – опускание и поднятие листьев (фотонастии) и др. Движения растений носят приспособительный характер.

**Развитие** – это качественные изменения структуры и функций растения, его органов, тканей и клеток, возникающие в процессе онтогенеза. В процессе развития растения проходят определенные возрастные этапы – эмбриональный, ювенильный (молодости), зрелости, старения.

В развитии сельскохозяйственных культур часто выделяют *фенологические фазы*. Например, у злаков выделяют фазы всходов, кушения, выхода в трубку, колошения, цветения, созревания.

Показателем развития является переход растений к цветению. Для перехода к цветению озимым и некоторым двулетним растениям необходимо пройти стадию яровизации. **Яровизация** – это стимуляция цветения низкими положительными температурами.

Многие растения обладают фотопериодической реакцией. **Фотопериодизм** – это способность растений переходить к цветению только при определенном соотношении длины темного (ночь) и светлого (день) периодов суток. По фотопериодической реакции растения подразделяют на *длиннодневные* (зацветают при длине дня более 12 ч), *короткодневные* (зацветают при длине дня 5...12 ч) и *нейтральные* (зацветают не зависимо от продолжительности дня). Регулируя продолжительность светлого и темного периодов (путем досвечивания или затенения растений) можно подучить несколько урожаев в год (земляники), вызвать цветение растений (декоративных).

Рост и развитие растений зависят как от внутренних (эндогенных), так и внешних (экологических) факторов.

К числу эндогенных факторов относят *фитогормоны* – ауксины (работы 34, 35), гиббереллины, цитокинины, абсцизины, этилен. Широкое применение в современных технологиях возделывания сельскохозяйственных культур находят синтетические аналоги фитогормонов – регуляторы роста: гербициды, ретарданты, дефолианты, десиканты, регуляторы созревания и др.

Важнейшими внешними факторами, влияющими на рост и развитие растений, являются свет (см. работу 32), температура (см. работу 33), водообеспеченность, уровень минерального питания и др. Путем регулирования этих факторов можно управлять ростом и развитием растений, формированием урожая.

## Работа 32. Влияние света на рост растений

Свет оказывает как прямое, так и косвенное действие на рост растений. *Прямое* действие света связано с его влиянием на фазы роста клеток, в частности, свет задерживает фазу растяжения и стимулирует фазы деления и дифференциации. Ингибирующее действие света на рост создает суточную периодичность роста – в ночные часы растения, как правило, растут значительно быстрее, чем в дневные. По этой же причине растения, произрастающие в условиях затенения (в загущенных посевах) или темноте, более вытянуты, чем растущие на свету. У таких растений недоразвиты механические ткани, и они сильнее полегают.

*Косвенное* влияние света на рост растений связано с фотосинтезом, в ходе которого синтезируются органические вещества, необходимые для ростовых процессов. Поэтому растения могут расти в темноте только за счет органических веществ, образованных в дневные часы при фотосинтезе или за счет запаса органических веществ семян при их прорастании. Без света невозможно нормальное новообразование структур клетки и увеличение массы растительного организма.

На рост растений влияет и качество света. Наиболее сильное действие оказывают коротковолновые лучи (синие и фиолетовые).

Растения, выросшие без света, называются *этиолированными*. Они лишены хлорофилла (имеют светло-желтую или белую окраску), стебли у них вытянуты, листья недоразвиты, покровные, механические и проводящие ткани развиты очень слабо, накопление сухого вещества не происходит. Этиоляция используется при выгонке цветочных и овощных культур – лука, салата, шпината и др.

Для изучения влияния света на рост растений их проростки выращивают в течение 1...2 недель в темноте (1-й вариант) и на свету (2-й вариант). У выращенных растений сравнивают высоту, а также количество, длину и ширину листьев, длину корней, общую сухую массу.

**Цель работы:** выявить влияние света на рост проростков зерновых злаковых культур (пшеницы, ячменя, ржи и др.).

**Ход работы.** Семена опытных растений предварительно проращивают в темноте при температуре 25 °С. Для закладки опыта используют проростки длиной 3...4 см (фаза первого настоящего листа).

Для каждого варианта отбирают по 5 или 10 одинаковых проростков, определяют их общую сырую массу. У каждого проростка измеряют высоту, определяют количество листьев, длину и ширину боль-

шего листа, максимальную длину корней. Измерения нужно делать быстро, не допуская высыхания корней.

После этого проростки высаживают в чашки Петри, заполненные на 2/3 высоты смесью из пропаренных опилок и промытого прокаленного песка в соотношении 1:1. В каждую чашку приливают по 20...30 мл водопроводной воды или разведенного вдвое раствора Кнопа.

В чашки устанавливают этикетки, на которых указывают вариант опыта и фамилии исполнителей.

Первую чашку с высаженными проростками помещают в темное место (шкаф), вторую – оставляют на свету. Для определения исходной сухой массы берут навески таких же проростков (5...10 г в 2...3-х повторениях) и высушивают в сушильном шкафу при температуре 105 °С до постоянной массы, затем рассчитывают процент сухого вещества. Зная сырую массу 5...10 проростков и процентное содержание сухого вещества в них, рассчитывают их сухую массу. Результаты заносят в табл. 32.1.

Таблица 32.1. Влияние света на рост проростков \_\_\_\_\_  
культура

Вариант опыта	Номер растения	Высота проростков, см		Число листьев, шт.		Длина и ширина листьев, см		Длина корней, см		Сырая/ сухая масса 5...10 проростков, г	
		исходная	конечная	исходное	конечное	исходная	конечная	исходная	конечная	исходная	конечная
На свету	1										
	2										
	...										
Среднее											
Без света	1										
	2										
	...										
Среднее											

Опыт продолжается 7...14 дней. Во время опыта необходимо периодически (через 1...2 дня) поливать субстрат в чашках Петри водой, чтобы он не подсыхал (но и не был переувлажнен).

В конце опыта субстрат хорошо увлажняют и проростки, используя стеклянные палочки, осторожно, не допуская обрыва корней, вынимают из влажного субстрата. Оставшиеся на корнях опилки и песок от-

мывают водопроводной водой сначала в фарфоровых чашках, а затем под краном. Затем проростки промокают фильтровальной бумагой и анализируют по указанным выше показателям. Для определения сухой массы проростков их высушивают в сушильном шкафу при температуре 105 °С. Затем рассчитывают средние значения по всем показателям в каждом варианте. На основании полученных данных делают вывод о влиянии света на рост растений.

**Материалы и оборудование:** проростки зерновых культур (пшеницы, ячменя, овса, кукурузы в фазе 1-го листа, чашки Петри, пропаренные древесные опилки, промытый и прокаленный песок, этикетки из плотной бумаги (3×5 см), стаканчики на 50 мл, линейки, стеклянные палочки, фарфоровые чашки, весы, сушильный шкаф.

### Контрольные вопросы

1. Что понимают под онтогенезом, ростом и развитием растений? Какие показатели характеризуют рост и развитие растений? Назовите типы меристем, укажите их локализацию и роль в ростовых процессах. В чем заключается сущность закона большого периода роста, его практическое значение? См. стр. 128.

2. Изложите методику постановки и результаты опыта.

3. Назовите эндогенные и экологические факторы, влияющие на рост растений. Какое влияние на рост и развитие растений оказывает интенсивность и спектральный состав света?

### Работа 33. Влияние температуры на рост растений

Рост растений, как и все другие жизненные процессы, зависит от температуры. Различают температурные *кардинальные точки роста* растений: *минимальная* (рост только начинается), *оптимальная* (наиболее благоприятная для роста) и *максимальная* (рост прекращается). У холодостойких растений температурный минимум роста составляет 0...5 °С, оптимум – 25...31 °С, максимум – 37...44 °С. У теплолюбивых растений минимальная температура для роста превышает 10 °С, оптимальная составляет 30...35 °С, а максимальная – 44...50 °С.

Температуры, оптимальные для роста растений, могут быть неблагоприятными для их развития. Так, озимым культурам для развития необходимо пройти стадию яровизации – период воздействия низкими положительными температурами (0...5 °С). В связи с этим различают

*гармонический* оптимум – температуру, благоприятную как для роста, так и развития растений.

Для определения оптимальной температуры роста проросшие семена зерновых, зернобобовых и овощных культур выращивают в течение 1...2 недель в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при различных температурах. В конце опыта выявляют варианты, в которых растения имеют наибольшую длину ростков, количество и длину корешков.

**Цель работы:** выявить оптимальные температуры для роста проростков овса, ячменя, пшеницы, кукурузы, гороха, фасоли, огурца, дыни, тыквы или других растений.

**Ход работы.** Предварительно семена опытных растений проращивают на влажной фильтровальной бумаге в термостате при температуре 20...25 °С.

Одинаковые и здоровые молодые проростки с длиной coleoptile 1...2 см используют для постановки опыта.

Для каждой культуры берут по три чашки Петри, в каждую помещают кружки фильтровальной бумаги, на которых указывают культуру и вариант опыта (температуру роста). В чашки вливают по 10 мл водопроводной воды и равномерно раскладывают по 10 наклюнувшихся семян. Чашки закрывают крышками и помещают в соответствующие температурные условия: 1-й вариант – 5...8 °С; 2-й вариант – 20...25 °С; 3-й вариант – 30...35 °С; 4-й вариант – 37...45 °С.

Во время опыта необходимо следить за температурой воздуха во всех вариантах. Для создания соответствующих температурных условий используют холодильник и термостаты.

Через 7...14 дней у каждого проростка определяют длину ростка, количество и длину всех корешков. Затем рассчитывают средние значения анализируемых показателей по каждому варианту для каждой культуры. Результаты заносят в табл. 33.1.

Таблица 33.1. Влияние температуры на рост проростков \_\_\_\_\_  
культура

Культура	Температурный режим роста, °С	Средняя длина ростков, см	Среднее количество корешков, шт.	Средняя длина корешков, см
	5...8			
	20... 25			
	30...35			
	37...45			

Полученные данные анализируют и определяют температурный оптимум роста для различных культур.

**Материалы и оборудование:** проросшие семена зерновых, зернобобовых и овощных культур (ячменя, овса, ржи, пшеницы, кукурузы, огурца, тыквы), чашки Петри, кружки фильтровальной бумаги, стаканчики на 50 мл, мерные пипетки на 10 мл, линейки, термостаты, холодильник, термометры.

### Контрольные вопросы

1. Что понимают под кардинальными точками роста? Укажите их значения для различных экологических групп растений. Что означает гармонический оптимум?

2. Назовите оптимальные температуры для роста изучаемых культур. К какой группе растений они относятся (теплолюбивым, холодоустойчивым)?

### Работа 34. Влияние гетероауксина на рост корней

К числу эндогенных факторов, влияющих на рост и развитие растений, относят фитогормоны. **Фитогормоны** – это соединения, с помощью которых осуществляется взаимодействие клеток, тканей и органов и которые в малых количествах необходимы для запуска и регуляции физиологических и морфогенетических программ растений.

Фитогормоны подразделяют на *стимуляторы* (ауксины, гиббереллины, цитокинины) и *ингибиторы* (абсцизовая кислота, этилен). Важнейшими свойствами фитогормонов являются дозовый характер действия, локализация синтеза в определенных частях растений, полярный транспорт, полифункциональность.

В сельскохозяйственной практике широко применяются регуляторы роста растений – синтетические аналоги фитогормонов. Они могут использоваться для стимуляции корнеобразования, нарушения или продления покоя семян, дефолиации и десикации растений, снижения предуборочного опадания плодов, получения партенокарпических плодов, подавления сорняков и т. д.

К группе **ауксинов** относится *индолилуксусная кислота* (ИУК) и ее производные (индолил-3-ацетальдегид, индолил-3-молочная кислота, метиловый и этиловый эфиры ИУК).

Ауксины продуцируются растущими верхушками (апексами) стеблей, корней и перемещаются в зону растяжения клеток, усиливая рост стеблей, листьев и корней. ИУК больше всего накапливается в развивающихся почках и листьях, активном камбии, в формирующихся семенах, в пыльце.

Ауксины активируют деление и растяжение клеток, необходимы для формирования проводящих пучков и корней, способствуют разрастанию околоплодника (формированию сочных плодов), стимулируют приток питательных веществ в семена и плоды, задерживают процессы старения, обуславливают явление апикального доминирования (усиливают рост главного побега, но тормозят рост боковых побегов и пазушных почек), участвуют в движениях органов растений (тропизмах и настигах).

Синтетические аналоги ауксина используются для получения партенокарпических (бессемянных) плодов, задержки опадения завязей и листьев, подавления двудольных сорняков, стимуляции корнеобразования у черенков плодово-ягодных и декоративных растений.

Одним из синтетических аналогов ауксина является гетероауксин ( $C_{10}H_9O_2N$ ). В данной работе изучается влияния его концентрации на прорастание семян и рост корней.

**Цель работы:** определить влияние концентрации гетероауксина на рост корней у прорастающих семян злаков.

**Ход работы.** В пять чашек Петри помещают кружки фильтровальной бумаги, на которых простым карандашом или шариковой ручкой указывают варианты опыта (табл. 34.1) и фамилии исполнителей. В четыре чашки приливают по 9 мл гетероауксина различной концентрации, в пятую – 9 мл воды (контроль).

В первую чашку вливают 9 мл готового раствора гетероауксина 0,01%-ной концентрации. Остальные растворы готовят в 2-х стаканчиках на 50 мл.

Для приготовления раствора 0,001%-ной концентрации в один стаканчик вливают 1 мл гетероауксина 0,01%-ной концентрации и 9 мл дистиллированной воды. После тщательного перемешивания пипеткой отбирают 1 мл этого раствора и переносят в другой стаканчик, оставшиеся 9 мл раствора вливают во вторую чашку.

Затем к 1 мл раствора во втором стаканчике приливают 9 мл воды, перемешивают, 1 мл переносят в первый пустой стаканчик, а оставшиеся 9 мл раствора (0,0001 %) вливают в третью чашку Петри.

Аналогично готовят раствор гетероауксина 0,00001%-ной концентрации, который вливают в четвертую чашку.

Растворы гетероауксина 0,001%-ной, 0,0001%-ной, 0,00001 %-ной концентрации можно готовить на всю подгруппу (4...5 повторений). Для этого используют мерные цилиндры на 50 мл, в которые приливают в 5 раз больше растворов гетероауксина и воды, т. е. 5 мл 0,01%-ного гетероауксина и 45 мл воды для второго варианта (*5 мл после перемешивания отливают* во второй мерный цилиндр, в который затем приливают 45 мл воды). Аналогично готовят раствор гетероауксина 0,00001%-ной концентрации. Полученные растворы делят на 4 или 5 бригад (каждой по 9 мл).

В пятую чашку приливают 9 мл дистиллированной воды.

В каждую чашку на фильтровальную бумагу помещают по 5 или 10 не проросших семян выбранной культуры. Чашки закрывают крышками и ставят в темное место для проращивания при комнатной температуре.

Через 7...14 дней в каждом варианте опыта определяют количество проросших семян. Затем у каждого проростка определяют количество корешков, измеряют длину *каждого корешка* и результаты заносят в таблицу-черновик, форма которой приведена ниже. После этого рассчитывают среднее количество корешков и общую длину корешков у одного проростка по данному варианту. Результаты заносят в табл. 34.1.

Таблица 34.1. **Результаты определения количества и длины корешков по варианту опыта** \_\_\_\_\_

вода, концентрация гетероауксина

№ проростка	Ко-во корешков	Длина каждого корешка, см	Суммарная длина всех корешков, см
1			
2			
И т. д.			
Среднее		x	

Средние значения количества корешков и суммарной их длины у одного проростка по каждому варианту заносят в табл. 34.2.



Таблица 34.2. Влияние концентрации гетероауксина на прорастание семян и образование корней

Вариант опыта	Количество проросших семян, шт.	Среднее у одного проросшего зерна	
		Количество корешков, шт.	Общая длина корешков, мм
1) 0,01 % гетероауксина			
2) 0,001 % гетероауксина			
3) 0,0001 % гетероауксина			
4) 0,00001 % гетероауксина			
5) Вода (контроль)			

Полученные данные анализируют и определяют оптимальные концентрации гетероауксина для роста корней.

**Материалы и оборудование:** семена пшеницы, ячменя, гороха, люпина, подсолнечника, огурца, кабачка или других культур, 0,01%-ный раствор гетероауксина, чашки Петри, кружки фильтровальной бумаги, стаканчики на 50 мл, мерные пипетки на 1 и 10 мл (5 и 50 мл), линейки.

### Контрольные вопросы

1. Дайте определение фитогормонов. Приведите их классификацию, перечислите представителей.
2. Какие регуляторы роста растений применяются в сельскохозяйственной практике, для чего они используются?
3. Какова химическая природа ауксина? Укажите локализацию их биосинтеза, направление транспорта и действие на рост клеток, тканей и органов растений.
4. Назовите синтетические аналоги ауксина. Для чего они используются?
5. Какие результаты получены в работе? На каких объектах рекомендуется применять гетероауксин для стимуляции корнеобразования?

### **Работа 35. Влияние гетероауксина на укоренение черенков ягодных и овощных культур**

В декоративном садоводстве, плодовоовощеводстве, лесном хозяйстве гетероауксин широко используется для стимуляции корнеобразования у растений, размножаемых вегетативным способом – стеблевыми или листовыми черенками.

Стеблевыми черенками размножают многие ягодные культуры (смородина, крыжовник, шиповник, малина, виноград), декоративные (розы) и лесные растения (хвойные и лиственные).

Листовыми черенками нередко размножают декоративные цветочные растения (в том числе комнатные).

Так как чувствительность к гетероауксину у различных растений разная, его практическое использование основано на подборе для каждой культуры и сорта оптимальной концентрации фитогормона, вызывающей наиболее быстрое образование корней и способствующее лучшей приживаемости укоренившихся черенков.

**Цель работы:** определить оптимальную концентрацию раствора гетероауксина для укоренения черенков ягодных и овощных культур.

**Ход работы.** Пять стаканов на 100 мл нумеруют соответственно вариантам опыта (табл. 35.1). В четыре стакана наливают по 45 мл раствора гетероауксина различной концентрации.

Растворы готовят следующим образом: в первый стакан наливают 45 мл готового 0,01%-ного раствора гетероауксина, во второй наливают 5 мл 0,01%-ного раствора гетероауксина и 45 мл воды. После перемешивания 5 мл этого раствора переносят в третий стакан и к нему приливают 45 мл воды. Аналогично готовят раствор в четвертом стакане.

В пятый стакан наливают 45 мл дистиллированной воды (контроль).

Затем берут 20 одинаковых по высоте 10-дневных проростков фасоли или томата, выращенных на влажных опилках. У проростков под водой отрезают корни, а черенки используют для постановки опыта.

У малины, смородины, винограда берут однолетние побеги и нарезают из них черенки длиной около 10 см с 3...5 почками.

В каждый стакан помещают по четыре черенка и выдерживают их в растворе 3 ч. Затем растворы из стаканов выливают, а основания черенков ополаскивают водопроводной водой под краном. После этого в стаканы наливают по 50 мл водопроводной воды. Черенки, погружен-

ные в воду на 4...5 см, оставляют на свету при температуре 20...22 °С для укоренения.

Через 7...14 дней черенки вынимают из стаканов, подсчитывают количество образовавшихся корней и замеряют их общую длину на каждой черенке. Результаты заносят в табл. 35.1.

После расчета средних показателей делают выводы о влиянии концентрации гетероауксина на образование корней у различных растений.

Таблица 35.1. Влияние гетероауксина на укоренение черенков \_\_\_\_\_  
культура

Номер стакана	Вариант опыта	Число образовавшихся корешков, шт.					Общая длина всех корешков, мм				
		черенки				среднее	черенки				среднее
		1-й	2-й	3-й	4-й		1-й	2-й	3-й	4-й	
1	0,01% гетероауксина										
2	0,001% гетероауксина										
3	0,0001% гетероауксина										
4	0,00001% гетероауксина										
5	Вода (контроль)										

**Материалы и оборудование:** проростки фасоли или томата, черенки смородины, малины, винограда или других растений, 0,01%-ный раствор гетероауксина, стаканы на 100 мл, пипетки на 5 мл, груши, мерные цилиндры на 50 мл, лезвия, ножи.

### Контрольные вопросы

1. Назовите синтетические регуляторы роста ауксинового типа? Как и для чего они используются в плодоводстве и декоративном садоводстве?

2. Изложите методику проведения опыта. Какие результаты получены в работе?

### Работа 36. Обнаружение углеводов при прорастании семян масличных культур

Между обменом жиров, углеводов и белков существует очень тесная взаимосвязь. Так, жирные кислоты и аминокислоты синтезируются из промежуточных веществ обмена углеводов – органических кислот. В свою очередь, в процессе обмена жиров и белков образуются промежуточные соединения, способные превращаться в углеводы.

Наиболее активно превращение жиров в углеводы происходит в процессе прорастания семян масличных культур, когда запасные жиры гидролизуются до глицерина и жирных кислот, а последние через гликоксилатный цикл превращаются в углеводы, необходимые для синтеза компонентов клеточных стенок (целлюлозы, гемицеллюлозы, пектиновых веществ), нуклеотидов (НАД, ФАД, АТФ, ДНК, РНК), витаминов, других соединений.

Обнаружить присутствие углеводов, имеющих свободную альдегидную или кетонную группу или свободный гликозидный гидроксил, можно по их способности восстанавливать сульфат меди фелинговой жидкости до оксида меди, который выпадает в виде осадка красно-коричневого цвета.

**Цель работы:** показать, что распад жиров при прорастании семян масличных культур (лен, подсолнечник, рапс) сопровождается образованием углеводов.

**Ход работы.** Берут 10...20 шт. сухих и такое же количество проросших семян масличных культур, помещают их в две разные ступки, добавляют кварцевый песок и по 10 мл воды. Семена растирают до однородной массы, которую отфильтровывают через ватный фильтр в пробирки или центрифугируют.

По 5 мл фильтрата (центрифугата) из каждой пробы наливают в чистые пробирки, добавляют по 5 мл фелинговой жидкости и нагревают до кипения. Выпадение осадка красно-коричневого цвета свидетельствует о присутствии в семенах углеводов.

Результаты наблюдений заносят в табл. 36.1 и делают выводы.

Таблица 36.1. Схема и результаты опыта

Вариант опыта, культура	Наличие осадка оксида меди	Объяснение
1. Непроросшие семена		
2. Проросшие семена		

**Материалы и оборудование:** сухие и проросшие семена масличных культур (подсолнечника, льна, рапса), мерные пипетки на 5 и 10 мл, жидкость Фелинга, ступки с пестиками, кварцевый песок, вата, воронки, пробирки, центрифуга.

### **Контрольные вопросы**

1. В чем проявляется связь между обменом углеводов, липидов и белков?
2. Какие процессы проходят в семенах зерновых, зернобобовых и масличных культур при прорастании?
3. На чем основан метод обнаружения углеводов в прорастающих семенах? Какие результаты получены в работе?

## Раздел 7. ПРИСПОСОБЛЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ

На растения в процессе их жизнедеятельности оказывают влияние различные неблагоприятные абиотические и биотические факторы, которые растения могут переносить благодаря устойчивости и адаптации.

**Устойчивость** – это свойство растений сохранять жизнеспособность при действии неблагоприятного фактора. Растения могут иметь высокую, среднюю или низкую устойчивость.

**Адаптация** – это способность растений приспосабливаться к условиям обитания. Все механизмы адаптации растений к неблагоприятным условиям можно разделить на три группы: *избегание неблагоприятных факторов* (короткий вегетационный период у эфемеров, переход в состояние анабиоза или покоя), *структурные приспособления* (образование кутикулы, воскового налета, опушения), *физиологическая адаптация* (накопление специфических защитных веществ, характерный тип обмена веществ).

При воздействии на растение неблагоприятного фактора в нем возникает напряженное состояние, отклонение от нормы – стресс.

**Стресс** – это общая неспецифическая адаптационная реакция организма на действие любых неблагоприятных факторов.

Все неблагоприятные факторы среды можно разделить на *абиотические* (факторы неживой природы) и *биотические* (факторы живой природы). Абиотические подразделяют на *физические* (низкие или высокие температуры, засуха, радиация) и *химические* (высокие концентрации солей, токсичных газов, пестицидов). К биотическим относят действие болезней, вредителей, обильное цветение или плодоношение и др.

В нашей зоне сорта яровых культур должны обладать высокой холодостойкостью (работа 37), озимые культуры – высокой морозостойкостью (работа 38), растения, произрастающие на засоленных почвах, должны быть солеустойчивыми (работа 39).

Познание закономерностей, лежащих в основе устойчивости растений к неблагоприятным факторам, позволяет не только диагностировать эти свойства на различных этапах онтогенеза, но и изменять их в сторону значительного повышения устойчивости путем селекционной работы или агротехнических мероприятий.

Наряду с прямыми методами оценки устойчивости растений к неблагоприятным факторам в полевых условиях имеются и лабораторные методы, некоторые из них рассматриваются в выполняемых лабораторных работах.

### **Работа 37. Влияние температуры на прорастание семян**

*Способность растений сохранять жизнеспособность при низких положительных температурах называется **холодостойкостью**. Холодостойкими являются растения умеренной зоны, к ним относится большинство яровых зерновых и зернобобовых культур (овес, ячмень, пшеница, горох, люпин). Не являются холодостойкими теплолюбивые растения южного происхождения (бахчевые, рис, кукуруза, томаты). При низких температурах у них замедляется рост, они повреждаются или погибают.*

Основной причиной гибели теплолюбивых растений от холода является повышение вязкости протоплазмы, снижение ее проницаемости, следствием этого является ухудшение транспорта воды, кислорода, минеральных веществ в клетки, выхода из клеток  $\text{CO}_2$ , токсичных продуктов жизнедеятельности и отравление ими. Кроме того, нарушаются синтетические процессы и усиливаются процессы распада (в том числе хлорофилла). Первыми признаками повреждения растений от холода являются завядание, а также пожелтение или побурение листьев.

О холодостойкости растений можно судить по всхожести прорастающих семян в условиях пониженных температур в лабораторных условиях (метод, который используется в данной работе) или в полевых условиях при раннем посеве в непрогретую почву.

**Цель работы:** определить действие различных температур на прорастание семян различных сельскохозяйственных культур.

**Ход работы.** В четыре чашки Петри помещают кружки фильтровальной бумаги, на которых указывают варианты опыта (температуры, при которых будут прорастиваться семена) и данные исполнителей. В каждую чашку вливают по 10 мл дистиллированной воды и помещают по 10 семян исследуемых растений. Чашки с семенами ставят на 5...7 дней в холодильники и термостаты со следующими температурными условиями: 3...5 °С, 7...10 °С, 20...25 °С, 30...35 °С. Во время опыта следят, чтобы фильтровальная бумага не подсыхала.

Начиная с третьих суток, ежедневно подсчитывают число проросших семян, которые затем удаляют из чашек.

Результаты заносят в табл. 37.1.

Полученные результаты анализируют и делают выводы о влиянии температуры на прорастание семян и холодостойкость исследуемых растений.

Таблица 37.1. Влияние температуры на всхожесть семян

Культура	Температура проращивания, °С	Исходное число семян, шт.	Дата анализа	Число проросших семян к моменту анализа	
				всего, шт.	% к исходному количеству

**Материалы и оборудование:** семена различных растений (пшеницы, ржи, ячменя, овса, гречихи, кукурузы, гороха, люпина, льна, подсолнечника, огурца, томата), чашки Петри, кружки фильтровальной бумаги, мерные пипетки на 10 мл, дистиллированная вода, термометры, термостаты, холодильники.

### Контрольные вопросы

1. Что понимают под холодостойкостью? Какие растения относят к холодостойким?
2. Что является причиной повреждения и гибели теплолюбивых растений при низких положительных температурах?
3. На чем основан метод оценки холодостойкости растений в работе?
4. Назовите оптимальные температуры для прорастания семян холодостойких и теплолюбивых растений.

### Работа 38. Защитное действие сахара на протоплазму при замораживании

*Свойство растений сохранять жизнеспособность при низких отрицательных температурах называют морозоустойчивостью.* Этим свойством на определенных этапах онтогенеза обладают озимые, двулетние и многолетние растения.

У растений, не обладающих морозоустойчивостью, при низких отрицательных температурах в результате замерзания свободной воды в клеточных стенках и межклетниках образуется лед, который оказывает водоотнимающее и механическое действие. В результате *механического* действия происходит сдавливание клеток и разрыв клеточных структур кристаллами льда, после оттаивания из поврежденных клеток



ткани вытекает клеточный сок. В результате *водоотнимающего* действия наблюдается обезвоживание и коагуляция коллоидов протоплазмы.

Морозостойкие растения имеют различные структурные и физиологические механизмы адаптации к низким отрицательным температурам. К *структурным* механизмам адаптации относят крупные межклетники, плотные покровные ткани, к *физиологическим* – снижение интенсивности ростовых процессов, переход в состояние покоя, накопление веществ, не чувствительных к низким температурам (сахаров, пектиновых веществ, жиров).

Важнейшим свойством морозостойких растений является их способность накапливать сахара. Так, в узлах кущения озимых культур в конце периода закаливания может накапливаться до 25 % сахаров на сырую массу.

Сахара предохраняют от замерзания большой объем внутриклеточной воды и уменьшают количество образующегося льда. Они защищают цитоплазму от коагуляции при замораживании, так как образуют гидрофильные связи с белками цитоплазмы. Особое значение имеет защитное влияние сахаров на белки мембран.

При накоплении сахаров снижается осмотический потенциал и температура замерзания цитозоля, увеличивается содержание прочносвязанной воды, а содержание свободной воды уменьшается.

Сахара также увеличивают вододерживающую способность коллоидов протоплазмы клеток, связанная с коллоидами вода при низких температурах не замерзает и не транспортируется.

Защитную роль сахаров можно наблюдать и в модельных опытах с растениями или тканями, не обладающими морозоустойчивостью. Для этой цели их замораживают в растворах сахарозы различной концентрации. О степени повреждения тканей судят по изменению окраски наружного раствора в связи с вытеканием клеточного сока (при наличии в нем антоцианов) или по способности клеток плазмолизировать при помещении их в гипертонический раствор соли.

**Цель работы:** определить влияние концентрации сахарозы на состояние тканей корнеплода столовой свеклы при замораживании.

**Ход работы.** Из корнеплода столовой свеклы пробочным сверлом диаметром 8...10 мм делают высечку длиной 2...3 см. Помещают ее на стеклянную пластину и с помощью острого лезвия делают очень тонкие срезы, пригодные для микроскопии. Срезы переносят в фарфоровую чашку с водопроводной водой на 5...10 мин для удаления клеточного сока из порезанных клеток (воду периодически сменяют).

Одновременно в две пробирки приливают по 5 мл сахарозы: в первую – 1,0 М раствор, во вторую – 0,5 М раствор (смешивают 2,5 мл 1,0 М раствора сахарозы и 2,5 мл воды). В третью пробирку приливают 5 мл воды (контроль).

В каждую пробирку помещают по 2...3 микроскопических среза корнеплода свеклы. Пробирки этикетировывают и помещают в охлаждающий раствор, который готовят в фарфоровом стакане путем смешивания трех частей снега или измельченного льда и одной части соли. Для определения температуры охлаждающей смеси в нее одновременно с пробирками помещают термометр. Через 30...35 мин пробирки переносят в стакан с водопроводной водой для оттаивания.

Затем содержимое пробирок перемешивают, отмечают интенсивность окрашивания наружного раствора и определяют количество живых клеток в каждом варианте. Для этого срезы извлекают из пробирок, помещают на предметное стекло в каплю 1 М раствора NaCl, покрывают покровным стеклом и просматривают в микроскоп при малом увеличении. В живых клетках возникает плазмолиз – цитоплазма, окрашенная антоцианами, отделяется от клеточных стенок.

Результаты наблюдений заносят в табл. 38.1.

Таблица 38.1. Влияние концентрации сахарозы на морозостойчивость корнеплода столовой свеклы

Вариант	Температура замораживающей смеси, °С	Окраска раствора	Количество плазмолизированных клеток (много, мало, нет)	Состояние тканей после оттаивания (живые, поврежденные, мертвые)
1,0 М сахароза				
0,5 М сахароза				
Вода				

На основании полученных данных делают выводы о влиянии концентрации сахарозы на жизнеспособность растительных тканей при замораживании.

**Материалы и оборудование:** корнеплод столовой свеклы, 1 М раствор сахарозы, 1 М раствор NaCl, поваренная соль, снег или лед, пробирки, фарфоровые стаканы вместимостью 1 л, фарфоровые чашки, термометры, лезвия, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, микроскопы, деревянные палочки для перемешивания охлаждающей смеси, карандаши по стеклу, мерные пипетки на 5 мл.

## Контрольные вопросы

1. Что понимают под морозостойкостью и зимостойкостью? Какие растения относят к морозостойким?
2. Назовите причины гибели растений при замерзании растительных тканей.
3. Перечислите механизмы адаптации растений к морозу.
4. Назовите методы изучения и пути повышения морозоустойчивости растений.
5. Чем объясняется защитное действие сахаров на протоплазму при замораживании?

### Работа 39. Определение солеустойчивости растений

**Солеустойчивость** – свойство растений произрастать на засоленной почве. Засоление обусловлено наличием в почве большого количества солей, главным образом натриевых. Большинство сельскохозяйственных растений не являются солеустойчивыми. Вредное действие засоления почвы проявляется прежде всего в задержке набухания и всхожести семян, снижении интенсивности роста проростков.

Существуют прямые и косвенные методы определения солеустойчивости растений. К прямым методам относят выращивание растений в почве с разной степенью засоления, к косвенным лабораторным методам – плазмолитический и определение вязкости протоплазмы, определение скорости раскрытия устьиц, определение содержания альбуминов, определение проницаемости протоплазмы, определение интенсивности прорастания семян в растворах разной концентрации.

В данной работе солеустойчивость растений определяют по интенсивности прорастания семян, помещенных в растворы солей разной концентрации.

**Цель работы:** определить солеустойчивость различных сельскохозяйственных культур.

**Ход работы.** В четыре чашки Петри помещают кружки фильтровальной бумаги, предварительно простерилизованные в термостате при температуре 150 °С в течение 1 ч. В три чашки наливают по 10 мл растворов NaCl разной концентрации: в первую – 5%-ный раствор, во вторую – 7%-ный раствор, в третью – 10%-ный раствор. В четвертую чашку приливают 10 мл дистиллированной воды (контроль).

В чашки раскладывают по 10...25 семян, предварительно обработанных раствором формалина в течение 3...5 мин.

Для получения более достоверных результатов опыт проводят в 3...4-кратной повторности. Чашки с семенами оставляют при комнатной температуре на 5...7 дней. По окончании проращивания в каждом варианте определяют число и процент проросших семян. Число проросших семян в дистиллированной воде (контроль) принимают за 100 %, а в растворах солей вычисляют в процентах от контроля.

Результаты опыта заносят в табл. 39.1.

Таблица 39.1. **Определение всхожести семян \_\_\_\_\_ в растворах солей**  
культура

Культура	Вариант опыта	Проросло семян	
		шт.	%

Результаты всех повторений заносят в сводную табл. 39.2 и рассчитывают среднее значение по каждому варианту.

Таблица 39.2. **Солеустойчивость растений**

Культура	Вариант опыта	Число проросших семян, %				Солеустойчивость растений (высокая, средняя, низкая)
		1-е повторение	2-е повторение	3-е повторение	среднее	

**Материалы и оборудование:** семена ячменя, кукурузы, томата, 5-, 7- и 10%-ные растворы NaCl, раствор формалина (1 мл на 300 мл воды), чашки Петри, кружки фильтровальной бумаги, мерные пипетки на 10 мл.

### Контрольные вопросы

1. Что является причиной засоления почвы?
2. Назовите типы галофитов. Какие сельскохозяйственные растения обладают большей солеустойчивостью?
3. Каким образом солеустойчивые растения приспосабливаются к произрастанию на засоленных почвах?
4. Назовите методы диагностики и пути повышения солеустойчивости культурных растений.

## Раздел 8. ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ФОРМИРОВАНИЯ КАЧЕСТВА УРОЖАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

Целью выращивания сельскохозяйственных культур является получение продуктов питания для человека, кормов для животных и сырья для перерабатывающей промышленности.

Биологическая, энергетическая и технологическая ценность различных частей растений (семян, корнеплодов, клубней, плодов, ягод, овощей, листьев, стеблей) разная и определяется содержанием и соотношением в них различных веществ – белков, углеводов, липидов, витаминов, минеральных веществ. Так, более высокую *энергетическую ценность* имеют жиры – при их окислении в процессе дыхания выделяется примерно в два раза больше энергии (38 ккал/г), чем при окислении углеводов и белков (17...20 ккал/г).

Более высокую *биологическую питательную ценность* имеют водорастворимые фракции белка (альбумины и глобулины), они преобладают в зерне бобовых культур (работа 40). В созревшем зерне злаков больше щелочес- и спирторастворимых белков (глобулинов и проламинов), определяющих хлебопекарные (*технологические*) качества муки и составляющих основу клейковины (работы 41, 42), однако их биологическая питательная ценность более низкая.

Твердые жиры (животного происхождения и некоторые растительные), в состав которых входят предельные жирные кислоты, имеют более низкую биологическую питательную ценность, чем жидкие жиры масличных культур (льна, подсолнечника, рапса, маслин), в составе которых преобладают непредельные жирные кислоты, по ценности их сравнивают с витаминами (работы 45, 46).

Химический состав продуктивных частей растений генетически детерминирован – зависит от их генетической природы (определяется видовыми, сортовыми особенностями). Так, в зерне злаков преобладает крахмал (60...85 %), в зерне бобовых – белки (25...60 %), в семенах масличных – жиры (35...60 %), в корнеплодах сахарной свеклы – сахароза (17...20 %), в плодах и ягодах много сахаров, органических кислот, витаминов.

Крахмал – основной запасной полисахарид растений, который содержится в виде крахмальных зерен. Это неоднородное вещество, состоящее из амилозы и амилопектина (см. работу 9). Образование крахмала в зерне злаков, клубнях картофеля стимулируют калийные удобрения, не содержащие хлора.

Растворимые моно- и олигосахариды (сахара) имеют сладкий вкус. В корнеплодах, плодах и ягодах они представлены в основном глюкозой, фруктозой и сахарозой.

Кислый вкус плодов и ягод зависит от содержания органических кислот (работа 47).

Много масла содержится в семенах масличных культур (работа 45). Качество масла зависит от содержания в нем ацилглицеринов, фосфоглицеридов, предельных и непредельных жирных кислот, свободных жирных кислот. Физико-химические свойства жиров (масел) характеризует ряд показателей (констант) – число омыления, йодное число (работа 46), кислотное число (работа 4), температура плавления и др.

Качество масла выше у растений, выращиваемых в северных районах, при достаточной их водообеспеченности, при внесении фосфорно-калийных удобрений.

У растений могут накапливаться различные токсичные вещества. Так, в зерне бобовых культур содержатся алкалоиды (см. работу 48), в семенах плодовых и ягодных культур – гликозиды. Больше токсичных веществ содержится у южных растений, при высоком уровне азотного питания.

В коре и листьях многих растений содержатся дубильные вещества (см. работу 49). Они могут использоваться при выделке кожи, в пищевой промышленности.

Витамины относятся к физиологически активным веществам, они содержатся во всех растительных тканях и выполняют регуляторную функцию. Например, витамины В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, РР, фолиевая и пантотеновая кислоты входят в состав ферментов и участвуют в регуляции обмена веществ и энергии в клетках. Так как человек и животные получают витамины с продуктами питания и кормами, их качество оценивается не только содержанием белков, углеводов, жиров, минеральных веществ, но и витаминов. Витамины подразделяют на водо- и жирорастворимые.

Витамин С относится к группе водорастворимых витаминов, наиболее распространенных в растениях (см. работу 50).

Витамин А относится к группе жирорастворимых витаминов (см. работу 51).

Содержание и состав различных веществ в растениях изменяется в онтогенезе и в значительной степени зависит от условий среды. Например, у растений, произрастающих в южных районах, синтезируется больше белков, а произрастающих в северных районах – углеводов и жиров. В сухую и жаркую погоду синтезируется больше белков, а в прохладную и дождливую – углеводов.



Биуретову реакцию дают также некоторые небелковые вещества, например биурет ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$ ), оксамид ( $\text{NH}_2\text{CO-CO-NH}_2$ ), ряд аминокислот.

Окрашенные растворы после завершения реакции центрифугируют (или фильтруют), затем на фотоэлектроколориметре определяют их оптическую плотность. После этого по графику, используя результаты оптической плотности растворов, определяют в них концентрацию белка (мг/мл). Зная объем раствора, концентрацию в нем белка и вес муки, взятой для анализа, рассчитывают содержание белка в муке (зерне) по приведенной ниже формуле.

**Цель работы:** определить содержание белка в муке зерновых злаковых (пшеница, рожь, ячмень, овес) и бобовых (горох, люпин, фасоль, бобы) культур.

**Ход работы.** Для анализа используют муку тонкого помола. Перед размолотом семени, имеющие окрашенные пленки и оболочки (овес, просо, люпин, бобы), очищают. Муку подсушивают при температуре  $80\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 6...7 ч, а затем при температуре  $105\text{ }^\circ\text{C}$  – 2...3 ч.

На торсионных или аналитических весах взвешивают по 200 мг муки и сыпают ее в фарфоровые ступки. В муку из семян злаков приливают, постепенно перемешивая, 10 мл 4%-ного раствора NaOH в 20%-ном растворе этилового спирта (раствор 1). В муку из зерна бобовых культур приливают такое же количество 5%-ного раствора NaCl в 4%-ном водном растворе NaOH (раствор 2). Муку растирают в растворах 15 мин для измельчения крупных частиц и экстракции белков.

Затем в ступку приливают еще 25 мл того же раствора и 5 мл 3,1%-ного раствора  $\text{CuSO}_4$ . Содержимое ступок растирают и перемешивают еще 15 мин, а затем переливают в стеклянные стаканы. Растворы белков оставляют на 1,5...2,0 ч для образования биуретового комплекса.

По истечении указанного времени окрашенные растворы центрифугируют 15 мин при 5...6 тыс. об/мин (или фильтруют через стеклянный фильтр).

Оптическую плотность белковых растворов определяют на фотоэлектроколориметре при длине волны 540 нм (*зеленый* светофильтр) в кюветах шириной 5 или 10 мм (см. работу 22).

Затем определяют концентрации белковых растворов по графикам, которые строят отдельно для злаковых и бобовых культур на основании показаний оптической плотности растворов с известным содержанием сырого протеина или белка.



Полученные данные заносят в табл. 40.1.

Таблица 40.1. **Результаты определения содержания белка в зерне** \_\_\_\_\_ культура

Масса навески муки, мг	Оптическая плотность раствора белка	Концентрация белка по графику, мг/мл	Содержание белка (сырого протеина) в муке (зерне), %
<i>H</i>	<i>D</i> <sub>540</sub>	<i>A</i>	<i>X</i>

Содержание белка в муке (зерне) рассчитывают по формуле

$$X = \frac{A \cdot 40}{H} \cdot 100\%,$$

где *X* – содержание белка в муке (зерне), %;

*A* – концентрация белка в растворе по калибровочной кривой, мг/мл;

40 – объем раствора белка, мл;

*H* – масса навески муки, мг;

100 – коэффициент для пересчета содержания белка в проценты.

Полученные результаты заносят в табл. 40.2, сравнивают с литературными данными и делают выводы.

Таблица 40.2. **Содержание белка в зерне злаков и бобовых культур**

Культура	Содержание белка в зерне, %	
	Опытные данные	Литературные данные
Пшеница мягкая		
Пшеница твердая		
Рожь		
... другие злаковые		
Горох		
Люпин		
Соя		
... другие бобовые		

**Материалы и оборудование:** мука из семян злаков и зернобобовых культур, 4%-ный раствор NaOH в 20%-ном растворе этилового спирта (раствор 1), 5%-ный раствор NaCl в 4%-ном водном растворе NaOH (раствор 2), 3,1%-ный раствор медного купороса (5 г CuSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O растворяют в 95 мл воды), ступки, пипетки, стеклянные палочки, мер-

ные цилиндры на 25 мл, центрифуга, фотоэлектроколориметр, центрифужные и стеклянные пробирки.

### **Контрольные вопросы**

1. Объясните особенности фракционного состава белков зерна злаков и бобовых культур?
2. На чем основан метод определения белков в зерне злаков и бобовых культур в данной работе?
3. Назовите пределы изменчивости содержания белка в зерне злаков и бобовых культур.

### **Работа 41. Определение содержания клейковины в зерне хлебных злаков**

*Клейковина – это белковый сгусток, образующийся при отмывании водой теста, замешанного из муки хлебных злаков (пшеницы, ячменя), а также некоторых злаковых кормовых трав.*

Содержание клейковины в муке и ее физико-химические свойства определяют характер использования и качество получаемых из муки изделий. Для получения хлебобулочных изделий используют муку с высоким содержанием белка и клейковины, для изготовления кондитерских изделий (печенье, торты) можно использовать муку с более низким содержанием клейковины.

Вся клейковина находится в эндосперме зерновки. В периферических частях эндосперма, имеющих повышенную зольность, содержание клейковины наивысшее. В зародыше, оболочках и алейроновом слое клейковины нет. В муке высшего сорта обычно содержится больше клейковины, чем в муке 1-го и 2-го сорта.

Химический состав клейковины не постоянен, не менее 80 % ее составляют белки спирторастворимые (глюадины) и щелочерастворимые (глютелины). В качестве примесей в клейковине содержатся крахмал, сахар и жир.

Количество клейковины, отмываемой из навески муки или размоленного зерна, называют *выходом клейковины*. Определяют выход сырой и сухой клейковины.

Содержание клейковины находится в прямой зависимости от общего количества белка и изменяется, как и ее свойства, от условий выращивания растений. Содержание сырой клейковины в зерне мягкой

пшеницы может колебаться в пределах 20...50 % в зависимости от сортовых особенностей и условий выращивания растений.

В зерне твердой пшеницы содержится больше клейковины, чем в зерне мягкой пшеницы. Зерно, выращенное в южных районах, при повышенной температуре и низкой влажности, высоком уровне азотного питания, содержит больше клейковины.

Белки клейковины способны набухать в воде и образовывать вязкие массы или сгустки. На этом свойстве основаны методы выделения клейковины. Сначала из муки замешивают тесто, затем его тщательно отмывают водой от крахмала и других веществ и получают сырую клейковину. После высушивания получают сухую клейковину.

**Цель работы:** определить содержание клейковины в зерне (муке) мягкой и твердой пшеницы, пшеничной муке различных сортов (1-го, 2-го, высшего), зерне других злаковых культур.

**Ход работы.** Зерно злаков тщательно размалывают на лабораторной электрической мельнице (типа ЭМ-3А). Муку просеивают на тонком сите, отруби отбрасывают. Взвешивают 10 г муки тонкого помола, помещают ее в фарфоровую чашку, к муке приливают 7 мл водопроводной воды с температурой 18...20 °С.

Шпателем из муки замешивают тесто, формируя один комок шаровидной формы. Приставшие к шпателю и стенкам чашки частицы теста счищают и присоединяют к комку, который затем полностью заливают водопроводной водой с температурой 18...20 °С. Тесто оставляют в чашке на 20 мин для того, чтобы все частицы муки равномерно пропитались водой.

После этого тесто переносят в емкость большего размера (на 3...5 л), в которую приливают около 2...3 л холодной водопроводной воды, и начинают отмывать клейковину.

Вначале клейковину отмывают очень осторожно, периодически опуская тесто в воду и слегка разминая его пальцами, смачивая и перекладывая тесто с одной руки на другую. *Нельзя долго держать тесто в руках, так как оно будет нагреваться и распадаться.*

Промывную воду по мере накопления в ней крахмала (окрашивает воду в белый цвет) и других водорастворимых веществ меняют 3...5 раз, процеживая ее через сито с мелким диаметром отверстий для сбора отделившихся кусочков клейковины.

Когда клейковина станет вязкой и упругой, а промывная вода прозрачной, дальнейшее ее отмывание можно вести более энергично под слабой струей водопроводной воды над ситом. Отмывание ведут до

тех пор, пока вода, стекающая при отжимании клейковины, не будет прозрачной (не будет содержать крахмала).

Более точно определить наличие крахмала можно по реакции на йод – в промывную воду вносят 1...2 капли раствора йода в йодиде калия. Отсутствие синей окраски свидетельствует о том, что клейковина полностью отмыта.

Отмытую клейковину отжимают руками (насколько это возможно) от избытка воды, скатывают в шарик и взвешивают с точностью до 0,01 г. Выход сырой клейковины определяют, умножая полученную массу клейковины на 10 (так как для определения берут 10 г муки).

После выделения сырой клейковины, как правило, определяют ее качество. Для этого формируют навеску 4 г и помещают ее в фарфоровую чашку с водой (см. работу 42).

Для определения содержания сухой клейковины сырую клейковину помещают во взвешенный бюкс с вложенным в него кружком пергаментной бумаги и высушивают в термостате при температуре 105 °С до постоянной массы. После охлаждения в эксикаторе бюкса с клейковиной определяют массу сухой клейковины. Выход сухой клейковины рассчитывают, умножая чистую массу сухой клейковины на 10.

Результаты заносят в табл. 41.1.

Таблица 41.1. Содержание сырой и сухой клейковины в зерне злаков

Культура	Сорт муки	Выход клейковины, %			
		сырой		сухой	
		1-2 повторения	среднее	1-2 повторения	среднее

**Материалы и оборудование:** мука пшеницы (мягкой, твердой, разных сортов), тритикале или других злаков, весы, фарфоровые чашки для замеса теста, емкости для отмывания клейковины (на 3...5 л), шпатели, мерные цилиндры на 10 мл, сита с малым диаметром отверстий.

### Контрольные вопросы

1. Что такое клейковина, каков ее химический состав?
2. Для каких целей используют муку злаков с высоким и низким содержанием клейковины?
3. Опишите методику выделения клейковины из муки. Как определяют выход сырой и сухой клейковины?
4. Укажите содержание сырой и сухой клейковины в зерне злаков.

## Работа 42. Определение качества клейковины

Качество зерна, а также хлебопекарные качества муки злаков характеризует ряд показателей, важнейшими из которых являются содержание белка, содержание и качество клейковины.

**Качество клейковины** – это комплекс ее физических свойств, определяемых на приборах или органолептически. При замесе теста белки клейковины набухают и образуют сетчатую структуру, укрепляющую тесто. Важнейшими свойствами клейковины являются эластичность, растяжимость, упругость, а также газодерживающая способность. Эти свойства клейковины, в свою очередь, влияют на эластичность пористость, объемный выход и аромат хлебобулочных изделий.

Выделяют три группы качества клейковины: 1-я группа – хорошая, 2-я группа – удовлетворительная, 3-я группа – неудовлетворительная (табл. 42.1).

В зависимости от содержания белка, содержания и качества клейковины мягкую пшеницу делят на *сильную, среднюю, слабую*. К сильной относят сорта, имеющие не ниже 14 % белка и не менее 28 % сырой клейковины первой группы. Средняя (или ценная) пшеница содержит не менее 11 % белка и не менее 25 % клейковины 2-й группы. Слабые сорта содержат менее 11 % белка и менее 25 % клейковины.

От качества клейковины зависят многие свойства муки (теста), которые можно определять с помощью таких приборов, как альвеограф и фаринограф.

*Альвеограф* позволяет определять следующие показатели: упругость теста (т. е. его способность противостоять деформации); максимальный объем воздуха, который может удерживать пузырь теста (газодерживающая способность); индекс эластичности; общая энергия деформации (хлебопекарная сила муки).

*Фаринограф* позволяет определять такие показатели как водопоглощительная способность муки, поведение теста при замесе (время образования теста, устойчивость теста, стабильность), степень разжижения теста (показывается, насколько сильно тесто разжижилось от начальной консистенции). Анализируемые показатели прибор регистрирует в виде графика – *фаринограммы* (рис. 42.1).

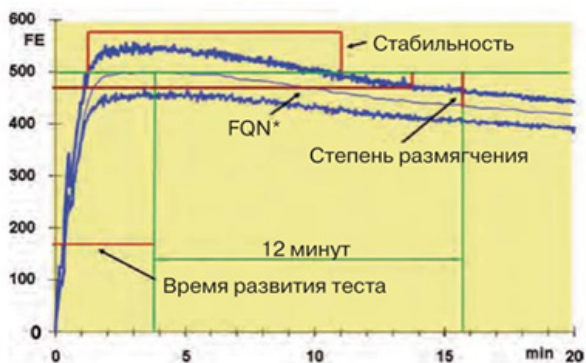


Рис. 42.1. Основные определяемые параметры при анализе фаринограммы

Приборы ИДК – измерители деформации клейковины (рис. 42.2) предназначены для определения качества клейковины зерна пшеницы и пшеничной муки хлебопекарного и макаронного помола по величине ее деформации под воздействием нагрузки определенной величины в течение заданного интервала времени. Прибор определяет качество клейковины в условных единицах ИДК (ед. ИДК).



Рис. 42.2. Измеритель деформации клейковины ИДК-3М

Прибор ИДК-3М позволяет с высокой точностью определять качество клейковины в зерне пшеницы. Процесс измерения деформации

клейковины полностью автоматизирован, результаты измерения фиксируются на цифровом табло.

Принцип работы прибора ИДК-3М заключается в измерении деформации образца клейковины, на который воздействуют тарированным грузом в течение заданного отрезка времени (30 с).

Прибор ИДК-3М состоит из измерительной головки и блока электронного управления. В нижней части измерительной головки расположена подвижная тарированная нагрузка, выполненная в виде конуса диаметром 35 мм, величина перемещения которой составляет 20 мм. Вертикальное перемещение тарированной нагрузки обеспечивается электродвигателем, а удержание нагрузки в крайнем верхнем положении осуществляется с помощью электромагнита. Исследуемый образец помещается на опорный столик.

В измерительной головке расположено устройство, которое формирует сигналы, соответствующие величине деформации образца клейковины. Расположенный в пластмассовом корпусе электронный блок осуществляет управление электродвигателем и электромагнитом, а также обработку сигналов измерительного устройства. В верхней левой части корпуса расположена кнопка «ПУСК». На лицевой панели блока находится жидкокристаллический индикатор единиц ИДК с подсветкой. На боковой панели корпуса блока управления расположены сетевой разъем и выключатель питания.

Таблица 42.1. Градации значений в условных единицах ИДК для различных групп качества клейковины муки и зерна

Группа качества клейковины	Характеристика клейковины	Показания прибора в условных единицах ИДК				
		Зерно пшеницы	Мука хлебопекарная		Макаронная мука высшего и 1-го сортов	
			Высшего, 1-го сорта, обойная	2-го сорта	твердой	мягкой
1	Хорошая	45–75	55–75	55–75	50–80	50–75
2	Удовлетворительная слабая	80–100		80–100	85–105	80–100
2	Удовлетворительная крепкая	20–40	35–50	40–50		
3	Неудовлетворительная крепкая	0–15	0–30	0–30		
3	Неудовлетворительная слабая	105 и более	105 и более	105 и более	110 и более	105 и более

**Цель работы:** определить группы качества клейковины, полученной из муки различных зерновых культур или различных сортов пшеничной муки.

**Ход работы.**

1. Из отмытой клейковины, полученной при выполнении работы 41, выделить навеску 4 г, обминая ее несколько раз пальцами, сформировать шарик, и поместить на 15 мин в чашку с водой, имеющей температуру  $(18 \pm 2)$  °С. Если клейковина крошащаяся, не формируется в шарик, то ее относят к 3-й группе без определения качества на приборе.

2. Включить прибор ИДК в сеть. На индикаторе появится надпись «ПЛАУН». Тарированная нагрузка должна находиться в нижнем положении.

3. Нажать кнопку ПУСК. На индикаторе появится надпись «ИЗМЕРЕНИЕ» и начнется обратный отсчет в 30 с.

4. Через 30 секунд произойдет подъем тарированной нагрузки. На индикаторе появится надпись «РЕЗУЛЬТАТ» и значение калибровочного числа  $150,7 \pm 0,5$  (т. е. 150,2...151,2) ед. ИДК.

5. Подготовленный образец клейковины положить строго в центр столика.

6. Нажать кнопку «ПУСК». Произойдет падение тарированной нагрузки на образец клейковины. На индикаторе появится надпись «ИЗМЕРЕНИЕ» и начнется обратный отсчет 30 с.

7. Через 30 секунд произойдет подъем тарированной нагрузки, на индикаторе появится надпись «РЕЗУЛЬТАТ» и измеренное значение ИДК в условных единицах.

8. Определить группу качества клейковины (см. табл. 42.1) и результат внести в табл. 42.2.

9. Снять испытуемый образец клейковины со столика. Диски столика и тарированной нагрузки протереть сухой мягкой тканью или фильтровальной бумагой.

10. Подготовить новый образец и повторить п. п. 3–7.

Таблица 42.2. Качество клейковины пшеничной муки различных сортов

Культура, сорт муки	Значение ИДК (стандартные единицы)	Группа качества (1, 2, 3-я)

**Материалы и оборудование:** отмытая сырая клейковина мягкой и твердой пшеницы, прибор ИДК, весы.



## Контрольные вопросы

1. Что понимают под качеством клейковины, как ее оценивают?
2. Какими свойствами обладает клейковина, какие свойства теста и хлебобулочных изделий зависят от качества клейковины?
3. Какие критерии лежат в основе определения силы зерна пшеницы?
4. С помощью каких приборов и по каким показателям можно определить хлебопекарные качества муки (теста)?
5. На чем основан принцип работы прибора ИДК? Изложите методу определения качества клейковины с помощью прибора ИДК.
6. Укажите градации значений в единицах ИДК для различных групп качества клейковины пшеничной муки (зерна).

### Работа 43. Колориметрический метод определения сахаров

Сахарами называют углеводы, хорошо растворимые в воде и имеющие сладкий вкус. К ним относят моно- и олигосахариды. Сахара являются основными продуктами фотосинтеза, субстратами дыхания, транспортными формами углеводов, защитными и запасными веществами растений. Сахара могут накапливаться в плодах, фруктах, ягодах и корнеплодах в значительных количествах. При этом в корнеплодах они распределяются не равномерно – больше в шейке корнеплода, меньше в сердцевине, головке и кончике корня. Это следует учитывать при определении сахаристости корнеплодов.

Используемый в работе метод определения сахаров основан на изменении интенсивности окраски раствора глицерата меди при кипячении его с вытяжками сахаров. Интенсивность окраски определяется с помощью фотоэлектроколориметра по величине оптической плотности раствора, которая в последующем переводится в концентрацию сахаров. При этом используется график, построенный по оптической плотности прокипяченного раствора глицерата меди с растворами сахаров известной концентрации. Содержание сахаров рассчитывается по приведенной ниже формуле.

**Цель работы:** определить содержание сахаров в корнеплодах сахарной и кормовой свеклы, репы.

**Ход работы.** Выделяют и измельчают отдельные части корнеплода (головки, шейки, сердцевины, корня) или тщательно перемешивают весь измельченный корнеплод. Из средней пробы берут навеску материала 5...10 г с точностью до 0,01 г. Навеску помещают в микро- или

макроизмельчитель (или ступку), приливают 10-кратный объем нагретой до  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  воды и измельчают (растирают) в течение 3...5 мин до однородного состояния. Одновременно происходит экстракция сахаров из клеток корнеплода. После охлаждения до  $25\text{...}30\text{ }^{\circ}\text{C}$  гомогенат используют для определения общего количества сахаров или редуцирующих сахаров.

**Определение общего количества сахаров.** К таким сахарам относятся редуцирующие сахара, а также **сахароза**, которая восстановительными свойствами не обладает.

1. Из охлажденного гомогената пипеткой отбирают 0,5 мл прозрачной вытяжки и переносят в чистую и сухую пробирку.

2. В пробирку добавляют 0,5 мл 1%-ного раствора соляной кислоты.

3. После перемешивания содержимого пробирки ее помещают на кипящую водяную баню на 15 мин.

4. Затем в пробирку добавляют 15 мл глицерата меди и пробирку нагревают еще ровно 6 мин.

5. Пробирку снимают с водяной бани и охлаждают в холодной воде.

6. Смесь отстаивают, прозрачную жидкость переносят в другую пробирку и определяют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре КФК-2 (см. работу 22) при длине волны 582 нм (ручку 1 устанавливают в положение 7).

**Определение редуцирующих сахаров.** К редуцирующим сахарам относят моносахариды, содержащие альдегидную или кетонную группы (цепные формы) или гликозидный гидроксил (циклические формы), а также дисахарид мальтозу.

1. Из охлажденного гомогената пипеткой отбирают 1 мл прозрачной вытяжки и переносят в чистую сухую пробирку

2. К вытяжке приливают 15 мл глицерата меди, нагревают на кипящей водяной бане 6 мин, далее поступают, как указано выше (п. п. 5 и 6).

Концентрацию сахаров определяют по графику, построенному по оптической плотности растворов глюкозы известной концентрации (от 0,5 до 10 мг глюкозы в 1 мл раствора).

Количество сахаров рассчитывают по формуле

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{m \cdot 1000},$$

где  $X$  – содержание сахаров, %;

$a$  – концентрация сахаров в пробе, найденная по калибровочной кривой, мг/мл;  
 $V$  – объем вытяжки, полученной из навески, мл;  
 $m$  – масса навески, г;  
 100 – коэффициент перевода в проценты;  
 1000 – коэффициент перевода граммов в миллиграммы.  
 Результаты заносят в табл. 43.1.

Таблица 43.1. Содержание сахаров в корнеплодах

Культура	Части корнеплода	Содержание сахаров, %

**Материалы и оборудование:** сахарная или кормовая свекла, репа, раствор глицерата меди (смешивают объемы реактивов № 1 и № 2 в соотношении 2:1; реактив № 1 готовят растворением  $8 \pm 0,01$  г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 1 л дистиллированной воды, реактив № 2 готовят растворением в воде 150 г едкого натра в мерной колбе на 1 л и объем доводят до метки, перед анализом на 40 мл реактива № 2 добавляют 1 мл чистого глицерина), весы, 1%-ная соляная кислота, измельчители или ступки с пестиками, пробирки, пипетки на 1 мл, мерные цилиндры на 50...100 мл, фотоэлектроколориметр (КФК-2 или др.).

### Контрольные вопросы

1. Какие углеводы называют сахарами (назовите представителей), какие функции они выполняют в растениях?
2. Какие сахара относят к редуцирующим, какими свойствами они обладают?
3. На чем основан используемый в работе метод количественного определения сахаров? Укажите отличия в методике определения общего количества сахаров и редуцирующих сахаров.
4. Укажите содержание сахаров в корнеплодах, плодах, ягодах, фруктах.

### Работа 44. Определение содержания крахмала поляриметрическим методом

Крахмал – полисахарид растений, который запасается в зерне, клубнях, корнеплодах и плодах в виде крахмальных зерен различной

формы и размеров. Крахмал состоит из двух компонентов – амилозы и амилопектина (см. работу 9).

Содержание крахмала зависит от вида и сорта растений, а также почвенно-климатических условий, удобрений, орошения и др. Знание этих зависимостей позволяет управлять процессом накопления крахмала в урожае.

Многие углеводы обладают оптической активностью, т. е. способностью вращать плоскость поляризованного света вправо (+) или влево (-). При определенных условиях опыта величина отношения угла вращения  $\alpha$  к плоскости поляризации  $[\alpha]_D$  есть величина постоянная и характерная для каждого оптически активного вещества.

Для количественного определения крахмала широко применяют поляриметрические методы. Крахмал сначала гидролизуют до глюкозы, а затем в гидролизате определяют угол вращения с помощью поляриметра. Содержание крахмала рассчитывают по приведенной ниже формуле.

**Цель работы:** определить содержание крахмала в зерне злаковых и бобовых культур, клубнях картофеля.

**Ход работы.**

**Определение содержания крахмала в семенах злаков или бобовых культур.**

1. Семена тщательно измельчают на лабораторной мельнице, муку просеивают через тонкое сито.

2. Берут навеску муки  $5 \pm 0,01$  г и переносят ее в мерную колбу на 100 мл, к муке приливают 12,5 мл 1%-ного раствора соляной кислоты, хорошо размешивают, затем приливают еще 12,5 мл этого же раствора.

3. Колбу нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Во время нагревания содержимое колбы систематически перемешивают. Сначала крахмал загустевает за счет клейстеризации, а затем разжижается за счет гидролиза до глюкозы.

4. После гидролиза крахмала в колбу приливают 30 мл дистиллированной воды и содержимое охлаждают водой под краном.

5. Затем в колбу приливают 5 мл фосфорно-вольфрамовой кислоты и после перемешивания объем доводят водой до метки 100 мл.

До анализа раствора на поляриметре его можно хранить в холодильнике. Условия гидролиза должны быть одинаковыми для всех проб.

**Определение содержания крахмала в клубнях картофеля.**

1. Клубни измельчают на измельчителе или в ступке.

2. Из взятой средней пробы предварительно извлекают сахара. Для этого к пробе добавляют концентрированный этиловый спирт, перемешивают и отфильтровывают на бумажном фильтре, фильтрат выбрасывают.

3. Из оставшейся массы берут навеску  $15 \pm 0,01$  г, дополнительно растирают ее в ступке в 5 мл 5%-ной соляной кислоты до однородной массы.

4. Полученную смесь переносят в мерную колбу на 100 мл, ступку и пестик несколько раз ополаскивают 1%-ной соляной кислотой и объем доводят до 25 мл.

В дальнейшем поступают так, как указано выше при определении крахмала в муке семян (п. п. 3...5).

#### *Устройство и подготовка поляриметра к работе.*

Поляриметр используется для измерения угла оптического вращения органических веществ в лабораториях различных типов.

Схема элементов оптического пути поляриметра приведена на рис. 44.1.

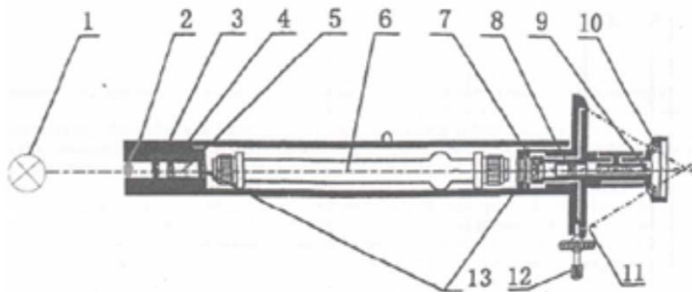


Рис. 44.1. Схема элементов оптического пути поляриметра:

- 1 – лампа; 2 – коллекторная линза; 3 – светофильтр; 4 – поляризатор; 5 – фазовая пластинка; 6 – поляриметрическая трубка с анализируемым раствором; 7 – анализатор; 8 – входная линза окуляра; 9 – выходная линза окуляра; 10 – увеличительное стекло окуляра; 11 – верньер; 12 – поворотная ручка; 13 – защитные пластины.

Оптическая система ручного поляриметра **Polar-2010 LED JP Selecta S.A.** (рис. 44.2) смонтирована на станине 1 с наклоном  $20^\circ$ . В качестве источника питания используется натриевая лампа 20 Вт. Электропитание прибора включается кнопкой 2, расположенной на тыльной стороне станины. Исследуемый раствор помещается в поля-

риметрическую трубку 3, которая помещается в прибор и закрывается крышкой 4.

Основными элементами оптической системы являются поляризатор 5 и анализатор 6. Вращением поворотной ручки 7 анализатора можно добиться регулировки угла затенения трехзонного поля зрения (рис. 44.3), которое можно видеть в окуляр 8. Для устранения разности от нецентричности в приборе использован двухшкальный верньер 9.



Рис. 44.2. Поляриметр ручной Polar-2010 LED JP Selecta S.A. (Испания):  
1 – станина; 2 – кнопка включения питания; 3 – поляриметрическая трубка  
с анализируемым раствором; 4 – крышка кожуха поляриметра; 5 – поляризатор;  
6 – анализатор; 7 – поворотная ручка анализатора; 8 – окуляр;  
9 – верньер; 10 – увеличительное стекло верньера

Верньер имеет основную шкалу (рис. 44.4, *a*), разделенную на 360 делений с ценой деления  $1^\circ$  и нониусную шкалу (рис. 44.4, *b*), разделенную на 20 делений, которые соответствуют 19 делениям основной шкалы, что обеспечивает точность считывания  $0,05^\circ$ . Верньер и анализатор механически соединены. Для удобства отсчета перед окошком верньера установлено увеличительное стекло 10.

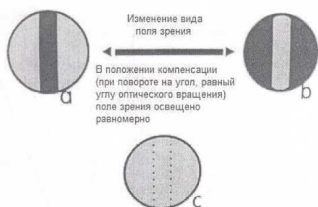


Рис. 44.3. Изменение угла затенения трехзонного поля зрения:

*a* и *b* – изменение поля зрения при вращении поворотной ручки; *c* – положение компенсации (равно углу оптического вращения).

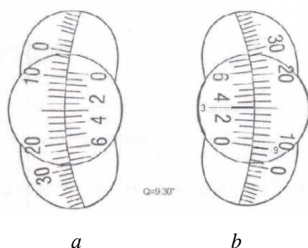


Рис. 44.4. Шкалы верньера: *a* – основная; *b* – нониусная

*Перед началом работы* следует включить кнопку 2 электропитания прибора и **прогреть** его **не менее 10 минут**. Измерения можно начинать только при характерном желтом свечении натриевой лампы.

Верньер следует установить в нулевое положение.

Перед определением угла вращения исследуемого раствора нужно проверить нулевую точку прибора. Для этого производят наблюдения с помощью поляриметрической трубки, наполненной водой. Окуляр 8 анализатора устанавливают на резкость по глазу вращением муфты окуляра. Затем вращают поворотную ручку 7, приводящий анализатор в движение вправо или влево, добиваясь равномерности освещения и однородности поля зрения (рис. 44.3, *c*). При этом нулевые деления основной шкалы (внешний круг) и шкалы нониуса (внутренний круг) должны совпадать (рис. 44.4). При несовпадении нулевого деления делают несколько отсчетов по двум противоположным шкалам (для учета эксцентриситета круга) и устанавливают среднюю поправку (+) или (–). Отсчеты производят до сотых долей градуса.

#### **Определение угла вращения гидролизованного крахмала.**

1. Полученные для анализа растворы фильтруют в сухую колбу. *Растворы должны быть прозрачными (бесцветны или слабо окрашены).*

2. Растворы оставляют на время, необходимое для выравнивания температуры с температурой в помещении.

3. Из поляриметра (рис. 44.2) вынимают поляриметрическую трубку 3, наполняют ее, удерживая вертикально, испытуемым раствором до краев так, чтобы образовался выпуклый мениск. Затем трубку прикрывают круглым стеклышком, **надвигая** его с края трубки до необходимого положения, и наблюдают, чтобы под стеклышком не осталось пузырьков воздуха. После этого на поляриметрическую трубку навин-

чивают винт с резиновой прокладкой. *Нельзя завинчивать винты слишком туго (возможно возникновение напряжений в защитной пластине, что может внести погрешность в результаты измерений).*

4. Поляриметрическую трубку протирают салфеткой до удаления остатков жидкости.

5. Открывают крышку кожуха поляриметра 4 и устанавливают внутрь заполненную поляриметрическую трубку расширенной частью вверх (чтобы пузырьки воздуха, если они попали в жидкость, собрались в расширенной части трубки и не попали в оптический путь).

6. Вращая поворотную ручку 7, в окуляр наблюдают четкие различия трех различно освещенных зон в поле зрения (рис. 44.3, *a* и *b*). Затем находят такое положение, при котором достигается равномерная освещенность поля зрения (рис. 44.3, *c*).

7. Определение угла вращения проводят по двум нониусам, расположенным на противоположных концах. Угол вращения устанавливают с учетом поправки, определенной ранее. Показание прибора записывают в табл. 44.1.

*Содержание крахмала в зерне злаков вычисляют по формуле*

$$x = k \cdot \alpha \cdot 100/0,3468 \cdot (100 - b),$$

где  $x$  – содержание крахмала, % на сухое вещество;

$k$  – переводной коэффициент (для пшеницы – 1,898; кукурузы – 1,879; ржи – 1,885; ячменя – 1,912; овса – 1,914; риса – 1,866; проса – 1,818; гречихи – 1,876);

$\alpha$  – угол вращения, град;

$b$  – влажность размолотого зерна, %.

*Содержание крахмала в клубнях картофеля вычисляют по следующей формуле:*

$$x = V \cdot \alpha \cdot 100 \cdot 0,3468/195,4 \cdot g \cdot n,$$

где  $x$  – содержание крахмала, % на сырое вещество;

$V$  – объем гидролизата, мл;

$\alpha$  – угол вращения, град;

$g$  – длина трубки, дм;

$n$  – масса навески, г;

195,4 – фактор для крахмала картофеля, соответствующий  $[\alpha]_D$ ;

0,3468 – коэффициент перевода в градусы круговой шкалы.

Полученные данные заносят в табл. 44.1 и делают выводы.



Таблица 44.1. Результаты определения крахмала в семенах и клубнях

Объект	Масса навески, г	Угол вращения, град	Содержание крахмала, %

**Материалы и оборудование:** поляриметр, ступки с пестиками или измельчители, колбочки вместимостью 50 и 100 мл, фарфоровые чашки, водяная баня, бумажные фильтры, 1%-ный и 5%-ный растворы соляной кислоты, 5%-ный раствор фосфорновольфрамовой кислоты.

### Контрольные вопросы

1. Что представляет собой крахмал (компоненты, их строение и свойства)?
2. Изложите принцип метода и методику определения крахмала в семенах злаков и бобовых культур и клубнях картофеля.
3. Сколько крахмала содержится в клубнях, корнеплодах, зерне различных культур?

### Работа 45. Определение содержания масла в семенах с помощью рефрактометра (по А. И. Ермакову)

Жиры и жироподобные вещества (липоиды) относят к липидам. Жиры – сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высокомолекулярных жирных кислот. В состав жиров входит несколько десятков жирных кислот, имеющих, как правило, четное число атомов углерода. В растительных жирах преобладают непредельные жирные кислоты, имеющие низкую температуру плавления, – олеиновая, ленолевая, леноленовая. Поэтому растительные жиры имеют жидкую консистенцию и их называют маслами. Жиры выполняют в основном функцию запасных питательных веществ.

К липоидам относят фосфоглицериды, гликолипиды, воска и стероиды. *Фосфоглицериды* выполняют структурную функцию – являются основными компонентами мембран клетки. *Гликолипиды* содержатся в зеленых частях растений (накапливаются в хлоропластах) и повышают питательную ценность продукции растениеводства. *Воска* – тугоплавкие соединения, выполняющие защитную функцию. Они входят в состав кутикулы и предохраняют растения от иссушения и поражения болезнями.

Рефрактометрический метод количественного определения масел основан на использовании различий в коэффициентах преломления исследуемого масла и  $\alpha$ -монобром-нафталина, который хорошо растворяет масла на холоде и не обладает большой летучестью благодаря высокой температуре кипения (280 °С). При растворении масла показатель преломления смеси понижается на величину, пропорциональную количеству растворенного масла. Содержание масла рассчитывается по приведенной ниже формуле.

**Цель работы:** определить содержание масла в семенах подсолнечника, льна, рапса или других масличных культур.

**Ход работы.** Семена масличных культур предварительно очищают от оболочек и высушивают. Ядра или семена тонко измельчают. Берут навески 300...500 мг на торсионных или аналитических весах. Навески высыпают в малые фарфоровые ступки, приливают в них с помощью микробюретки точный объем  $\alpha$ -монобромнафталина. Соотношение между навеской муки и объемом растворителя должно быть 3:4. Навеску тщательно растирают пестиком до однородного состояния, оставляют на 3...5 мин для растворения масла и повторно растирают. Затем специальной пипеткой, на конце которой вставлен ватный фильтр, отбирают несколько капель раствора масла и определяют показатель преломления при температуре, близкой к 20 °С, на рефрактометре (см. работу 13). На каждый градус температуры выше и ниже 20 °С вносят поправку (+) или (–) 0,0004. Содержание масла в семенах вычисляют по формуле

$$x = \frac{a \cdot p \cdot (n_b - n_c)}{m \cdot (n_c - n_m)} 100 \%,$$

где  $x$  – содержание масла в семенах, %;

$a$  – объем  $\alpha$ -монобромнафталина, мл;

$p$  – плотность масла, г/мл;

$m$  – масса навески масла, г;

$n_b$  – показатель преломления  $\alpha$ -монобромнафталина;

$n_c$  – показатель преломления определяемой смеси;

$n_m$  – показатель преломления масла.

Результаты определения заносят в табл. 45.1.

Таблица 45.1. Содержание масла в семенах различных культур

Культура	Масса навески, г	Показатели преломления			Содержание масла, %
		$\alpha$ -монобром-нафталина	смеси	масла	

**Материалы и оборудование:** семена масличных культур или готовые растительные масла, торсионные или электронные аналитические весы,  $\alpha$ -монобром-нафталин ( $n_b = 1,6585$ ), петролейный или диэтиловый эфир (для промывания пипеток и призм рефрактометра), специальная пипетка с ватным фильтром, микробюретки на 2 мл (цена деления 0,01 мл), рефрактометр.

### Контрольные вопросы

1. Как классифицируют липиды? Какое строение имеют жиры и липоиды? Назовите свойства и функции липидов.
2. На чем основан метод определения масел в данной работе? Изложите методику выделения масел из семян и их количественного определения с помощью рефрактометра.
3. Укажите пределы изменчивости содержания масел в семенах масличных культур?

### Работа 46. Быстрый рефрактометрический метод определения йодного числа масел

Физико-химические свойства жиров (масел) характеризуют несколько показателей (констант), важнейшими из которых являются температура плавления, кислотное число, число омыления и йодное число.

**Йодное число** – это количество граммов галогена (в пересчете на йод), которое способно присоединяться к 100 г жира. Йодное число характеризует степень непредельности жирных кислот, входящих в состав жира. Жиры с высоким йодным числом содержат больше непредельных жирных кислот, которые по своей биологической роли приравнивают к витаминам (витамин F). Таким образом, чем выше йодное число, тем выше биологическая питательная ценность жира.

Жиры (масла) с очень высоким йодным числом способны быстро окисляться и высыхать на воздухе. При этом образуются летучие альдегиды, кетоны и низкомолекулярные кислоты, имеющие специфический запах, на поверхности масла образуется тонкая прочная и устойчивая к внешним воздействиям пленка. Такие масла используют в лакокрасочной промышленности для получения олиф, лаков, красок.

Пищевые жиры (масла) с высоким йодным числом при хранении легко прогоркают – изменяется их цвет, запах и вкус. Хранить их следует при пониженных температурах и в герметичной таре.

Йодные числа большинства животных жиров колеблются в пределах 30...70, а растительных – в пределах 120...160.

Приведенный в данной работе *рефрактометрический метод* определения йодного числа масел является удобным для сравнительной оценки и отбора образцов в процессе селекции масличных культур с повышенным йодным числом масла в семенах. Метод сочетает простой способ получения нативного масла путем холодного прессования семян с вычислением йодных чисел по показателям преломления, определяемых на рефрактометре.

**Цель работы:** определить йодное число масел, полученных из семян подсолнечника, льна, рапса или других масличных культур.

**Ход работы.** Для получения масла используют специальный пресс высокого давления. В стальной пресс-стакан насыпают около 2 г грубо измельченных высокомасличных семян (выше 25 %) или 3...10 г семян с низким содержанием масла (15...25 %). Мелкие семена засыпают не измельчая. В стакан вставляют плотно входящий пестик-поршень. Стакан подставляют под пресс и доводят давление до 100 кг/см<sup>2</sup>. Масло, выступившее вокруг поршня на поверхность пресс-стакана, собирают пипеткой, на конце которой вставлен ватный фильтр. Профильтрованное через вату масло насаживается внутрь пипетки резиновой грушей. Для каждого образца получают по две пробы масла, в которых определяют показатели преломления.

Показатель преломления определяют на рефрактометре при температуре близкой к 20 °С (устройство рефрактометра и порядок определения показателя преломления описаны в работе 13).

Результаты заносят в табл. 46.1.

Таблица 46.1. Результаты определения йодного числа масла

Культура	Показатель преломления ( $n_{D_{20}}$ )			Йодное число масла
	1-я проба	2-я проба	Среднее	

Величину йодного числа вычисляют по формуле, в которую подставляют среднюю величину показателя преломления, полученную для двух параллельных проб масла, взятых из одного образца:

$$J = (nD_{20} - 1,4595) \cdot 100 / 0,0118,$$

где  $J$  – йодное число;

$nD_{20}$  – показатель преломления масла при температуре 20 °С.

**Материалы и оборудование:** весы, специальный пресс для получения масла, рефрактометр, пипетка с ватным фильтром, семена масличных культур.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие показатели характеризуют физико-химические свойства и качество жиров? См. работу 4.
2. Какими свойствами обладают жиры (масла) с высоким йодным числом, для каких целей они могут использоваться?
3. Изложите методику выделения масел из семян масличных культур. На чем основан метод определения йодного числа масел в данной работе?
4. Какие результаты получены в опыте? В каких пределах изменяется йодное число жиров животного и растительного происхождения?

### **Работа 47. Определение содержания органических кислот**

Органические кислоты относят к веществам вторичного происхождения. Они являются промежуточными продуктами обмена углеводов, липидов и белков, образуются в цикле Кребса, цикле Кальвина, глиоксилатном цикле, при гидролизе и окислении жиров, дезаминировании аминокислот. Органические кислоты являются исходными веществами для синтеза многих важных органических соединений – аминокислот, фитогормонов, пигментов, витаминов и др.

Органические кислоты накапливаются в значительных количествах в листьях, корнях, овощах, плодах и ягодах (особенно незрелых) и определяют их кислый вкус. В растениях наиболее часто встречаются яблочная, лимонная, янтарная, винная, фумаровая, щавелево-уксусная, щавелевая кислоты. Однако степень кислотности плодов, ягод, овощей определяется не только количественным и качественным составом органических кислот, но и содержанием в них сахаров. Сильно кислый

вкус ощущается при соотношении сахаров (в пересчете на сахарозу) к кислотам (в пересчете на яблочную) равном меньше 5 (лимон, вишня), умеренно кислый – при соотношении 5...15 (апельсины, земляника), слабокислый – при соотношении 15...20 (персики, некоторые сорта яблок), пресный вкус – при соотношении 25...30.

Органические кислоты отличаются хорошей растворимостью в воде. Это свойство используется для их выделения из растительных тканей. Количество органических кислот устанавливают путем титрования 0,1 н. раствором NaOH. При этом нейтральные соли органических кислот почти не учитываются, титруют в основном свободные кислоты и кислые соли органических кислот. Содержание кислот рассчитывается по приведенной ниже формуле.

**Цель работы:** определить содержание органических кислот в овощах, плодах, ягодах, листьях растений.

**Ход работы.** Навеску растительного материала массой 5...10 г измельчают на терке или растирают в ступке. Растиертую массу без потерь через воронку переносят в широкогорлую колбу вместимостью 200 мл, ступку и пестик несколько раз обмывают дистиллированной водой, сливая ее в колбу. Объем смеси в колбе доводят дистиллированной водой до 150 мл. Затем колбу нагревают в водяной бане или термостате при температуре 80 °С в течение 30 мин. Через каждые 5 мин содержимое колбы взбалтывают для лучшей экстракции кислот.

После охлаждения объем жидкости в колбе доводят дистиллированной водой до 200 мл, содержимое колбы взбалтывают и фильтруют через бумажный фильтр в сухую мерную колбу на 100 мл.

Затем мерным цилиндром точно отмеряют 50 мл фильтрата и переносят его в другую коническую колбу, добавляют 3...5 капель спиртового раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором NaOH до слабо розовой окраски.

В том случае если исследуемый раствор сильно окрашен и переход окраски при титровании определить трудно, используют индикаторную бумагу, на которую наносят несколько капель смеси титруемого раствора, и цвет индикатора сравнивают со шкалой.

Содержание органических кислот в растительном материале рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{a \cdot T \cdot 200 \cdot 100}{H \cdot 50 \cdot 10},$$

где  $X$  – количество кислот в растительном образце, мг-экв/100 г;

$a$  – объем 0,1 н. NaOH, пошедший на титрование, мл;  
 $T$  – поправка к титру щелочи (= 1 для фексоналовских реактивов);  
 200 – общий объем вытяжки, мл;  
 100 – коэффициент перевода на 100 г навески;  
 50 – объем фильтрата, взятый для титрования, мл;  
 10 – коэффициент перевода в миллиграмм-эквиваленты кислот  
 (1 мл 0,1 н. раствора NaOH соответствует 0,1 мг-экв кислоты);

$H$  – масса навески материала, г.

Содержание органических кислот часто рассчитывают не в мг-экв/100 г, а в процентах. Для этого результат, полученный по приведенной выше формуле, умножают на коэффициент перевода, означающий количество граммов определенной кислоты, соответствующей 1 мл 0,1 н. раствора NaOH. В зависимости от преобладания той или иной органической кислоты в изучаемом объекте для пересчета используют соответствующий коэффициент. Для яблочной кислоты коэффициент перевода равен 0,0067; для щавелевой – 0,0045; для лимонной – 0,0064; для винной – 0,0075. Обычно кислотность большинства плодов и овощей выражают в яблочной кислоте, ягод – в лимонной, винограда – в винной.

Результаты опытов заносят в табл. 47.1.

Таблица 47.1. Результаты определения кислотности растительных тканей

Объект	Масса навески, г	Объем 0,1 н. NaOH, пошедший на титрование, мл	Содержание органических кислот	
			мг-экв/100 г	%

**Материалы и оборудование:** клубни картофеля, яблоки, груши, ягоды, капуста белокочанная, листья комнатных растений, ступки с пестиками, широкогорлые колбы вместимостью 200 мл, конические колбочки вместимостью 100 мл, мерные цилиндры на 50 мл, водяная баня или термостат, воронки, бумажные фильтры, 0,1 н. раствор NaOH, 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина, бюретки для титрования.

### Контрольные вопросы

1. Назовите наиболее распространенные органические кислоты. Какие из них относят к моно-, ди- и трикарбоновым кислотам? В каких процессах они образуются, их роль?

2. В каких растительных объектах преобладают яблочная, лимонная, винная кислоты?

3. На чем основан метод количественного определения органических кислот в данной работе? Изложите методику их определения.

4. Сколько органических кислот содержится в исследуемых объектах, в каких единицах измеряется их содержание?

#### **Работа 48. Обнаружение алкалоидов в растениях**

*Алкалоиды* – азотсодержащие ароматические соединения щелочного характера, обладающие сильными физиологическими действиями. Алкалоидоносные растения составляют около 10 % всей мировой флоры. Алкалоиды могут содержаться или во всем растении, или в одном или нескольких органах. Обычно алкалоиды синтезируются в листьях и подземных органах, а затем перемещаются в семена.

Как правило, алкалоиды содержатся в растениях в незначительных количествах (0,001...0,01 %). Некоторые растения (хинное дерево, табак, барбарис) содержат больше алкалоидов (до 10 %).

Предполагается, что алкалоиды являются побочными продуктами обмена веществ и запасными веществами или выполняют защитную роль. Возможно, они играют роль гормонов, вызывающих усиление обменных процессов на определенных фазах развития растений.

Алкалоиды в зависимости от строения азотсодержащих циклов классифицируют на группы, различающиеся между собой по химическим и биологическим свойствам: производные *пиридина*, *пирролидина*, *хинолина*, *изохинолина*, *индола*, *пурина* и др.

Многие алкалоиды обладают высокой токсичностью, поэтому содержащие их растения нельзя использовать на корм (люпин, вика, польнь и др.). Некоторые алкалоиды используются как средства борьбы с вредителями сельскохозяйственных растений. Некоторые алкалоиды в малых дозах применяются в медицине.

Богат алкалоидами род люпина, но у различных видов их содержание разное (от 0,05 до 4 %). Наиболее распространенными алкалоидами люпина являются *лупинин* (малотоксичен), *спартейн* и *лупанин* (наиболее ядовиты – минимальная смертельная доза 22...30 мг/кг), *оксилупанин* (в 10 раз менее ядовит).

*Никотин* (табак, махорка) – сильный яд, действующий на центральную и периферическую нервную систему (ЦНС и ПНС). Под его действием происходит сужение кровеносных сосудов и повышение



кровенного давления. Смертельная доза 0,01...0,04 г. Применяется для борьбы с кожными заболеваниями животных.

*Кофеин* возбуждает ЦНС и сердечную деятельность, сужает кровеносные сосуды, обладает мочегонным действием. Применяется при усталости, отравлении наркотиками, при сердечных заболеваниях.

*Атрапин, гиасциамин, скополамин* (алкалоид белены черной) – сильные яды, действуют на нервную систему, используются как противоспазматические и болеутоляющие средства.

*Эфедрин* (алкалоид растений семейства эфедровые) возбуждает дыхание, вызывает сужение сосудов. Применяется при ревматизме, болезнях органов пищеварения и дыхательных путей (бронхит, астма).

*Рицинин* (алкалоид клещевины) – сильный яд, содержит синильную кислоту. В молодых этиолированных растениях содержится до 2,5 %.

*Кокаин* (алкалоид растения кока) – парализует окончания чувствительных нервов и применяется как местное анестезирующее средство, действует на ЦНС и вызывает чувство опьянения (высшая лечебная доза 0,03 г, токсичная доза – 0,2 г).

*Морфин, наркотин, папаверин, кодеин* и другие (алкалоиды опия – сока незрелых головок спяточного или опийного мака) действуют на ЦНС и ПНС. Морфин лучшее болеутоляющее и успокаивающее средство. Кодеин почти не обладает наркотическими свойствами, применяется как средство от кашля. Папаверин используется для снижения кровяного давления.

Для алкалоидов характерна цветная реакция с йодом в йодистом калии – образование красновато-бурой окраски.

**Цель работы:** установить наличие алкалоидов в семенах разных видов люпина или других растений.

**Ход работы:**

1. С 5...10 набухших семян люпина снять кожуру.
2. Каждое семя разделить на 2 семядоли.
3. Семядоли поместить на стеклянную пластину рядом (плоской стороной вверх).
4. На поверхность одной семядоли нанести 1...2 капли раствора йода в йодистом калии, вторая семядоля остается в качестве контроля.
5. Определить интенсивность красновато-бурой окраски на поверхности семядолей и отметить их в табл. 48.1 знаками: слабая (+), средняя (++) , сильная (+++), отсутствует (-).

Таблица 48.1. **Наличие алкалоидов в семенах люпина**

Вид люпина	Интенсивность окраски	Наличие алкалоидов

На основании результатов опыта делают выводы о наличии алкалоидов в семенах различных видов люпина.

**Материалы и оборудование:** семена различных видов люпина (многолетнего, желтого, узколистного, белого), лезвия бритвы или ланцеты, стеклянные пластины, раствор йода в KI с пипетками.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие вещества относят к алкалоидам, как их классифицируют?
2. В каких органах растений синтезируются и накапливаются алкалоиды? Назовите алкалоиды люпина, табака, других растений. Какую роль алкалоиды выполняют в растениях?
3. Какими свойствами обладают алкалоиды различных растений, для чего применяются?
4. На чем основан метод определения алкалоидов в семенах? Какие результаты получены в опытах?

### **Работа 49. Обнаружение дубильных веществ в растениях**

К дубильным относят вещества, способные дубить невыделанную шкуру, превращая ее в кожу. Дубильные вещества при взаимодействии с коллагеном – белком кожных покровов – образуют устойчивую поперечно-связанную структуру, определяющую высокую прочность и устойчивость кожи к различным факторам.

Дубильные вещества подразделяются на гидролизуемые и конденсированные. К *гидролизуемым* относятся *галловые* и *эллаговые* дубильные вещества. К галловым дубильным веществам относится *галлотанин*, или *китайский танин*, который образуется в листьях и листовых галлах различных видов растения сумаха. Основным компонентом галлотанина является пентагаллоилглюкоза. *Эллаговые* дубильные вещества состоят из эллаговой кислоты, содержатся в корке граната, кожуре незрелых грецких орехов, миробилинах, древесине эвкалипта.

**Конденсированные** дубильные вещества являются полимерами *катехинов или антоцианов* или сополимерами этих двух типов соединений. Они содержатся в коре ивы, сосны, ели, лиственницы, древесине некоторых видов акации, каштана и дуба.

Термин «дубильные вещества» используется также в пищевой промышленности и в технической биохимии для обозначения более низкомолекулярных соединений, обладающих терпким и вяжущим вкусом, но не способных к истинному дублению. К **пищевым дубильным веществам** относят *димеры катехинов*, образующиеся при изготовлении черного чая (имеют слабо вяжущий вкус и характерную золотисто-красную окраску) и обладающие частичной Р-витаминной активностью. Димеры катехинов и лейкоантоцианов содержатся в бобах какао, плодах терна, айвы, боярышника, яблок, груш.

Физиологическое значение дубильных веществ у растений связано с их участием в окислительно-восстановительных реакциях.

Характерной реакцией на дубильные вещества является почернение их при обработке слабым раствором хлорного железа.

**Цель работы:** определить наличие дубильных веществ в листьях и коре дуба, ивы, акации, плодах терна, груш, яблок, в черном чае.

**Ход работы:**

1. Измельченную массу (3...5 г) коры, листьев, чая, плодов и ягод поместить в колбы вместимостью 25...50 мл.

2. В колбы залить по 15 мл воды и кипятить в течение 5 мин.

3. Полученную вытяжку профильтровать через ватный фильтр в чистые пробирки.

4. В две пробирки налить по 1 мл полученной вытяжки. В одну из них прибавить 2 капли хлорного железа, вторая остается в качестве контроля.

Появление черной окраски раствора свидетельствует о наличии дубильных веществ. Интенсивность окраски отмечают знаками: слабая (+), средняя (++), сильная (+++). Результаты наблюдений заносят в табл. 49.1 и делают выводы.

Таблица 49.1. **Наличие дубильных веществ у различных растений**

Объект	Реакция на хлорное железо (+, ++, +++)	Наличие дубильных веществ (много, мало, отсутствуют)

**Материалы и оборудование:** черный и зеленый чай, листья комнатных растений, кора ивы и дуба, ступки с пестиками, пробирки, колбы вместимостью 25...50 мл, мерные цилиндры, раствор хлорного железа, глазные пипетки.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие вещества называют дубильными? Как классифицируют дубильные вещества, какова их химическая природа, где содержатся?
2. Какие функции выполняют дубильные вещества в растениях?
3. Какие дубильные вещества относят к пищевым, какими свойствами они обладают, где содержатся?
4. На чем основан метод обнаружения дубильных веществ в растениях? Какие результаты получены в опытах?

### **Работа 50. Количественное определение витамина С (аскорбиновой кислоты)**

***Витамины** – низкомолекулярные органические соединения различной химической природы, необходимые всем живым организмам в небольших количествах для нормального протекания биохимических и физиологических процессов.*

Растения и микроорганизмы синтезируют все необходимые для их жизнедеятельности витамины. Человек и животные получают витамины с пищей или кормами, или синтезируют их из предшественников (провитаминов).

Витамины не входят в состав клеточных структур и не являются энергетическими веществами, они выполняют в основном регуляторные функции. Основная функция витаминов у растений – *каталитическая*, т. е. они входят в состав небелковой части двухкомпонентных ферментов (известно более 200 таких ферментов). Благодаря этому витамины участвуют в белковом, углеводном, липидном и минеральном обмене растений.

В организме человека и животных витамины принимают участие в восстановлении тканей (кожи, волос, половых клеток), передаче нервных сигналов, световосприятию, транспорте веществ через стенки кишечника и кровеносных капилляров, улучшают использование всех питательных веществ, способствуют повышению устойчивости человека и животных к болезням. Некоторые витамины обладают антиму-

тагенными свойствами (снижают вероятность возникновения мутаций) и антиоксидантными свойствами (подавляют свободно-радикальные окислительные реакции, ускоряющие старение).

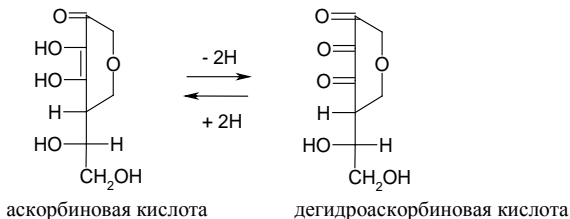
При частичном недостатке какого-либо витамина у человека возникают признаки заболеваний, которые называют *гиповитаминозом*. При длительном недостатке или полном отсутствии витамина возникают специфические заболевания, называемые *авитаминозом* (цинга, рахит, полиневрит и др.). Нарушения обмена веществ, связанные с употреблением большого количества какого-либо витамина, называют *гипервитаминозом*.

Витамины подразделяют на жирорастворимые (А, Д, Е, К) и водорастворимые (С, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, Р, Н, В<sub>с</sub>, U, инозит, ПАБК).

Содержание витаминов является важным показателем биологической ценности продуктов питания и кормов. Содержание водорастворимых витаминов обычно выражают в миллиграммах на 100 г (мг%), а содержание жирорастворимых витаминов – в международных единицах (МЕ).

Витамин С (*аскорбиновая кислота*) принимает участие в окислительно-восстановительных реакциях в клетках живых организмов и влияет на их устойчивость к неблагоприятным условиям среды и болезням. У человека при частичном недостатке витамина С (*гиповитаминозе*) появляется головная боль, головокружение, повышается утомляемость. При полном отсутствии витамина С (*авитаминозе*) наблюдается кровоточивость десен, расшатывание и выпадение зубов (болезнь скорбут, или цинга). Следы железа, меди, щелочная реакция среды, нагревание в присутствии кислорода воздуха разрушают содержащийся в продуктах витамин С.

В процессе обмена веществ аскорбиновая кислота окисляется в *дегидроаскорбиновую*, которая витаминной активностью не обладает. Взаимное превращение этих двух форм в окислительно-восстановительных процессах клетки можно представить следующей схемой:



В растениях аскорбиновая кислота находится как в свободном, так и в связанном с биокolloидами протопласта состоянии. Для выделения (экстракции) свободной аскорбиновой кислоты используют 2%-ный раствор метафосфорной кислоты. Для экстракции как свободной, так и связанной аскорбиновой кислоты используют соляную и щавелевую кислоты.

Для количественного определения аскорбиновой кислоты экстракты, полученные из растительных объектов, титруют *2,6-дихлорфенолиндофенолом*, имеющим синюю окраску. В процессе титрования 2,6-дихлорфенолиндофенол восстанавливается аскорбиновой кислотой и обесцвечивается. Содержание витамина С рассчитывают по приведенной ниже формуле.

**Цель работы:** определить содержание свободной и связанной аскорбиновой кислоты в листьях, плодах, ягодах, овощах и других объектах.

**Ход работы.** Взвешивают 5...10 г растительного материала, измельчают его ножом или ножницами на стеклянной пластине или пергаментной бумаге. Измельченный материал переносят в ступку и растирают пестиком до однородной массы. Затем в ступку приливают 5 мл 1%-ного раствора HCl и смесь растирают 5 мин. Во время растирания приливают еще 15 мл 1%-ного раствора HCl. После этого содержимое ступки переносят без потерь через воронку в мерную колбу вместимостью 100 мл. Ступку и пестик несколько раз ополаскивают 2%-ным раствором щавелевой кислоты ( $C_2H_2O_4$ ), сливая его в ту же колбу. Затем объем раствора в колбе доводят щавелевой кислотой до 100 мл, смесь перемешивают и оставляют для экстракции витамина С на 10 мин.

Экстракт фильтруют через сухой складчатый бумажный фильтр в чистую колбу вместимостью 100 мл. Затем мерной пипеткой или мерным цилиндром отбирают 10 мл фильтрата, переносят его в стаканчик или колбу вместимостью 50 мл и титруют 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин. Титрование повторяют 2...3 раза, среднее значение (*a*) заносят в табл. 50.1.

Одновременно проводят контрольное титрование для учета кислот, применяемых при экстракции из растительных тканей витамина С. Для этого в сухой чистый стаканчик (или колбу) вносят 2 мл соляной и 8 мл щавелевой кислоты и титруют 2,6-дихлорфенолиндофенолом до такого же окрашивания. Результат (*b*) заносят в табл. 50.1.

Таблица 50.1. Результаты количественного определения аскорбиновой кислоты

Исследуемый материал	Масса взятой навески, г	Объем 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование раствора, мл		Содержание аскорбиновой кислоты, мг/100 г
		опытного	контрольного	
	<i>H</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>X</i>

Содержание витамина С в материале рассчитывают по формуле

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot C \cdot 100}{B \cdot H},$$

где *X* – содержание аскорбиновой кислоты в миллиграммах на 100 г исследуемого материала, мг%;

*a* – объем краски, пошедшей на титрование опытного раствора, мл;

*b* – объем краски, пошедшей на контрольное титрование, мл;

*T* – титр краски 2,6-дихлорфенолиндофенола (0,088);

*C* – объем вытяжки, полученной из взятой навески (100 мл);

*B* – объем вытяжки, взятой для титрования (10 мл);

*H* – масса навески исследуемого материала, г;

100 – коэффициент для перевода результатов на 100 г растительного материала.

Полученные данные заносят в табл. 50.2 и делают выводы.

Таблица 50.2. Содержание аскорбиновой кислоты в растительных материалах

Исследуемый материал	Содержание аскорбиновой кислоты, мг/100 г	
	Опытные данные	Литературные данные

**Материалы и оборудование:** проросшие семена злаков, хвоя ели или сосны, листья комнатных растений, клубни картофеля, яблоки, лук репчатый, капуста белокочанная или другие овощи, плоды и ягоды, электронные весы, 1%-ный HCl, 2%-ный C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола, бюретки титровальные, мерные пипетки или цилиндры на 10 мл, резиновые груши, конические мерные колбы на 100 мл, стаканчики или колбы вместимостью 50 мл для титрования, ступки с пестиками.

*Приготовление раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола:* 60 мг 2,6-дихлорфенолиндофенола переносят в мерную колбу на 200 мл,

приливают 100...150 мл теплой дистиллированной воды и 4...5 капель 0,01 н. раствора NaOH. Колбу сильно взбалтывают в течение 10 мин. После охлаждения объем раствора доводят водой до 200 мл, хорошо перемешивают и фильтруют через плотный бумажный фильтр в сухую колбу. Раствор может быть использован в течение 8 дней при хранении в холодильнике и при проверке титра в день использования. Титр краски устанавливают аскорбиновой кислотой.

### Контрольные вопросы

1. Дайте определение и приведите классификацию витаминов. Какую роль витамины выполняют в растениях, организме человека и животных? Что понимают под авитаминозом, гипо- и гипервитаминозом?
2. Какова химическая природа витамина С, из каких веществ он синтезируется? Какие функции выполняет витамин С в клетках растений, организме человека и животных? Как проявляется гипо- и авитаминоз С у человека?
3. На чем основан метод определения витамина С в данной работе?
4. Укажите содержание витамина С в плодах, ягодах, овощах, клубнях, корнеплодах и других объектах.

### Работа 51. Количественное определение каротина

**Каротин** ( $C_{40}H_{56}$ ) – пигмент оранжевого цвета, один из наиболее изученных спутников хлорофилла (см. работу 20). Каротин содержится в хлоропластах и хромопластах клеток высших растений. В хлоропластах каротин участвует в фотосинтезе – поглощает синевioletовые лучи. В хромопластах, плодов (яблоко, груш), ягод (шиповника, смородины), овощей (томата), корнеплодов (моркови, репы), клубней (картофеля) каротин может откладываться как запасное вещество и определяет их розовую или кремовую окраску.

Каротин является провитамином А – в организме человека и животных он при участии ферментов превращается в витамин А (ретинол), который образует с белком опсином светочувствительный пигмент сетчатки глаза родопсин, отвечающий за сумеречное зрение. Проявлением гиповитаминоза А является болезнь «*куруная слепота*» (снижение остроты зрения в сумерках), а проявлением авитаминоза – *ксерофтальмия* (высыхание эпителия глаз, изъязвление и ороговение глазного яблока).

Витамин А относится к группе жирорастворимых витаминов.



Содержание каротина в пище и кормах – один из важнейших показателей их качества.

Используемый в работе метод количественного определения каротина основан на его способности поглощать свет определенной длины волны. Сначала каротин извлекают из растительных объектов бензином, затем определяют оптическую плотность полученного раствора на фотоэлектроколориметре, используя синий светофильтр (в этой области находится максимум поглощения света каротиноидами).

Затем по графику определяют концентрацию пигмента в растворе. Содержание каротина в растительном материале рассчитывают по приведенной ниже формуле.

**Цель работы:** определить содержание каротина в разных частях корнеплода (флоэме, сердцевине), клубнях картофеля, листьях, ягодах или других объектах.

**Ход работы.** Корнеплоды и клубни сначала моют, очищают, а затем измельчают на терке. Листья измельчают ножом или ножницами. Берут навеску 0,5...1,0 г, без потерь переносят ее в ступку и растирают с кварцевым песком до однородного состояния. Затем в ступку приливают 10 мл бензина и продолжают растирать еще несколько минут.

Смесь настаивают 15 мин для извлечения каротина (бензин окрашивается в яркий оранжевый цвет).

В мерный цилиндр на 50 мл устанавливают воронку, в которую вкладывают складчатый бумажный фильтр. Затем специальной пипеткой с расширением набирают надосадочную жидкость, не захватывая осадок, и переносят в несколько приемов на фильтр, не допуская потерь.

К оставшейся в ступке массе прибавляют еще 5...10 мл бензина, снова растирают и после 5-минутного отстаивания надосадочную жидкость снова переносят на фильтр.

Извлечение каротина производят небольшими порциями бензина до полного обесцвечивания растительного материала в ступке.

Затем ступку, пестик и фильтр обмывают небольшими порциями бензина, используя ту же пипетку, до полного исчезновения окраски.

Объем вытяжки доводят прибавлением бензина до 25...30 мл.

После этого определяют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре КФК-2 (см. работу 13), устанавливая синий светофильтр.

Зная оптическую плотность раствора, определяют концентрацию в нем каротина по калибровочной кривой.

Содержание каротина в навеске рассчитывают по формуле:

$$P = \frac{C \cdot B}{H \cdot 10},$$

где  $P$  – содержание каротина, мг/100 г;

$C$  – концентрация каротина, мг/л;

$B$  – объем полученной вытяжки, мл;

$H$  – масса навески растительного материала, г.

Все полученные данные заносят в табл. 51.1.

Таблица 51.1. **Определение содержания каротина**

Объект	Масса навески $A$ , г	Объем вытяжки $B$ , мл	Оптическая плотность раствора	Концентрация раствора по калибровочной кривой $C$ , мг/л	Содержание каротина $P$ , мг/100 г

Результаты, полученные во всех вариантах опыта, заносят в сводную таблицу и делают выводы.

Более точно содержание каротина в растительном материале можно определить по методике, описанной в работе 22 (п. 2). При этом оптическую плотность раствора определяют на спектрофотометре при длине волны 440,5 нм, а концентрацию и содержание каротина рассчитывают по приведенным в работе формулам.

**Материалы и оборудование:** корнеплоды моркови, клубни картофеля, ягоды красной смородины, желтоплодного томата, листья растений, терка, весы, шпатель, ступки с пестиками, воронки, бумажные фильтры, бензин, пипетки для переноса вытяжки, мерные цилиндры на 50 мл.

### Контрольные вопросы

1. Какая связь существует между каротином и витамином А?
2. Какова роль витамина А в обмене веществ человека? Как проявляется гипо- и авитаминоз А?
3. На чем основан метод количественного определения каротина в растительных объектах? Изложите методику выделения каротина из материала, определения оптической плотности раствора, расчета концентрации и содержания.
4. Назовите источники и содержание в них каротина и витамина А.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Викторов, Д. П. Практикум по физиологии растений / Д. П. Викторов; под общ. ред. А. А. Землянухина. – Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 1991. – 157 с.
2. Журбицкий, З. И. Теория и практика вегетационного метода / З. И. Журбицкий. – Москва: Наука, 1968. – 260 с.
3. Лебедев, С. И. Физиология растений: учебник для студентов вузов / С. И. Лебедев. – Изд. 3-е, перераб. и доп. – Москва: Агропромиздат, 1988. – 544 с.
4. Летние практические занятия по физиологии растений. Полевая практика / Ф. Д. Сказкин [и др.]; под ред. М. С. Миллер. – Изд. 3-е, перераб. – Москва: Просвещение, 1973. – 208 с.
5. Методы биохимических исследований / под ред. А. И. Ермакова. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: Колос, 1972. – 456 с.
6. Плешков, Б. П. Биохимия сельскохозяйственных растений: учебник для студентов вузов / Б. П. Плешков. – Изд. 5-е, перераб. и доп. – Москва: Агропромиздат, 1987. – 486 с.
7. Тарасенко, С. А. Физиология и биохимия растений. Практикум: учеб. пособие / С. А. Тарасенко, Е. И. Дорошкевич. – Гродно: ГГАУ, 2004. – 210 с.
8. Практикум по физиологии растений: учеб. пособие / Н. Н. Третьяков [и др.]; под ред. Н. Н. Третьякова. – Москва: Колос, 2003. – 288 с.
9. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений: учеб. пособие / Н. Н. Третьяков [и др.]; под ред. Н. Н. Третьякова. – Изд. 2-е. – Москва: Колос, 2005. – 656 с.
10. Методы биохимического анализа растений / под ред. В. В. Полевого, Г. Б. Максимова. – Ленинград: Изд-во ЛГУ, 1978. – 192 с.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
Раздел 1. ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ.....	4
Работа 1. Проницаемость живой и мертвой протоплазмы.....	8
Работа 2. Влияние ионов калия и кальция на состояние протоплазмы.....	12
Работа 3. Обнаружение редуцирующих сахаров в репродуктивных органах растений.....	13
Работа 4. Определение кислотного числа жиров.....	17
Работа 5. Определение изоэлектрической точки белка.....	20
Работа 6. Обнаружение дегидрогеназ в растительных тканях.....	23
Работа 7. Газометрическое определение активности каталазы.....	26
Работа 8. Обнаружение пероксидазы у растений.....	32
Работа 9. Влияние температуры на гидролиз крахмала амилазами.....	34
Раздел 2. ВОДНЫЙ ОБМЕН РАСТЕНИЙ.....	39
Работа 10. Определение содержания воды и сухого вещества в растительном материале.....	40
Работа 11. Получение полупроницаемой перепонки и наблюдение явлений осмоса.....	44
Работа 12. Явления плазмолиза и деплазмолиза в растительной клетке.....	46
Работа 13. Определение водного потенциала растительных тканей с помощью рефрактометра (по Н. А. Максимову и Н. С. Петинovu).....	50
Работа 14. Определение осмотического потенциала клеточного сока методом плазмолиза.....	58
Работа 15. Влияние света и влажности воздуха на транспирацию.....	60
Работа 16. Определение интенсивности транспирации по методу Л. А. Иванова (с помощью торсионных весов).....	64
Работа 17. Определение интенсивности транспирации объемным методом (в модификации В. П. Моисеева).....	66
Работа 18. Определение относительной транспирации.....	69
Работа 19. Определение водного дефицита растений.....	71
Раздел 3. ФОТОСИНТЕЗ.....	74
Работа 20. Строение и химические свойства пигментов зеленого листа.....	76
Работа 21. Оптические свойства пигментов.....	81
Работа 22. Количественное определение пигментов в листьях растений.....	84
Работа 23. Определение интенсивности видимого и истинного фотосинтеза.....	91
Работа 24. Определение чистой продуктивности фотосинтеза.....	96
Раздел 4. ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ.....	101
Работа 25. Определение интенсивности дыхания семян по расходу органических веществ.....	103
Работа 26. Влияние температуры на интенсивность дыхания.....	105
Работа 27. Определение величины дыхательного коэффициента семян зерновых и масличных культур.....	109
Раздел 5. МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ РАСТЕНИЙ.....	113
Работа 28. Влияние отдельных элементов минерального питания на рост и развитие растений.....	114
Работа 29. Определение общей и рабочей адсорбирующей поверхности корней методом Д. А. Сабинина и И. И. Колосова.....	120

Работа 30. Влияние концентрации раствора нитрата аммония на прорастание семян .....	124
Работа 31. Антагонизм ионов .....	126
Раздел 6. РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ .....	128
Работа 32. Влияние света на рост растений .....	130
Работа 33. Влияние температуры на рост растений .....	132
Работа 34. Влияние гетероауксина на рост корней .....	134
Работа 35. Влияние гетероауксина на укоренение черенков ягодных и овощных культур .....	138
Работа 36. Обнаружение углеводов при прорастании семян масличных культур .....	140
Раздел 7. ПРИСПОСОБЛЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ .....	142
Работа 37. Влияние температуры на прорастание семян .....	143
Работа 38. Защитное действие сахара на протоплазму при замораживании .....	144
Работа 39. Определение солеустойчивости растений .....	147
Раздел 8. ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ФОРМИРОВАНИЯ КАЧЕСТВА УРОЖАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР .....	149
Работа 40. Определение содержания белка в зерне злаковых и бобовых культур по биуретовой реакции .....	151
Работа 41. Определение содержания клейковины в зерне хлебных злаков .....	154
Работа 42. Определение качества клейковины .....	157
Работа 43. Колориметрический метод определения сахаров .....	161
Работа 44. Определение содержания крахмала поляриметрическим методом .....	163
Работа 45. Определение содержания масла в семенах с помощью рефрактометра (по А. И. Ермакову) .....	169
Работа 46. Быстрый рефрактометрический метод определения йодного числа масел .....	171
Работа 47. Определение содержания органических кислот .....	173
Работа 48. Обнаружение алкалоидов в растениях .....	176
Работа 49. Обнаружение дубильных веществ в растениях .....	178
Работа 50. Количественное определение витамина С (аскорбиновой кислоты) .....	180
Работа 51. Количественное определение каротина .....	184
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК .....	187

У ч е б н о е и з д а н и е

**Моисеев** Виктор Потапович  
**Дуктова** Наталья Александровна  
**Мыхлык** Алеся Ивановна

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

ПРАКТИКУМ

Учебно-методическое пособие

Редактор *Е. П. Савиц*  
Технический редактор *Н. Л. Якубовская*

Подписано в печать 27.12.2023. Формат 60×84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная.  
Ризография. Гарнитура «Таймс». Усл. печ. л. 11,16. Уч.-изд. л. 10,07.  
Тираж 60 экз. Заказ .

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».  
Свидетельство о ГРИИРПИ № 1/52 от 09.10.2013.  
Ул. Мичурина, 13, 213407, г. Горки.

Отпечатано в УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».  
Ул. Мичурина, 5, 213407, г. Горки.