

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
Высшего профессионального образования  
«Саратовский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского»

# П Р А К Т И К У М ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Саратов  
2015

**Касаткин М.Ю., Коробко В.В., Степанов С.А.**  
**Практикум по физиологии растений: учебное пособие для студентов**  
**биологического факультета, направление подготовки 06.03.01 Биология**

Практикум включает лабораторные работы по основным разделам программы: физиологии растительной клетки, водообмену, фотосинтезу, минеральному питанию, превращению веществ, дыханию, росту и развитию, устойчивости растений к неблагоприятным внешним условиям. Для каждой работы дан перечень материалов и оборудования, описана методика выполнения работы.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.Чернышевского

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Общие методические указания .....	3
<b>Физиология растительной клетки</b> .....	5
Работа 1. Явление плазмолиза и деплазмолиза .....	5
Работа 2. Определение вязкости цитоплазмы по времени плазмолиза .....	6
Работа 3. Влияние ионов калия и кальция на вязкость цитоплазмы .....	7
Работа 4. Накопление нейтрального красного в молодых и старых клетках .....	8
Работа 5. Определение осмотического давления клеточного сока плазмолитическим методом (по Де Фризу) .....	8
Работа 6. Проницаемость разновозрастных клеток для мочевины .....	10
Работа 7. Определение изоэлектрической точки растительных тканей колориметрическим методом .....	11
<b>Водный режим растений</b> .....	13
Работа 8. Влияние концентрации раствора на прорастание семян .....	13
Работа 9. Наблюдение за перераспределением калия при движении устьиц .....	14
Работа 10. Определение интенсивности транспирации весовым методом .....	15
Работа 11. Водообмен ветки сосны .....	17
<b>Фотосинтез</b> .....	18
Работа 12. Пигменты зеленого листа .....	18
Работа 13. Разделение пигментов методом бумажной хроматографии .....	21
Работа 14. Оптические свойства пигментов .....	22
Работа 15. Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла .....	24
Работа 16. Определение содержания хлорофилла в листьях .....	25
<b>Минеральное питание растений</b> .....	26
Работа 17. Водные культуры черенков традесканции .....	26
Работа 18. Смещение pH питательного раствора корневой системой растений ...	28
Работа 19. Физиологически кислые и щелочные соли растений .....	29
Работа 20. Определение общей и рабочей адсорбирующей поверхности корневой системы методом Сабина и Колосова .....	30
Работа 21. Микрхимический анализ золы .....	32
<b>Превращение органических веществ</b> .....	34
Работа 22. Обнаружение амилазы в прорастающих семенах .....	34
Работа 23. Определение активности амилаз в прорастающих семенах .....	35
Работа 24. Кислотный гидролиз крахмала .....	37
Работа 25. Получение шкалы гидролиза крахмала амилазой при разных температурах .....	38
Работа 26. Обнаружение запасных сахаров в растительном материале .....	39
<b>Дыхание растений</b> .....	41
Работа 27. Потеря сухого вещества при прорастании семян .....	41
Работа 28. Определение дыхательного коэффициента прорастающих семян ....	42
Работа 29. Определение интенсивности дыхания по количеству выделенной углекислоты (по Бойсен-Иенсену) .....	43
Работа 30. Определение содержания аскорбиновой кислоты, глутатиона и общей редуцирующей активности растительной ткани методом Петта в модификации Прокошева .....	44
<b>Рост и развитие растений</b> .....	47
Работа 31. Учёт роста методом меток .....	47
Работа 32. Полярность черенков .....	49

Работа 33. Влияние индолилуксусной кислоты (ИУК) на укоренение черенков .....	49
Работа 34. Влияние гетероауксина на рост корней .....	50
Работа 35. Хемотропизм корней (по Ф.М.Породко) .....	51
Работа 36. Действие света на рост растений .....	52
Работа 37. Биологический контроль за ростом и развитием растений ( по Куперман) .....	53
<b>Устойчивость растений</b> .....	55
Работа 38. Защитное действие сахара на цитоплазму при замораживании .....	55
Работа 39. Влияние высокой температуры на проницаемость цитоплазмы .....	56
Работа 40. Определение жаростойкости растений (по Ф.Ф.Мацкову) .....	57
Работа 41. Диагностика засухоустойчивости и жаростойкости растений по изменению содержания статолитного крахмала .....	58
Приложение .....	60

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

# ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

## Работа 1. Явление плазмолиза и деплазмолиза

**Материалы и оборудование:** 1) луковица синего лука или листья традесканции; 2) 1 М раствор сахарозы в капельнице; 3) лезвие бритвы; 4) препаровальная игла; 5) скальпель; 6) микроскоп; 7) предметные и покровные стекла; 8) стеклянная палочка; 9) стакан с водой; 10) кусочки фильтровальной бумаги; 11) спиртовка; 12) пинцет; 13) спички.

**Объяснение.** Растительную клетку можно рассматривать как осмотическую систему, в которой роль раствора осмотически действующих веществ играет клеточный сок, а роль полупроницаемой плёнки – цитоплазматические мембраны. Клеточный сок, как и любой раствор, обладает потенциальным осмотическим давлением, которое прямо пропорционально числу частиц в единице объема независимо от размеров и характера этих частиц (молекулы, ионы). Раствор, отделенный от чистой воды полупроницаемой плёнкой (пропускающей воду и непроницаемой для растворенных веществ), поглощает воду с силой, численно равной его потенциальному осмотическому давлению, т.е. давлению, которое нужно приложить, чтобы воспрепятствовать передвижению воды в сторону раствора.

Для растительной клетки можно подобрать следующие растворы: 1) гипотонический, осмотическое давление которого меньше осмотического давления клеточного сока; 2) изотонический, имеющий осмотическое давление, равное осмотическому давлению клеточного сока; 3) гипертонический, осмотическое давление которого больше, чем давление клеточного сока.

При погружении клетки в гипертонический раствор вода из неё выходит наружу до выравнивания осмотических давлений клеточного сока и внешнего раствора. При этом клетка претерпевает следующие изменения: сначала она сокращается, а после полной потери тургора протопласт отстает от клеточной стенки по углам (угловой плазмолиз), затем во многих местах (вогнутый плазмолиз) и, наконец, протопласт округляется (выпуклый плазмолиз). Образующееся пространство между протопластом и клеточной стенкой (хорошо проницаемой как для воды, так и для растворенных веществ) заполняется внешним раствором. В качестве плазмолитиков (веществ, растворы которых вызывают плазмолиз) используют неядовитые вещества, плохо проникающие или не проникающие через цитоплазму в вакуоль.

Плазмолиз – обратимый процесс. Исчезновение плазмолиза называется деплазмолизом.

**Ход работы.** Сделать бритвой срез эпидермиса, клетки которого содержат антоциан. Во избежание повреждения клеток эпидермиса желательно, чтобы срезы состояли из двух слоев клеток.

Поместить срез в каплю воды на предметное стекло, накрыть покровным стеклом и рассмотреть в микроскоп клетки с окрашенным клеточным соком.

Затем заменить воду на 1 М раствор сахарозы, для чего нанести на предметное стекло рядом с покровным стеклом большую каплю раствора и убрать воду кусочком фильтровальной бумаги, прикладывая его с другой стороны покровного стекла. Повторить этот прием 2-3 раза до полной замены воды раствором. Все время следить в микроскоп за тем, что происходит в клетках.

Через 15-20 мин, когда плазмолиз будет хорошо заметен, ввести под покровное стекло каплю воды, убирая раствор фильтровальной бумагой, и вновь наблюдать за изменениями, происходящими в клетках.

Приготовить второй срез эпидермиса, поместить его в большую каплю воды на предметное стекло и убить клетки, нагревая препарат на пламени спиртовки (нагревать следует осторожно, не допуская полного испарения воды). Убрать воду фильтровальной бумагой, нанести на срез каплю 1 М раствора сахарозы, закрыть покровным стеклом и, рассматривая препарат в микроскоп, установить, происходит ли плазмолиз.

Записать результаты наблюдений и сделать схематические рисунки клеток в воде и после пребывания в растворе, обозначив основные составные части клеток и показав стрелками процессы плазмолиза и деплазмолиза. Сделать выводы, ответив на следующие вопросы:

1. Что такое плазмолиз и каковы его причины?
2. Как происходит деплазмолиз?
3. Способны ли плазмолизироваться мертвые клетки?

## Работа 2. Определение вязкости цитоплазмы по времени плазмолиза

**Материалы и оборудование:** 1) веточки элодеи (*Elodea densa*); 2) луковица синего лука или листья традесканции; 3) 0,8 М раствор сахарозы в капельнице; 4) лезвие бритвы; 5) препаровальная игла; 6) пинцет; 7) микроскоп; 8) предметные и покровные стекла.

**Объяснение.** Промежуток времени от момента погружения клеток в гипертонический раствор до появления выпуклого плазмолиза называют временем плазмолиза. Время плазмолиза зависит от вязкости цитоплазмы: чем меньше вязкость, тем легче цитоплазма отстает от клеточной оболочки и тем быстрее вогнутый плазмолиз переходит в выпуклый. Вязкость цитоплазмы определяется степенью дисперсности и гидратации коллоидов, содержанием в клетке воды и рядом других факторов. Цитоплазма растущих клеток и клеток, закончивших рост, имеет разную вязкость.

Для опыта используют молодые листочки элодеи, в которых можно различить четыре зоны: в основании расположена слабо окрашенная зона деления клеток, выше находится зона растяжения, над ней — зона дифференцировки и, наконец, верхушка листа, состоящая из клеток, закончивших свой рост и имеющих интенсивно зеленую окраску. Для сравнения рекомендуется проделать опыт с объектом, клетки которого имеют окрашенный клеточный сок.

**Ход работы.** Взять 2—3 молодых листочка из верхушечной части побега элодеи (листья должны иметь зеленый кончик и бледно-зеленое основание), погрузить в каплю 0,8 М раствора сахарозы на предметном стекле и закрыть покровным стеклом. В другую каплю раствора сахарозы поместить срез эпидермиса синего лука или традесканции. Отметить время погружения исследуемых объектов в раствор. Рассматривая препараты в микроскоп через каждые 5 мин, определить время плазмолиза, причем у листа элодеи следует наблюдать за клетками различных зон.

Записать результаты и сделать вывод о зависимости вязкости цитоплазмы от возраста клетки.

### Работа 3. Влияние ионов калия и кальция на вязкость цитоплазмы

**Материалы и оборудование:** 1) луковица синего лука или листья традесканции; 2) растворы 1М  $KNO_3$  и 0,7М  $Ca(NO_3)_2$  в капельницах; 3) лезвие бритвы; 4) препаровальная игла; 5) микроскоп; 6) предметные и покровные стекла; 7) тонкая стеклянная трубочка; 8) спиртовка; 9) карандаш по стеклу; 10) вазелин; 11) спички.

**Объяснение.** Наружный слой цитоплазмы (плазмалемма) значительно более проницаем, чем расположенный на границе с клеточным соком тонопласт. Ионы минеральных солей способны проникать через плазмалемму в мезоплазму, вызывая изменения ее коллоидных свойств, в том числе вязкости. О вязкости цитоплазмы можно судить по форме плазмолизированного протопласта: при большой вязкости она с трудом отстает от оболочки, образуя в течение длительного времени вогнутые поверхности (вогнутый плазмолиз), если же вязкость цитоплазмы мала, то вогнутый плазмолиз быстро переходит в выпуклый.

**Ход работы.** Нанести на предметные стекла по капле растворов  $KNO_3$  и  $Ca(NO_3)_2$  (сделать на стеклах соответствующие надписи). Поместить в растворы по кусочку эпидермиса с окрашенным клеточным соком и закрыть покровными стеклами. Во избежание испарения смазать края покровных стекол разжиженным вазелином: набрать в стеклянную трубочку немного вазелина, подогреть на пламени спиртовки и осторожно капать по краям покровного стекла. Рассмотреть препараты в микроскоп и зарисовать наиболее характерные клетки (при этом не следует принимать во внимание периферическую зону, так как там свойства цитоплазмы клеток могут быть изменены вследствие механического раздражения).

Сделать вывод о влиянии ионов калия и кальция на свойства коллоидов цитоплазмы.

#### Работа 4. Накопление нейтрального красного в молодых и старых клетках

**Материалы и оборудование:** 1) веточки элодеи; 2) 0,02%-й раствор нейтрального красного; 3) пинцет; 4) стаканчик ; 5) фарфоровая чашка; 6) предметное стекло; 7) цветные карандаши.

Мембраны молодых и старых клеток обладают разной проницаемостью. В этом можно убедиться, сравнивая окрашиваемость нейтральным красным нижних (взрослых) и верхних (растущих) листьев одного побега, а также различных зон молодого листа.

**Ход работы.** Поместить побег элодеи в стаканчик с раствором нейтрального красного. Через 1-2 ч вынуть побег из раствора и смыть избыток краски водой. Отрывая пинцетом листья один за другим, разложить их на предметном стекле, располагая от старых (нижних) к молодым. Рассмотреть листья на белом фоне и зарисовать, раскрасив цветными карандашами.

Сделать вывод об изменении проницаемости клеточных мембран при переходе от молодых растущих клеток к взрослым, закончившим рост.

#### Работа 5. Определение осмотического давления клеточного сока плазмолитическим методом (по Де Фризу)

**Материалы и оборудование:** 1) луковица синего лука или листья традесканции; 2) 1 М раствор NaCl или сахарозы; 3) дистиллированная вода; 4) бюретки с воронками (2 шт.); 5) часовое стекло; 6) баночки или тигельки для растворов (7 шт.); 7) крышки или стекло для закрывания баночек (7 шт.); 8) микроскоп; 9) предметные и покровные стекла; 10) скальпель; 11) лезвие безопасной бритвы; 12) препаровальная игла; 13) кисточка; 14) стеклянная палочка; 15) стакан с кипяченой водой; 16) кусочки фильтровальной бумаги; 17) карандаш по стеклу; 18) термометр комнатный.

**Объяснение.** Давление, которое способен развивать раствор, всасывая воду через полупроницаемую плёнку, называют осмотическим. Величина осмотического давления какого-либо раствора прямо пропорциональна его концентрации (числу частиц, растворенных в единице объема) и абсолютной температуре. Концентрацию клеточного сока, представляющего собой раствор большого количества разнообразных органических и минеральных веществ, чаще всего определяют по величине его осмотического давления. Наиболее простой метод определения осмотического давления клеточного сока - плазмолитический. Известно, что плазмолиз способны вызывать только гипертонические растворы, тогда как в изо- и гипотонических растворах плазмолиз не наблюдается.

Для определения осмотического давления клеточного сока плазмолитическим методом срезы исследуемой ткани погружают в ряд растворов известной концентрации. В качестве плазмолитика обычно используют сахарозу, однако хорошие результаты можно получить и с растворами хлористого натрия. Находят такой раствор, который вызывает начальный (уголковый) плазмолиз не менее чем у 50% клеток погруженного в раствор кусочка исследу-



дуемой ткани. Изотонический раствор будет находиться между этим раствором и следующим (более слабым), который не вызывает плазмолиза. Отсюда следует, что концентрация изотонического раствора равна (с известной долей погрешности) среднему арифметическому между концентрациями указанных соседних растворов.

Установив концентрацию изотонического раствора, вычисляют осмотическое давление по уравнению Вант-Гоффа:

$$P = RTCi,$$

где  $P$  — осмотическое давление, атм;

$R$  — универсальная газовая постоянная (0,0821 л·атм/ моль·град);

$T$  — абсолютная температура по Кельвину ( $273^{\circ}$  + комнатная);

$C$  — концентрация раствора, М;

$i$  — изотонический коэффициент.

Для неэлектролитов, например для сахарозы,  $i = 1$ . Для растворов электролитов величина  $i$  зависит от числа ионов, на которые распадается молекула, и от степени диссоциации.

Значения  $i$  для растворов NaCl даны в табл. 1.

Таблица 1

Концентрация NaCl, М	1,0	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,01
Изотонический коэффициент	1,62	1,64	1,66	1,68	1,70	1,73	1,75	1,78	1,83	1,93

**Ход работы.** Приготовить растворы NaCl или сахарозы концентраций 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 и 0,1 М, наливая в баночки, снабженные надписями, из бюреток соответствующие количества молярного раствора и дистиллированной воды (например, для приготовления 10 мл раствора 0,7 М нужно взять 7 мл 1 М раствора и 3 мл воды, для 0,6 М - 6 мл 1 М раствора и 4 мл воды и т. д.). Тщательно перемешав растворы, закрыть баночки крышками или кусочками стекла для защиты от испарения.

Приготовить при помощи бритвы 14 срезов исследуемой ткани, например кожицы синего лука, и поместить их в воду на часовое стекло (вода должна быть кипяченая, чтобы не было пузырьков воздуха). При погружении в воду удаляется сок, вытекающий из поврежденных клеток, и достигается одинаковое состояние всех срезов. Через несколько минут кисточкой извлечь из воды срезы, обсушить их фильтровальной бумагой и погрузить по 2 среза в каждый раствор, начиная с самого концентрированного. При этом необходимо следить за тем, чтобы срезы не плавали на поверхности, а были погружены в растворы (если срез всплывает, его следует «утопить» при помощи препаровальной иглы). Через 20—30 мин рассмотреть срезы в микроскоп в капле соответствующего раствора в той же последовательности. Стекланную палочку, которой наносилась капля раствора, кисточку, стекла после каждого раствора

необходимо ополаскивать водой и вытирать салфеткой или фильтровальной бумагой.

Результаты опыта оформить, заполняя табл. 2.

Во второй строке указать, в каком состоянии находится большинство клеток среза, в третьей строке схематически зарисовать одну клетку, характерную для данного среза.

Таблица 2

Концентрация раствора, М	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Степень плазмолиза							
Рисунок клетки							

Найти изотоническую концентрацию и вычислить осмотическое давление клеточного сока по уравнению Вант-Гоффа.

Сделать вывод о связи между концентрацией наружного раствора и степенью плазмолиза клеток.

### Работа 6. Проницаемость разновозрастных клеток для мочевины

**Материалы и оборудование:** 1) веточки элодеи; 2) 1 М раствор мочевины (60 г/л) в капельнице; 3) микроскоп; 4) предметные и покровные стекла; 5) пинцет; 6) препаровальная игла; 7) кусочки фильтровальной бумаги; 8) вазелин.

**Объяснение.** Проницаемостью называют скорость проникновения вещества через мембрану. Проницаемость цитоплазматических мембран для большинства растворенных веществ очень мала, но некоторые вещества, в том числе мочевины, проникают через мембраны довольно быстро.

При погружении растительных клеток в гипертонический раствор мочевины наблюдается плазмолиз вследствие отнятия воды от клеток. Однако при длительном пребывании в этом растворе молекулы плазмолитика проникают в клеточный сок, концентрация которого увеличивается, в результате чего вода вновь поступает в клетки. Происходит самопроизвольный деплазмолиз; промежуток времени от погружения в раствор до окончания деплазмолиза можно использовать для определения проницаемости цитоплазмы для мочевины.

**Ход работы.** Нанести на предметное стекло большую каплю 1 М раствора мочевины и погрузить в него не закончивший рост листочек элодеи из верхней части побега, отметив время. Накрыть препарат покровным стеклом и сразу начать наблюдение в микроскоп. Отметить разную скорость наступления выпуклого плазмолиза в нижней (растущей) и верхней частях листа, что свидетельствует о неодинаковой вязкости цитоплазмы клеток.

Продолжать наблюдение еще в течение 15—20 мин. Следить за тем, чтобы раствор мочевины не подсыхал, вводя время от времени под покровное стекло новые капли (или смазав края покровного стекла вазелином). Отметить время наступления самопроизвольного деплазмолиза в клетках разных зон листа.

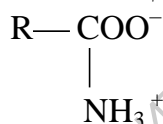
Ответить на следующие вопросы:

1. Каковы причины самопроизвольного деплазмолиза?
2. Как объяснить неодинаковую скорость деплазмолиза в клетках разных зон листа?
3. Существует ли связь между проницаемостью цитоплазмы и ее вязкостью?

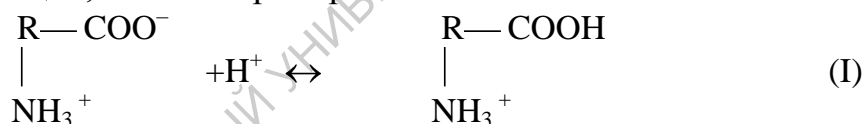
Работа 7. **Определение изоэлектрической точки растительных тканей колориметрическим методом**

**Материалы и оборудование:** 1) пророщенные семена фасоли или гороха; 2) 0,1М раствор лимонной кислоты; 3) 0,2 М раствор  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 4) 0,1 %-й раствор эозина; 5) 0,02%-й раствор метиленового синего; 6) 70%-й раствор этилового спирта; 7) лезвие безопасной бритвы; 8) бюксы; 9) фарфоровые чашки; 10) кисточка; 11) препаровальная игла; 12) микроскоп; 13) предметные и покровные стекла.

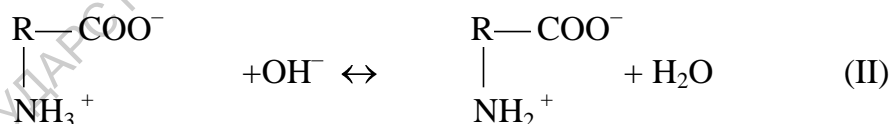
**Объяснение.** Аминокислоты и белки цитоплазмы—амфотерные вещества. В растворе они диссоциируют и как кислоты, и как основания. Белки и аминокислоты схематично можно представить в следующем виде:



Чем выше концентрация водородных ионов в среде, тем более подавлена кислотная диссоциация, и белок приобретает больший положительный заряд.



Чем больше концентрация гидроксильных ионов, тем в большей степени подавлена основная диссоциация, и белок приобретает больший отрицательный заряд.



При определенной величине pH среды диссоциация по уравнениям I и II подавлена в одинаковой степени. Количество положительных и отрицательных зарядов уравнивается. Амфолит (т.е. молекула амфотерного соединения в состоянии диссоциации) становится электронейтральным. Данное значение pH среды называют изоэлектрической точкой (ИЭТ).

Каждый амфолит имеет свою величину ИЭТ. У белков и аминокислот она зависит от количества свободных кислотных (карбоксильных), основных (аминных) групп. Зная ИЭТ белков, можно судить о соотношении в их составе кислых и основных аминокислот. В тех случаях, когда в растворе амфотерного соединения диссоциация идет по типу основания (в средах с pH ниже ИЭТ), положительный заряд будет связывать анионы. Если диссоциация идет по кислотному типу (в средах с pH выше ИЭТ), отрицательный заряд связывает кати-

оны.

Для определения изоэлектрической точки растительной ткани применяют кислый краситель эозин, у которого розовой окраской обладает анион, и основной краситель метиленовый синий (МС), цвет которого обусловлен катионом. При окрашивании амфотерного соединения этими красками и погружении в среды, рН которых ниже ИЭТ, связываются преимущественно анионы эозина. Поэтому раствор приобретает розовую окраску. В среде, где рН выше ИЭТ, амфолит удерживает катион метиленового синего и окрашивается в синий цвет. В среде с рН, равным ИЭТ, окраска амфолита будет промежуточной между розовой и синей—фиолетовой, так как в этом случае количество отрицательных и положительных зарядов одинаково.

В цитоплазме содержится смесь растворов амфотерных соединений, поэтому переходная зона между розовой и синей окраской будет соответствовать более или менее широкому интервалу рН.

**Ход работы.** В бюксах готовят по 10 мл буферных растворов со следующими значениями рН: 2,2; 3,0; 3,6; 5,0; 5,4; 6,0; 7,0; 8,0 (в соответствии с табл.1).

Таблица 1

**Приготовление буферных растворов с различным рН**

Номер пробирки	рН	0,2 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , мл	0,1 М лимонная кислота, мл
1	2,2	0,2	9,8
2	3,0	2,05	7,95
3	3,6	3,22	6,78
4	5,0	5,15	4,85
5	5,4	5,57	4,43
6	6,0	6,31	3,69
7	7,0	8,23	1,77
8	8,0	9,72	0,28

На расстоянии 0,5 см от кончика корня гороха бритвой делают строго поперечные срезы (не менее 24) и помещают их в фарфоровую чашку с 70%-м раствором этилового спирта на 5 мин.

В одну фарфоровую чашку наливают 2 - 3 мл 0,1%-го раствора эозина, в другую — столько же 0,02 %-й метиленового синего. Из спирта срезы кисточкой переносят в раствор эозина на 10 мин. При этом наблюдается окраска срезов в розовый цвет. Затем срезы без промывания помещают из эозина в раствор МС также на 10 мин; срезы окрашиваются в синий цвет.

Результаты опыта записывают по форме (табл.2).

Таблица 2

**Окраска растительной ткани в зависимости от рН буферного раствора**

Номер бюкса	рН буферного раствора	Окраска ткани		ИЭТ	
		кора	ксилема	кора	ксилема
1	2,2				
2	3,0				
3	3,6				
4	5,0				
5	5,4				
6	6,0				
7	7,0				
8	8,0				

Окрашенные срезы кисточкой переносят в буферные растворы с различной концентрацией водородных ионов - по три среза в каждый. В буферных растворах их выдерживают в течение 1 - 2 ч. Затем срезы вынимают, размещают на предметном стекле в определенном порядке и рассматривают под микроскопом при малом увеличении. В растворах с рН ниже ИЭТ окраска ткани будет розовой; при рН выше ИЭТ—синей. Переход окраски (фиолетовый цвет) будет указывать на то, что рН внешнего раствора соответствует ИЭТ ткани. Изoeлектрическая точка для коры и ксилемы будет неодинакова (переход окраски от розовой к синей будет наблюдаться при разном рН). Следовательно, состав цитоплазмы в клетках этих тканей различен.

**ВОДНЫЙ РЕЖИМ РАСТЕНИЙ****Работа 8. Влияние концентрации раствора на прорастание семян**

**Материалы и оборудование:** 1) семена пшеницы или других растений; 2) 1,0; 0,1 и 0,01 М растворы NaCl; 3) бюретки с воронками (4 шт.); 4) весы технические; 5) разновесы; 6) разборная доска; 7) пинцет; 8) чашки Петри (4 шт.); 9) чистый сухой песок; 10) бумага; 11) клей; 12) пинцет; 13) миллиметровая линейка.

**Объяснение.** Прорастание семян и рост проростков зависят от условий водоснабжения. Одним из факторов, влияющих на поступление воды в растение, является концентрация солей в почве, точнее, разность между осмотическими давлениями клеточного сока и почвенного раствора. Для понимания результатов данного опыта нужно иметь в виду, что осмотическое давление клеточного сока у молодых проростков обычно не превышает 10 атм.

**Ход работы.** Насыпать в четыре чашки Петри по 50 г песка, снабдить чашки этикетками и смочить песок в первой чашке 10 мл 1М раствора NaCl, во второй-10 мл 0,1 М раствора NaCl, в третьей-10 мл 0,01 М раствора NaCl, в четвертой-10 мл воды. Отобрать 4 порции (по 50 штук в каждой) неповрежденных и по возможности одинаковых семян. Поместить их в чашки Петри, разло-

жив равномерно по поверхности песка. Закрывать чашки крышками и поставить в теплое место.

Через неделю подсчитать количество проросших семян. Определить размеры проростков, для чего взять из каждой чашки 10 проростков (по ряд, не выбирая), измерить длину надземных частей и корней (при наличии нескольких корней у одного проростка выбрать самый длинный) и найти среднее арифметическое всех 10 измерений.

Вычислить осмотическое давление растворов по формуле  $P=RTC_i$  (величина изотонических коэффициентов приведена в работе 5).

Результаты записать в табл. 1.

Таблица 1

Название растения	Концентрация раствора, М	Осмотическое давление, атм	Количество проросших семян, шт.	Длина, мм	
				побега	корня

Сделать выводы о причинах различного прорастания семян в растворах разной концентрации.

### Работа 9. Наблюдение за перераспределением калия при движении устьиц

**Материалы и оборудование:** 1) растения традесканции или семи-десятидневные проростки овса, кукурузы, бобов и других сельскохозяйственных культур; 2) среда инкубации; 3) бидистиллированная вода; 4) 50%-й глицерин; 5) насыщенный раствор сульфида аммония; 6) ледяная уксусная кислота; 7) микроскоп; 8) предметные и покровные стекла; 9) сосуд со снегом или льдом; 9) лезвие безопасной бритвы; 10) чашки Петри; 11) мерная колба; 12) бюкс; 13) стеклянные палочки.

**Приготовление среды инкубации.** Растворяют 20 г нитрата кобальта и 35г нитрата натрия в 75 мл подкисленной бидистиллированной воды (10 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 75 мл бидистиллятом). Смесь фильтруют и доводят бидистиллятом до 100 мл. Работать лучше со свежеприготовленной смесью. При необходимости ее можно хранить в холодильнике в течение месяца.

**Объяснение.** Движение устьиц обусловлено особенностями их анатомического строения. Устьица состоят из двух замыкающих клеток полулунной или бобовидной формы, внутренние стенки которых утолщены. При насыщении замыкающих клеток водой наружные стенки сильно растягиваются, кривизна замыкающих клеток увеличивается и устьичная щель открывается. В случае потери воды замыкающие клетки выпрямляются и устьичные щели закрываются. В основе динамики тургора замыкающих клеток лежит изменение их осмотического давления.

Согласно «крахмальной» теории устьичной регуляции, господствовавшей в науке на протяжении многих десятилетий, изменение осмотического давления происходит за счет обратимых превращений в системе крахмал-сахар. Однако в последнее время достаточно убедительно показано, что ведущую роль в этом процессе играет работа калиевых ионных насосов, обеспечивающих перераспределение калия между замыкающими клетками устьиц и соседними эпидермальными клетками. Увеличение осмотического давления в замыкающих клетках при открывании устьиц связано с поступлением в них калия. Закрывание устьиц происходит при выходе калия из замыкающих клеток. Поэтому в открытых устьицах замыкающие клетки намного богаче ионами калия, чем в закрытых. Эти различия можно выявить гистохимически кобальтнитритным методом.

Метод основан на взаимодействии кобальтнитрита натрия с ионами калия в ткани:  $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6] + 2\text{K}^+ = \text{K}_2\text{Na}[\text{Co}(\text{NO}_2)_6] + 2\text{Na}^+$ .

При этом образуется желтый кристаллический осадок соли  $\text{K}_2\text{Na}[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ . Для более четкого обнаружения препарат обрабатывают сульфидом аммония, что приводит к образованию в местах локализации калия коричневого осадка сульфида кобальта.

**Ход работы.** Удобным объектом для наблюдения служит традесканция, листья которой имеют хорошо развитый устьичный комплекс. Можно использовать также листья овса, кукурузы, бобов и др. Для работы необходимо иметь растения с широко открытыми и плотно закрытыми устьицами. Поэтому перед началом опыта одну часть растений поливают и выставляют на яркий свет на 1,5 - 2 ч, другую—выдерживают в темноте до полного закрывания устьиц.

Полностью открытые устьица можно также получить на листовых сегментах. Для этого за 1 ч до опыта нарезают полоски листа и помещают их в освещенные настольной лампой чашки Петри с водопроводной водой.

На нижней стороне подготовленных к опыту листьев или сегментов острой бритвой под прямым углом к центральной жилке делают поверхностные надрезы через 2-3 мм и срезают в этом же направлении небольшие участки эпидермиса.

Подготовленные эпидермальные полоски помещают на 1-2 мин в чашки Петри с охлажденной бидистиллированной водой с тем, чтобы удалить внеклеточный калий. Затем переносят на 5 мин в бюкс с охлажденной инкубационной средой и промывают в чашке Петри охлажденной бидистиллированной водой 2-3 мин.

Так как кристаллы натриево-калиевой соли кобальтоазотистой кислоты при комнатной температуре относительно растворимы, чашки Петри с водой и бюкс с инкубационной средой помещают в сосуд со снегом или льдом. Подготовленные препараты просматривают под микроскопом в смеси 50%-го глицерина и насыщенного раствора сульфида аммония (1 : 1).

Зарисовывают локализацию калия в замыкающих и прилегающих к ним клетках эпидермиса при открытых и закрытых устьицах. Сделать вывод.

#### Работа 10. Определение интенсивности транспирации весовым методом

**Материалы и оборудование:** 1) комнатные растения или свежесрезанные ветки древесных пород, поставленные в воду; 2) весы технические и торсионные; 3) разновесы; 4) ножницы; 5) скальпель; 6) приспособление для подвешивания побега (зажим или кусок нитки с петлей на конце); 7) стеклянная чашка или крышка чашки Петри; 8) миллиметровая бумага; 9) фильтровальная бумага; 10) вода комнатной температуры.

**Объяснение.** Транспирацией называют процесс испарения воды надземными частями растений. Интенсивность транспирации есть количество воды, испаренной с единицы листовой поверхности в единицу времени (например, с  $1 \text{ м}^2$  за 1 ч). Относительная транспирация - отношение интенсивности транспирации к интенсивности испарения со свободной водной поверхности при тех же условиях; этот показатель характеризует способность растений регулировать транспирацию и выражается в виде десятичной дроби или в процентах.

Весовой метод учета транспирации основан на определении количества испаренной воды по уменьшению веса целого растения или срезанного побега (или даже отдельного листа). Поскольку работа с целым укорененным растением значительно сложнее, чем со срезанным побегом, чаще всего пользуются последним методом. В промежутке между двумя взвешиваниями побег иногда ставят нижним концом в воду, но при этом резко изменяются условия водоснабжения. Наиболее точным считается метод быстрого взвешивания (по Л. А. Иванову): побег срезают (желательно под расплавленным парафином — для сохранения натяжения воды в сосудах) и дважды взвешивают, причем интервал между взвешиваниями не должен быть больше 5 мин, так как при более длительной экспозиции может начаться завядание листьев, приводящее к уменьшению интенсивности транспирации. Весьма удобно пользоваться для метода быстрого взвешивания торсионными весами.

**Ход работы.** Установить весы в вертикальном положении и проверить их нулевую точку. Срезать побег с несколькими листьями (или один большой лист), немедленно подвесить его к коромыслу весов при помощи зажима или нитки с петлей на конце, быстро взвесить и записать время уравнивания весов. Через 3—4 мин взвесить побег второй раз, также отметив время. Если определение проводится в комнате, где испарение идет слабо, можно увеличить экспозицию до 5 мин.

Для определения поверхности листьев наложить листья на бумагу (лучше всего миллиметровую), тщательно обвести листья карандашом, вырезать и взвесить полученные бумажные фигуры. Кроме того, взвесить вырезанный из той же бумаги квадрат известной площади (например,  $100 \text{ см}^2$ ) и найти площадь листовых пластинок по пропорции:



$$a / b = c / s,$$

где a — вес квадрата;

b — вес бумажных фигур;

c — площадь квадрата;

s — площадь листьев.

Интенсивность транспирации (I) вычислить по формуле

$$I = n \cdot 60 \cdot 10000 / s \cdot t, \text{ г/м}^2 \text{ ч},$$

где n — количество воды, испаренной побегом за время опыта, г;

s — площадь листьев, см<sup>2</sup>;

t — продолжительность опыта, мин;

60 — коэффициент перевода минут в часы;

10000 — коэффициент перевода см<sup>2</sup> в м<sup>2</sup>.

Результаты записать в таблицу.

Объект	Время		Продолжительность опыта, мин	Вес, г		Изменение веса, г	Площадь, см <sup>2</sup>
	начало	конец		1-й	2-й		
Побег							
Сосуд с водой							

Чтобы убедиться в том, что транспирация не является простым физическим процессом испарения, поставить одновременно с определением транспирации опыт по учету свободного испарения. Для этого взвесить чашку, наполненную почти до краев водой комнатной температуры (наружная поверхность чашки должна быть совершенно сухой), и через определенное время, например через 30 мин, сделать второе взвешивание. Между взвешиваниями сосуд с водой должен находиться в тех же условиях, при которых учитывалась транспирация. Определить испаряющую поверхность, измеряя внутренний диаметр чашки линейкой, и вычислить интенсивность испарения со свободной водной поверхности (E), пользуясь той же формулой, по которой вычислялась интенсивность транспирации. Относительную транспирацию вычислить, разделив интенсивность транспирации на интенсивность свободного испарения.

### Работа 11. Водообмен ветки сосны

**Материалы и оборудование:** 1) ветка сосны; 2) раствор эозина 0,003%-й (30 мг эозина в 1 л кипяченой воды); 3) весы технические большие или весы Беранже (магазинные, двухчашечные); 4) разновесы; 5) стеклянные банки на 300—500 мл с пробками (2 шт.); 6) бритва; 7) скальпель; 8) пробочные сверла; 9) кристаллизатор большой; 10) вода кипяченая; 11) парафин; 12) электроплитка; 13) вата; 14) бумага; 15) клей; 16) цветные карандаши.

**Объяснение.** Задача данной работы - количественный учет и изучение особенностей трех основных процессов, из которых складывается водообмен рас-

тения: поступления воды в растение, передвижения воды по проводящим тканям и транспирации. Для этого растение помещают в банку с определенным количеством воды, принимают меры против испарения воды непосредственно из банки и взвешивают всю установку. Через несколько дней вторично взвешивают установку, учитывают количество оставшейся в банке воды и на основе полученных данных вычисляют количество поглощенной растением воды (по убыли воды в банке) и количество транспирированной воды (по уменьшению веса всей установки). Для получения ответа на вопрос, по какой части стебля идет восходящий ток, к воде добавляют небольшое количество красителя, а также ставят второй опыт с окольцованным стеблем.

**Ход работы.** Налить в банку примерно на  $\frac{3}{4}$  воду, подкрашенную эозином, наклеить этикетку и взвесить банку с водой. Взять 2-летнюю ветку сосны, очистить нижнюю часть стебля (до мутовки побегов) от хвои и вставить стебель в отверстие пробки. Если имеется резиновая пробка, то можно очень плотно зажать в ней ветку, для чего нужно просверлить в пробке отверстие немного меньше толщины стебля, вставить в отверстие с нижней стороны более крупное сверло, опустить в сверло с верхней стороны пробки стебель и, придерживая пробку и стебель пальцами, вытащить сверло из пробки. Если пробка корковая, то приходится делать отверстие немного больше толщины ветки, а затем закрыть ватой щели между веткой и пробкой. Вставив ветку в пробку, следует обновить срез стебля под водой: погрузить нижний конец стебля в кристаллизатор с кипяченой водой и отрезать наискось острой бритвой кусок стебля длиной 6—8 см. Продержав свежесрезанный конец стебля под водой не менее 30 с, вставить пробку с веткой в банку так, чтобы нижний конец не доходил до дна банки на 1-2 см. Залить пробку парафином (если пробка резиновая и плотно закрывает банку, то можно этого не делать) и взвесить всю установку с точностью до 0,1 г.

Поставить таким же способом опыт с другой веткой, у которой после закрепления ее в отверстии пробки окольцевать стебель. Для этого ниже пробки, но выше уровня жидкости сделать два круговых надреза коры на расстоянии 1 см один от другого и снять кольцо коры (до белой древесины).

Через неделю сделать второе взвешивание всей установки, вынуть пробку с веткой и взвесить банку с оставшейся в ней водой. Если пробку заливали парафином, то перед взвешиванием необходимо тщательно удалить весь оставшийся на стенках банки парафин. Оборвать всю хвою и взвесить.

Сделать бритвой продольные или поперечные разрезы стеблей и зарисовать, обозначив красным карандашом части, окрашенные эозином.

Результаты записать в таблицу. Испаряющую поверхность вычислить исходя из того, что 1 г сырой хвои сосны соответствует поверхность в  $33 \text{ см}^2$  (поверхностью стебля можно пренебречь). Интенсивность транспирации вычислить, разделив количество испаренной воды на поверхность хвои и продолжительность опыта (время нужно выразить в часах).

Вариант	Вес банки с водой, г		Вес всей установки, г		Количество воды, г		Вес хвои, г	Поверхность хвои, см <sup>2</sup>	Интенсивность транспирации, г/м <sup>2</sup> ·ч
	исходный	через 7 дней	исходный	через 7 дней	поглощенной	испаренной			
Неокольцованная ветка Окольцованная ветка									

Сделать выводы, ответив на следующие вопросы:

1. Совпадает ли количество поглощенной воды с количеством воды испаренной и если нет, то как это объяснить?
2. По какой части стебля идет восходящий ток?
3. Мешает ли кольцевание передвижению воды по стеблю?
4. Велика ли интенсивность транспирации хвойных растений по сравнению с лиственными (сравнить с литературными данными).

## ФОТОСИНТЕЗ

### Работа 12. Пигменты зеленого листа

**Материалы и оборудование:** 1) свежие или высушенные листья растений (крапивы, аспидистры, плюща); 2) этиловый спирт; 3) бензин; 4) 20%-й раствор КОН в капельнице; 5) 10%-я соляная кислота в капельнице; 6) CaCO<sub>3</sub>; 7) уксуснокислый цинк; 8) кварцевый песок или толченое стекло; 9) ступка с пестиком (сухие); 10) воронка; 11) стеклянная палочка; 12) штатив с пробирками (5 шт.); 13) стакан с водой; 14) пипетка; 15) ножницы; 16) скальпель; 17) спиртовка; 18) держатель для пробирок; 19) вазелин; 20) бумажный фильтр; 21) спички; 22) цветные карандаши.

**Объяснение.** Фотосинтез – процесс превращения энергии света, поглощаемого хлорофиллом, в химическую энергию органических соединений, образующихся из диоксида углерода и воды:



Фотосинтез происходит в хлоропластах, которые окружены двумя белково-липидными мембранами. Хлоропласт включает систему ламеллярных двойных мембран тилакоидов, образованных внутренней мембраной. В тилакоидах осуществляется световая фаза фотосинтеза, т.е. преобразование энергии световых лучей в химическую энергию молекул АТФ и НАДФ·Н<sub>2</sub>, а биохимические реакции восстановления СО<sub>2</sub> и синтеза углеводов происходят в межтилакоидном пространстве.

В мембранах тилакоидов содержатся следующие пигменты: хлорофилл а ( $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ )- зеленый с синеватым оттенком; хлорофилл б ( $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ )- зеленый с желтоватым оттенком; каротин ( $C_{40}H_{56}$ )-желто-оранжевый; ксантофилл ( $C_{40}H_{56}O_2$ )- золотисто-желтый. Все эти пигменты не растворимы в воде, но растворяются в органических растворителях (спирте, ацетоне и др.).

По химической природе хлорофилл представляет собой сложный эфир дикарбоновой кислоты хлорофиллина и двух спиртов - метанола  $CH_3OH$  и фитола  $C_{20}H_{39}OH$ . Хлорофиллин содержит порфириновое ядро, состоящее из четырех пиррольных колец, соединенных друг с другом метиновыми мостиками  $=CH-$ . В центре порфиринового ядра расположен атом магния, соединенный с атомами азота пиррольных колец. Кроме того, в ядре молекулы хлорофилла имеется пятое кольцо - циклопентановое, содержащее карбонильную группу. Хлорофилл б отличается от хлорофилла а лишь тем, что у второго пиррольного кольца вместо метильной группы имеется альдегидная.

Порфириновое ядро имеет гидрофильный характер и связано с белками мембран. В то же время длинный гидрофобный "хвост", образованный остатком фитола, обращен в сторону липидных слоев тилакоидов и обуславливает хорошую растворимость хлорофилла в неполярных растворителях (бензин, эфир). Однако для полного извлечения хлорофилла из листьев используют не эти безводные растворители, а спирт или ацетон, содержащие небольшое количество воды, необходимой для гидролиза хлорофиллбелкового комплекса.

Наряду с хлорофиллами а и б в хлоропластах содержатся каротиноиды- группа желтых пигментов, являющихся по химической природе тетрапирроноидами (8 остатков изопрена  $C_5H_8$ ). Каротины (в основном  $\beta$ -каротин)- непредельные углеводороды, содержащие два симметрично расположенных иононовых кольца, соединенных длинной углеродной цепью. Среди ксантофиллов, являющихся кислородсодержащими производными каротина, преобладает лютеин, имеющий в каждом иононовом кольце спиртовую группу.

### **Ход работы**

**1. Получение вытяжки пигментов зеленого листа.** Свежие или высушенные листья измельчить ножницами, отбросив крупные жилки и черешки, поместить в ступку, добавить на кончике ножа  $CaCO_3$  (для нейтрализации кислот клеточного сока) и немного чистого кварцевого песка или толченого стекла. Тщательно растереть, приливая понемногу этиловый спирт, смазать носик ступки с наружной стороны вазелином и слить полученный темно-зеленый раствор по палочке в воронку с фильтром. Прилить в ступку ещё немного спирта, растереть и слить на тот же фильтр. Повторить эту операцию несколько раз до полного извлечения пигментов.

В другой ступке растереть листья с водой и профильтровать. Рассмотрев полученные вытяжки на свет, установить, какая из них представляет собой истинный раствор, а какая - коллоидный.

Сделать вывод о растворимости пластидных пигментов в воде и в органиче-

ском растворителе (спирте). Использовать спиртовую вытяжку в следующих работах.

**2. Разделение пигментов по Краусу.** Метод Крауса основан на разной растворимости пигментов в спирте и бензине: хлорофилл, имеющий длинный углеводородный “хвост”, и каротин, являющийся углеводородом, имеют большее сродство к неполярному растворителю, тогда как ксантофилл (лютеин), будучи двухосновным спиртом, почти не растворим в бензине.

Налить в пробирку 2-3 мл спиртовой вытяжки пигментов зеленого листа, добавить несколько больший объем бензина и 2 капли воды (чтобы спирт не смешивался с бензином). Закрывать пробирку, несколько раз сильно встряхнуть и дать отстояться. Если разделение пигментов будет недостаточно четким (оба слоя окрашены в зеленый цвет), то необходимо прилить ещё бензина и продолжать взбалтывание. Помутнение нижнего слоя (от избытка воды) можно устранить, добавляя немного спирта. Отметить окраску нижнего спиртового слоя и верхнего бензинового (сделать рисунок).

Сделать выводы о различной растворимости пигментов в спирте и бензине.

**3. Омыление хлорофилла щелочью.** При добавлении щелочи к раствору хлорофилла происходит реакция омыления: отщепляются спирты – метанол и фитол, а двухосновная кислота хлорофиллин образует соль.



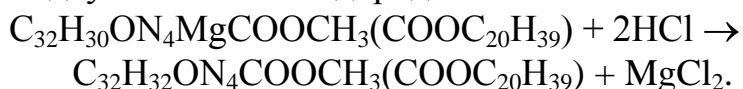
Соли хлорофиллов имеют зеленую окраску, но отличаются от хлорофилла нерастворимостью в бензине.

К 2-3 мл спиртовой вытяжки пигментов добавить 4-5 капель 20%-го раствора щелочи и взболтать. Прилить в пробирку равный объем бензина, сильно встряхнуть и дать отстояться.

Отметить окраску нижнего спиртового и верхнего бензинового слоев (зарисовать). Указать, какие вещества растворены в спирте и какие в бензине, имея в виду, что желтые пигменты со щелочью не реагируют. Записать реакцию омыления хлорофилла.

**4. Получение феофетина и восстановление металлорганической связи.**

Если к раствору хлорофилла добавить небольшое количество соляной кислоты, то получится буровато-оливковый феофетин - продукт замещения магния в молекуле хлорофилла двумя атомами водорода.



Металлорганическую связь можно восстановить путем нагревания феофетина с уксуснокислым цинком или уксуснокислой медью: атом двухвалентного металла вытесняет водород из феофетина; образующаяся при этом уксусная кислота служит катализатором.

Налить в две пробирки по 3-4 мл спиртовой вытяжки пигментов зеленого листа и добавить в них по 2-3 капли 10%-й соляной кислоты. Отметить окраску

полученного продукта реакции.

В одну из пробирок с феофетином внести несколько кристаллов уксуснокислого цинка и довести раствор до кипения (нагревать следует осторожно, не допуская выбрасывания жидкости из пробирки). Если окраска не изменится, добавить ещё уксуснокислого цинка и продолжать нагревание. Отметить изменение окраски, вызванное замещением двух атомов водорода в феофетине атомом цинка. Зарисовать пробирки и написать уравнения прямой (см. выше) и обратной реакции.

### Работа 13. Разделение пигментов методом бумажной хроматографии

**Материалы и оборудование:** 1) свежие листья каких-либо растений; 2) ацетон; 3) петролейный эфир или бензин с точкой кипения 80-120°C; 4) CaCO<sub>3</sub>; 5) кварцевый песок или толченое стекло; 6) полоска фильтровальной бумаги для хроматографии («быстрой») размером 1,5×15 см; 7) ступка с пестиком; 8) чистая сухая колба Бунзена с пробкой, в которую вставлен стеклянный фильтр; 9) стеклянная палочка; 10) насос Камовского; 11) вазелин; 12) стеклянные бюксы (2 шт.); 13) стеклянный цилиндр или большая пробирка высотой 20-25 см с хорошо подобранной пробкой или пришлифованной крышкой; 14) две стеклянные палочки длиной несколько меньше диаметра цилиндра, соединенные отрезками резиновой трубки; 15) пинцет; 16) цветные карандаши.

**Объяснение.** Хроматографический метод разделения пигментов, впервые предложенный русским учёным М.С.Цветом, заключается в том, что раствор, содержащий смесь пигментов, пропускается через слой адсорбента. Разные пигменты, обладая неодинаковой растворимостью в данном растворителе и разной адсорбируемостью, передвигаются с неодинаковой скоростью и располагаются на адсорбенте в разных местах. Чем больше растворимость пигмента в растворителе и чем хуже он адсорбируется данным адсорбентом, тем быстрее он будет передвигаться и тем дальше будет располагаться зона этого пигмента.

**Ход работы.** Измельченные свежие листья поместить в ступку, добавить немного CaCO<sub>3</sub> и толченого стекла, растереть, постепенно приливая бензин или ацетон (на 2-3 грамма материала около 25 мл ацетона). Полученный раствор профильтровать в чистую сухую пробирку.

Налить вытяжку в бюкс (пробирку) и погрузить в неё кончик полоски, вырезанной из фильтровальной бумаги. Через несколько секунд, когда вытяжка поднимется по бумаге на 1-1,5 см, высушить бумагу на воздухе и снова погрузить её в раствор пигментов на несколько секунд. Эту операцию повторять 5-7 раз до тех пор, пока у верхней границы распространения пигментов на бумаге не образуется темно-зеленой полоски. После этого погрузить кончик бумажной полоски на несколько секунд в чистый бензин (ацетон), чтобы все пигменты поднялись на 1-1,5 см.

Высушив полоску до полного исчезновения запаха ацетона (бензина), поместить её в вертикальном положении в чистую сухую пробирку, на дно которой

налит бензин-0,5 мл. Отверстие пробирки прикрыть пробкой. В связи с тем, что пигменты разрушаются на свету, разделение следует проводить в темноте или при слабом освещении.

Через 10-15 мин растворитель поднимется на 10-12 см. При этом пигменты расположатся в следующем порядке: внизу хлорофилл б, над ним хлорофилл а, затем ксантофилл и выше всех каротин, поднимающийся вместе с фронтом растворителя.

Зарисовать полученную хроматограмму и сделать вывод о причинах разделения пигментов на бумаге.

#### Работа 14. Оптические свойства пигментов

**Материалы и оборудование:** 1) концентрированная спиртовая вытяжка или ацетоновая вытяжка пигментов зеленого листа; 2) раствор каротина (бензиновая вытяжка корнеплода моркови); 3) раствор ксантофилла, полученный при разделении пигментов по Краусу; 4) спирт или ацетон; 5) спектроскоп; 6) настольная лампа; 7) штатив с пробирками (5 шт.); 8) пипетки, градуированные на 5-10 мл (2 шт.); 9) кусок черной бумаги или черной материи; 10) цветные карандаши.

**Объяснение.** Важнейшее свойство хлорофилла - его способность поглощать световую энергию в пределах видимой части спектра (380-720 нм). Поглощение света хлорофиллом является не сплошным, а избирательным. В этом можно убедиться, пропуская белый свет через раствор хлорофилла, а затем разлагая его с помощью призмы. Отдельные участки спектра окажутся поглощенными, и на их месте будут видны темные полосы. Полученный спектр называется спектром поглощения.

Сопоставляя спектры поглощения растворов разной концентрации (или одного и того же раствора, но при разной толщине слоя), можно установить степень поглощения отдельных лучей: чем слабее поглощается данный участок спектра, тем концентрированнее нужно взять раствор, чтобы добиться исчезновения этого участка в спектре поглощения. Наиболее поглощаемые лучи можно определить по полосам в спектре поглощения очень разбавленного раствора, тогда как наименее поглощаемые лучи проходят даже через довольно концентрированный раствор.

Спектр поглощения каротиноидов охватывает только коротковолновую область видимых лучей (до 540 нм).

#### Ход работы

**1. Спектры поглощения пигментов.** Направить спектроскоп на источник света. Отрегулировать ширину щели на конце трубы спектроскопа так, чтобы спектр получился четким и достаточно ярким (при слишком широкой щели спектр получается размытым, нечистым, при очень узкой щели освещенность спектра недостаточна).

Налить исследуемый раствор в пробирку и закрепить её в лапке штатива перед щелью спектроскопа. Изучить спектры поглощения растворов хлоро-

филла разной концентрации, разбавляя вытяжку из зеленого листа в отношениях 1:1, 1:3, 1:5, 1:15. Для сравнения рассмотреть спектр бензиновой вытяжки из корнеплода моркови, содержащей каротин, и спиртовой раствор ксантофилла, полученный при разделении пигментов по Краусу.

Зарисовать спектры по форме, приведенной в таблице, причем поглощенные участки закрасить черным, а видимые участки - цветными карандашами.

Раствор пигментов	Спектральные участки света						
	фиолет.	синий	голубой	зеленый	желтый	оранж.	красный
Хлорофилла:							
1:15							
1:5							
1:3							
1:1							
Неразведенный раствор:							
каротина							
ксантофилла							

Сделать вывод о поглощении световой энергии зелеными и желтыми пигментами.

**2. Флуоресценция хлорофилла.** Флуоресценция представляет собой свечение веществ при поглощении ими света. Флуоресценция хлорофилла, не являясь фотосинтетически утилизируемой формой энергии, служит признаком его фотохимической активности.

В темноте молекула хлорофилла находится в основном состоянии с наиболее низким энергетическим уровнем валентных электронов. При поглощении кванта света один из  $\pi$ -электронов молекулы хлорофилла переходит на более высокий энергетический уровень, в результате чего возникает электронно-возбужденное состояние молекулы. При возвращении из возбужденного состояния в основное энергия электронов может расходоваться на: 1) фотохимическую работу, 2) возбуждение соседних молекул хлорофилла, 3) потерю в виде тепла, 4) флуоресцентное излучение. Спектр флуоресценции хлорофилла, независимо от длины волны возбуждающего света, имеет максимум при 670 нм. Хлорофилл сильно флуоресцирует в растворах и слабо - в листьях, что объясняется плотной упаковкой молекул в тилакоидах и использованием поглощенной энергии в фотохимических процессах.

Вытяжку пигментов в пробирке или конической колбе поместить на темном фоне у настольной лампы или осветить пучком света проекционного фонаря. Рассмотреть вытяжку с той стороны, откуда падает свет.

Отметить окраску раствора и сделать вывод о причине флуоресценции.



## Работа 15. Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла

**Материалы и оборудование:** 1) спиртовая вытяжка из зеленых листьев; 2) аскорбиновая кислота кристаллическая; 3) 0,04%-й спиртовой раствор метилового красного в капельнице; 4) этиловый спирт; 5) штатив с пробирками (4 шт.); 6) пипетки на 5 мл (2 шт.); 7) скальпель; 8) настольная лампа на 200—300 Вт; 9) светонепроницаемая бумага; 10) карандаш по стеклу.

**Объяснение.** Хлорофилл хлоропластов играет роль фотосенсибилизатора окислительно-восстановительной реакции переноса электронов от донора к акцептору. Аналогичное действие хлорофилла можно наблюдать и в модельных системах, содержащих вытяжку пигментов зеленого листа. Если в эту систему поместить донор электронов (аскорбиновую кислоту) и акцептор электронов (метилорозовый), то на свету происходит необратимое восстановление краски (М) в бесцветную лейкоформу ( $MH_2$ ), а аскорбиновая кислота ( $AH_2$ ) окисляется в дегидроаскорбиновую (А):



Чтобы убедиться в том, что восстановление метилового красного представляет собой фотосенсибилизированную хлорофиллом реакцию, проводят контрольные опыты с исключением света, аскорбиновой кислоты или хлорофилла. Данная работа воспроизводит опыт, известный как «реакция Красновского».

**Ход работы.** Пронумеровать 4 пробирки и налить в 1-ю, 2-ю и 3-ю по 5 мл спиртовой вытяжки хлорофилла, а в 4-ю — 5 мл спирта. Внести в 1-ю, 2-ю и 4-ю пробирки кристаллическую аскорбиновую кислоту до насыщения (избыток реактива оседает на дно). Добавить во все пробирки по каплям раствор метилового красного до перехода окраски в красно-бурую (в пробирке № 4 — до ярко-розовой) и хорошо их встряхнуть. Обернуть пробирку № 2 черной бумагой, а остальные выставить на яркий свет.

Через 15—20 мин отметить окраску растворов в пробирках и заполнить таблицу.

№ пробирки	Реакционная смесь	Условия	Изменение цвета раствора
1	Хлорофилл + аскорбиновая кислота + метилорозовый	Свет	
2	Хлорофилл + аскорбиновая кислота + метилорозовый	Темнота	
3	Хлорофилл + метилорозовый	Свет	
4	Спирт + аскорбиновая кислота + метилорозовый	Свет	

В выводах объяснить роль хлорофилла и аскорбиновой кислоты в реакции восстановления метилового красного.

## Работа 16. Определение содержания хлорофилла в листьях

**Материалы и оборудование:** 1) свежие листья различных растений; 2) ацетон; 3)  $\text{CaCO}_3$ ; 4) кварцевый песок или толченое стекло; 5) весы; 6) ножницы; 7) ступка малого размера; 8) колба Бунзена с пробкой, в которую вставлен стеклянный фильтр №2 или №3; 9) насос Камовского; 10) стеклянная палочка; 11) мерная колба на 25–50 мл с пробкой; 12) фотоэлектрический колориметр (ФЭК); 13) калька; 14) вазелин; 15) салфетка.

**Объяснение.** Содержание хлорофилла в листьях зависит от условий освещения и минерального питания, возраста листьев и ряда других внешних и внутренних факторов. При точных определениях сначала выделяют хлорофилл хроматографическим методом или путем его омыления. При сравнительных исследованиях можно определить содержание хлорофилла в спиртовой или ацетоновой вытяжке без предварительного разделения пигментов.

Известно, что хлорофиллы имеют максимум поглощения в красной части спектра, тогда как сопутствующие им пигменты не поглощают длинноволновые лучи. Поэтому при работе на ФЭКе с использованием красного светофильтра или на спектрофотометре можно достаточно точно определить содержание хлорофиллов, не отделяя их от каротиноидов.

Во избежание потерь хлорофилла все операции необходимо проводить быстро, в затененном помещении, желательно на холоде.

**Ход работы.** Измельчить листья ножницами, отбросив черешки и крупные жилки, и отвесить на куске кальки 300–500 мг. Поместить навеску в ступку, добавить толченого стекла и немного  $\text{CaCO}_3$ , прилить 4–5 мл 96% спирта (80%-го ацетона) и тщательно растереть. Смазать снизу носик ступки вазелином и слить вытяжку по палочке в воронку с фильтром, вставленным в колбу на 25 или 50 мл. Прилить в ступку ещё немного спирта (ацетона), растереть, снова профильтровать. Повторить эту операцию 2–3 раза, т.е. добиться полного извлечения пигментов. Довести спиртом (ацетоном) объем вытяжки до метки на колбе. Закрыть колбу пробкой, тщательно перемешать и хранить до определения в темноте на холоде.

Определить концентрацию хлорофилла на ФЭКе. Для этого за 20 мин до определения включить ФЭК, установить гальванометр на нулевое деление, поставить красный светофильтр, открыть шторы (предварительное освещение фотоэлементов необходимо потому, что в первые минуты после включения ФЭК дает неустойчивые показания). Определить оптическую плотность раствора относительно чистого растворителя (спирт, ацетон), используя кюветы с расстоянием между гранями 10 мм.

Надежные результаты получаются при показаниях ФЭКа от 0,1 до 0,4. Если оптическая плотность более 0,5, то вытяжку следует разбавить, отмерив в чистую сухую посуду определенные объемы вытяжки и растворителя (спирт, ацетон); если же показание ФЭКа окажется ниже 0,08, необходимо выполнить всю работу сначала, взяв большую навеску.

Повторить измерение и из полученных отсчетов взять среднее арифметическое. Определить концентрацию вытяжки по калибровочному графику: найти на оси ординат соответствующую оптическую плотность, провести от неё горизонтальную линию и от точки пересечения с калибровочным графиком опустить перпендикуляр на ось абсцисс. Для построения калибровочного графика готовят серию стандартных растворов хлорофилла возрастающей концентрации и находят оптическую плотность каждого из них. Затем строят график: на оси абсцисс откладывают значения концентрации, а на оси ординат - соответствующие им значения оптической плотности. Точки пересечения соединяют и получают калибровочный график.

Стандартные растворы для калибровочного графика готовят в мерных колбах на 25 (50) мл; концентрацию исходного раствора хлорофилла обычно определяют на спектрофотометре по формуле (для 96%-го раствора этанола:  $C_{\text{хл.а+хл.б}} = 6,10 D_{665} + 20,04 D_{649} = 25,1 D_{654}$ ). В качестве стандартного раствора можно использовать также раствор Гётри (для приготовления раствора Гётри в мерную колбу на 100 мл наливают 28,5 мл 1% -го раствора  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 50 мл 2%-го раствора  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  и 10 мл 2 н раствора  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; доливают дистиллированной водой до метки и тщательно взбалтывают; при правильном приготовлении концентрация раствора Гётри соответствует 85 мг/л).

Вычислить процентное содержание хлорофилла в листьях. Результаты анализов всех объектов, исследованных группой, записать в таблицу.

В выводах сопоставить содержание хлорофилла в разных объектах.

Объекты	Навеска, мг	Объем вытяжки, мл	Оптическая плотность	Кол-во хл. по калибр. графику, мг / 25 мл	Содержание хлорофилла, %
Листья гороха					
Пшеница					

## МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ РАСТЕНИЙ

### Работа 17. Водные культуры черенков традесканции

**Материалы и оборудование:** 1) черенки традесканции длиной 10-15 см, срезанные с верхушек побегов и высаженные для укоренения за 2 недели до постановки опыта в промытый песок; 2) сухие реактивы  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 3) 2%-й раствор цитрата железа; 4) 3%-й раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$  в капельнице; 5) 0,1 н раствор  $\text{HCl}$ ; 6) 0,1 н раствор  $\text{NaOH}$ ; 7) технические весы с разновесами; 8) мерная колба на 1 л; 9) воронка; 10) пипетка на 5 мл; 11) бутылки на 1 л (4 шт.); 12) стеклянные банки емкостью 0,5 л с деревянными крышками, пропитанными горячим парафином, с двумя отверстиями, в одно из которых вставлена стеклянная изогнутая трубка (8 шт.); 13) негигроскопическая вата; 14) резиновая груша; 15) черная и

белая бумага; 16) суровая нитка или шпагат; 17) дистиллированная вода; 18) карандаш по стеклу; 19) универсальный индикатор.

**Объяснение.** Выращивание растений на искусственных питательных смесях (методы водных и песчаных культур) широко используют при изучении корневого питания растений.

Исключая из питательной смеси какой-либо элемент, можно узнать, необходим ли он растению. Если элемент необходим, то растение, исчерпав собственные запасы этого элемента, резко сокращает рост, затем перестает расти и даже отмирает, тогда как отсутствие ненужного растению элемента не влияет на рост. Удалив из смеси соль, содержащую исключаемый элемент, нужно заменить ее другой с таким расчетом, чтобы остающиеся элементы были в том же количестве, как и в полной смеси, и раствор имел примерно такое же осмотическое давление.

Для постановки опытов с исключением отдельных элементов обычно используют проростки кукурузы, бобов или других сельскохозяйственных растений. Однако обилие запасных веществ в семенах приводит к тому, что отчетливые различия между вариантами опыта обнаруживаются только при большой продолжительности опытов. Кроме того, светолюбивые растения зимой растут медленно даже в теплице. Лучшие результаты можно получить в опытах с черенками традесканции, которые не содержат больших запасов необходимых растению элементов и довольно непритворливы к условиям освещения.

**Ход работы.** Приготовить питательные смеси по схеме (см. табл. 1). Навески соответствующих реактивов перенести в мерную колбу на 1 л, налить примерно половину объема колбы дистиллированной водой и после полного растворения реактива довести водой до метки. Перемешать раствор, перевернув колбу несколько раз, и перелить в чистую бутылку. Определить с помощью универсального индикатора pH приготовленных растворов и довести его до 7, добавляя по каплям 0,1 н раствор HCl или NaOH.

Таблица 1

Реактив	№1, полный раствор	№2, без N	№3, без P	№4, без Mg
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , г/л	2,5	-	2,5	2,5
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , г/л	-	1,8	-	-
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , г/л	0,6	0,6	-	0,6
$\text{K}_2\text{SO}_4$ , г/л	-	-	0,4	0,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , г/л	0,5	0,5	0,5	-
2%-й раствор цитрата железа, мл	5	5	5	5

Стеклянные банки емкостью 0,5 л обернуть черной бумагой (для предотвращения развития водорослей), а сверху — белой (чтобы избежать нагревания солнечными лучами), перевязать горла банок суровой ниткой или шпагатом. Пронумеровать сосуды (по 2 для каждого варианта опыта) и заполнить их питательными растворами, не доливая до краев 2—3 см. Одинаковые укорененные черенки традесканции осторожно извлечь из песка, сполоснуть корневую систему дистиллированной водой, вставить в отверстие крышки и с помощью полоски из негигроскопической ваты плотно закрепить стебель, не допуская его сдавливания. Корни должны быть погружены в раствор, а ватная пробка оставаться сухой. Поместить сосуды в теплицу или у окна, обращенного на север.

Два раза в неделю доливать растворы дистиллированной водой взамен испаренной и продувать через них воздух резиновой грушей в течение 2—3 мин (вместо продувания можно добавлять 3—4 капли 3%-го раствора  $H_2O_2$ , при разложении которого образуется молекулярный кислород). Проводить наблюдения за ростом и внешним видом растений. Закончить опыт тогда, когда различия между вариантами будут отчетливо заметны. Результаты записать в табл. 2.

Таблица 2

№ сосуда	Вариант опыта	Длина стебля	Размер новых листьев, см		Окраска листьев
			длина	ширина	

В выводах указать, как влияет на растение исключение из питательной смеси азота, фосфора и магния.

### Работа 18. Смещение рН питательного раствора корневой системой растений

**Материалы и оборудование:** 1) проростки растений; 2) 0,5 н раствор питательной смеси Хогланда — Снайдерса; 3) 0,01 н раствор NaOH; 4) 0,01 н раствор HCl; 5) универсальный индикатор рН; 6) конические колбы; 7) штатив с пробирками (4 шт.); 8) широкие пробирки; 9) пипетки на 1 и 10 мл; 10) рН-метр.

**Объяснение.** Корни способны активно смещать реакцию среды небуферных растворов в результате постоянного выделения цитоплазмой ионов  $H^+$ , амфолитоидных свойств цитоплазмы, выделения органических кислот из клеток, ионообменных свойств пектоцеллюлозных клеточных стенок. Смещение рН может достигать значительных величин, соответствуя изменению концентрации  $H^+$  на два-три порядка.

**Ход работы.** Приготовить растворы питательной смеси Хогланда — Снайдерса с рН 5; 6; 7 и 7,8. Для этого в четыре пробирки наливают по 5 мл 0,5 н смеси и в каждую добавляют четыре-пять капель универсального индикатора. Для получения заданных значений рН в пробирки по каплям добавляют 0,01 н раствор HCl или NaOH. Определенным объемом питательной смеси заполнить

четыре широкие пробирки и в каждую добавить во столько раз большее число капель кислоты или щелочи, во сколько раз объем широких пробирок превышает 5 мл. В приготовленные растворы погрузить корни проростков пшеницы (или других растений) и через 2 ч определить рН питательного раствора.

Результаты опыта занести в таблицу.

Вариант	рН питательной смеси	
	в начале опыта	в конце опыта
1	5,0	
2	6,0	
3	7,0	
4	7,8	

Сделать вывод об изменении рН питательного раствора корнями растений.

### Работа 19. Физиологически кислые и щелочные соли

**Материалы и оборудование:** 1) проростки пшеницы, ячменя или других растений с корнями длиной 5—6 см; 2) 0,2 г/л раствора  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 3) 0,2 г/л раствора  $\text{NaNO}_3$ ; 4) универсальный индикатор и шкала цветов; 5) вата негигроскопическая; 6) штатив с пробирками (3 шт.); 7) фарфоровая чашка; 8) светонепроницаемая бумага; 9) карандаш по стеклу.

**Объяснение.** Катионы и анионы солей поступают в растения независимо друг от друга с разной скоростью. Соли, у которых катион поглощается корнями быстрее, чем анион, называют физиологически кислыми: выделяемый из клеток в обмен на катион ион водорода образует с остающимся в растворе анионом кислоту, вследствие чего происходит подкисление среды. Из физиологически щелочных солей быстрее поглощается анион, в обмен на который корни выделяют ион  $\text{HCO}_3^-$ . Например, из раствора  $\text{NaNO}_3$  быстрее поглощается  $\text{NO}_3^-$ , а в среде накапливается гидрокарбонат натрия, при гидролизе которого образуется щелочь:  $\text{NaHCO}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaOH} + \text{H}_2\text{CO}_3$ .

**Ход работы.** Пронумеровать 3 пробирки, налить в 1-ю почти до краев 0,02%-й раствор  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , во 2-ю — 0,02%-й раствор  $\text{NaNO}_3$ , в 3-ю (контрольную) — водопроводную воду. В каждой пробирке определить рН с помощью универсального индикатора. Высадить в пробирки по 3 проростка, закрепив их ватной пробкой, которая не должна соприкасаться с раствором. Завернуть пробирки светонепроницаемой бумагой так, чтобы корни растений были в темноте. Оставить пробирки в хорошо освещенном месте. Через 1—2 недели определить рН растворов. Результаты записать в таблицу.

Растение	№ пробирки	Вариант опыта	Величина рН	
			исходная	в конце опыта
	1	$\text{NH}_4\text{Cl}$		
	2	$\text{NaNO}_3$		
	3	$\text{H}_2\text{O}$		

Сформулировать выводы, объясняющие причины изменения рН.

## Работа 20. Определение общей и рабочей адсорбирующей поверхности корневой системы методом Сабинина и Колосова

**Материалы и оборудование:** 1) растения с корневой системой; 2) 0,0002 н раствор метиленового синего (64 мг в 1 л дистиллированной воды); 3) дистиллированная вода; 4) салфетка; 5) бюретки с воронками (2 шт.); 6) стаканы стеклянные (3 шт.); 7) чистые сухие колбочки (4 шт.); 8) пипетка градуированная на 2-5 мл; 9) фотоэлектроколориметр (ФЭК); 10) кристаллизатор; 11) фильтровальная бумага; 12) карандаш по стеклу.

**Объяснение.** Важнейшие характеристики состояния корневой системы - её масса и поглощающая поверхность. Считается, что в интервале между апикальной и базальной частями корня активное поглощение меняется, и даже выделяют специальную поглощающую зону корня, поэтому определяют как общую, так и рабочую поверхность корня. Д.А.Сабинин и И.И.Колосов, считавшие, что первичный акт поглотительного процесса - адсорбция, разработали метод определения общей поверхности корней, включающей рабочую и недеятельную их поверхности.

Большинство поглощаемых корнем веществ не только адсорбируются, но и десорбируются с его поверхности. Поэтому размеры десорбции более значительны на тех участках корня, где отсутствует или замедлен процесс транспорта веществ внутрь корня. В качестве поглощаемого вещества, которое можно легко определить колориметрически, авторы метода выбрали метиленовый синий. При мономолекулярной адсорбции 1 мг МС покрывает  $1,05 \text{ м}^2$  поверхности адсорбента.

Зная исходную концентрацию раствора МС до и после экспозиции в ней корней, по разности этих концентраций можно определить, какое количество красителя (мг) адсорбировалось корневой системой. Умножение этого количества МС на  $1,05 \text{ м}^2$  дает величину поглощающей поверхности.

Метиленовый синий проникает в клетки эпидермиса в течение 90 с. При двукратном погружении корней (каждый раз по полторы минуты) в раствор МС происходит адсорбция красителя на децельной и недецельной поверхности корней. При третьем погружении корня в раствор МС поглощается только децельной (рабочей) поверхностью корня. По изменению концентрации МС в двух первых стаканах рассчитывают общую поверхность корневой системы, а по результатам третьего определения - рабочую.

Концентрацию МС определяют колориметрически на ФЭКе. Калибровочный график для количественного определения МС готовят заранее.

Наряду с определением общей, недецельной и рабочей поверхностей корня желательно проследить изменение этих параметров на корнях нормальных растений и голодающих по одному из основных элементов минерального питания. Поэтому предусматривают два варианта: контрольные растения, выращенные

на полной смеси Хогланда - Снайдерса; опытные растения, выращенные при исключении из смеси одного из макроэлементов - N, P, K или Ca (табл.1).

**Ход работы.** Для работы лучше использовать корни растений, выращенных в водной культуре. Объединенные вместе корни десяти проростков образуют поглощающую корневую массу. Важно не допустить погружения в раствор МС зерновок, находящихся на 10 – 14 -дневных проростках. В три бюкса наливают 0,0003 н раствор МС, объем которого должен быть примерно в десять раз большим, чем объем корней. В четвертый бюкс наливают раствор CaCl<sub>2</sub>. Слегка обсушив корни фильтровальной бумагой, последовательно погружают их в три бюкса с раствором МС на полторы минуты в каждый. После каждого погружения дают возможность раствору красителя стечь в тот же бюкс, из которого были вынуты корни.

Уменьшение концентрации метиленового синего определяют, сравнивая найденную для каждого бюкса концентрацию после погружения с исходной, т.е. с 0,0003 н раствором МС (112 мг метиленового синего на 1 л воды; молекулярная масса МС с тремя молекулами воды равна 373,68 г), предварительно разбавленным, как и раствор МС в бюксах, в десять раз. Разбавление МС перед установлением её концентрации повышает точность определения.

Таблица 1

Соли	Полная		Без N		Без P		Без K	
	г/л	г-моль/л	г/л	г-моль/л	г/л	г-моль/л	г/л	г-моль/л
KNO <sub>3</sub>	0,51	0,005	-		0,51	0,005	-	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> б /в	0,82	0,005	-		0,82	0,005	0,82	0,005
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,136	0,001	0,136	0,001	-		-	
MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,49	0,002	0,49	0,002	0,49	0,002	0,49	0,002
KCl	-		0,38	0,005	0,07	0,001		
NaNO <sub>3</sub>	-		-		-		0,42	0,005
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-		-		-		0,138	0,001
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-		0,86	0,005	-		-	

По количеству поглощенного метиленового синего в первых двух бюксах рассчитывают общую адсорбирующую поверхность корней, по ее количеству, поглощенному в третьем бюксе, - рабочую адсорбирующую поверхность. Разница между общей и рабочей адсорбирующей поверхностями дает представление о недействительной поверхности корней. Частное от деления величин общей и рабочей поверхности на объем корней (более грубо - на их сырую массу в граммах) - о соответствующих величинах удельной адсорбирующей поверхности корней.

Результаты опытов записывают в табл.2.



Таблица 2

**Определение адсорбирующей поверхности корней**

Вариант	Номер бюкса	Объем раствора МС в бюксе, мл	Масса МС в бюксе, мг			Адсорбирующая поверхность, м <sup>2</sup>						
			до погружения корней	после погружения корней	поглощенной	общая	рабочая	недеятельная	удельная			
									общая	рабочая	недеятельная	
Контроль	1											
	2											
	3											
Опыт	1											
	2											
	3											

Окрашенные корни после извлечения из третьего бюкса промывают водой и помещают в бюкс с CaCl<sub>2</sub>. Метиленовый синий, несущий положительный заряд, в результате обменной адсорбции ионов Ca<sup>2+</sup> выделяется из корней и окрашивает раствор в синий цвет.

Делают вывод о результатах работы в целом.

### Работа 21. Микрохимический анализ золы

**Материалы и оборудование:** 1) зола, полученная при сжигании листьев или табачный пепел; 2) 10%-й раствор соляной кислоты; 3) 1%-й раствор серной кислоты; 4) 10%-й раствор аммиака; 5) 1%-й раствор Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 6) 1%-й раствор молибденовокислого аммония в 15%-й азотной кислоте; 7) 1%-й раствор желтой кровяной соли в капельнице; 8) дистиллированная вода в стакане; 9) пробирки (2 шт.); 10) воронка маленькая; 11) бумажный фильтр; 12) стеклянные палочки с заостренным концом (2 шт.); 13) предметные стекла (3 шт.); 14) микроскоп; 15) кусочки фильтровальной бумаги.

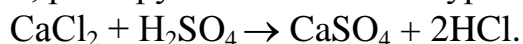
**Объяснение.** Зола, получаемая при сжигании растений, содержит большое количество элементов. Среди них различают макроэлементы (фосфор, сера, калий, кальций, магний) и микроэлементы (железо, медь, цинк, марганец, молибден, бор и ряд других).

Для изучения химического состава золы можно использовать микрохимический метод, для которого требуется небольшое количество материала.

**Ход работы.** Насыпать в пробирку небольшое количество золы и залить её примерно четырехкратным объемом 10% HCl. Отфильтровать полученный раствор в чистую пробирку через маленький фильтр. Провести на предметных стеклах реакции на Ca, Mg и P. Для этого тупым концом стеклянной палочки нанести на предметное стекло маленькую каплю вытяжки и на расстоянии 4-5

мм от неё - каплю соответствующего реактива. Затем заостренным концом стеклянной палочки соединить капли дугообразным каналом. В месте соединения произойдет реакция, причем по краям канала будет наблюдаться быстрая кристаллизация продуктов реакции. Рассмотреть образующиеся кристаллы в микроскоп. Стеклянные палочки после нанесения каждого реактива необходимо вымыть и вытереть фильтровальной бумагой.

Реактивом на ион кальция служит 1%-я  $H_2SO_4$ . При этом хлорид кальция, содержащийся в вытяжке, реагирует с кислотой по уравнению



Образующийся гипс осаждается в виде игольчатых кристаллов (рис.1).

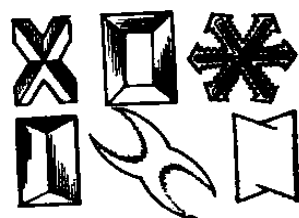


Рис.1. Кристаллы сульфата кальция

Для обнаружения магния к капле испытуемого раствора следует сначала добавить каплю раствора аммиака, а затем соединить каналцем с реактивом, которым служит 1%-й раствор фосфорнокислого натрия. Образуется фосфорноаммиачномагнезиальная соль (рис.2), кристаллизующаяся в виде прямоугольников, "крышечек", звезд или "крыльев", в результате следующей реакции:



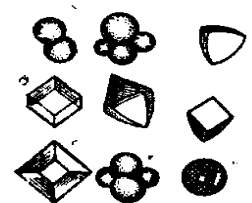
Рис.2. Кристаллы фосфорноаммиачномагнезиальной соли



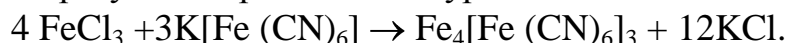
Для обнаружения фосфора соединить каплю вытяжки с 1%-м раствором молибдата аммония в азотной кислоте. Получается зеленовато-желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония (рис.3):



Рис.3. Кристаллы фосфорномолибденовокислого аммония



Железо можно обнаружить с помощью раствора желтой кровяной соли. В результате реакции образуется берлинская лазурь:



Реакцию на железо рекомендуется проводить в пробирке: к остатку зольной вытяжки добавлять по каплям раствор желтой кровяной соли до появления синей окраски.

Результаты работы оформить в виде рисунков кристаллов гипса, фосфорноаммиачномагнезиальной соли и фосфорномолибденовокислого аммония. Записать уравнения реакций.

## ПРЕВРАЩЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

### Работа 22. Обнаружение амилазы в прорастающих семенах

**Материалы и оборудование:** 1) проросшие и непроросшие семена пшеницы; 2) чашки Петри с крахмальным агаром; 3) тарелка; 4) скальпель; 5) пинцет; 6) стакан с водой; 7) слабый раствор  $I_2K$  (концентрированный раствор, разбавленный в 10 раз).

**Объяснение.** Ферменты могут действовать не только в той клетке, которая их вырабатывает, но и вне её, перемещаясь в другие клетки или выделяясь во внешнюю среду. Чтобы наблюдать быстрое выделение ферментов из клеток семян злаков, необходимо разрезать зерновки, так как семенная кожура и околоплодник препятствует диффузии веществ.

В данной работе изучается внеклеточное действие амилазы на крахмал. В растениях встречается две амилазы:  $\alpha$  - амилаза, вызывающая распад молекулы крахмала на крупные осколки (декстрины), и  $\beta$  - амилаза, которая отщепляет от крахмала концевые остатки мальтозы. В сухих семенах пшеницы, ржи и ячменя содержится только  $\beta$  - амилаза, причем почти вся она связана с белками. При прорастании  $\beta$  - амилаза переходит из связанного состояния в свободное и, кроме того, происходит синтез  $\alpha$  - амилазы.

**Ход работы.** Разрезать несколько непроросших зерен пополам, слегка смочить водой и разложить пинцетом на одной половине пластинки из крахмального агара поверхностью среза вниз, не вдавливая семена в пластинку. На другую половину агаровой пластинки поместить несколько проросших семян того же растения, также разрезанных пополам и смоченных водой (желательно оставить на некоторых проросших семенах корешки и приложить их к поверхности крахмального агара). Закрыть крышкой, чтобы не было подсыхания. Через 1 ч осторожно снять семена и облить всю пластину слабым раствором йода.

Отметить результат и ответить на следующие вопросы:

1. Какое действие оказали семена на пластинку?
2. Почему проросшие и непроросшие семена оказали неодинаковое действие?

## Работа 23. Определение активности амилаз в прорастающих семенах

**Материалы и оборудование:** 1) проросшие семена пшеницы, ячменя и гороха; 2) 1%-й раствор NaCl; 3) 0,2 н ацетатный буфер с pH 5,5; 4) 2%-й раствор крахмала; 5) 1 н раствор HCl; 6) фарфоровые ступки с пестиками; 7) кварцевый песок; 8) центрифужные пробирки на 50 мл; 9) градуированные пробирки на 10 мл; 10) мерные цилиндры на 25 мл; 11) градуированные пипетки на 1 и 5 мл; 12) аналитические и лабораторные весы; 13) водяная баня или термостат; 14) мерные колбы на 50 мл; 15) конические колбы на 100 мл; 16) центрифуга; 17) спектрофотометр; 18) фотоэлектрокolorиметр.

**Объяснение.** В процессе прорастания семян в результате гидролиза и фосфоролитического распада крахмал распадается на более простые соединения. Гидролитический распад запасного крахмала может протекать при участии четырех видов гидролаз:  $\alpha$ -амилазы,  $\beta$ -амилазы, глюкоамилазы и амилопектин-1,6-глюкозидазы. Фосфоролитический распад запасного крахмала осуществляется ферментом  $\alpha$ -глюканфосфорилазой. По мере набухания сухих семян в период прорастания возрастает активность гидролитических ферментов, при этом содержание крахмала падает, а сахаров возрастает.

Определение суммарной активности амилаз включает выделение амилаз раствором NaCl, инкубацию их со стандартным раствором крахмала в течение заданного промежутка времени и, наконец, колориметрическое определение негидролизованного амилазами остаточного крахмала. Активность амилаз выражается в миллиграммах гидролизованного крахмала за 1 ч на 1 мл раствора ферментов или в миллиграммах гидролизованного крахмала на 1 мг белка за 1 ч (удельная активность).

### Ход работы

**1. Выделение амилаз.** Взвесить 4 г проросших семян пшеницы, ячменя или гороха, поместить в фарфоровую ступку, добавить немного промытого и прокаленного кварцевого песка, 10 мл 1 % раствора NaCl и тщательно растереть до получения однородной мелкодисперсной кашицы. Добавить еще 5 мл раствора NaCl и продолжать растирание.

Затем смазать нижнюю часть носика ступки вазелином и суспензию количественно перенести в центрифужную пробирку на 50 мл. Ступку и пестик несколько раз ополоснуть небольшими порциями раствора NaCl, следя за тем, чтобы объем суспензии в пробирке не превысил 40 - 45 мл. В пробирку поместить стеклянную палочку и содержимое тщательно перемешать, после чего оставить на 1 ч в холодильнике (каждые 15 мин перемешивать). Затем пробирку вынуть из холодильника, извлечь стеклянную палочку, все пробирки с исследуемыми ферментными препаратами уравновесить между собой, поместить в гнезда ротатора центрифуги и центрифугировать в течение 15 мин. Надосадочную жидкость (препарат амилаз) осторожно слить в чистую сухую колбу, закрыть и при необходимости поместить в холодильник.

**2. Приготовление субстрата.** Активность амилаз, выделенных из того или иного растительного объекта, определяют при помощи специально приготовленных растворов чистого крахмала заданной концентрации. В две градуированные на 10 мл чистые сухие пробирки вносят по 3 мл 0,2 н ацетатного буфера с рН 5,5 и по 3 мл 2 %-го раствора крахмала. При серийных определениях пробирки, заполненные забуференным раствором крахмала, можно заготовить сразу на всю серию. Осторожным легким встряхиванием содержимое пробирок перемешивают.

Заготовленные пробирки поставить на водяную баню, заранее нагретую до 40°C. По достижении субстратом температуры бани (проверить по контрольной пробирке, в которую вставлен термометр) в пробирки прилить по 0,5 мл ферментного препарата, смесь осторожно перемешать. В серии обязательно должна быть контрольная пробирка, которая содержит все те компоненты, что и остальные, но вместо препарата ферментов в нее внести 0,5 мл воды. Пробирки вновь поместить на 30 мин на водяную баню, нагретую до 40 °С.

Если есть термостат, пробирки с реакционной смесью лучше поместить в него. Через 30 мин инкубирования в реакционную смесь каждой пробирки для остановки реакции внести по 2 мл 1 н раствора НСl, содержимое их перемешать. Затем из каждой пробирки взять по 0,5 мл смеси и внести в мерные колбы на 50 мл, которые заранее до половины заполнены водой и в них внесено по 1 мл 0,1 н раствора НСl и по 5 капель 0,3 %-го раствора йода в 3 %-м растворе КJ. Раствор довести до метки водой, колбу закрыть и хорошо перемешать содержимое.

Окрашивание смеси лучше проводить во времени с интервалами 3 мин, стремясь к тому, чтобы период от начала окрашивания до спектрофотометрирования (колориметрирования) для каждой колбы был примерно одинаковым (в среднем 3 мин). Спектрофотометрирование окрашенных растворов выполняют при 595 нм (фотоэлектроколориметрирование—при красном светофильтре).

Активность амилаз (в 1 мг гидролизованного крахмала за 1 ч на 1 мл ферментативного раствора) рассчитывают по формуле

$$AA = \frac{E_k - E_0}{E_k} \cdot 2 \cdot 2 / 60,$$

где  $E_k$  и  $E_0$  — светопоглощение контрольного и опытного растворов, единиц шкалы прибора; 2 и 2 — пересчетные коэффициенты на 1 ч и 1 мл ферментного раствора; 60 — пересчетный коэффициент на 1 мг крахмала (3 мл 2 %-го раствора соответствуют 60 мг).

Полученные данные записывают в таблицу.

Номер пробирки	Объект исследования	Навеска материала, г	Объем препарата амилаза, мл	Объем раствора субстрата, мл	E <sub>595</sub>	AA

## Работа 24. Кислотный гидролиз крахмала

**Материалы и оборудование:** 1) крахмал; 2) 20%-й раствор соляной кислоты; 3) раствор J в KJ в капельнице; 4) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 5) фелингова жидкость; 6) электроплитка или газовая горелка; 7) весы технические с разновесом; 8) колба на 100-150 мл; 9) мерный цилиндр; 10) стаканчик химический; 11) штатив с пробирками (7 шт.); 12) градуированная пипетка на 2 мл; 13) калька.

**Объяснение.** Крахмал представляет собой полисахарид (точнее, смесь двух близких полисахаридов - амилозы и амилопектина) с эмпирической формулой (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>x</sub>·H<sub>2</sub>O. Молекула крахмала состоит из большого количества остатков глюкозы, соединенных попарно в мальтозы. Крахмал нерастворим в холодной воде, а в горячей воде образует коллоидный раствор - крахмальный клейстер. При кипячении крахмального клейстера с минеральной кислотой крахмал гидролизуется до глюкозы через ряд промежуточных продуктов с постепенно уменьшающимся молекулярным весом, называемых декстринами. Проследить за процессом гидролиза крахмала можно при помощи реакции с раствором йода, который окрашивает крахмал в синий цвет, амилодекстрин - в фиолетовый, эритродекстрин - в красный, ахродекстрин - в оранжевый, а с мальтодекстрином и мальтозой окрашивания уже не дает (остается желтым).

**Ход работы.** Приготовить 0,1%-й крахмальный клейстер. Для этого отвесить на технических весах 0,05 г крахмала, высыпать крахмал в стаканчик, добавить 10 мл воды и тщательно размешать. Налить в колбу 40 мл воды, нагреть до кипения, вылить в неё содержимое стаканчика, взболтать, дать раствору ещё раз закипеть и снять с огня.

Поставить в штатив 7 пробирок. Отлить в первую пробирку 4-5 мл крахмального клейстера. Добавить в колбу 1,5 мл 20% -й соляной кислоты и нагревать на электроплитке или газовой горелке. При появлении первых пузырьков (начало кипения) отлить из колбы 4-5 мл во вторую пробирку. Продолжать кипятить содержимое колбы, отливая из неё через каждые 5-10 минут по 4-5 мл в следующие пробирки. Дать пробам в пробирках охладиться, разбавить их водой и добавить по 5 капель раствора J в KJ. При отсутствии окрашивания йодом гидролиз можно считать окончанным. Прodelать с раствором, оставшимся в колбе, реакцию на редуцирующие сахара: налить 2-3 мл жидкости в чистую

пробирку, нейтрализовать кислоту содой, прилить равный объем фелинговой жидкости и довести до кипения.

Результаты записать в таблицу.

Окраска раствора	Продолжительность гидролиза, мин					
	0	5	10	15	20	25

Сделать вывод о причинах изменения окраски растворов и указать время, в течение которого произошел полный гидролиз крахмала.

### Работа 25. Получение шкалы гидролиза крахмала амилазой при разных температурах

**Материалы и оборудование:** 1) солод; 2) глицерин; 3) 1%-й крахмальный клейстер; 4) слабый раствор J в KJ (20 мл концентрированного раствора на 1 л воды); 5) весы с разновесами; 6) мерный цилиндр; 7) колбы на 100-150 мл (3 шт.); 8) фильтры бумажные; 9) воронка; 10) термометр; 11) электроплитка; 12) штатив с пробирками (16 шт.); 13) пипетки на 5 мл (2 шт.); 14) пипетки градуированные на 1-2 мл (3 шт.).

**Объяснение.** Под действием фермента амилазы крахмал гидролизуеться через те же промежуточные продукты (декстрины), которые образуются при кислотном гидролизе, в чем легко убедиться по реакции с раствором иода. Амилаза широко распространена в растениях. Весьма активная амилаза содержится в солоде — измельченных проросших зернах злаков.

Если налить в пробирки одинаковое количество раствора амилазы и крахмального клейстера, выдержать их при разных температурах и периодически делать пробы с иодом, то по скорости появления промежуточных продуктов можно судить об активности фермента.

**Ход работы.** Приготовить солодовую вытяжку, для чего поместить в колбу 10 г солода, залить его 50 мл теплой воды (35—40° С), добавить немного глицерина для ускорения извлечения фермента, перемешать, настоять не менее полчаса и профильтровать. Фильтрат содержит активную амилазу.

Налить в 14 пробирок, расставленных в 2 ряда, по 5 мл слабого раствора иода. Нагреть водяную баню до температуры 45°С (можно использовать колбу с водой нужной температуры) и приступить к опыту. Налить в 2 чистые пробирки по 5 мл крахмального клейстера и по 3 мл солодовой вытяжки и взболтать. Немедленно взять пипетками из этих пробирок по 0,5 мл жидкости и внести в первую пару пробирок с раствором иода, после чего одну пробирку с крахмалом и солодовой вытяжкой (вместе с пипеткой) поместить в водяную баню (в колбу с водой 45° С), а другую поставить в штатив. Через 2 мин влить по 0,5 мл жидкости во вторую пару пробирок с растворами иода, еще через 2 мин — в третью пару и т. д.

Результаты записать в таблицу, указывая в соответствующей графе окраску раствора иода.

Температура, °С	Продолжительность гидролиза, мин						
	0	2	4	6	8	10	12
15							
45							

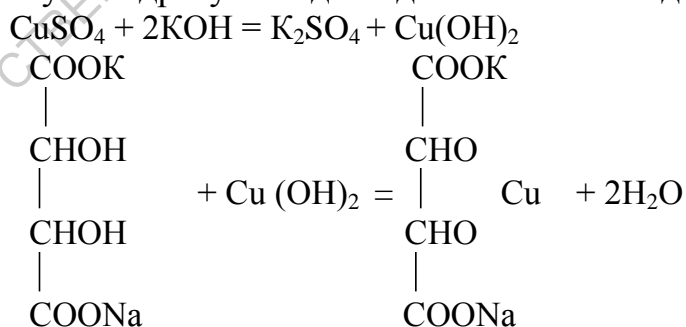
В зависимости от активности фермента интервал между взятием проб может быть изменен; важно только, чтобы пробы из обеих пробирок брались одновременно.

Сделать вывод о влиянии температуры на активность амилазы

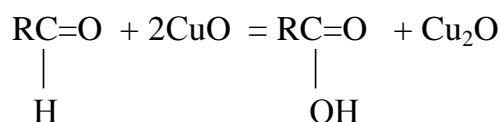
### Работа 26. Обнаружение запасных сахаров в растительном материале

**Материалы и оборудование:** 1) свежий или высушенный растительный материал (лук, морковь, сахарная свекла); 2) глюкоза; 3) сахароза; 4) 4%-й раствор  $\text{CuSO}_4$ ; 5) щелочной раствор сегнетовой соли (200 г сегнетовой соли и 150 г  $\text{KOH}$  или  $\text{NaOH}$  в 1 л воды); 6) 20%-я  $\text{HCl}$  в капельнице; 7)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  порошкообразный; 8) тарелки (3 шт.); 9) скальпели (3 шт.); 10) штатив с пробирками с резиновыми колечками (15 шт.); 11) водяная баня; 12) спиртовка; 13) мерный цилиндр на 100-200 мл; 14) колба для фелинговой жидкости; 15) пипетки на 2-3 мл (3 шт.); 16) держатель для пробирок; 17) воронки (3 шт.); 18) бумажные фильтры; 19) стакан химический; 20) спички.

**Объяснение.** Все моносахара, а также дисахариды типа мальтозы благодаря присутствию альдегидной или кетонной группы являются редуцирующими, т.е. обладают восстанавливающими свойствами. Распространенная в растениях сахароза - нередуцирующее вещество, т.к. ее молекула состоит из глюкозы и фруктозы, соединенных за счёт альдегидной группы глюкозы и кетонной группы фруктозы. Характерная реакция на редуцирующие сахара - реакция восстановления фелинговой жидкости. Эту жидкость готовят непосредственно перед употреблением путем смешивания равных объемов раствора медного купороса и раствора щелочи с сегнетовой солью. Последнюю прибавляют для того, чтобы не дать образовавшемуся гидрату оксида меди выпасть в осадок:



Для обнаружения редуцирующих сахаров, т.е. сахаров с альдегидной или кетонной группой, к исследуемому раствору приливают фелингову жидкость в равном объеме и доводят до кипения. При этом  $\text{CuO}$  восстанавливается с образованием кирпично-красного осадка  $\text{Cu}_2\text{O}$ :





Для обнаружения сахарозы сначала необходимо подвергнуть её гидролизу на глюкозу и фруктозу и лишь затем провести реакцию с жидкостью Фелинга. По количеству осадка  $\text{Cu}_2\text{O}$  можно судить о количестве редуцирующих сахаров, как содержащихся в исходном материале, так и образовавшихся в результате гидролиза сахарозы.

**Ход работы.** Перед тем как приступить к анализу растительного материала, следует приготовить фелингову жидкость и проделать следующие качественные реакции:

1) поместить в пробирку щепотку глюкозы, растворить в небольшом количестве воды, прилить равный объем фелинговой жидкости и нагреть до кипения;

2) растворить в воде щепотку сахарозы, добавить равный объем фелинговой жидкости и довести до кипения;

3) приготовить в пробирке раствор сахарозы, добавить 2-3 капли 20%-й  $\text{HCl}$  и кипятить в течение 1 мин; нейтрализовать кислоту содой (сыпать до прекращения выделения  $\text{CO}_2$ ), прилить равный объем фелинговой жидкости и вновь довести до кипения.

Отметить, образуется ли в пробирках кирпично-красный осадок, и сделать вывод о причинах наблюдаемых явлений.

**Анализ растительного материала.** Нарезать на мелкие кусочки луковицу лука, корнеплоды моркови и сахарной свеклы. Поместить материал в отдельные пробирки, заполнив их примерно на  $\frac{1}{4}$  часть объема пробирки, залить небольшим количеством воды и нагревать не менее 5 мин в кипящей водяной бане. Полученную вытяжку профильтровать и перенести при помощи пипетки одинаковые порции фильтрата в две чистые пробирки. С одной порцией проделать реакцию на редуцирующие сахара, во второй пробирке провести гидролиз сахарозы соляной кислотой; после нейтрализации кислоты прилить фелингову жидкость в равном объеме и вновь нагреть до  $100^\circ\text{C}$ .

Полученные результаты записать в таблицу, оценивая количество  $\text{Cu}_2\text{O}$  по пятибальной шкале.

Объект	Количество $\text{Cu}_2\text{O}$	
	без гидролиза	после гидролиза

Сделать выводы о присутствии в исследованном материале редуцирующих сахаров и сахарозы.

## ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ

### Работа 27. Потеря сухого вещества при прорастании семян

**Материалы и оборудование:** 1) семена гороха; 2) весы; 3) разновес; 4) опилки лиственного дерева, прокипяченные с водой и отжатые для удаления экстрактивных веществ; 5) тарелка; 6) сушильный шкаф; 7) эксикатор; 8) бюкс; 9) стаканы (2 шт.), один из них снабжен этикеткой; 10) фильтровальная бумага; 11) кристаллизатор.

**Объяснение.** Дыханием называют биологическое окисление органических веществ до углекислоты и воды, происходящее с освобождением энергии. Этот процесс может быть выражен следующим суммарным уравнением:



Интенсивность дыхания определяют, измеряя количество поглощенного клетками кислорода или выделенной углекислоты, или окисленного органического вещества. Наиболее удобный объект для учета количества израсходованных на дыхание органических веществ - прорастающие семена. Проращивание ведут в темноте на влажных опилках, т. е. в условиях, исключающих возможность как почвенного, так и воздушного питания. По истечении определенного времени проростки высушивают и взвешивают. Для определения исходного, сухого веса необходимо использовать другую порцию таких же семян, поскольку высушивание при высокой температуре убивает зародыши и делает семена не всхожими.

**Ход работы.** Поместить на чашку весов 10 здоровых и по возможности одинаковых семян и уравновесить их второй порцией из десяти таких же семян. Одну порцию поместить на 1—2 ч в сосуд с небольшим количеством воды, чтобы вызвать набухание семян. Вторую порцию семян взвесить, поместить в бюкс, высушить при температуре 100—105°C, охладить в эксикаторе и определить абсолютно сухой вес. Результаты определения занести в таблицу.

Наполнить стакан, снабженный этикеткой, влажными и отжатыми от избытка воды опилками, отсыпать часть опилок, разложить набухшие семена и покрыть их сверху опилками, которые следует слегка уплотнить. Поместить стакан в темноту и ежедневно поливать водой.

Через неделю извлечь проростки из опилок (чтобы не повредить корни, в стакан следует налить воды), тщательно промыть корни, обсушить проростки фильтровальной бумагой и определить сырой вес. Поместить проростки в пакет из фильтровальной или газетной бумаги, высушить до абсолютно сухого веса и взвесить. Если проросли не все семена, то учитывают только проросшие, а затем пересчитывают результаты на то количество семян, которое было посеяно.

Полученные данные оформить в виде таблицы.

Вес 10 семян, г		Содержание воды в семенах, %	Вес 10 проростков, г		Содержание воды в проростках, %	Потеря сухого вещества		
воздушно-сухой	абсолютно сухой		сырой	абсолютно сухой		в г, на 10 семян	в % от исходного веса	
		за 7 суток			за 1 сутки			

Сделать выводы о причинах изменения сырого и сухого веса при проращивании семян.

### Работа 28. Определение дыхательного коэффициента прорастающих семян

**Материалы и оборудование:** 1) прорастающие семена подсолнечника; 2) 20%-й раствор едкого натра; 3) прибор для определения дыхательного коэффициента; 4) пинцеты; 5) полоски фильтровальной бумаги; 6) песочные часы на 2 мин; 7) стеклянные чашки; 8) пипетки; 9) стеклянные палочки; 10) конические колбы на 250 мл.

**Объяснение.** Важный показатель химической природы дыхательного субстрата—дыхательный коэффициент (ДК), т. е. отношение объема выделенного диоксида углерода ( $V_{CO_2}$ ) к объему поглощенного кислорода ( $V_{O_2}$ ). При окислении углеводов дыхательный коэффициент равен 1, при окислении жиров (более восстановленных соединений) кислорода поглощается больше, чем выделяется диоксида углерода и  $ДК < 1$ . При окислении органических кислот (менее восстановленных, чем углеводы, соединений)  $ДК > 1$ .

Величина ДК зависит и от других причин. В некоторых тканях из-за затрудненного доступа кислорода наряду с аэробным происходит анаэробное дыхание, не сопровождающееся поглощением кислорода, что приводит к повышению значения ДК. Величина коэффициента обусловлена также полнотой окисления дыхательного субстрата. Если, кроме конечных продуктов, в тканях накапливаются менее окисленные соединения (органические кислоты), то  $ДК < 1$ .

**Ход работы.** Половину пробирки заполняют прорастающими семенами подсолнечника. Плотнo закрывают пробирку каучуковой пробкой с измерительной трубкой и вводят в конец этой трубки при помощи пипетки небольшую каплю воды, создавая таким образом внутри прибора замкнутую атмосферу. Во время опыта обязательно поддерживают постоянную температуру. Для этого ставят прибор в штатив или колбу и не нагревают руками или дыханием. Измеряют, на сколько делений шкалы продвинется капля внутрь трубки за 2 мин. Для получения точного результата вычисляют среднюю величину из несколь-

ких отсчетов. Полученная величина (А) выражает разницу между объемом поглощенного при дыхании кислорода и объемом выделенного диоксида углерода.

Открывают пробирку с семенами и вкладывают в нее пинцетом свернутую в кольцо полоску фильтровальной бумаги, смоченную 20 %-м раствором едкого натра. Снова закрывают пробирку, помещают в измерительную трубку новую каплю воды и продолжают измерение скорости ее движения при той же температуре. Новые данные, из которых опять вычисляют среднюю величину за тот же период, выражают объем поглощенного при дыхании кислорода (В), так как выделенный диоксид углерода поглощается щелочью. Дыхательный коэффициент будет равен

$$V_{CO_2} / V_{O_2} = (B-A) / B.$$

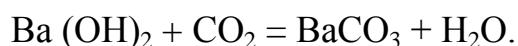
Результаты опыта записывают в таблицу.

Условия	Отсчёты, мм за 2 мин				ДК (B-A) / B
	1	2	3	среднее	
Без щелочи (А)					
Со щелочью (В)					

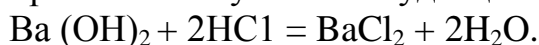
### Работа 29. Определение интенсивности дыхания по количеству выделенной углекислоты (по Бойсен-Иенсену)

**Материалы и оборудование:** 1) проросшие и непроросшие семена, покоящиеся и набухшие почки, листья, цветки и другой растительный материал; 2) 0,1 н раствор Ва(ОН)<sub>2</sub> в бюретке, закрытой пробкой, в которую вставлена трубка с натронной известью; 3) 0,1 н раствор НСl в бюретке; 4) фенолфталеин в капельнице; 5) весы; 6) разновес; 7) одинаковые конические колбы (3 шт.) и резиновые пробки к ним (две пробки — с металлическими крючками); 8) куски марли размером 10x10 см (2 шт.); 9) парафин; 10) электроплитка.

**Объяснение.** Для определения интенсивности дыхания по количеству выделенной углекислоты в замкнутый сосуд помещают навеску исследуемого материала и определенное количество раствора щелочи. Выделяемая в процессе дыхания углекислота реагирует со щелочью, в результате чего концентрация раствора уменьшается:



Через определенное время оставшуюся в сосуде щелочь титруют:



Сравнивают полученную величину с результатом титрования такого же количества исходного раствора щелочи. Последнее необходимо для определения исходной концентрации щелочи и одновременно для учета того небольшого количества СО<sub>2</sub>, которое содержалось в сосуде до опыта, а также поглощаемого щелочью во время открывания сосуда. Разность между результатами титрова-

ния содержимого контрольного и опытного сосудов прямо пропорциональна количеству выделенного при дыхании  $\text{CO}_2$ .

Продолжительность экспозиции зависит от размера навески и от интенсивности дыхания исследуемого объекта. При очень короткой экспозиции разность между результатами титрования контрольной и опытной колб будет не достоверной. Наоборот, если в колбе останется слишком мало барита, то может произойти неполное поглощение  $\text{CO}_2$ . Желательно поэтому подобрать такую экспозицию, чтобы на связывание  $\text{CO}_2$  было израсходовано 10—40% щелочи (если, например, на титрование в контрольной колбе пошло 10 мл  $\text{HCl}$ , то на титрование раствора в опытной колбе должно пойти не более 9 и не менее 6 мл).

**Ход работы.** Поместить навеску исследуемого материала (5—10 г) в марлевый мешочек и прикрепить его к пробке при помощи крючка, вставленного в пробку. Провести пробную сборку установки, проверив, свободно ли проходит мешочек с материалом через горло колбы и не опускается ли он слишком низко. Внести в колбу две капли фенолфталеина и налить 10 мл децинормального раствора  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ . Быстро опустить в колбу материал, плотно (вращательным движением) закрыв колбу пробкой, и записать время начала опыта. При использовании корковых пробок необходимо залить их парафином.

Задача работы—сравнение интенсивности дыхания разных объектов. Для этого нужно взять две колбы и поместить в них различные части одного и того же растения, например листья и стебли или проросшие и непроросшие семена и т. п.

В контрольную (пустую) колбу также налить 10 мл барита и 2 капли фенолфталеина и плотно закрыть пробкой. Колбы с объектами, содержащими хлорофилл, необходимо на все время опыта поместить в темноту для исключения процесса фотосинтеза.

Время от времени колбы следует осторожно покачивать, чтобы разрушить пленку  $\text{BaCO}_3$ , препятствующую полноте поглощения  $\text{CO}_2$ , не допуская попадания ни одной капли раствора на мешочек с материалом.

Через 1—2 ч вынуть материал, быстро закрыть колбу пробкой и отметить время окончания опыта. Провести титрование оставшейся щелочи, приливая через отверстие в пробке 0,1 н соляную кислоту до исчезновения розового окрашивания. Чтобы избежать уменьшения концентрации раствора барита из-за поглощения углекислоты воздуха, следует провести титрование, закрыв колбу резиновой пробкой с двумя отверстиями, одно из которых закрыто трубкой с натронной известью, а другое — плотно вставленным концом бюретки. Контрольную колбу можно титровать через 20 мин после наливания раствора барита (за это время колбу необходимо периодически взбалтывать).

Интенсивность дыхания вычисляется по формуле

$$X = (a - b) K \cdot 2,2/pt ,$$

где  $a$ —результат титрования содержимого контрольной колбы, мл;

$b$  — результат титрования содержимого опытной колбы, мл;

К—поправка к титру HCl;

2,2—количество мг CO<sub>2</sub>, эквивалентное 1 мл 0,1 н HCl;

p — вес пробы, г;

t—продолжительность опыта, ч.

Сделать вывод, сопоставив интенсивность дыхания разных объектов.

Результаты записать в таблицу.

Объект	Вес пробы, г	Налито Ва(OH) <sub>2</sub> , мл	Время			Пошло HCl, мл		Поправка к титру HCl	Интенсивность дыхания, мг/г·ч
			начало	конец	продолжительность опыта, ч	контроль	опыт		

### Работа 30. Определение содержания аскорбиновой кислоты, глутатиона и общей редуцирующей активности растительной ткани методом Петта в модификации Прокошева

**Материалы и оборудование:** 1) растение с листьями нескольких ярусов, проростки пшеницы или другой культуры; 2) 20%-й раствор метафосфорной кислоты; 3) 0,001 н раствор йодата калия; 4) 15%-й раствор йодида калия; 5) 1%-й раствор крахмала; 6) 0,001 н раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола; 7) кристаллическая аскорбиновая кислота; 8) кварцевый песок; 9) бюретки; 10) пипетки на 10 мл и на 1 мл; 11) мерные колбы на 50 мл; 12) конические колбы на 100 мл; 13) воронки; 14) фильтры; 15) весы с разновесами; 16) мерные цилиндры на 25 мл.

**Объяснение.** Аскорбиновая кислота — неустойчивое соединение, способное к обратимому окислению и восстановлению, что обусловлено наличием в молекуле двух енольных гидроксильных групп, легко окисляющихся в дикетогруппировку.

Глутатион — трипептид, состоящий из остатков глутаминовой кислоты, цистеина и гликокола. Благодаря сульфгидрильной группе глутатион может подвергаться окислительно-восстановительным превращениям.

Аскорбиновая кислота и глутатион — сильные восстановители и могут восстанавливать —S—S— связи белков, а также функционируют как промежуточные переносчики водорода при окислении некоторых органических кислот в процессе дыхания. Окислительно-восстановительные превращения аскорбиновой кислоты в растениях связаны с ферментативными превращениями окисленного и восстановленного глутатиона. Содержание этих веществ в растительных тканях служит показателем их восстановительной и общей физиологической активности.

Определение содержания аскорбиновой кислоты основано на ее способности восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол. Последний дает два вида реакции. Один обусловлен изменением рН среды: в щелочной среде окраска интенсивно-синяя, в кислой — бледно-красная. Вторым видом реакций — восстановительно-окислительный переход от окисленной формы (темно-синяя окраска) в восстановленную (бесцветная). Последнюю реакцию и используют для определения аскорбиновой кислоты. Титруют до появления розового окрашивания, обусловленного избытком индикатора в кислой среде.

Определение содержания глутатиона основано на его способности восстанавливать свободный йод, образующийся при титровании экстракта из растений йодатом калия в кислой среде.

Аскорбиновая кислота, как и глутатион, восстанавливает свободный йод, поэтому титрованием устанавливают суммарную восстановительную активность растительной ткани, которую выражают в миллилитрах йодата калия. Содержание глутатиона находят, вычитая из данных титрования экстракта йодатом калия данные титрования 2,6-дихлорфенолиндофенолом.

**Ход работы.** Поместить в фарфоровую ступку 2 г листьев, растереть с кварцевым песком и с 20 мл 5 %-го раствора метафосфорной кислоты (НРОз) до состояния однородной кашицы, которую перенести через воронку в мерную колбу на 50 мл, смывая ступку остатком НРОз. Содержимое колбы довести до метки дистиллированной водой, перемешать и настаивать 5 мин. Затем колбу взбалтывают 2-3 мин и фильтруют содержимое через сухой складчатый фильтр в сухую колбу.

Для определения содержания аскорбиновой кислоты в два бюкса взять по 5 мл фильтрата и титровать из бюретки 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до слабо-розового окрашивания, сохраняющегося в течение 1 мин.

Для определения количества глутатиона и общей редуцирующей активности налить по 5 мл фильтрата в два других бюкса, добавить 2 - 3 капли 15 %-го раствора КJ, 5 капель 1 %-го раствора крахмала и титровать из другой бюретки 0,001 н раствором КJОз до слабо-синего окрашивания, сохраняющегося 1 мин.

Содержание аскорбиновой кислоты (А) и глутатиона (Г), а также редуцирующую активность (Ра) растительной ткани рассчитать по следующим формулам:

$$A = (aK) \cdot 0,088 \cdot M \cdot 100 / mn, \text{ мг \%};$$

$$Г = (b - aK) \cdot 0,307 \cdot M \cdot 100 / mn, \text{ мг \%};$$

$$Pa = bM \cdot 100 / m n, \text{ мл},$$

где а — количество 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование, мл; b — количество йодата калия, израсходованное на титрование, мл; К — соотношение объемов: йодата калия, мл / 2,6-дихлорфенолиндофенола, мл; 0,088 — количество восстановленной аскорбиновой кислоты, мл, эквивалентное 1 мл 0,001 н раствора краски; 0,307 — количество восстановленно-

го глутатиона, мг, эквивалентное 1 мл 0,001 н раствора йодата калия; n— навеска материала, мг; M—общий объем экстракта, мл; m – объем экстракта, взятого для титрования, мл.

Результаты опыта занести в таблицу.

Ярус	Навеска листьев, г		Объем экстракта, мл		Пошло на титрование аскорбиновой кислоты, мл		Отношение объемов КЮ <sub>3</sub> / краска	Пошло на титрование филтрага, мл		Содержание, мг % массы сырых листьев		Общая редуцирующая активность, мл 0,001 н КЮ <sub>3</sub> на 100 г сырых листьев
	общий	для титрования	краски	КЮ <sub>3</sub>	краски	КЮ <sub>3</sub>		аскорбиновой кислоты	глутатиона			
Верхний												
Нижний												

Для приготовления раствора аскорбиновой кислоты на 2%-м растворе метафосфорной кислоты в мерную колбу на 50 мл следует налить 20 мл 5 %-го раствора НРО<sub>3</sub>, бросить кристаллик аскорбиновой кислоты и довести жидкость в колбе до метки дистиллированной водой. Оттитровать 5 мл полученного раствора в двукратной повторности раствором краски и раствором йодата калия, как указано выше, и рассчитать соотношение объемов.

Содержание аскорбиновой кислоты, глутатиона и общую восстановительную активность определить в листьях верхнего и нижнего ярусов. В качестве объектов можно использовать также проростки сельскохозяйственных культур, выращенных в разных условиях питания, освещения и влажности.

## РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ

### Работа 31. Учёт роста методом меток

**Материалы и оборудование:** 1) проросшие семена бобов, гороха или кукурузы с прямыми корешками длиной около 2 см; 2) проростки подсолнечника, тыквы или фасоли, выращенные в темноте в горшочках с почвой, с подсемядольным коленом длиной 2-3 см; 3) тушь в баночке или тигельке; 4) стеклянная банка с этикеткой, закрытая корковой пробкой; 5) фильтровальная бумага; 6) ножницы; 7) булавки (3 шт.); 8) кисточка или заостренная спичка; 9) полоска миллиметровой бумаги; 10) пинцет; 11) чашки Петри.



**Объяснение.** Корень и стебель растут в длину за счёт деятельности верхушечной меристемы. В процессе роста растительные клетки последовательно проходят три фазы: 1) эмбриональную, 2) растяжения и 3) дифференцировки. Наиболее значительное увеличение размеров наблюдается во второй фазе роста клеток.

Для обнаружения зоны растяжения клеток удобно пользоваться методом нанесения на поверхность растущего органа меток тушью на одинаковых расстояниях одна от другой. По изменению расстояния между метками судят о росте разных участков исследуемого органа.

### Ход работы

**1. Определение зоны роста корня.** Извлечь из опилок три проросших семени и осторожно удалить влагу с поверхности корешков кусочком фильтровальной бумаги. При помощи заостренной спички нанести на корни метки тушью: подложить под корешок полоску фильтровальной бумаги и сделать первую метку на расстоянии 1 мм от конца корня, а следующие - через каждые 2 мм.

Поместить проростки во влажную камеру, приготовленную из банки, стенки которой нужно обложить фильтровальной бумагой, а на дно налить немного воды. Проколоть семя булавкой и прикрепить к пробке так, чтобы корешок был расположен вертикально вниз. Чтобы семя не подсыхало, подложить под него узкую полоску фильтровальной бумаги, верхний конец которой наколоть на ту же булавку, а нижний опустить в воду, налитую на дно банки. Через сутки измерить расстояние между метками. Если метки, растянувшись при росте, превратились в полоски, то измерения проводят с их середины. Вычислить приросты для каждого участка, вычитая из полученных величин исходное расстояние между метками.

Записать результаты в таблицу, считая участки корня снизу вверх (за первый участок принимаем расстояние от кончика корня до первой метки).

**2. Определение зоны роста стебля.** Нанести на подсемядольное колено трёх проростков подсолнечника или фасоли метки тушью на расстоянии 2 мм одна от другой, начиная от места прикрепления семядолей. Полить растения и поместить в темноту. Через сутки измерить расстояния между метками и определить прирост каждого участка, вычитая из полученных исходные интервалы (2 мм).

Зарисовать корни и стебли с нанесенными на них метками в начале опыта и в конце, обозначив на вторых рисунках зоны роста - эмбриональную, растяжения и дифференцировки. На основе полученных средних данных вычертить кривые “большого периода роста” корня и стебля, откладывая на оси абсцисс номера участков, а по оси ординат - приросты.

Результаты записать в таблицу.

Объект	Прирост участков, мм								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Корни									
Стебли									

В выводах указать, как происходит рост осевых органов в длину, сопоставив размеры зон растяжения корня и стебля.

### Работа 32. Полярность черенков

**Материалы и оборудование:** 1) безлистные побеги тополя длиной 50-60 см, выросшие из спящих почек в основании ствола или из корневых отпрысков; 2) стеклянный цилиндр высотой около 25 см с корковой пробкой; 3) скальпель; 4) ножницы; 5) фильтровальная бумага; 6) нитки.

**Объяснение.** Полярностью называют неравноценность физиологических особенностей и физико-химических свойств морфологически противоположных концов растения и его отдельных частей (органов, клеток). Полярность проявляется, например, в образовании на противоположных концах тела растения различных органов, независимо от положения по отношению к силе тяжести. Полярность можно продемонстрировать на черенках тополя, легко образующих придаточные корни (для опыта следует использовать побеги, выросшие у основания ствола, т.к. черенки, вырезанные из кроны взрослых деревьев, укореняются значительно хуже). Одна из причин полярности черенков - односторонний (полярный) транспорт ауксина, стимулирующего в местах своего накопления образование каллуса и заложение придаточных корней.

**Ход работы.** Приготовить влажную камеру, для чего обложить внутри стеклянный цилиндр фильтровальной бумагой и налить на дно немного воды; наклоняя цилиндр, добиться плотного прилипания бумаги к его стенкам.

Вырезать из побега тополя три одинаковых черенка, длина которых должна быть на 5-6 см меньше высоты цилиндра. У одного черенка снять в средней части кольцо коры (до древесины) шириной около 1 см. Подвесить черенки при помощи ниток в пробке так, чтобы два черенка, в том числе окольцованный, находились в нормальном положении, а третий - в перевернутом. Опуская черенки в цилиндр, следить за тем, чтобы их концы не касались воды. Черенки должны беспрепятственно снабжаться кислородом, поэтому цилиндр закрывают пробкой неплотно. Поставить цилиндр с черенками в темное место и время от времени, по мере испарения воды, подливать её на дно цилиндра.

Через 2-3 недели можно наблюдать образование на черенках каллуса, придаточных корней и побегов. Сделать соответствующие рисунки.

В выводах указать, по какой части стебля и в каком направлении передвигается ауксин.

### Работа 33. Влияние индолилуксусной кислоты (ИУК) на укоренение черенков

**Материалы и оборудование:** 1) десятидневные проростки фасоли, выращенные на свету в сосудах с влажными опилками; 2) побеги ивы корзиночной (*Salix viminalis*, но не *S. caprea*); 3) раствор ИУК (гетероауксина) 70 мг/л; 4) ланолиновая паста с ИУК и контрольная (водная) паста; 5) стаканы фаянсовые на 100-200 мл (2 шт.); 6) вазоны или банки с влажным песком; 7) лезвие бритвы; 8) скальпель; 9) карандаш по стеклу; 10) толстая деревянная палочка (карандаш).

**Объяснение.** Природный фитогормон ИУК и некоторые синтетические вещества индуцируют заложение придаточных корней на стеблях черенков травянистых и древесных растений. Обработка стимуляторами роста широко используется в практике растениеводства при вегетативном размножении трудно укореняющихся растений.

Черенки фасоли способны укореняться и без обработки, однако корнеобразование (ризогенез) у них значительно усиливается под влиянием стимуляторов роста, вследствие чего этот объект можно использовать для определения физиологической активности ещё не изученных веществ.

#### **Ход работы**

**Опыт 1.** Взять два фаянсовых стакана (или стеклянных, обернутых черной бумагой) и налить в один стакан водопроводную воду слоем 4-5 см, а в другой - раствор ИУК концентрации 70 мг/л, сделав на стаканах соответствующие надписи. Срезать при помощи бритвы несколько (не менее четырех) одинаковых десятидневных проростков фасоли высотой 10-15 см (у корневой шейки). Половину черенков поставить в стакан с водопроводной водой (контроль). Другие черенки выдержать в течение трех часов в растворе ИУК, после чего слить раствор, сполоснуть стакан и стебли черенков водой и поместить их в водопроводную воду, налитую в таком же количестве, как и в контроле. Оставить черенки на свету при комнатной температуре.

Через несколько дней, когда на стеблях отрастут придаточные корни, измерить зону ризогенеза и подсчитать количество корней на каждом черенке.

**Опыт 2.** Нарезать одинаковые черенки ивы и удалить с них нижние листья. У одних черенков смазать нижнюю часть стебля ауксиновой пастой, у других (контрольных) - водной пастой. Взять два сосуда с влажным песком и снабдить их соответствующими надписями. Сделать в песке лунки толстой палочкой и осторожно посадить черенки, прижав песок пальцами. Оставить растения на свету и ежедневно поливать.

Через 2 - 3 недели извлечь черенки из песка и установить стимуляцию корнеобразования.

#### **Работа 34. Влияние гетероауксина на рост корней**

**Материалы и оборудование:** 1) семена пшеницы, подсолнечника и др.; 2) 0,01%-й раствор гетероауксина; 3) колба; 4) чашки Петри (5 шт.); 5) пипетки градуированные на 10 мл (2 шт.) и на 1 мл; 6) клей; 7) бумага; 8) миллиметровая линейка.

**Объяснение.** Рост растительных клеток регулируется фитогормонами группы ауксина, из которых наибольшее значение имеет гетероауксин ( $C_{10}H_9O_2N$ ).

В малых концентрациях эти вещества стимулируют рост, а в больших оказывают отрицательное влияние на растительные клетки.

**Ход работы.** Взять 5 чашек Петри, снабдить их этикетками и налить в них растворы гетероауксина разной концентрации:

в 1-ю чашку налить 10 мл 0,01%-го раствора,

во 2-ю — 1 мл 0,01%-го раствора и 9 мл воды,

в 3-ю — 1 мл раствора из 2-й чашки и 9 мл воды,

в 4-ю — 1 мл раствора из 3-й чашки и 9 мл воды,

в 5-ю — 10 мл воды. (Переносить растворы из одной чашки в другую можно одной и той же пипеткой, используя её и для перемешивания растворов в чашках.)

Поместить в каждую чашку по 10 шт. одинаковых семян, закрыть чашки крышками и поставить в теплое темное место. Через 5-7 дней измерить длину корешков всех проростков и занести полученные данные в таблицу.

№ чашки	Концентрация гетероауксина, %	Общая длина корней десяти проростков, см
1	0,01	
2	0,001	
3	0,0001	
4	0,00001	
5	0	

Сделать вывод о влиянии концентрации гетероауксина на рост корней.

### Работа 35. Хемотропизм корней (по Ф.М.Породко)

**Материалы и оборудование:** 1) проростки гороха с прямыми корешками длиной 2—3 см, выращенные строго вертикально в стакане с влажными опилками; 2) желатин или химически чистый агар-агар; 3) 2%-й раствор однозамещенного фосфата аммония; 4) 2,5%-й раствор NaCl; 5) пинцет; 6) ножницы; 7) технические весы с разновесами; 8) электроплитка или газовая горелка с треножником и асбестовой сеткой; 9) конические колбы на 1 л и на 200—300 мл; 10) мерный цилиндр; 11) невысокие химические стаканы диаметром 7—8 см (3 шт.); 12) крышки от чашек Петри для закрытия стаканов (3 шт.); 13) пипетки на 5—10 мл (3 шт.); 14) маленькие пробирки диаметром 1 см (3 шт.); 15) вязальная спица или кусок толстой алюминиевой проволоки; 16) картон; 17) фильтровальная бумага; 18) дистиллированная вода; 19) карандаш по стеклу.

Корни растений (а также гифы грибов) способны реагировать на химические раздражения: при неравномерном распределении каких-либо веществ в среде их обитания возникают хемотропические изгибы. Если вещество необходимо для растения и присутствует в оптимальной для роста концентрации, то наблюдается положительный хемотропизм (рост по направлению к этому ве-

шеству), тогда как при неблагоприятном действии вещества на клетки проявляется отрицательный хемотропизм.

**Ход работы.** Приготовить 500 мл 8%-го раствора желатина или 2%-го агар-агара (агар необходимо брать светлый, чтобы получился прозрачный раствор): навеску желатина или агара залить в большой колбе горячей дистиллированной водой и осторожно кипятить, помешивая, на слабо нагретой плитке или на горелке с асбестовой сеткой до полного растворения.

Разлить горячий раствор в 3 стакана слоем 6—7 см и пока он не застыл, погружить в середину каждого стакана маленькую пробирку с холодной водой, закрепив ее в куске картона с отверстием, равным диаметру пробирки, которая должна быть установлена строго вертикально и не доходить до дна стакана. Дождаться полного застывания студня (желатин застывает при комнатной температуре за 12 ч, агар-агар — гораздо быстрее; для ускорения застывания можно поставить стаканы в холодильник). Опрокинув стакан, вылить из пробирки воду, налить в нее горячую воду и осторожно вынуть ее вращательным движением из студня.

Заполнить образовавшиеся лунки растворами  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  и  $\text{NaCl}$ , сделав соответствующие надписи. Наливать растворы следует пипеткой, не допуская попадания жидкости на поверхность студня. Лунку третьего стакана заполнить дистиллированной водой (контроль).

Сделать с помощью горячей спицы или толстой проволоки 4—5 строго вертикальных неглубоких каналов на расстоянии 1—2 см от лунок с растворами. Опустить пинцетом в каждый канал корешок проростка гороха, тщательно соблюдая вертикальность. Закрыть стаканы крышками от чашек Петри, выложенными внутри влажной фильтровальной бумагой, и поставить в темное место.

Через несколько дней установить, как растут корни под влиянием веществ, находящихся на некотором удалении от них. Зарисовать корни растений разных вариантов опыта и сделать соответствующие выводы.

### Работа 36. Действие света на рост растений

**Материалы и оборудование:** 1) наклюнувшиеся семена гороха, бобов или других двудольных растений; 2) вазоны или фаянсовые стаканы с влажным песком или опилками (3 шт.); 3) стеклянная палочка; 4) миллиметровая линейка; 5) цветные карандаши.

**Объяснение.** Свет влияет на прохождение клетками фазы растяжения, на дифференцировку тканей (в первую очередь механических), на формирование листьев и на ряд других процессов. Растения, выращенные в темноте, называются этиолированными; они резко отличаются от растений, выросших на свету, по внешнему и внутреннему строению, а также по составу пигментов. Поскольку предотвратить этиоляцию могут несколько минут ежедневного освещения, то можно сделать вывод, что этиоляция не связана с отсутствием фотосинтеза.

**Ход работы.** Высадить в три сосуда с влажным песком или опилками по 5-6 наклюнувшихся семян гороха или другого двудольного растения (перед посадкой сделать углубления палочкой). Поместить два сосуда в полную темноту, а третий - на свет и ежедневно поливать. Через 7 дней выставить один из сосудов, находившихся в темноте, на свет. Через 2 недели осмотреть и зарисовать растения, обратив внимание на их окраску, измерить высоту стеблей, длину и ширину листьев определенного яруса (например, 2-го снизу) у нескольких растений и вычислить средние величины. Результаты записать в таблицу.

Вариант опыта	Длина стебля и корня, мм	Размеры листьев, см	
		длина	ширина
Темнота			
7 дней темноты, затем свет			
Свет			

Ответить на следующие вопросы:

1. Чем отличаются этиолированные растения от выросших на свету?
2. Как влияет свет на отдельные фазы роста клеток?
3. Устраняется ли этиоляция после выставления на свет растения, выросшего в темноте?

### Работа 37. Биологический контроль за ростом и развитием растений (по Куперман)

**Материалы и оборудование:** 1) проростки злаковых растений; 2) бинокулярная лупа; 3) препаровальные иглы ( 2 шт.); 4) предметное стекло.

**Объяснение.** У одно- и двулетних растений выделяют 12 последовательных этапов органообразования (органогенез). Показано, что, воздействуя на определенные этапы органогенеза температурой, освещенностью, изменяя режим водного питания, можно изменить число междоузлий, строение цветка и другие важные признаки у злаков.

#### Этапы органогенеза в онтогенезе высших растений.

Фенологическими наблюдениями регистрируются основные фазы роста и развития растений, но они не отражают всего хода формирования органов растений, всех сложных органообразовательных процессов, протекающих в межфазные периоды. Установлено, что формирование каждого органа, как и растения в целом, проходит этапами. На каждом из этапов органогенеза происходит формирование характерных для данного этапа одноименных органов.

I этап органогенеза проходит в недифференцированном конусе нарастания. При прорастании семени либо в начале развития вегетативной почки конус нарастания несколько увеличивается в размерах и имеет вид небольшой округлой выпуклости. На этом этапе в конусе нарастания, морфологически еще не дифференцированном, идут активные процессы анатомической дифференциа-

ции первичной меристемы на основные ткани будущего стебля и листьев. У основания конуса нарастания можно различить зародышевые листья.

II этап характеризуется дифференциацией конуса нарастания на узлы и укороченные междоузлия зачаточного стебля, а также формированием листовых зачатков. В пазухах листовых валиков закладываются точки роста боковых побегов. На каждом побеге дифференцируется относительно определенное для того или иного сорта число узлов, междоузлий и листовых валиков. На этом этапе частично предопределяется типичная форма растения и возможные отклонения в строении растения в целом.

III этап характеризуется вытягиванием и сегментацией конуса нарастания — зачаточной оси соцветия. В этот период идет процесс закладки и дифференциации оси соцветия.

IV этап характеризуется формированием боковых осей, так называемых лопастей соцветия, зачаточных веточек соцветия или колосковых бугорков у злаков.

V этап характеризуется формированием цветков. На этом этапе определяется число цветковых бугорков в каждом колоске. Цветковые бугорки дифференцируются сначала на чашечку и венчик, а затем образуются генеративные бугорки (будущие тычинки и пестики).

VI этап характеризуется формированием пыльниковых мешков и завязи пестика. На этом этапе проходит формирование материнских клеток пыльцы.

VII этап характеризуется завершением процесса формирования пыльцы.

VIII этап—происходит выметывание, выколашивание, что совпадает с одноименной фазой, обычно регистрируемой фенологическими наблюдениями.

IX этап — период цветения, оплодотворения, образования зиготы.

X этап—формирование плодов и семян.

XI этап характеризуется накоплением питательных веществ в плодах и семенах.

XII этап—накопленные в плодах и семенах питательные вещества превращаются в запасные вещества.

**Ход работы.** Проведение биологического контроля складывается из следующих работ:

1. Выбор растений для анализа и взятия проб.
2. Регистрация пробы.
3. Описание растений и измерение их органов.
4. Определение этапа органогенеза.
5. Документация и анализ хода органогенеза.

Для биологического контроля берутся растения, состояние которых и фаза роста являются типичными для данного поля и отражают состояние большинства растений. Если наблюдения ведутся за яровыми, пробы берутся через день, начиная с прорастания семян и до наступления V этапа органогенеза; на VI—IX этапах органогенеза пробы берутся ежедневно, на X—XII этапах интервалы со-

ставляют 3—5 дней. Каждую пробу снабжают этикеткой, в которой указываются: дата взятия пробы, сорт (вид), варианты опыта и т. д.

### **Определение этапов органогенеза**

Для того чтобы определить этап органогенеза, конус нарастания необходимо отпрепарировать. У злаков, находящихся в фазе кущения (на I—III этапах), конус нарастания помещается вблизи узла кущения. Перед препарированием у самого основания стебля подрезают листья, которые затем удаляют. На первых этапах органогенеза размеры всего конуса нарастания колеблются от долей миллиметра до 15—20 мм. Зачатки последних (верхних) листьев также очень малы. Поэтому окончательное препарирование конуса нарастания приходится производить при увеличении (бинокулярная лупа). Для определения этапа органогенеза в начале развития растения (I—IV этапы) при быстром просмотре достаточно отпрепарированный конус нарастания поместить на сухое предметное стекло и без покровного стекла рассматривать при малых увеличениях.

При переходе злаков к стеблеванию конус нарастания у них находится над самым верхним узлом побега, и листья в этом случае подрезают именно здесь. С наступлением V этапа органогенеза производится уже более детальное препарирование самого конуса нарастания. Поместив его на предметном стекле под лупой и придерживая у основания одной препаровальной иглой, другой отделяют один, наиболее развитый, зачаточный цветок, раздвигают или удаляют его покровы иглой и определяют степень дифференциации тычинок и пестика. Для определения этапов дифференциации пыльцы выделенные из цветка пыльники (тычинки) погружают в каплю жидкой среды на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. При легком надавливании иглой на покровное стекло пыльники лопаются и генеративная ткань высвобождается в среду.

Каждый этап органогенеза зарисовывается в рабочей тетради. По окончании работы на основе имеющихся рисунков составляется схема прохождения всех XII этапов органогенеза.

## **УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ**

### **Работа 38. Защитное действие сахара на цитоплазму при замораживании**

**Материалы и оборудование:** 1) корнеплод красной свеклы; 2) 1,0 и 0,5 М растворы сахарозы; 3) 8%-й раствор NaCl в капельнице; 4) снег или лед в кастрюле или в тазике; 5) соль поваренная; 6) лопатка для перемешивания снега; 7) термометр до  $-25^{\circ}\text{C}$ ; 8) скальпель; 9) бритва; 10) фарфоровая чашка; 11) пробирки с резиновыми колечками (3 шт.); 12) стакан; 13) микроскоп; 14) предметные и покровные стекла; 15) кисточка; 16) карандаш по стеклу; 17) кусочки фильтровальной бумаги.

**Объяснение.** При замерзании растительных тканей в межклетниках образуются кристаллы льда, которые оттягивают воду от цитоплазмы. Если цито-



плазма не обладает достаточной морозоустойчивостью, то она, не выдержав обезвоживания, а также механического давления кристаллов льда, коагулирует. О степени повреждения цитоплазмы можно судить по ее способности удерживать клеточный сок. Устойчивость коллоидов цитоплазмы может быть повышена защитными веществами, среди которых важная роль принадлежит растворимым сахарам.

**Ход работы.** Из очищенного корнеплода красной свеклы сделать 12—15 одинаковых по размеру не очень тонких срезов (толщина примерно 1 мм). Поместить срезы в фарфоровую чашку и тщательно промыть водой для удаления сока, вытекшего из поврежденных клеток. Перенести по 4—5 срезов в 3 пробирки, снабженные этикетками. В 1-ю пробирку налить на 1/4 воды, во 2-ю— столько же 0,5М раствора сахарозы, в 3-ю— 1,0 М раствора сахарозы.

Приготовить охлаждающую смесь: к 3 частям снега или битого льда добавить 1 часть поваренной соли и тщательно перемешать (температура должна быть около  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Погрузить все пробирки в охлаждающую смесь на 15—20 мин, после чего поставить в стакан с водой комнатной температуры. После оттаивания отметить окраску жидкости в пробирках и окраску срезов. Проверить жизнеспособность клеток, подвергнув их плазмолизу в 8%-м растворе  $\text{NaCl}$ .

Результаты записать в таблицу.

В выводах объяснить различия между вариантами, отметив значение сахара как защитного вещества.

Вариант	Окраска наружного раствора	Окраска среза	Количество плазмолизированных клеток, %
Вода Сахароза 0,5 М Сахароза 1,0 М			

### Работа 39. Влияние высокой температуры на проницаемость цитоплазмы

**Материалы и оборудование:** 1) корнеплод красной свеклы; 2) скальпель; 3) пинцет; 4) термометр; 5) ФЭК; 6) электроплитка; 7) песочные часы на 1 мин; 8) штатив с пробирками (7шт.); 9) фарфоровая чашка; 10) стаканы химические (2 шт.); 11) колба с дистиллированной водой; 12) пипетка на 10 мл; 13) карандаш по стеклу; 14) салфетка.

При нагревании растений до температуры выше оптимальной в клетках нарушается обмен веществ: происходит разобщение дыхания и фосфорилирования, прекращается синтез белков и усиливается их распад, накапливаются ядовитые вещества. При более высоких температурах резко повышается проницаемость цитоплазматических мембран, а затем наступают коагуляция белков и отмирание клеток.

**Ход работы.** Вырезать из очищенного корнеплода красной свеклы 7 прямоугольных кусочков размером 3 x 10 x 40 мм, поместить их в фарфоровую чашку, многократно промыть водопроводной водой до полного обесцвечивания промывных вод и оставить в чашке под слоем воды.

Нагреть в стакане воду до 75<sup>0</sup>С, захватить пинцетом один кусочек свеклы и погрузить его ровно на 1 мин в нагретую воду, а затем перенести в пробирку с 10 мл холодной дистиллированной воды, сделав на ней надпись карандашом по стеклу. Добавлением холодной воды охлаждать содержимое стакана до 70—65—60—55—50 и 45<sup>0</sup>С и при каждой температуре проделывать то же, что описано выше: выдержать очередной кусочек в стакане в течение 1 мин и перенести в пробирку с 10 мл дистиллированной воды.

Встряхивать пробирки в течение 15 мин и определить интенсивность окраски жидкости на ФЭЖе при зеленом светофильтре (против дистиллированной воды). Результаты записать в таблицу.

Номер пробирки	Температура, °С	Оптическая плотность
1	75	
2	70	
3	65	
4	60	
5	55	
6	50	
7	45	

Вычертить кривую выделения антоциана из клеток, откладывая по оси абсцисс температуру, а по оси ординат — оптическую плотность. Найти летальную температуру — наименьшую температуру, вызывающую наибольший выход пигмента из клеток.

#### Работа 40. Определение жаростойкости растений (по Ф.Ф. Мацкову)

**Материалы и оборудование:** 1) свежие листья каких-либо растений; 2) 0,2 н раствор соляной кислоты; 3) водяная баня; 4) термометр; 5) пинцет; 6) чашки Петри (5 шт.); 7) стакан с водой; 8) карандаш по стеклу.

**Объяснение.** При повышении температуры выше оптимальной в растениях нарушается обмен веществ и как следствие этого накапливаются ядовитые вещества. При более высоких температурах резко повышается проницаемость цитоплазматических мембран, а затем наступает коагуляция белков и отмирание клеток.

Если подвергнуть лист действию высокой температуры, а затем погрузить в слабый раствор соляной кислоты, то поврежденные и мертвые клетки побуреют вследствие свободного проникновения в них кислоты, которая вызовет превращение хлорофилла в феофитин, тогда как неповрежденные клетки останутся

зелеными. У растений, имеющих кислый клеточный сок, феофитинизация может произойти и без обработки соляной кислотой, так как при нарушении полупроницаемости тонопласта органические кислоты проникают из клеточного сока в цитоплазму и вытесняют магний из молекулы хлорофилла.

**Ход работы.** Нагреть водяную баню до 40°C, погрузить в нее по 5 листьев исследуемых растений и выдержать листья в воде в течение 30 мин, поддерживая температуру на уровне 40°C. Затем взять первую пробу: вынуть по одному листу каждого вида растений и поместить их в чашку Петри с холодной водой (на чашке необходимо сделать соответствующую надпись). Поднять температуру в водяной бане до 50°C и через 10 мин после этого извлечь из бани еще по одному листу и перенести их в новую чашку с холодной водой. Так постепенно довести температуру до 80°C, беря пробы через каждые 10 мин при повышении температуры на 10°C.

Заменить воду в чашках 0,2 н соляной кислотой и через 20 мин учесть степень повреждения листа по количеству появившихся бурых пятен. Результаты записать в таблицу, обозначив отсутствие побурения знаком «—», слабое побурение—«+», побурение более 50% площади листа—«++» и сплошное побурение—«+++».

Результаты работы представить в таблице.

Объект	Степень повреждения листьев при t, °C				
	40	50	60	70	80

Сделать выводы о степени жаростойкости исследованных растений.

#### Работа 41. Диагностика засухоустойчивости и жаростойкости растений по изменению содержания статолитного крахмала

**Материалы и оборудование:** 1) семена овса, ячменя, проса, люпина; 2) фильтровальная бумага; 3) раствор глицерина; 4) раствор NaCl; 5) раствор Люголя; 6) микроскоп; 7) чашки Петри; 8) эксикаторы, термостат; 9) ножницы; 10) секундомеры.

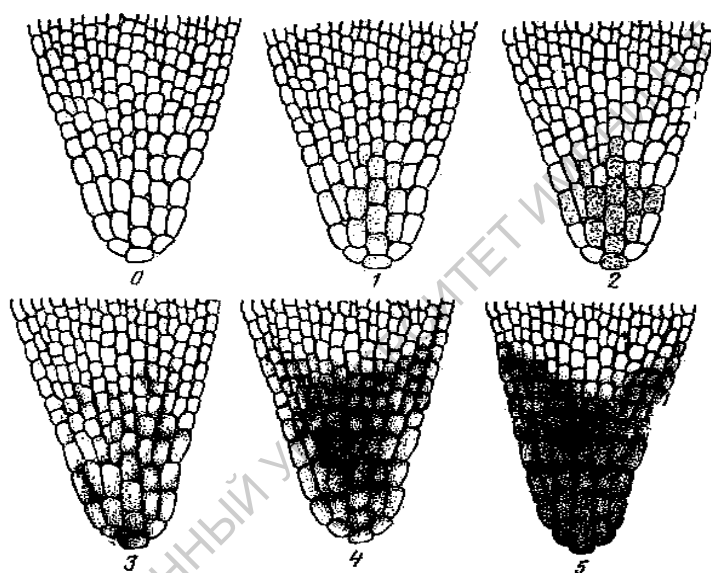
**Объяснение.** Метод определения устойчивости по изменению содержания статолитного крахмала применяют в селекции. Статолитный крахмал, находящийся в корневом чехлике, почти не расходуется в процессе жизнедеятельности растительного организма, в связи с этим содержание его в растении довольно постоянно. Однако при воздействии повышенной температурой или обезвоживанием происходит гидролиз этого крахмала (в большей степени у менее устойчивых растений). Определяя количество оставшегося крахмала, можно судить об устойчивости сорта.

**Порядок работы.** Семена прорастить на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри при 25 °C. Для определения устойчивости растений к засухе двух-трехдневные проростки подсушить в эксикаторах над раствором глицерина (100 мл воды + 37 мл глицерина) в течение 24 ч при 16 - 17°C или над рас-

твором NaCl (8 г соли на 100 мл воды) в течение 24 ч при 20 - 21 °С. Опыт проводят в темноте.

Для определения жаростойкости проростки выдерживают в воде при 37°С в течение 1 ч. По окончании прогрева или подсушивания у главного корня бритвой срезают кончики длиной 2 - 3 мм и окрасить их раствором Люголя (1%-й раствор йода в йодиде калия) 30 с. В качестве контроля окрашивают кончики корня растений, не подвергавшихся нагреванию или обезвоживанию.

После окраски корни сразу же просмотреть под микроскопом. Чем более устойчивы растения, тем больше крахмала гидролизовалось в их клетках. Оценку дать в баллах или в процентном отношении к контролю. Образцы по устойчивости разделяют на три группы: высокоустойчивые—гидролизует до 35% крахмала, среднеустойчивые — 36 - 50 %, неустойчивые—более 50%.



Содержание крахмала в корневом чехлике (0-5 баллов)

Результаты работы представить в таблице.

Сорт	Гидролиз статолитного крахмала в корневом чехлике, % от контроля			Группа устойчивости
	1	2	3	
Засухоустойчивость				
1				
2				
3				
Жаростойкость				
1				
2				
3				

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### 1. Приготовление некоторых растворов и реактивов

**Раствор нейтрального красного.** Приготовить 0,2%-й раствор путем растворения 0,5 г краски в 250 мл дистиллированной воды. Раствор профильтровать и хранить в склянке из темного стекла. Перед употреблением развести водопроводной водой в 10 раз.

**Раствор метилового красного 0,04%-й.** Растворить 40 мг метилового красного в 100 мл 60%-го этанола и профильтровать. Хранить в плотно закрытой склянке из темного стекла.

**Стандартный раствор Гетри для определения хлорофилла.** Приготовить на дистиллированной воде три раствора: 1) 1%-й  $\text{SiSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (брать только синие кристаллы, после растворения профильтровать), 2) 2%-й  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , 3) 7%-й аммиак. Перенести в мерную колбу из 100 мл 28,5 мл 1-го раствора, 50 мл 2-го раствора и 10 мл 3-го раствора, довести до метки дистиллированной водой, перемешать и перелить в чистую сухую склянку с притертой пробкой.

Раствор Гетри по окраске эквивалентен раствору хлорофилла концентрации 85 мг/л.

**Раствор иода в иодиде калия (J в KJ).** Растворить 2 г KJ в 5 мл дистиллированной воды, добавить 1 г металлического иода, после полного растворения последнего долить 295 мл воды. Хранить реактив в темной склянке с притертой пробкой.

**Хромовая смесь.** Растворить в большой колбе 6 г  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  в 100 мл воды. Добавить 100 мл концентрированной серной кислоты (приливать осторожно малыми порциями, перемешивая и охлаждая колбу струей водопроводной воды). После полного охлаждения перелить в толстостенную склянку.

Способ применения: налить хромовую смесь в посуду на 1/4, осторожно смочить стенки и слить обратно в склянку. Дать постоять несколько минут (очень грязной посуде — несколько часов) и мыть водой. Пипетки поставить в высокий цилиндр, заполненный хромовой смесью. Не следует мыть хромовой смесью посуду, загрязненную парафином, минеральными маслами и солями бария. После долгого употребления раствор приобретает зеленую окраску; такая смесь утрачивает моющие свойства и непригодна для дальнейшего использования.

**Раствор барита 0,025 н.** Для приготовления 1 л этого раствора требуется 2,14 г чистого  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ . Однако обычно в реактиве содержится значительная примесь  $\text{BaCO}_3$ , вследствие чего рекомендуется брать навеску примерно в 1,5 раза больше, т. е. 3,5 г. Прокипятить дистиллированную воду в течение длительного времени (не менее 30 мин) для удаления растворенного  $\text{CO}_2$ . Высыпать навеску  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  в горячую воду и взболтать. После охлаждения перелить раствор в плотно закрывающуюся склянку и оставить на несколько суток, время от

времени взбалтывая раствор. После отстаивания осторожно слить сифоном прозрачный раствор в бутылку, соединенную с бюреткой. Закрывать бутылку пробкой, в которую вставлена трубка с натронной известью.

**Фенолфталеин.** Растворить 0,1 г фенолфталеина в 100 мл 60%-го спирта. Индикатор изменяет окраску от бесцветной к пурпурной в интервале pH от 8,2 до 10,0.

**Крахмальный клейстер 1%-й.** Отвесить на технических весах 1 г растворимого крахмала, высыпать в стакан, прилить 20 мл воды и тщательно размешать стеклянной палочкой. Налить в колбу 80 мл воды, нагреть до кипения, вылить в неё содержимое стакана, взболтать, дать раствору ещё раз закипеть и снять с огня.

**Фелингова жидкость** готовится непосредственно перед употреблением путем смешивания равных объемов двух растворов. 1-й раствор: 40 г медного купороса растворить в дистиллированной воде, довести объем до 1 л и профильтровать; 2-й раствор: растворить 200 г сегнетовой соли в дистиллированной воде, добавить 150 г КОН или NaOH и довести дистиллированной водой до 1 л.

**Крахмальный агар.** Поместить в колбу 2 г мелко нарезанного агар-агара, прилить 100 мл воды и осторожно кипятить до полного растворения агара. 2 г крахмала размешать стеклянной палочкой с 10 мл холодной воды, вылить в кипящий раствор агара и вновь довести до кипения. Горячую смесь разлить в чашки Петри.

**Раствор индолилуксусной кислоты (ИУК) для стимуляции корнеобразования.** Растворить 70 мг ИУК (гетероауксина) в 10-15 мл горячей воды и долить холодной воды до 1 л. Раствор пригоден для употребления только в течение нескольких часов.

**Ланолиновая паста с ИУК.** Растворить 10 мг ИУК в 50 мл горячей воды. Вылить 5 мл этого раствора в фарфоровую чашку с 5 г (чайной ложкой) ланолина, расплавленного на кипящей водяной бане. Размешивать стеклянной палочкой не менее 10 мин до получения кремообразной эмульсии. Если к пасте добавить каплю масляной кислоты, то равномерное распределение ИУК происходит быстрее; паста становится мягче, легче растирается и более эффективно проникает в растительные ткани. Контрольная (водная) паста готовится так же путем растирания 5 г расплавленного ланолина с 5 мл воды; если в ростовую пасту добавляли масляную кислоту, то ее добавляют и к водной пасте. Хранить пасты следует на холоде.

**Очистка агар-агара.** Поместить агар в стеклянную посуду, залить водопроводной водой и поставить в термостат при 30-37°C. Примеси выщелачиваются и разлагаются микроорганизмами. Через 1-2 дня слить жидкость, промыть несколько раз свежей водой, снова залить водой и поставить в термостат. Когда и эта вода помутнеет, ее опять заменить новой. Так повторять до тех пор, пока вода не перестанет мутнеть. Обычно через 2—3 недели получают чистый агар. Разложить агар-агар тонким слоем и просушить на воздухе или в сушильном шкафу при 40—50°C.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО