

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**М.В. Ефимова, И.Ф. Головацкая,
Е.С. Гвоздева, М.А. Большакова**

**МАЛЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

*Учебно-методическое пособие
для биологических специальностей вузов*

Томск
Издательский Дом Томского государственного университета
2018

РАССМОТРЕНО И УТВЕРЖДЕНО методической комиссией
Биологического института
Протокол № 200 от 28 июня 2018 г.

Председатель МК БИ А.Л. Борисенко

В учебно-методическом пособии представлены теоретические основы и практические методики основных разделов физиологии растений. Рассмотрены методы изучения физиологии растительной клетки, водного обмена, фотосинтеза, дыхания, минерального питания и устойчивости растений. Целью пособия является проверка и закрепление основных теоретических положений, излагаемых в лекционном курсе, знакомство с методами изучения физиологических процессов у растений, получение навыков научно-исследовательской работы. В практических работах предложены алгоритмы их выполнения, содержатся иллюстрации для лучшего представления об объекте или методах исследования, задания и варианты обобщения данных. В каждый раздел включены вопросы самоконтроля по теоретической и практической части работы.

Пособие предназначено для студентов, обучающихся по направлению 06.03.01 «Биология» биологических, сельскохозяйственных и педагогических вузов.

АВТОРЫ-СОСТАВИТЕЛИ:

канд. биол. наук, доцент М.В. Ефимова,
д-р биол. наук, профессор И.Ф. Головацкая,
канд. биол. наук, доцент Е.С. Гвоздева,
М.А. Большакова

СОДЕРЖАНИЕ

Техника безопасности лабораторных работ.....	4
Занятие 1 Физиология растительной клетки.....	5
Занятие 2 Осмотические свойства клетки.....	13
Занятие 3 Водный обмен. Транспирация.....	17
Занятие 4 Обнаружение процесса фотосинтеза.....	21
Занятие 5 Фотосинтетические пигменты.....	25
Занятие 6 Количественное определение фотосинтетических пигментов.....	30
Занятие 7 Дыхание растений	35
Занятие 8 Превращение органических веществ в растении.....	40
Занятие 9 Рост растений. I часть	46
Занятие 10 Рост растений. II часть	49
Занятие 11 Минеральное питание растений. I часть	53
Занятие 12 Минеральное питание растений. II часть	56
Занятие 13 Устойчивость растений к действию абиотических факторов.....	61
Занятие 14 Обнаружение вирусов в растениях методом ОТ-ПЦР.....	66
Список использованной литературы.....	72
Приложение А. Правила работы с микроскопом.....	73
Приложение Б. Измерение величины клеток растений.....	75
Приложение В. Порядок работы на спектрофотометре СФ-26 ЛОМО.....	77
Приложение Г. Расчет описательных статистик и достоверности различий параметров.....	79

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

1. На первом занятии студент должен внимательно ознакомиться с правилами работы в лаборатории, инструкцией по технике безопасности, расписаться в журнале инструктажа и неукоснительно выполнять требования преподавателя, лаборанта и дежурного по работе.
2. Запрещается находиться в лаборатории в верхней одежде, загромождать рабочее пространство посторонними предметами, сорить, шуметь, разговаривать по телефону; трогать и перемещать оборудование, реактивы и другие предметы, не имеющие отношения к выполняемым работам практикума.
3. При работе обязательно надевать защитные халаты, при необходимости – перчатки.
4. Перед началом работы необходимо тщательно ознакомиться с её описанием; усвоить принципы действия приборов и основные правила работы с ними.
5. Без указания преподавателя не производить дополнительных экспериментов.
6. Приём пищи и употребление напитков на рабочем месте запрещены.
7. Категорически запрещается пользоваться лабораторной посудой для еды или питья; пробовать на вкус, на ощупь и нюхать химические реактивы, употреблять в пищу объекты исследования.
8. При определении запаха следует лёгкими движениями руки направить воздух от горлышка сосуда к носу.
9. Пользоваться можно только маркированными реактивами.
10. Излишки реактивов необходимо сливать в отдельную ёмкость (если представляют опасность), но не возвращать в ту посуду, из которой они были взяты.
11. Отработанные органические растворители, концентрированные кислоты и щёлочи следует сливать в специальную посуду, установленную под тягой.
12. Работы с опасными и сильно пахнущими веществами следует проводить под тягой.
13. При попадании кислот и щелочей на кожу, пораженные места следует немедленно тщательно промыть водой, а затем обработать нейтрализующими растворами низкой концентрации (бикарбоната натрия и уксусной кислоты соответственно).
14. При нагревании жидкости в пробирках использовать только водяную баню. В случае использования спиртовки пробирки с жидкостью следует держать наклонно отверстием в сторону от себя и других работающих. Использование открытого огня (спиртовок) в подвальных и цокольных этажах запрещено!
15. Запрещается оставлять без присмотра включенные электроприборы.
16. Горячие приборы или посуду ставить только на специальные подставки.
17. После окончания работы нужно вымыть использованную посуду, привести в порядок рабочее место, тщательно вымыть руки водой с мылом.

ЗАНЯТИЕ 1

Тема. Физиология растительной клетки

Цель занятия: приготовление элементарных растительных препаратов для микроскопирования; получение навыков работы с микроскопом; ознакомление с методами обнаружения движения цитоплазмы и измерения его скорости; определение жизнеспособности клеток; изучение функциональных особенностей мембран живых клеток.

Материалы и оборудование: луковица синего репчатого лука, корнеплод столовой свеклы, веточки элодеи, валлиснерия, дистиллированная вода, этанол, растворы 30%-ной уксусной кислоты, 0.8 М глюкозы, 1 М роданида калия, 1 М карбамида, 1 М сахарозы, 1 М нитрата калия, 0.7 М нитрата кальция, 0.01 % нейтрального красного в дистиллированной воде. Термостат, микроскоп, предметные и покровные стёкла, лезвия, препаровальные иглы, секундомер, настольная лампа, пробирки, штатив для пробирок, пипетки Пастера минимального объема или наконечники, кусочки фильтровальной бумаги, пинцет, маркер, объект-микромметр, электроплитка.

В начале занятия со студентами обсуждаются следующие вопросы:

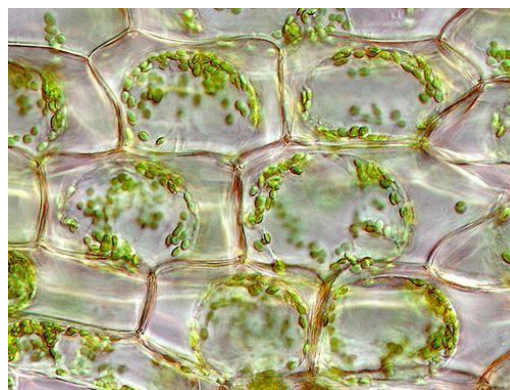
- ✓ Чем растения отличаются от других живых организмов?
- ✓ Почему надо изучать растения?
- ✓ Что могут сделать физиологи растений для решения глобальных общечеловеческих проблем (борьба с голодом, борьба с болезнями, сохранение биоразнообразия, сохранение окружающей среды, поиск возобновляемых источников энергии).
- ✓ Особенности строения растительных клеток.

Работа 1. Наблюдение за движением цитоплазмы

Характерной особенностью любой живой растительной клетки является движение цитоплазмы. Различают движение цитоплазмы спонтанное, постоянное и индуцированное внешними факторами – изменением освещенности, температуры, химическими веществами, механическими воздействиями и т. п. Движение цитоплазмы обеспечивает внутриклеточный и межклеточный транспорт веществ, перемещение органелл внутри клетки. В его осуществлении участвуют элементы цитоскелета – микрофиламенты. Источником энергии движения служит АТФ.

Ход работы: отрывают лист элодеи (или кусочек листа валлиснерии) вблизи верхушки побега и кладут его в каплю воды, взятой из сосуда с элодеей. Объект накрывают покровным стеклом и рассматривают сначала при малом, затем при большом увеличении (Приложение А). Лист элодеи состоит только из двух слоев клеток, и каждый слой легко просматривается под микроскопом. Обрывание листа вызывает в его клетках движение цитоплазмы, которое легко

наблюдать по перемещению всех хлоропластов в одном направлении вдоль клеточной стенки. Такое движение называется **ротационным**. В двух соседних клетках оно может происходить в разных направлениях – по часовой стрелке и против нее. Наиболее интенсивное движение можно увидеть в длинных узких клетках средней жилки листа. У растений, находившихся перед исследованием при слабом освещении или в темноте, движения хлоропластов обычно не наблюдается. Неподвижные хлоропласты располагаются под клеточными стенками параллельно поверхности листовой пластинки. Но если препарат выдержать несколько минут, не снимая со столика микроскопа, при освещении, то движение появляется.



ва-

Хлоропласты начинают двигаться сначала медленно, затем быстрее и занимают положение вдоль боковых клеточных стенок, расположенных перпендикулярно поверхности пластинки (парастрофное расположение).

Движение цитоплазмы в клетках элодеи можно обнаружить также по перемещению более мелких, чем хлоропласты, органелл – мелких бесцветных «зернышек», взвешенных в цитоплазме. Их перемещение легче всего обнаружить в краевых клетках листовой пластинки, они легче просматриваются. В этих клетках значительно меньше хлоропластов или они отсутствуют.

Задание: схематически изобразить рисунки клеток и стрелками указать направление движения цитоплазмы. Сделать вывод о зависимости движения цитоплазмы от присутствия света.

Работа 2. Определение скорости движения цитоплазмы

Скорость движения цитоплазмы удобнее всего наблюдать по перемещению хлоропластов вместе с током цитоплазмы. Определение ведется до и после воздействия повышенной температурой, светом, раствором этанола. Выявить влияние света или температуры можно, выдерживая препарат на ярком свету или в термостате при температуре 35 - 40 °С в течение непродолжительного времени (от 5 до 15 минут).

Для определения скорости движения цитоплазмы используют секундомер и окулярную линейку, помещенную в окуляр микроскопа (Приложение Б, рис. 1). С помощью секундомера отсчитывают время, в течение которого хлоропласт или другая движущаяся частица проходит расстояние между двумя выбранными делениями окулярной линейки. Такие измерения в одной и той же клетке проводят несколько раз. По ним определяют среднюю величину и среднюю скорость движения, которая выражается числом делений окулярной линейки, пройденных движущейся частицей за 1 с. Если известна цена деления

окулярной линейки при данном увеличении микроскопа, то скорость движения можно найти, поделив величину расстояния в микрометрах на число секунд, за которые движущаяся частица проходит это расстояние (мкм/с).

Расстояние, которое проходит движущаяся частица, можно определить и без окулярной линейки, оценивая его приблизительно в долях диаметра поля зрения микроскопа. Диаметр поля зрения микроскопа Биолам при объективе $\times 40$ с окуляром $\times 15$ составляет 200 мкм, с окуляром $\times K15$ – 270 мкм, с окуляром $\times K7$ – 900 мкм. При измерении скорости с помощью микроскопа фирмы Zeiss используют объект-микрометр. При разрешении объектива $\times 40$ определяют, сколько делений объект-микрометра попадает в поле зрения (приблизительно, 45) и вычисляют диаметр поля зрения и примерное расстояние, которое проходит движущаяся частица в долях поля зрения микроскопа.

Ход работы: на одном из препаратов, полученных в работе 1, измеряют скорость движения цитоплазмы до и после воздействия на них внешних факторов – света (не допускать перегрева клеток) и повышенных температур (выдерживают препарат в термостате при температуре выше 40 °С 10 минут).

Задание: определить скорость движения цитоплазмы в выбранном объекте до и после воздействия на него света и повышенной температуры.

Работа 3. Сравнение проницаемости мембран живых и мертвых клеток

Мембраны отделяют клетку от внешней среды, делят клетку на компартменты (от англ. *compartment* – отделение, ячейка), увеличивают внутреннюю поверхность клетки, регулируют транспорт веществ между клеткой и её свободным пространством, между органеллами. Главный контроль движения питательных веществ и метаболитов из клетки в клетку выполняет плазмалемма. Для большинства веществ она служит барьером, ограничивающим их движение по градиенту электрохимического потенциала. Для некоторых жизненно важных веществ (сахара, аминокислоты, ионы) в мембранах существуют специальные белки (транспортёры, насосы), которые обеспечивают их транспорт через мембрану против градиента.

Контролируя поглощение и выделение веществ клеткой или органеллой, мембраны таким способом регулируют скорость и направленность химических реакций. Увеличение проницаемости мембраны может способствовать соединению фермента с субстратом, следовательно, становится возможна реакция, которая ранее не была допустима. Активность ряда ферментов определяется взаимодействием с мембраной; некоторые ферменты активны только, когда прикреплены к мембране. Последовательность протекания химических реакций или циклов во многом зависит от расположения фермента (мультиферментных комплексов) на мембране. Благодаря плотной упаковке молекул расстояния между компонентами системы очень маленькие, что особенно важно при образовании нестабильных соединений.

Важнейшее свойство клеточных мембран – *избирательная проницаемость*, благодаря которой через них проходят молекулы только определенных веществ. Это свойство может изменяться в зависимости от процессов, протекающих в клетке. Избирательная проницаемость мембраны сохраняется до тех пор, пока клетка остается живой. После ее гибели мембраны становятся полностью проницаемыми.

В вакуолях клеток корнеплода столовой свеклы содержится бетацианин – пигмент, придающий ткани корнеплода окраску. Тонoplastы живых клеток непроницаемы для молекул этого пигмента. После гибели клеток тонoplast теряет свойство полупроницаемости, становится проницаемым, молекулы пигмента выходят из клеток и окрашивают воду.

Ход работы: корнеплод свеклы после удаления покровных тканей нарезают на кубики (сторона кубика 5 мм) и тщательно промывают водой, чтобы удалить пигмент, вышедший из поврежденных клеток. Затем по одному кусочку опускают в три пробирки. В первую и вторую наливают по 5 мл воды, в третью – 5 мл 30%-ного раствора уксусной кислоты (третью пробирку закрывают пробкой). Первую пробирку оставляют для контроля. Содержимое второй кипятят 2–3 мин. Во второй и третьей пробирках, где клетки были убиты кипячением или кислотой, вода окрашивается, а в первой пробирке остается неокрашенной.

Задание: выявить различия в проницаемости мембран живых и мертвых клеток и сделать вывод о причинах этих различий.

Работа 4. Сравнение проницаемости клеточных мембран для различных веществ. Стойкий и временный плазмолиз

Избирательная проницаемость мембран обеспечивает прохождение через них молекул воды, препятствует проникновению растворенных в воде веществ и обуславливает явление **плазмолиза** (отставание протопласта от стенок клетки вследствие потери воды вакуолью и уменьшения ее объема) при действии на клетку гипертонического раствора. Если же молекулы растворенного вещества (например, карбамида) через мембрану проходят, но медленнее, чем молекулы воды, то начавшийся плазмолиз потом исчезает. Так как проницаемость для карбамида меньше, чем для воды, то вода из клетки выходит быстрее, чем в нее входит мочевины. **Деплазмолиз** (увеличение объема протопласта) происходит в результате постепенного проникновения растворенного вещества в клетку, выравнивания концентраций снаружи и внутри, а также поступления воды в клетку из наружного раствора по градиенту концентрации.

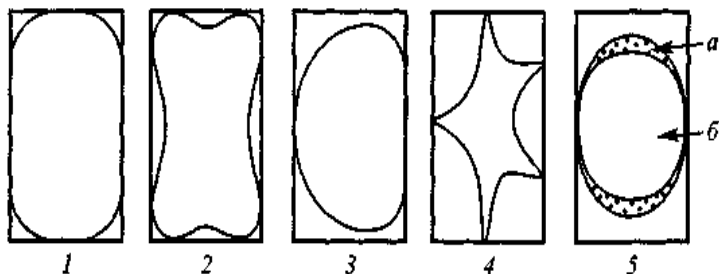
Ход работы: на два предметных стекла наносят по капле раствора: на одно – 1 М раствор сахарозы, на другое – 1 М раствор карбамида. В каждую каплю помещают по листу элодеи, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом сначала при малом (объектив $\times 8$), потом при большом увеличении (объектив $\times 40$). Находят участки листа, в которых хорошо видны

плазмолизированные клетки. Отмечают время начала плазмолиза (начало наблюдения), зарисовывают плазмолизированные клетки и оставляют препараты на 30–60 мин, затем вновь их рассматривают.

Задание: зарисовать плазмолизированные и деплазмолизированные клетки и сформулировать выводы о степени проницаемости мембраны для сахарозы и карбамида.

Работа 5. Влияние ионов калия и кальция на форму плазмолиза

Плазмолиз наступает не сразу и имеет несколько этапов. Сначала цитоплазма отстает от оболочки по углам (**уголковый** плазмолиз). Затем протопласт продолжает отставать от клеточных стенок, сохраняя связь с ними в отдельных участках (в зонах нахождения плазмодесм, экзодесм), поверхность протопласта между этими точками имеет вогнутую форму (**вогнутый**). Постепенно протопласт отрывается от клеточных стенок по всей поверхности и принимает округлую форму (**выпуклый**). Если у протопласта связь с клеточной стенкой в отдельных местах сохраняется, то при дальнейшем уменьшении объема в ходе плазмолиза протопласт приобретает неправильную форму (**судорожный**). Время, в течение которого вогнутый плазмолиз переходит в выпуклый, позволяет оценить степень вязкости цитоплазмы. При более длительном нахождении в растворе (например, нитрата калия) цитоплазма набухает, и там, где протопласт не касается клеточных стенок, образуются колпачки цитоплазмы (**колпачковый**).



Основные формы плазмолиза:

- 1 – уголковый (начальная стадия);
- 2 – вогнутый;
- 3 – выпуклый;
- 4 – судорожный (при быстром действии концентрированного

плазмолитика и высокой степени вязкости цитоплазмы); 5 – колпачковый. а – цитоплазма, б – вакуоль.

Ионы калия повышают гидрофильность цитоплазмы, уменьшают вязкость и способствуют быстрому отставанию от клеточной стенки. Ионы кальция повышают вязкость цитоплазмы, увеличивают силы сцепления ее с клеточной стенкой.

Ход работы: поместить на предметные стекла в капли 1 М KNO_3 и 0.7 М $Ca(NO_3)_2$ срез эпидермиса верхней чешуи луковицы. Накрыть покровным стеклом и через 10 минут рассмотреть под микроскопом.

Задание: заполнить таблицу, определить степень плазмолиза в каждом случае, объяснить результат.

Используемый реактив	1 М KNO ₃	0.7 М Ca(NO ₃) ₂
Рисунок		
Форма плазмолиза		

Работа 6. Наблюдение колпачкового плазмолиза в растворе роданида калия

При длительном нахождении клеток в растворе нитрата калия (15 мин и более) цитоплазма набухает в удлинённых клетках, там, где протопласт не касается клеточных стенок, образуются так называемые колпачки цитоплазмы. Такой плазмолиз носит название колпачкового. В ещё большей степени набухание происходит в растворах роданида калия, в которых колпачки цитоплазмы образуются сразу же после начала плазмолиза. Колпачковый плазмолиз может свидетельствовать о разной проницаемости плазмалеммы и тонопласта для ионов калия.

Ионы калия, проникая через плазмалемму в цитоплазму, вызывают её набухание. В вакуоль через тонопласт они не проходят. Объём плазмолированной вакуоли не увеличивается и плазмолиз сохраняется. Особенно четкая картина колпачкового плазмолиза наблюдается при использовании эпидермы чешуй окрашенного лука или верхней эпидермы неокрашенного лука, снятой с вогнутой поверхности чешуи луковичи и предварительно окрашенной нейтральным красным.

Ход работы: на предметное стекло наносят каплю 1 М раствора роданида калия, помещают в неё кусочек эпидермы чешуи репчатого лука, накрывают покровным стеклом и сразу рассматривают под микроскопом с объективом × 40.

Задание: сделать рисунок и сформулировать вывод о причине появления колпачкового плазмолиза.

Работа 7. Форма и время плазмолиза растущих и закончивших рост клеток

Промежуток времени от момента погружения клеток в раствор до достижения выпуклого плазмолиза называют **временем плазмолиза**. Это время зависит от вязкости протоплазмы, которая различна у растущих клеток и клеток, закончивших рост.

Для опыта используются молодые листочки элодеи, в которых можно различить четыре зоны: в основании расположена слабо окрашенная зона деления клеток, выше находится зона растяжения, ещё выше – зона дифференцировки и, наконец, верхушка листа, которая состоит из клеток, закончивших свой рост и имеющих интенсивно зеленую окраску.

Ход работы: Взять 2–3 молодых листочка из верхушечной части побега элодеи (листья должны иметь зеленый кончик и бледно-зеленое основание), по-

грузить в каплю раствора глюкозы 0.8 М на предметном стекле, накрыть покровным стеклом и отметить время начала опыта. Рассматривая препарат в микроскоп через каждые 10 мин, определить время плазмолиза для каждой зоны листа (не учитывать клетки, расположенные рядом со срезом основания листа).

Задание: сделать вывод о том, как вязкость цитоплазмы связана с возрастом клеток и временем их плазмолиза.

Работа 8. Выявление живых и мертвых клеток

Жизнеспособность клеток можно определить по движению цитоплазмы и по их способности к плазмолизу в гипертонических растворах. Для этой цели часто используют различные красители. Красители, окрашенной частью которых служит анион (кислотные красители), не проникают в живые клетки. Некоторые основные красители, окрашенной частью которых является катион, проникают в живые клетки, их называют витальными (прижизненными) красителями. Из витальных красителей для оценки жизнеспособности клеток чаще всего используют нейтральный красный (нейтральрот). Другой эффективный метод определения жизнеспособности клеток – выявление в них ферментативной активности, так как при гибели клеток все их ферменты теряют активность.

Молекулы нейтрального красного не аккумулируются в цитоплазме живой растительной клетки, а с участием аппарата Гольджи и тонопласта активно выделяются в вакуоль. Поэтому у живых клеток краситель накапливается в вакуоли, а ядро и цитоплазма остаются неокрашенными. У мертвых клеток, наоборот, цитоплазма и особенно ядро адсорбируют краситель, а в вакуолярном соке он не задерживается. Поэтому у мертвых клеток ярко окрашивается ядро, в меньшей степени цитоплазма, а вакуоли остаются неокрашенными.

Ход работы: срез эпидермиса верхней чешуи луковицы помещают на 3 минуты в раствор красителя на предметное стекло. Затем, накрыв препарат стеклом, рассматривают его при малом, а потом при большом увеличении.

Окрашенные клетки «убивают», подержав предметное стекло в термостате. Затем снова рассматривают препарат под микроскопом.

Задание: сравнить окраску живых и мертвых клеток, сделать рисунки, сформулировать выводы.

Вопросы для самоконтроля:

1. Провести сравнение строения клеток растений и животных.
2. Что называют свободным пространством клетки?
3. Что такое симпласт, апопласт?
4. Какие свойства имеет мембрана?
5. Какие органеллы не окружены мембраной?
6. Какую роль играет движение цитозоля и органелл?

7. Что такое плазмодесмы?
8. Что такое компартмент?
9. Схематически изобразить строение клеточной стенки, мембраны, плазмодесмы, митохондрии, хлоропласта.
10. Перечислить функции клеточной стенки, мембраны, вакуолей, митохондрий, хлоропластов.
11. С чем связано ускорение движения цитоплазмы на свету?
12. Назовите величину скорости движения цитоплазмы элодеи и валлиснерии в разных условиях освещения.
13. С чем связана полупроницаемость мембран для веществ? Какие факторы изменяют эти свойства?
14. С помощью каких явлений в растительной клетке можно определить её возраст?
15. Каким методом можно выявить жизнеспособность клеток?

ЗАНЯТИЕ 2

Тема. Осмотические свойства клетки

Цель занятия: доказать, что клетка является осмотической системой, получить искусственную клеточку Траубе, продемонстрировать явление тургора, научиться определять величину осмотического потенциала клеток плазмолитическим методом.

Материалы и оборудование: луковица синего лука, корнеплод моркови; дистиллированная вода, растворы 1 М NaCl или 1 М сахарозы, 0.5% CuSO₄, кристаллы K₄[Fe(CN)₆], NaCl сухой. Микроскоп, предметные и покровные стёкла, лезвия, препаровальные иглы, часовое стекло или чашка Петри, пенициллиновые флаконы или пробирки, пипетки Пастера или стеклянные пипетки, кусочки фильтровальной бумаги, два стакана, нож, маркер.

Работа 9. Явление плазмолиза и деплазмолиза

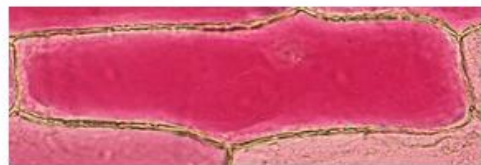
В зависимости от концентрации раствора его можно отнести к группе:

- ✓ **гипотонический** (осмотическое давление ($P_{осм}$) раствора меньше давления клеточного сока; концентрация растворённого вещества в растворе меньше концентрации растворённых веществ в клеточном соке);
- ✓ **изотонический** (давление раствора равно $P_{осм}$ клеточного сока);
- ✓ **гипертонический** (давление раствора превышает осмотическое давление клеточного сока).

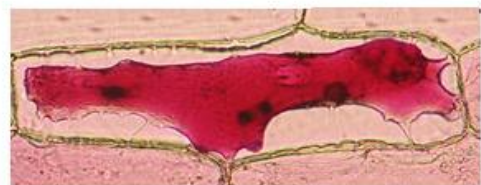
При помещении клетки в гипертонический раствор происходит отставание протопласта от стенок клетки (**плазмолиз**), вследствие потери воды вакуолью и уменьшения ее объема. После замены наружного раствора на чистую воду, последняя начинает поступать внутрь клетки. Объем протопласта увеличивается и происходит **деплазмолиз**. После его завершения протопласт вновь заполняет весь объем клетки.

Плазмолиз хорошо заметен в клетках с окрашенным клеточным соком или при окраске препарата раствором нейтрального красного. Данный процесс может наступать только при условии разной проницаемости растворителя и растворенных веществ. К плазмолизу способна только живая клетка, в убитой клетке плазмолиз невозможен, так как мембрана теряет свойство полупроницаемости и становится полностью проницаемой (сквозная проницаемость) как для воды, так и для растворенных в ней веществ.

типичная клетка эпидемиса чешуи лука



клетка в состоянии плазмолиза



Метод плазмолиза широко используется для диагностики жизнеспособности клеток органов растения, перенесшего резкие воздействия неблагоприятных условий среды. Плазмолиз – обратимый процесс. У плазмолизированной клетки, погруженной в чистую воду, плазмолиз исчезает, наступает деплазмолиз. Деплазмолиз не имеет промежуточных форм.

Ход работы: на предметное стекло наносят каплю дистиллированной воды и помещают в нее срез эпидермиса верхней чешуи луковицы. Препарат накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом сначала при малом, а потом при большом увеличении. Далее, не снимая предметного стекла со столика микроскопа, заменяют воду на раствор NaCl; каплю раствора наносят с одной стороны, с другой оттягивают раствор кусочком фильтровальной бумаги (повторить несколько раз). Таким образом, раствор NaCl проникает под стекло к исследуемой эпидерме. Рассматривают полученный препарат под микроскопом. Через некоторое время раствор заменяют водой. Наблюдают за изменениями, происходящими в клетках.

Задание: заполнить таблицу, объяснить причину наблюдаемых явлений в выводах.

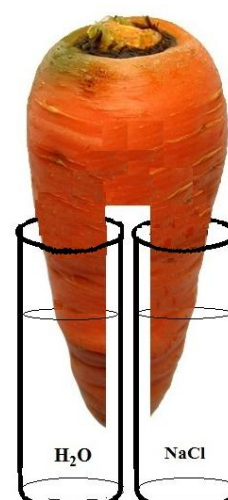
№	Используемый реактив	Рисунок	Наблюдаемое явление
1			
2			
3			

Работа 10. Тургор растительной клетки. Поглощение воды и ее выход из клеток корнеплода моркови

Ход работы: из середины корнеплода моркови вырезают, начиная с кончика корня, продольную полосу ткани шириной около 1 см и удаляют ее. Две части корня остаются соединенными на протяжении примерно 1/3 всей его длины. Обе части корнеплода помещают в два стакана, стоящие рядом, в одном – вода, в другом – насыщенный раствор хлорида натрия.

Через 1,5–2 часа корень извлекают из стаканов, сравнивают размер и тургор тканей в его половинах и делают вывод о том, в каком из стаканов произошел выход воды из тканей корня, приведший к потере ими тургора.

Задание: сделать рисунок корнеплода моркови и сформулировать вывод о причинах изменения состояния обеих его частей.



Работа 11. Получение искусственной клеточки Траубе

Клеточку Траубе получают, помещая кристаллик гексацианоферрата калия в слабый водный раствор сульфата меди. Вокруг кристаллика в результате взаимодействия солей образуется осадочная мембрана гексацианоферрата меди. Эта мембрана проницаема только для молекул воды, но не для растворенных в ней веществ.

Ход работы: пенициллиновый флакон наполовину заполняют раствором сульфата меди и осторожно опускают один или несколько кристалликов гексацианоферрата (II) калия (ГЦФК). Полупроницаемая пленка $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$ разделяет два раствора разной концентрации: внутри мешочка находится концентрированный раствор ГЦФК (образующийся при растворении кристаллика соли), а снаружи – раствор сульфата меди. Возникает ток воды внутрь мешочка, объем раствора ГЦФК увеличивается, в результате чего мембрана растягивается. Будучи очень тонкой, мембрана в отдельных местах разрывается под действием гидростатического давления. В этих местах соли снова взаимодействуют, возникают новые участки мембраны, что приводит к неравномерному увеличению размера мешочка. Мешочек будет расти, пока весь кристаллик не растворится. Дальнейшее поступление воды в мешочек приведет к разрыву пленки и она осядет в виде хлопьев на дно флакона.

Задание: описать опыт, сделать рисунок, сформулировать вывод о механизме перемещения воды через полупроницаемую мембрану.

Работа 12. Определение осмотического давления клеточного сока плазмолитическим методом

Осмотическое давление – дополнительное давление, которое мешает одностороннему току растворителя через полупроницаемую мембрану. Величина осмотического давления прямо пропорциональна его концентрации и абсолютной температуре. Концентрацию клеточного сока можно определить по величине его осмотического давления **плазмолитическим методом**. Для этого срезы тканей погружают в ряд растворов известной концентрации (сахароза, хлористый натрий). Находят такую концентрацию плазмолитика, которая вызывает уголкового плазмолиза не менее чем у 50% клеток. Изотонический раствор будет находиться между этим раствором и следующим (более слабым), который не вызывает плазмолиза. Т.е. концентрация изотонического раствора равна среднему арифметическому значению между концентрациями указанных соседних растворов.

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

$$P=R \cdot T \cdot C \cdot i,$$

где P – осмотическое давление, атм.; R – универсальная газовая постоянная (0.0821); T – абсолютная температура ($273+t^{\circ}\text{C}$);

C – концентрация раствора, моль; i – изотонический коэффициент.

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 следующих концентраций: 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 и 0.1 М (например, для получения 10 мл 0.7 М раствора берут 7 мл 1 М раствора и 3 мл воды; 0.6 М – 6 мл 1 М раствора и 4 мл воды и т.д.) и разлить по пенициллиновым флаконам или пробиркам. Сделать 14 одинаковых срезов эпидермиса чешуи лука и поместить их на часовое стекло в воду так, чтобы они не плавали на поверхности. Через несколько минут срезы промокнуть фильтровальной бумагой и погрузить по два среза в каждый раствор. Через 25 минут рассмотреть срезы под микроскопом.

Задание: заполнить таблицу. Рассчитать величину осмотического давления клеточного сока лука.

Концентрация раствора, М	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
Степень плазмолиза							
Рисунок клетки							

Вопросы для самоконтроля:

1. Дать определение понятиям «водный потенциал», «вязкость», «осмос», «осмотическое давление», «тургорное давление», «осмолиты», «плазмолиз/деплазмолиз», «циторриз», «протопласт», «симпласт/апопласт», «активный транспорт», «совместимые осмолиты» и т.д.
2. Провести сравнение строения клеток растений и животных.
3. Схематически изобразить строение клеточной стенки, мембраны, плазмодесмы, митохондрии, хлоропласта.
4. Перечислить функции клеточной стенки, мембраны, вакуолей, митохондрий, хлоропластов.
5. Какова величина осмотического давления клеточного сока чешуи лука?

ЗАНЯТИЕ 3

Тема. Водный обмен растений. Транспирация

Цель занятия: научиться определять интенсивность транспирации и площадь поверхности листьев. Приготовление срезов верхнего и нижнего эпидермиса листа для микроскопирования. Наблюдение за движениями замыкающих клеток устьиц.

Материалы и оборудование: листья растений, дистиллированная вода, парафин, 5% раствор глицерина. Микроскоп, окулярный микрометр, объективный микрометр, предметные и покровные стёкла, препаровальные иглы, весы, чашка Петри, пипетки Пастера минимального объема или наконечники, фильтровальная бумага, ножницы, маркер.

Поглощение, транспорт и выделение воды составляет **водный обмен растения**. Корень является специализированным органом поглощения воды. Однако любая клетка растения, не насыщенная водой, может поглощать воду. Только сухая кутикула непроницаема для воды; при смачивании она набухает и становится проницаемой (смоченные дождём или росой листья могут поглощать до 25 % падающей на них воды).

Поступление воды в клетки корня растений определяется градиентом водного потенциала (в сторону более отрицательного значения). Создаётся градиент с помощью двух механизмов – поглощения клетками веществ из почвы и испарения воды из листьев. Реализация этих механизмов приводит к повышению концентрации клеточного сока. Чем ниже насыщенность клеток водой, тем меньше их водный потенциал (более отрицателен).

Листья выделяют воду в результате **транспирации** и **гуттации**. Транспирация возможна только тогда, когда окружающий побег воздух не насыщен водой. В обратном случае происходит гуттация, характерная для растений влажных субтропических лесов. В основном транспирируют листья, но могут и стебли (до 10 % от общей транспирации побегов). Транспирацию характеризуют по интенсивности, продуктивности и транспирационному коэффициенту.

Интенсивность транспирации – количество воды, испаренной с единицы листовой поверхности в единицу времени (например, г/м²ч).

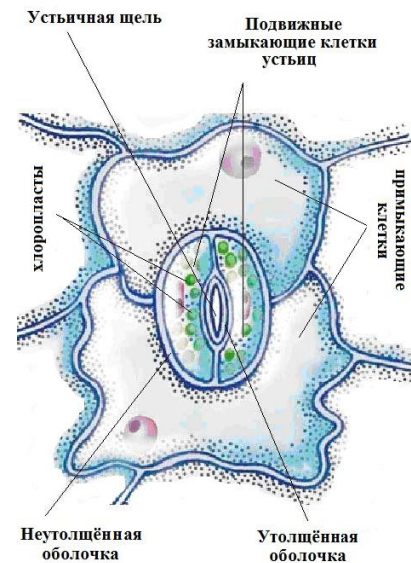
Транспирационный коэффициент (эффективность использования воды) – количество граммов воды, израсходованной растением при накоплении 1 г сухого вещества. Средняя величина транспирационного коэффициента у C₃-растений – 600, у C₄-растений – 300, а у растений САМ-типа она колеблется от 33 до 240 г воды/г сухого вещества.

Продуктивность транспирации (обратная величина транспирационного коэффициента) – количество граммов сухого вещества, накопленного в растении при испарении 1000 г воды. Показатель варьирует в диапазоне от 1 до 8.

Работа 13. Определение относительной транспирации весовым методом

Относительная транспирация – отношение интенсивности транспирации к интенсивности испарения со свободной поверхности при тех же условиях. Данный показатель характеризует способность растений регулировать транспирацию и выражается в виде десятичной дроби или в процентах.

Испарение воды из ряда мелких отверстий, расположенных на небольшом расстоянии друг от друга, идет интенсивнее, чем с большего отверстия той же площади. Здесь действует закон И. Стефана о зависимости испарения от диаметра отверстия, а не от его площади. Несколько отверстий с малым диаметром имеют значительно большее диффузионное поле, чем одно крупное, т.к. общая длина окружностей малых отверстий значительно больше, чем длина окружности одного крупного отверстия, здесь действует так называемый краевой эффект. С другой стороны транспирация может регулироваться изменением степени открытости устьиц, а значит и интенсивностью испарения влаги через них. Закрывание всех устьиц наполовину почти не отражается на интенсивности транспирации (согласно закону Стефана); полное их закрывание сокращает транспирацию приблизительно на 92 %.



Ход работы:

1) определить интенсивность транспирации листа:

а) лист растения (черешок листа обмакнуть в расплавленный парафин) взвесить и через 5 минут повторить взвешивание;

б) определить площадь листа (наложить лист на бумагу, аккуратно обвести карандашом, вырезать и взвесить полученную бумажную фигуру; параллельно вырезать квадрат известной площади, например, 1 см² из этой же бумаги и взвесить его). Рассчитать площадь листа (S) по формуле:

$$S = (a \cdot b) / c, \text{ см}^2,$$

где a – площадь бумажного квадрата, см²; c – масса бумажного квадрата, г; b – масса бумажных фигур, г.

в) рассчитать интенсивность транспирации листа (I₁) по формуле:

$$I_1 = (n \cdot 60 \cdot 10000) / (s \cdot t), \text{ г}/(\text{м}^2 \cdot \text{ч}),$$

где n – количество испаренной воды, г; t – продолжительность опыта, мин.; 10000 – коэффициент перевода см² в м²; s – площадь листьев, см²; 60 – коэффициент перевода минут в часы.

2) определить интенсивность испарения со свободной поверхности:

а) взвесить чашку Петри с водой (чашка должна быть наполнена так, чтобы вода полностью покрывала её дно; наружная поверхность чашки должна быть сухой) и через 30 минут повторить взвешивание;

б) по формуле $S = \pi R^2$ определить площадь чашки Петри;

в) рассчитать интенсивность транспирации (I_2).

3) Найти относительную транспирацию.

Значение интенсивности транспирации нужно разделить на значение интенсивности свободного испарения.

Задание: определить относительную транспирацию. Объяснить различие показателей интенсивности транспирации листа и интенсивности испарения со свободной поверхности.

Работа 14. Наблюдение за движением замыкающих клеток устьиц

Газообмен между межклетниками листа и наружной атмосферой регулируется устьицами. Каждое устьице состоит из двух замыкающих клеток, у которых стенки, примыкающие к устьичной щели, сильно утолщены, тогда как наружные части оболочки остаются тонкими. Неодинаковая толщина наружных и внутренних стенок замыкающих клеток приводит к тому, что при изменении тургора замыкающие клетки способны искривляться или распрямляться, открывая или закрывая при этом устьичную щель. В основе механизма устьичных движений лежат осмотические явления. При насыщении водой замыкающих клеток устьиц они растягиваются, утолщенная часть не растягивается, а еще больше искривляется вовнутрь, устьица открываются. При потере воды тургор падает, замыкающие клетки выпрямляются и устьичные щели закрываются.

Ход работы: срез нижней эпидермы листа исследуемых растений помещают в каплю глицерина на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и сразу начинают наблюдения под микроскопом. Отмечают явление плазмолиза как в замыкающих клетках, так и в остальных клетках эпидермиса. Устьичные щели закрываются.

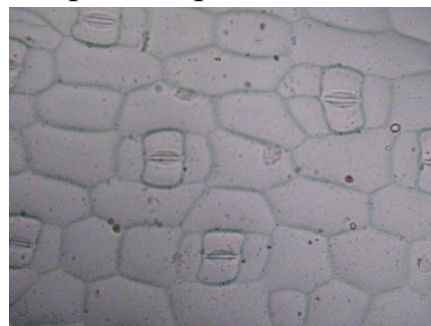
Через 15 минут, вследствие того, что глицерин начинает проникать через цитоплазму в клеточный сок, наступает деплазмолиз и устьичные щели открываются.

Заменяют глицерин водой. При этом устьица откроются еще шире, т.к. из-за проникновения глицерина в клеточный сок осмотическое давление в замыкающих клетках повысится.

Задание: зарисовать устьица в открытом и закрытом состоянии. Сделать вывод о причинах открывания и закрывания устьичной щели.

Работа 15. Подсчет числа устьиц

Ход работы: с поверхности листа исследуемых растений снимают эпидермис верхней или нижней стороны листа, надрезая его лезвием, помещают на предметное стекло в каплю дистиллированной воды и рассматривают под микроскопом при увеличении объектива $\times 20$ ($\times 40$). Необходимо в 5 повторностях подсчитать число устьиц, попадающих в поле зрения микроскопа при соответствующем увеличении объектива на нижнем и верхнем эпидермисе листьев растений разных видов. Затем определяют площадь поля зрения микроскопа с учётом увеличения окуляра и объектива; для этого, с помощью объективного микрометра измеряют в миллиметрах диаметр поля зрения при большом увеличении и рассчитывают его площадь ($S = \pi R^2$).



Цену деления окулярного микрометра определяют следующим образом. Совмещают окулярную шкалу со шкалой объективного микрометра. Находят какой-либо интервал, на котором совпадают риски шкал. Подсчитывают, сколько делений окулярной шкалы и сколько делений объективного микрометра укладывается на этом отрезке. Учтя, что цена деления объективного микрометра составляет 0.01 мм, рассчитывают цену деления окулярного микрометра (Приложение Б). При использовании микроскопа Zeiss ($\times 40$) определяют, сколько делений объект-микрометра попадает в поле зрения микроскопа (приблизительно, 45) и вычисляют площадь поля зрения.

Используя полученные данные, определяют количество устьиц на 1 см^2 поверхности верхнего и нижнего эпидермиса листа.

Задание: определить количество устьиц на единицу площади листа в верхнем и нижнем эпидермисе. Пояснить выявленные различия.

Вопросы для самоконтроля:

1. Перечислите функции воды.
2. Что такое гомеостатическая вода?
3. Какие типы транспирации Вам известны?
4. Какие механизмы устьичных движений существуют?
5. Какой характер расположения устьиц у водных растений?
6. Какую роль в жизни растений играет транспирация?
7. Перечислите способы снижения транспирации.
8. Что такое «гуттация»?
9. Что такое «физиологическая засуха»?
10. Что такое корневое давление?
11. В каких условиях у растений формируется ксероморфная структура?

ЗАНЯТИЕ 4

Тема. Обнаружение процесса фотосинтеза

Цель занятия: обнаружить фотосинтез у водных растений по выделению пузырьков газа, оценить зависимость интенсивности фотосинтеза от влияния абиотических факторов.

Материалы и оборудование: элодея, валлиснерия, роголистник, листья растений, дистиллированная вода, стеклянные сосуды, пробирки, воронки, водопроводная вода, прокипяченная и остуженная в закрытом сосуде, 0.5% раствор гидрокарбоната натрия NaHCO_3 , пинцет, термометр, пробочные сверла, шприцы на 10 мл, сосуд для теплового экрана, черная бумага для экрана, линейка, лампа (100 Вт), стеклянные стаканчики, лед, лезвия, спички, маркер.

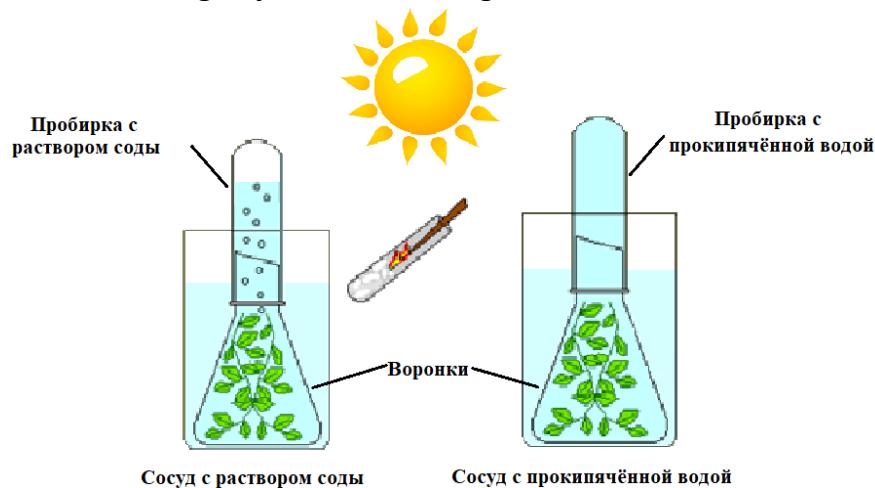
Исходя из суммарного уравнения фотосинтеза



можно сделать вывод о том, что обнаружить процесс фотосинтеза можно или по поглощению CO_2 , или по выделению кислорода, или по накоплению углерода (например, углеводов – глюкоза и др.) в листьях.

Работа 16. Выделение кислорода водными растениями

Ход работы: в один сосуд наливают прокипяченную воду (вода без CO_2), в другой — 0.5%-ный раствор гидрокарбоната натрия (вода с CO_2). Отбирают здоровые растения. Обновляют под водой срезы. Помещают растения под воронки. На суженные концы воронок надевают пробирки, заполненные теми же растворами, что и в сосудах, не допуская попадания в них воздуха. Сосуды с растениями устанавливают под яркий свет (лампочка 100 Вт). Температура всех жидкостей в опыте должна достигать 26°C . В пробирки, заполненные газом, который выделяют растения, можно опустить зажженную лучину. Горение будет свидетельствовать о присутствии кислорода.



Задание: сделать рисунки. Отметить время заполнения каждой из пробирок кислородом и сделать выводы о роли CO_2 в реализации фотосинтеза.

Работа 17. Всплывание на свету инфильтрированных дисков из листьев

У наземных растений выделяющийся при фотосинтезе кислород накапливается в межклетниках листа. Если межклетники листа наполнены газом, то плотность тканей листа мала и лист плавает на поверхности воды. Если межклетники заполнены водой, то лист оседает на дно. Кислород, выделяющийся при фотосинтезе, вытесняет из межклетников воду, лист становится легче и всплывает на поверхность.

Ход работы: пробочным сверлом из листа делают высечки и инфильтрируют их водой, насыщенной CO_2 , используя шприц или насос Комовского. Инфильтрированные высечки помещают по шесть штук в стаканчики с водой, обогащенной CO_2 . Один из стаканчиков помещают в темноту (контроль), другие выставляют на свет на разные расстояния от его источника и засекают время.

Высечки всплывают в разное время в зависимости от интенсивности света (расстояние от лампы 0, 25, 50, 100 см) в результате вытеснения воды из межклетников кислородом, образующимся при фотосинтезе. Высечки, находящиеся в темноте, не должны всплывать. Мерой интенсивности фотосинтеза служит время, прошедшее с момента установки стакана с инфильтрированными высечками на свет до всплывания 50% высечек.

Задание: определить время всплывания высечек в стаканчиках, установленных на разных расстояниях от лампы. Сделать вывод о влиянии интенсивности света на интенсивность фотосинтеза.

Работа 18. Зависимость интенсивности фотосинтеза от освещенности листьев и от температуры

Процесс фотосинтеза протекает за счет световой энергии, поглощаемой пигментами листа, поэтому его интенсивность зависит от интенсивности падающего на лист света, точнее, от интенсивности фотосинтетически активной радиации (ФАР). Это легко показать на водных растениях, у которых интенсивность фотосинтеза измеряется количеством выделяющихся пузырьков кислорода.

В естественной среде все факторы взаимодействуют друг с другом и, действие одного фактора, зависит от напряженности всех остальных. В общем виде это можно сформулировать так: изменение напряженности одного фактора при неизменности прочих влияет на фотосинтез, начиная от минимального уровня, при котором процесс начинается, и, кончая оптимумом, при достижении которого процесс перестает изменяться (кривая выходит на плато). Во мно-

гих случаях увеличение напряженности фактора после определенного уровня приводит даже к подавлению процесса. Однако если начать изменять какой-либо другой фактор, то оптимальное значение напряженности первого фактора меняется в сторону увеличения. Иначе говоря, плато достигается при более высоком значении напряженности. Скорость процесса, в частности скорость фотосинтеза, зависит в первую очередь от напряженности того фактора, который находится в минимуме (ограничивающий фактор). В качестве примера можно привести взаимодействие таких факторов, как интенсивность света и содержание CO_2 . Чем выше содержание углекислого газа (в определенных пределах), тем при более высокой освещенности показатели фотосинтеза выходят на плато.

На интенсивность процесса фотосинтеза помимо интенсивности света и содержания CO_2 также оказывают влияние другие внешние факторы – температура окружающей среды, снабжение растения водой и O_2 , минеральное питание.

Ход работы: выбирают здоровое растение элодеи. Под водой обламывают веточку длиной 3-4 см с верхушечной почкой и помещают в пробирку с водой, обогащенной CO_2 с помощью раствора бикарбоната натрия в концентрации не более 0.5%. Более высокие концентрации соды оказывают вредное действие на живые клетки и могут привести к подавлению фотосинтеза. Вместо применения раствора соды можно продуть воду выдыхаемым через трубочку воздухом. Продувание в течение 5-10 мин насытит воду углекислотой.

Элодею помещают в пробирку верхушкой вниз, так, чтобы свежесломанный кончик ветки был на 5 см ниже поверхности воды. Пробирку с веточкой помещают во внешний сосуд с температурой воды 27°C . Слой воды служит тепловым фильтром.

Из свежесрезанного побега, помещенного на свет, начинают выделяться пузырьки газа – происходит фотосинтез. Если пузырьки крупные и поступают редко, то нужно слегка придавить кончик среза пинцетом или слегка прижать его стеклянной палочкой к стенке пробирки. Это изменит величину пузырьков и скорость их выделения. Иногда полезно обновить срез. Во избежание утомления глаз сосуд надо держать не прямо перед лампой, а справа или слева от нее. Когда пузырьки начнут выделяться равномерно, надо убедиться в том, что при затенении пробирки с веточкой ток пузырьков останавливается, а при ее освещении продолжается. Повторяют затенение несколько раз, пока пузырьки газа из растения совсем прекратят выделяться. Затенение производят черной бумагой, помещенной между лампой и сосудом, так, чтобы веточка была закрыта.

Затем надо проследить:

1) как влияет интенсивность света на фотосинтез. Веточку элодеи помещают сначала под лампу, а затем отодвигают на расстояние 5, 15, 25, 50, 100 см. Величина освещенности при этом меняется пропорционально квадрату расстояния от лампы (при удалении растения от света освещенность уменьшается).

Подсчет пузырьков кислорода делают в 3-х повторностях. Для каждого расстояния берут среднее из трех отсчетов. Сравнение числа пузырьков при разных условиях освещения и при разной концентрации CO_2 нужно проводить на одном и том же объекте (веточке), так как величина пузырьков, от которой зависит скорость их выделения, определяется величиной перерезанных межклетников. У разных веточек эти величины будут разными. Они изменяются также, если сдвинуть срез или сделать новый на той же веточке.

2) как влияет температура окружающей среды на интенсивность процесса фотосинтеза. Пробирку с веточкой элодеи помещают сначала в холодную воду, чтобы температура воды в пробирке снизилась до 10-15 °С. Затем пробирку с веточкой водорослей переносят в сосуд с горячей водой, чтобы температура воды поднялась до 25 °С, После измерений воду во внешнем сосуде нагревают сильнее, чтобы температура воды в пробирке поднялась до 30-35 °С. При каждом изменении температуры подсчитывают количество пузырьков кислорода, выделяющихся за 1 минуту.

Задание: подсчитать среднее число пузырьков кислорода, которые выделяются за 1 мин из одной и той же веточки при установке ее на разное расстояние от лампы и при каждой смене температуры. Сделать выводы.

ЗАНЯТИЕ 5

Тема. Фотосинтетические пигменты

Цель занятия: ознакомиться с методами экстракции и разделения фотосинтетических пигментов растений; изучить свойства пигментов.

Материалы и оборудование: зелёные листья растений, дистиллированная вода, 96% этиловый спирт, бензин, 10% HCl; кристаллы уксуснокислого цинка $Zn(O_2CCH_3)_2$, $CaCO_3$ и NaOH. Центрифуга, спектроскоп, пробирки, пробирки Эппендорфа, ступки, пестики, пипетки, пипетки Пастера или наконечники, фильтровальная бумага, маркер, хроматографическая бумага, хроматографические камеры в штативах.

Фотосинтетические (массовые пигменты) растений избирательно поглощают свет, накапливаются в большом количестве и выполняют ряд функций. **Хлорофиллы** (1) поглощают свет, (2) передают его энергию реакционному центру и (3) входят в состав реакционного центра и совершают химическую работу. **Фикобилины** – поглощают свет и передают его энергию молекулам хлорофилла *a* (но не реакционному центру). **Каротиноиды** – (1) поглощают свет и передают его энергию хлорофиллам; (2) защищают хлорофилл от окисления, (3) участвуют в кислородном обмене клетки, (4) придают окраску отдельным частям растений. **Антоцианы** – (1) придают окраску цветкам, (2) увеличивают осмотическое давление клеток (стрессоустойчивость растений), (3) преобразуют видимый свет в тепловое излучение (устойчивость к холоду), (4) способствуют повышению фотохимической активности хлоропластов.

Работа 19. Получение вытяжки пигментов

Ход работы: навеску зелёных листьев (~1 грамм) измельчают и тщательно растирают в ступке с небольшим количеством песка, $CaCO_3$ (для нейтрализации кислот) и 96% этилового спирта (~1 мл). После того, как образец будет полностью гомогенизирован, к нему добавляют около 10-15 мл 96% этилового спирта. Полученный гомогенат центрифугируют (10 минут, 12-14 тыс. об./мин.) или отфильтровывают через стеклянный фильтр с помощью насоса Комовского и колбы Бунзена.

Задание: часть полученной вытяжки (~0.5 мл) отлить в пробирку Эппендорфа (для выполнения работы 20), оставшийся раствор разлить по трём пробиркам (1, 3 и 4) примерно в равных частях (для выполнения 21 и 22 работ).

Работа 20. Хроматографическое разделение пигментов на бумаге

Хроматография – метод разделения и анализа смесей веществ, а также изучения их физико-химических свойств. Основан на распределении веществ между двумя фазами – *неподвижной* (твёрдая фаза или жидкость, связанная на

инертном носителе) и *подвижной* (газовая или жидкая фаза, *элюент*). В данной работе – на разделении пигментов между волокнами целлюлозы хроматографической бумаги (неподвижной фазой) и растворителем (подвижной фазой). При перемещении раствора по бумаге под действием капиллярных сил, молекулы пигментов распределяются между этими двумя фазами, в зависимости от адсорбционной способности и растворимости пигментов.

Расстояние, пройденное нанесённым на бумагу пигментом в направлении движения растворителя, характеризуется **величиной R_f** , которая представляет собой отношение расстояния, пройденного растворённым пигментом, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя. В стандартных условиях это величина для данного пигмента постоянна и соответствует коэффициенту распределения.

Хроматографию на бумаге проводят **восходящим** и **нисходящим** способами. При **восходящей** хроматографии бумажную полоску подвешивают вертикально; её нижний конец (на который нанесена смесь пигментов) погружают в растворитель. При этом место нанесения (линия старта) **должно** находиться **выше** уровня растворителя. По мере движения растворителя под действием капиллярных сил вертикально вверх происходит разделение растворённых веществ. При **нисходящей** хроматографии верхний конец бумажной полосы со смесью пигментов, нанесённых недалеко от кромки бумаги (линия старта), закрепляют в сосуде и размещают в верхней части камеры. Нижний конец бумаги спускают вниз, но так, чтобы он не касался налитого на дно камеры растворителя. В результате действия капиллярных сил и силы тяжести растворитель начинает передвигаться вниз по бумажной полосе, в результате чего происходит разделение смеси.

Хроматографирование проводят в герметически закрытых камерах, где поддерживается атмосфера, насыщенная парами растворителей, что предотвращает их испарение с бумаги. Для эффективного распределения пигментов бумага должна быть равномерной по толщине и обладать достаточной плотностью.

Ход работы: проводим бумажную восходящую хроматографию. Полоску хроматографической бумаги шириной 1.5 см и длиной, соответствующей высоте сосуда, помещают на чистую поверхность. На расстоянии 2 см от нижнего края полоски (**линия старта**) в середину осторожно (**не допуская** образования большого пятна) наносят 10-15 небольших капель (микрокапилляром или наконечником микропипетки) спиртового экстракта пигментов, дожидаясь **полного высыхания** предыдущей капли. Полоску подвешивают на крючок в хроматографической камере (так, чтобы нижний конец был погружён в бензин; место нанесения смеси пигментов должно находиться



выше растворителя) и плотно её закрывают. По окончании разделения пигментов (после того, как растворитель пройдёт ~ 10 см) хроматограмму вынимают, сразу отмечают карандашом границу подъема растворителя (**фронт растворителя**), высушивают в вытяжном шкафу и рассчитывают значение R_f для каждого пигмента.

Задание: зарисовать полученную хроматограмму в тетрадь, сделать выводы о разделении фотосинтетических пигментов на бумаге, учитывая их разную растворимость пигментов в бензине и их молекулярные массы.

Работа 21. Разделение пигментов по Краусу и омыление хлорофилла щёлочью

Молекула хлорофилла состоит из двух частей – порфиринового ядра и фитольного хвоста (в два раза длиннее ядра). Благодаря атомам кислорода, азота и магния порфириновое кольцо гидрофильно. Фитольный хвост является гидрофобным участком углеводородной цепи молекулы. Полярность молекулы обуславливает её расположение в мембранах хлоропласта: фитольный хвост располагается в гидрофобной части мембраны тилакоида, а порфириновое ядро – в гидрофильной. Имея разные свойства, обе части молекулы хлорофилла выполняют разные функции: порфириновое ядро поглощает свет, а фитольный хвост «заякоривает» молекулу хлорофилла в определённой части мембраны тилакоида.

Полученный из листа хлорофилл легко реагирует с кислотами и щелочами. При взаимодействии со щёлочью образуется два спирта – метанол и фитол – щелочная соль хлорофиллина.

При действии слабой кислоты хлорофилл теряет зелёный цвет, образуется бурое вещество феофитин, у которого атом магния замещён на два атома водорода. В естественных условиях образование феофитина происходит при старении листьев, осенью, под влиянием неблагоприятных факторов. В природе появление феофитина вызвано увеличением проницаемости мембран и проникновением в хлоропласт кислого клеточного сока.

Щёлочь отделяет от молекулы хлорофилла фитольный хвост, в результате образующаяся соль теряет способность растворяться в бензине, но сохраняет зелёный цвет. В живом листе фитол может отщепляться от хлорофилла под действием фермента хлорофиллазы.

Кроме пиррольных колец, в состав молекулы хлорофилла входит ещё карбоциклическое кольцо с высокоактивной кетогруппой. Предполагают, что эта группа участвует в окислении воды.

Ход работы: добавить к спиртовой вытяжке пигментов (**пробирка 1**) 2-3 капли дистиллированной воды и равный (спиртовому) объём бензина. Работу проводить в вытяжном шкафу. Закрывать пробирку, несколько раз сильно встряхнуть и дать отстояться. Отметить окраску слоёв жидкости. Верхнюю

бензиновую фракцию необходимо перенести **во вторую пробирку**. Экстракцию повторить дважды. В первой пробирке остаётся раствор ксантофилла.

К бензиновой фракции (**пробирка 2**) добавить несколько кристаллов NaOH и несколько капель воды, сильно встряхнуть. Прилить в пробирку спирт (объём равен объёму бензина), сильно встряхнуть и дать отстояться. Верхняя фракция – раствор каротина в бензине; нижняя – раствор соли хлорофиллина в спирте.

Задание: разделить смесь пигментов, полученные растворы оставить их для выполнения работы 23.

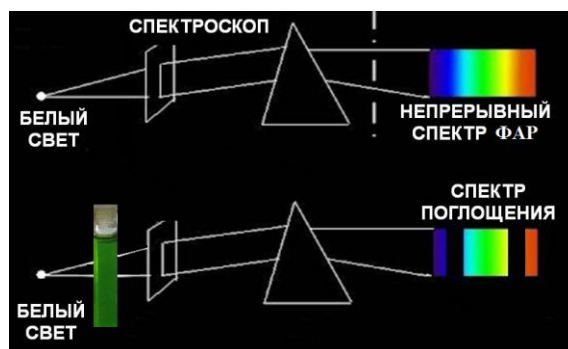
Работа 22. Получение раствора феофитина и металлозамещённого хлорофилла

Ход работы: в пробирки три и четыре со спиртовыми растворами пигментов добавляют по две капли 10%-ного раствора HCl. При разрушении металлоорганической связи (потеря иона магния) образуется феофитин и цвет раствора изменяется. В **четвёртую** пробирку нужно добавить кристаллы уксуснокислого цинка и прокипятить (пробирку прикрыть фольгой). Образуется аналог хлорофилла (ион цинка встраивается вместо иона магния).

Задание: получить растворы и оставить их для выполнения работы 23.

Работа 23. Оптические свойства фотосинтетических пигментов

Пигменты характеризуются избирательным поглощением лучей света. Для определения, какие именно лучи поглощает пигмент, нужно кювету (пробирку) с раствором пигмента поместить перед щелью **спектроскопа**. В месте лучей, поглощаемых молекулами пигмента, в спектре излучения источника света появляются тёмные поло-



та.

На
ми

сы.

Чем полнее поглощаются лучи, тем темнее полоса. Спектр с темными полосами на месте поглощённых лучей и называется **спектром поглощения пигмента**. Наиболее затемнённые полосы в зонах поглощения соответствуют **максимумам поглощения**. Ширина полос поглощения зависит от количества молекул пигмента в слое раствора, через который проходит луч света, попадающий в щель спектрометра. Положение максимумов поглощения пигментов может **смещаться** из-за изменения их структуры или взаимодействия отдельных молекул между собой.

Ход работы: оценивают спектр поглощения растворов пигментов, полученных при выполнении работ 19 и 21-22. Раствор хлорофилла находится в нижней части пробирки 2; феофитина – пробирке 3; металлозамещённого хло-

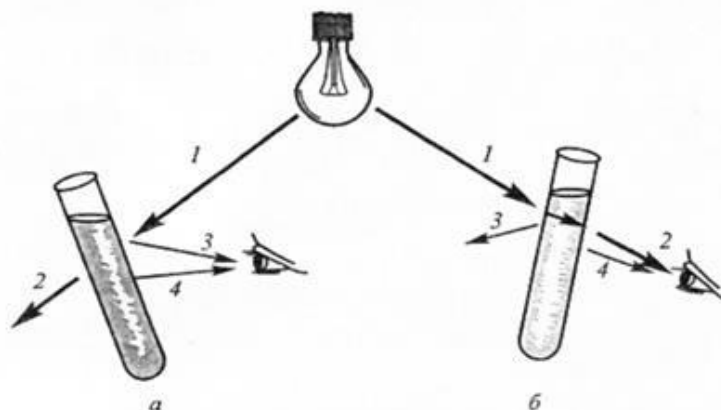
рофилла – пробирке 4; каротина – верхней части пробирки 2; ксантофилла – пробирке 1.

Задание: заполнить таблицу, сделать вывод о роли строения молекул фотосинтетических пигментов в формировании их оптических свойств.

Фотосинтетические пигменты	Спектр поглощения
Хлорофилл	
Феофитин	
Металлозамещённый хлорофилл	
Каротин	
Ксантофилл	

Работа 24. Наблюдение флуоресценции хлорофилла

Хлорофилл обладает и другим оптическим свойством – *флуоресценцией*, возникающей при поглощении света (1). Это явление объясняется переходом молекул хлорофилла из возбужденного в нормальное состояние. Флуоресценция является признаком фотохимической активности хлорофилла – это процесс испускания возбужденной молекулой хлорофилла света с длиной волны, большей, чем длина волны света, возбудившего флуоресценцию.



В проходящем свете (2) спиртовая вытяжка пигментов имеет изумрудно-зеленую окраску, т.к. из непрерывного спектра белого света удаляются полосы синего и красного цветов. Флуоресценция (4) обнаруживается по красному цвету свечения раствора хлорофилла, рассматриваемого в отраженном свете (3) на темном фоне.

Ход работы: для наблюдения флуоресценции спиртовую вытяжку пигментов, полученную в начале работы, рассматривают в отраженном (а) и проходящем (б) свете.

Задание: сделать вывод о наличии флуоресценции хлорофилла, описать цвет раствора хлорофилла в проходящем и отраженном свете.

ЗАНЯТИЕ 6

Тема. Количественное определение фотосинтетических пигментов

Цель занятия: ознакомиться с методами количественного определения фотосинтетических пигментов растений, с помощью модельного опыта продемонстрировать фотосенсибилизирующую активность хлорофилла.

Материалы и оборудование: зелёные листья растений, 96% этиловый спирт, кристаллическая аскорбиновая кислота, насыщенный спиртовой раствор метилового красного. Центрифуга, спектрофотометр, ступки, пестики, центрифужные пробирки, мерные пробирки, пробирки Эппендорфа, пипетки Пастера, кварцевые кюветы, маркер, лампа 100 W, штатив с пробирками, ступка, пестик, черная бумага.

Работа 25. Определение концентрации фотосинтетических пигментов

Ход работы:

(1) Точную навеску зелёных листьев (500-700 мг) тщательно растирают в ступке с небольшим количеством песка, CaCO_3 (для нейтрализации кислот) и 96% этилового спирта (~1 мл). После того, как образец будет полностью гомогенизирован, к нему добавляют около 10-15 мл 96% этилового спирта. Полученный гомогенат центрифугируют (10 минут, 12-14 тыс. об./мин.). Надосадочную жидкость переносят в мерную пробирку для определения объема экстракта, после чего переливают часть раствора в кювету для оценки оптической плотности раствора.

(2) Точную навеску зелёных листьев (7-10 мг) тщательно растирают в пробирке Эппендорфа с небольшим количеством песка, CaCO_3 и 96% этилового спирта (~300 мкл). После того, как образец будет полностью гомогенизирован, доводят объем экстракта до 1.5 мл. Полученный гомогенат осаждают (10 минут, 12-14 тыс. об./мин.) на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия). Надосадочную жидкость переносят в чистую пробирку Эппендорфа и доводят объём до 1.5 мл 96% этиловым спиртом, после чего раствор переливают в кювету для оценки оптической плотности раствора.

Оптическую плотность проб при разных длинах волн определяют с помощью спектрофотометра (Genesys 10S UV-Vis Thermo Electron, Германия), или с помощью спектрофотометра СФ-26 (Приложение В).

Примерно за 30 минут до начала работы включают спектрофотометр. В одну из кювет наливают 96% спирт (контроль), в другие – опытные образцы. Кюветы ставят в прибор, так, чтобы просветы и прозрачная часть кювет совпадали, так как через них



идет луч. Контрольную кювету с 96% спиртом помещают в лунку «В». Во время непосредственного проведения измерений, крышка прибора **должна быть закрытой**. Прежде чем фиксировать результат при соответствующей длине волны для опытных образцов – нужно обнулить контроль. Для этого нажимают клавишу для набора длины волны – «**set nm**», указывают соответствующее значение (470, или 648.6, или 664.2, или 720 нм (для оценки мутности экстракта)), сохраняют выбранную длину волны клавишей «**enter**». Далее, последовательно нажимают на клавишу «**В**», «**measure blank**» (чтобы обнулить контроль) и «**номер лунки**» (в соответствии с анализируемой пробой).

Концентрацию пигментов в спиртовой вытяжке рассчитывают согласно Н.К. Lichtenthaler [96]:

$$C_{\text{хлорофилла } a} = 13,36 \cdot D_{664,2^*} - 5,19 \cdot D_{648,6}$$

$$C_{\text{хлорофилла } b} = 27,43 \cdot D_{648,6} - 8,12 \cdot D_{664,2}$$

$$C_{\text{сумма хлорофиллов } a+b} = 5,24 \cdot D_{664,2} + 22,24 \cdot D_{648,6}$$

$$C_{\text{каротиноидов}} = (1000 \cdot D_{470} - 2,13 \cdot C_a - 97,64 \cdot C_b) / 209$$

$$A = C \cdot V / 1000 \cdot n,$$

где C – концентрация, D – оптическая плотность раствора при соответствующей длине волны, V – объем экстракта, n – масса растительной навески, г.

* – любое значение D вводится в формулы **только после вычитания** показателя оптической плотности мутности раствора (при 720 нм).

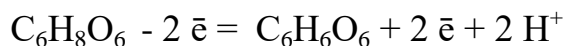
Задание: рассчитать концентрацию хлорофиллов a и b , каротиноидов, соотношение суммы хлорофиллов к каротиноидам. Сравнить результат, полученный методами (1) и (2). Заполнить таблицу.

Вариант	C				A, мг/г сырой массы				
	Хф a	Хф b	Хф $a + \text{Хф } b$	Ка-рот	Хф a	Хф b	Хф $a + \text{Хф } b$	Ка-рот	$\frac{(\text{Хф } a + \text{Хф } b)}{\text{Карот}}$

Работа 26. Демонстрация фотосенсибилизирующей активности хлорофилла в модельном опыте

В 1948 г. академик А.А. Красновский простым опытом доказал, что хлорофилл в фотосинтезе является участником и инициатором окислительно-восстановительных реакций. Показать эту способность хлорофилла можно в модельном опыте с помощью двух соединений – аскорбиновой кислоты (АК) $C_6H_8O_6$ и метилового красного (МК) $C_{15}H_{15}N_3O_2$, обладающих окислительно-восстановительными свойствами.

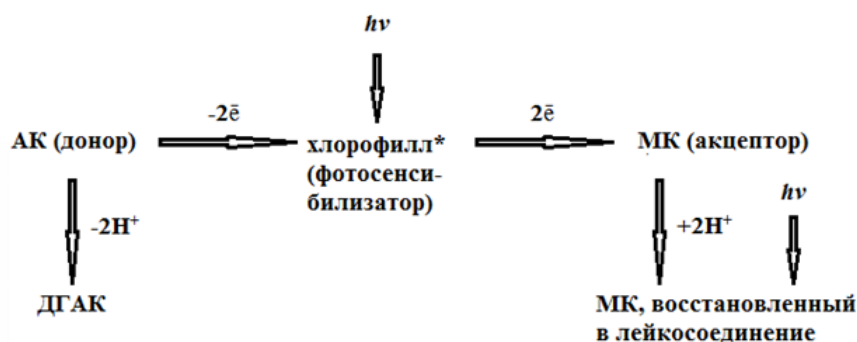
АК способна к необратимой окислительно-восстановительной реакции с образованием дегидроаскорбиновой кислоты (ДГАК), что сопровождается переносом электрона к акцептору:



В этом заключается важнейшая функция АК в клетках живых организмов, где она выступает в качестве источника энергии, отдавая электроны и протоны в дыхательную электронно-транспортную сеть. Окислительно-восстановительный потенциал (E_0) АК равен 0,1 эВ (при pH 5,75). АК является восстановителем, а в данной реакции – донором электронов.

МК ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) также обладает окислительно-восстановительными свойствами, и его E_0 составляет 0,8 эВ. Являясь окислителем, МК в силу большой разницы потенциалов ($\Delta E_0 = 0,7$ эВ) не может окислить АК спонтанно. Однако осуществить восстановление МК можно с помощью фотосенсибилизатора, т.е. вещества, использующего энергию света и стимулирующего химическую реакцию, но не участвующего в ней.

Таким образом, как бы моделируется принцип цепи окислительно-восстановительных реакций, происходящих при фотосинтезе после поглощения света молекулами хлорофилла. Транспорт \bar{e} в окислительно-восстановительной реакции с участием фотосенсибилизатора (возбужденного хлорофилла) можно представить в виде схемы:



В тилакоидной мембране хлоропласта, наоборот, благодаря высокоэнергетическому электрону (\bar{e}) хлорофилл приобретает свойства сильного восстановителя и может восстанавливать редокс-системы с большим отрицательным потенциалом. Отдаваемый при этом электрон остается высокоэнергетическим и может свою энергию потратить на последующие окислительно-восстановительные реакции, направленные на переборс протонов с наружной стороны мембраны тилакоида на внутреннюю для последующего синтеза АТФ.

Ход работы: листья (0,5 г) размельчают в ступке с добавлением 5-6 мл этилового спирта. Осадок пропускают через воронку с бумажным фильтром, экстракт хлорофилла (Хф) разливают поровну в три пробирки. В четвертую пробирку наливают столько же этилового спирта. Затем во все четыре пробирки по каплям добавляют спиртовой раствор метилового красного, пока зеленая окраска не приобретет бурый цвет в первых трех вариантах опыта и красный в IV варианте. Много добавлять метилового красного не следует.

Опыт закладывают в четырех вариантах:

Вариант опыта	Компоненты среды и освещенность	Первоначальный цвет	Изменение цвета	Причины изменения цвета или их отсутствия
I	Хф + МК + АК + свет			
II	Хф + МК + АК + темнота			
III	Хф + МК + свет			
IV	МК + АК + свет			

В пробирки I, II и IV вариантов добавляют по 30 мг кристаллической или несколько капель раствора аскорбиновой кислоты и встряхивают.

Во II варианте пробирку закрывают черной бумагой. Пробирки ставят непосредственно перед яркой лампой, поместив их в сосуд с водой, чтобы предотвратить нагрев растворов.

Через 10—20 мин от начала экспозиции в одной пробирке происходят изменения, и раствор снова приобретает зеленую окраску, так как метиловый красный восстанавливается в лейкосоединение, и только хлорофилл обеспечивает зеленый цвет раствора.

В остальных вариантах опыта красная и красно-бурая окраски не изменяются.

Задание: зарисовать пробирки в конце опыта, после изменения окраски в одном из вариантов. Сделать выводы относительно фотосенсибилизирующей активности хлорофилла, роли аскорбиновой кислоты, метилового красного и света.

Вопросы для самоконтроля по 4-6 занятиям:

1. Космическая роль фотосинтеза.
2. Перечислите массовые пигменты растений.
3. Чем отличается хлорофилл *a* от хлорофилла *b*?
4. На какие части делят молекулу хлорофилла по свойствам? Какую функцию выполняет каждая часть молекулы?
5. Как называется молекула хлорофилла, в которой магний замещен на два водорода?
6. В какой части хлоропласта происходит световая фаза фотосинтеза?
7. В какой части хлоропласта происходит темновая фаза фотосинтеза?
8. Какой тип транспорта электронов характерен для агранальных хлоропластов?
9. Что такое ФАР?
10. На чем основано хроматографическое разделение фотосинтетических пигментов?
11. Какой критерий используют для идентификации вещества на хроматографии?

12. Какие длины волн соответствуют максимумам поглощения каротиноидов, хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и используются для спектрофотометрического определения содержания пигментов в листе растений?
13. На каком принципе основана работа спектрофотометра?
14. На каком принципе основана работа спектроскопа?
15. Как можно обогатить воду CO₂ при выращивании водных растений?
16. Сравните устойчивость фотосинтетических пигментов к факторам среды и соотнесите с выполняемыми ими функциями.

ЗАНЯТИЕ 7

Тема. Дыхание растений

Цель занятия: научиться определять и рассчитывать дыхательный коэффициент; определять активность ряда дыхательных ферментов.

Материалы и оборудование: проросшие семена льна, овса, чечевицы, пшеницы, дистиллированная вода, метиленовый синий, 20%-ный раствор NaOH или KOH, 1 н раствор уксусной кислоты, 1 н раствор ацетата натрия, 10% раствор фосфорной кислоты, 1% раствор крахмала, раствор аскорбиновой кислоты (1 мг/мл), 0.02 М раствор пирокатехина, 0.01 н раствор йодата калия.

Пробирка с хорошо пригнанной резиновой пробкой, в которую вставлена изогнутая под прямым углом тонкая стеклянная трубка с нанесёнными делениями, секундомер, водяная баня, пинцет, ступка с пестиком, штатив с пробирками, фильтровальная бумага, пипетки Пастера разного объема, стеклянные пипетки, стеклянные цилиндры объёмом 10 мл, конические колбы на 100 мл, бюретка, воронка, стакан, маркер.

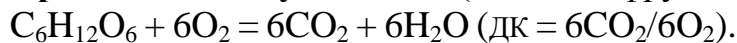
Работа 27. Определение дыхательного коэффициента

Дыхание – физиологический процесс постепенного окисления органических веществ с выделением энергии, которая запасается в молекулах АТФ (доноры энергии для выполнения любой работы в клетке).

Органические вещества, разрушающиеся во время дыхания, называются **дыхательным субстратом**. Показателем химической природы субстрата служит дыхательный коэффициент (ДК) – отношение объема выделенной при дыхании углекислоты к объему поглощенного кислорода. Дыхательные коэффициенты, определённые для целых семян и зародышей, обычно ниже, чем коэффициенты, измеренные у клеток и чистых растворов дыхательных субстратов.

Для ориентировочного определения величины ДК помещают исследуемый материал в пробирку, соединенную с градуированной трубкой, в которую введена капля красителя. В случае если объемы обмениваемых при дыхании газов равны, то капля в трубке передвигаться не будет.

При окислении углеводов (глюкоза, фруктоза) ДК = 1:

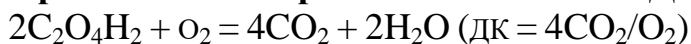


При величине ДК не равной 1, объёмы поглощённого O_2 и выделенного CO_2 не соответствуют друг другу, капля смещается.

При окислении белков или жиров (стеариновой кислоты) ДК < 1:



При окислении органических кислот ДК > 1:



Субстрат дыхания	Жир тристеарин	Жир триолеин	Лейцин	Лизин	Фенилаланин	Белки	Гексозы и их производные	Глу	Асп	Малат	Лимонная кислота	Щавелевая кислота
ДК	0.70	0.74	0.80	0.86	0.90	0.70÷0.99	1.00	1.11	1.33	1.33	1.33	4.00

Ход работы: в пробирку осторожно, стараясь не травмировать, помещают проросшие семена масличных, злаковых или бобовых культур. Заполняют пробирку на 1/3 по объёму и плотно закрывают пробкой со стеклянной градуированной трубкой. Пробирку ставят строго вертикально в штатив (чтобы избежать нагревания прибора от прикосновения рук) и вводят в трубку каплю красителя. За каплей в трубке наблюдают в течение 5 минут, если капля не сдвигается, то ДК = 1 и дальнейшие наблюдения за данными семенами можно прекращать. Если капля поменяла своё расположение, то отмечают положение внутреннего мениска капли через 5 минут (3 минуты, если трубка короткая; время отчёта должно быть одним и тем же). Измерение повторяют ещё два раза, каждый раз проветривая пробирку. Вычисляют среднее расстояние, пройденное каплей (А), которое соответствует разности между объемами поглощенного кислорода и выделенной углекислоты.



Потом в пробирку вставляют кольцо из фильтровальной бумаги, смоченной раствором щелочи (для поглощения CO_2), не допуская попадания её на семена. Закрывают пробирку пробкой и вновь вводят в трубку каплю красителя. Через 5 минут начинают измерения, перемещение окрашенной капли измеряют три раза и вычисляют среднее значение (В – объём поглощённого O_2).

Определяют величины А и В:

$$A = \text{O}_2 - \text{CO}_2; \text{CO}_2 = \text{O}_2 - A;$$

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

$$\text{ДК} = \text{CO}_2 / \text{O}_2 = (B - A) / B.$$

Задание: заполнить таблицу, сделать вывод о химической природе веществ, используемых для дыхания прорастающими семенами растений.

Растение	Расстояние, пройденное каплей за 3-5 минут, мм								Кол-во CO_2	Величина ДК	Дыхательный субстрат
	без щелочи (А)				со щелочью (В)						
	1	2	3	Хср	1	2	3	Хср			
Пшеница											
Лён											
Чечевица											

Работа 28. Количественное определение активности полифенолоксидазы

Процессы дыхания в клетках обеспечиваются активностью **оксидоредуктаз**, которые катализируют реакции переноса электронов (e^-) от окисляемого субстрата – донора e^- к акцептору e^- . Во многих реакциях e^- переносится вместе с протоном. Оксидоредуктазы, катализирующие перенос H^+ , называются **дегидрогеназами**. Акцептором может служить кислород или другие соединения (промежуточные акцепторы). Оксидоредуктазы, катализирующие перенос электронов на молекулярный кислород или кислород H_2O_2 и органических перекисей, называют **оксидазами**. В дыхательной цепи митохондрий терминальной оксидазой является **цитохромоксидаза**. Многие оксидазы ускоряют реакции окисления, не связанные с дыхательной цепью митохондрий. Они завершают окислительные процессы вне митохондрий. Такие оксидазы, как **каталаза** и **пероксидаза**, защищают клетки от сильных окислителей.

Полифенолоксидаза (аэробная дегидрогеназа) повышает окислительно-восстановительный потенциал молекулярного кислорода и присоединяет к нему водород, отщеплённый от полифенола или близкого соединения. Непрореагировавший субстрат может быть окислен йодом, что позволяет количественно оценить активность фермента с помощью титрования в присутствии крахмала.

Ход работы: навеску растений (400 мг) гомогенизировать в ацетатном буфере (10 мл; буфер получают при смешивании равных объёмов однонормальных растворов уксусной кислоты и ацетата натрия ($pH=4.7$)). Ступку оставить на 30 минут, накрыв листом бумаги. Вытяжку отфильтровать или центрифугировать, разделить на две половины и одну из них прокипятить (накрыть фольгой) для получения контрольного раствора (учёт неферментативного окисления). Половину сырой и кипячёной вытяжки оставить для выполнения **работы 29**.

В две колбы, подписанные **ПФН** (полифенолоксидаза в некипяченой вытяжке) и **ПФК** (полифенолоксидаза в кипяченой вытяжке) налить по 3 мл воды, 2 мл аскорбиновой кислоты и 1 мл пирокатехина. Добавить в одну колбу (**ПФН**) 1 мл некипяченого фильтрата, в другую (**ПФК**) – кипячёного, перемешивать две минуты и остановить реакцию ортофосфорной кислотой (1 мл) – схема опыта для **работы 28**. Добавить в каждую колбу по три капли раствора крахмала и титровать раствором йодата калия до появления синей окраски. Определение концентрации повторить 2-3 раза.

Расчёт активности фермента выполнить по формуле:

$$A = (10 \cdot \Delta V \cdot 5) / (m \cdot 2), \text{ где}$$

10 – коэффициент для учёта всего объёма вытяжки; ΔV – средняя разность между результатами титрования контрольной (с кипячёным фильтратом) и опытной вытяжек, мл; 5 – коэффициент для расчёта количества молекул субстрата, превращаемых ферментом, мкмоль/мл; m – навеска, г; 2 – время реакции, мин.

Ферментативная активность (А) показывает, сколько субстрата способен за минуту преобразовать фермент, содержащийся в 1 грамме растительного материала (мкмоль субстрата/г·мин).

Задание: рассчитать активность полифенолоксидазы.

Работа 29. Количественное определение активности пероксидазы в присутствии полифенолоксидазы

Пероксидазы окисляют полифенолы и ароматические амины, взаимодействуя не с молекулярным кислородом, а с H_2O_2 или органическими перекисями. Последние образуются в клетке под действием флавиновых оксидаз из каротиноидов, терпенов, жирных кислот в присутствии молекулярного кислорода.

Ход работы: смотрите «схема опыта для работ 28 и 29» – ПН (пероксидаза в некипяченой вытяжке) и ПК (пероксидаза в кипяченой вытяжке). Расчет активности пероксидазы проводится по формуле, приведенной в **работе 28**. Для получения «реальной» активности пероксидазы необходимо от значения, полученного вычислением по формуле, отнять значение активности полифенолоксидазы (полученной в **работе 28**).

Задание: рассчитать активность пероксидазы.

Схема опыта для работ 28 и 29:

для работы 28		для работы 29	
ПФН (полифенолоксидаза в некипяченой вытяжке)	ПФК (полифенолоксидаза в кипяченой вытяжке)	ПН (пероксидаза в некипяченой вытяжке)	ПК (пероксидаза в кипяченой вытяжке)
3 мл дистиллированной воды 2 мл (1 мг/1 мл) аскорбиновой кислоты 1 мл 0.02 М пирокатехина		3 мл дистиллированной воды 2 мл (1 мг/1 мл) аскорбиновой кислоты 1 мл 0.02 М пирокатехина 1 мл 0.01 % раствора H_2O_2	
1 мл соответствующего фильтрата			
Перемешивать две минуты			
Остановить реакцию добавлением 1 мл 10 % раствора ортофосфорной кислоты			
Добавить три капли 1 % раствора крахмала			
Титровать 0.01 н раствором йодата калия до появления синей окраски.			

Вопросы для самоконтроля:

1. Какое значение имеет дыхание для растений?
2. Где расположена дыхательная цепь?
3. Почему электроны перемещаются к кислороду воздуха?
4. Как происходит синтез АТФ?

5. Что такое «окислительное фосфорилирование»?
6. Какова роль кислорода в дыхании?
7. Какое значение имеет цикл Кребса для растений?
8. Каковы причины гибели растений от гипоксии? Как растения приспосабливаются к условиям гипоксии?
9. Что такое эффект Пастера?
10. Как меняется величина дыхательного коэффициента от степени окисления субстрата?
11. Что лежит в основе определения активности фермента в растительной ткани?

ЗАНЯТИЕ 8

Тема. Превращение органических веществ в растении

Цель занятия: ознакомиться с методами обнаружения вторичных веществ в травянистых и древесных растениях.

Материалы и оборудование: ветви хвойных растений; спилы деревьев хвойных и лиственных пород, кора сосны, ели, дуба или осины; кора корней бересклета; листья фикуса (молочая), лимона, аконита, диффенбахии, растения элодеи или валлиснерии, листья лука, проросшие и непроросшие семена пшеницы и льна, растения фиалки, выдержанные 2-е суток и в темноте и выращиваемые все это время на свету, жидкость Фелинга (раствор А и Б; смешивают непосредственно перед работой равные объемы раствора медного купороса и раствора щелочи с сегнетовой солью), 1% раствор хлорного железа, 1% раствор желатина, 1%-ный раствор крахмального клейстера, раствор краски судан-III в капельнице, концентрированные H_2SO_4 и CH_3COOH , 20% HCl , 1% KOH , 10% $NaOH$, 1% $CuSO_4$, насыщенный водный раствор уксуснокислой меди, 10% раствор перманганата калия, 25% раствор аммиака, слабый раствор йода в йодистом калии (концентрированный раствор, разбавленный в 3 раза), 96% этиловый спирт, чашка Петри с крахмальным агаром (2 г крахмала и 2 г агар-агара на 100 мл воды), сухой крахмал. Водяная баня, штатив с пробирками, коническая колба на 250 мл, микроскоп, ступки, пестики, градуированные пипетки на 5 мл, препаровальные иглы, пробочное сверло, предметные и покровные стекла, воронка, стакан с водой, фильтровальная бумага, пинцет, пипетки Пастера, стеклянная палочка, лезвие безопасной бритвы, маркер.

Работа 30. Обнаружение сахаров, образовавшихся в листьях растения при фотосинтезе

Ход опыта: 2 г листьев лука растирают в ступке, переносят в пробирку, смывая 10-15 мл H_2O , кипятят и фильтруют. Параллельно берут кусочек листа лука длиной 2-3 см, убивают его кипячением в воде. Заменяют воду на этиловый спирт и обесцвечивают кипячением в спирте. Далее проводят йодную реакцию на крахмал. В полученной вытяжке открывают моносахариды (глюкозу и фруктозу) пробой Фелинга и Троммера.

а) Проба Фелинга: к 3-5 мл фильтрата прибавляют такой же объем смеси Фелинга и нагревают до кипения. При наличии в жидкости сахаров выпадает кирпично-красный осадок закиси меди, образующийся благодаря восстановлению окиси меди, входящей в состав фелинговой жидкости.

б) Пробу Троммера: к 5 мл фильтрата приливают 1 мл 10% $NaOH$ и 3 капли слабого раствора $CuSO_4$. Образующийся вначале гидрат окиси меди растворяется, и жидкость окрашивается в синий цвет. Раствор $CuSO_4$ прибавляют до тех пор, пока останется в жидкости немного нерастворимого гидрата окиси меди. После этого жидкость нагревают до кипения. Сахар, отнимая от окиси

меди кислород, окисляется в кислоту, а окись меди восстанавливается в закись, которая выпадает в виде кирпично-красного осадка; иногда выпадает желтый гидрат закиси меди.

Оба осадка указывают на присутствие в растворе сахара, обладающего редуцирующими свойствами.

Задание: сделать вывод о том, какие продукты фотосинтеза накапливаются в листьях лука?

Работа 31. Обнаружение первичного крахмала с помощью микроскопа

Ход работы: растение элодеи (или валлиснерии) освещают несколько часов, затем лист убивают кипячением в воде, обесцвечивают кипячением в этиловом спирте. Затем обрабатывают в течение 10 мин 1% раствором КОН для просветления, окрашивают раствором I_2 в KI и рассматривают под микроскопом окрашенные крахмальные зерна, которые находятся внутри хлоропластов.

Задание: записать результаты наблюдений и сделать схематический рисунок.

Работа 32. Обнаружение крахмала и белков, образующихся при фотосинтезе

Ход работы: растение (например, фиалку) двое суток выдерживают в темноте для освобождения листьев от продуктов фотосинтеза. Пробочным сверлом берут 5-6 высечек диаметром в 0.5 см из листьев растений, выдержанных в темноте и на свету, помещают их в пробирки, приливают H_2O и кипятят. Затем воду сливают и кипятят высечки в этиловом спирте до обесцвечивания.

Для выявления крахмала освещенные и затемненные высечки обливают на предметном стекле слабым раствором йода в йодистом калии. При наличии крахмала растительная ткань окрашивается в синевато-лиловый или черный цвет.

Для открытия белка высечки на предметном стекле обливают концентрированной серной кислотой. При наличии белка появляется оранжево-красное окрашивание.

Задание: сравнить окраску высечек листьев растений, выдержанных в темноте и на свету, объяснить полученные результаты.

Работа 33. Обнаружение амилазы в прорастающих семенах

Ферменты могут функционировать не только в той клетке, которая их вырабатывает, но и вне ее, передвигаясь в другие клетки или диффундируя во внешнюю среду. Чтобы наблюдать быстрое выделение ферментов из клеток семян злаков, необходимо разрезать зерновки, так как семенная кожура и околоплодник препятствуют диффузии веществ.

Ход работы: разрезать несколько непроросших зерен пополам, слегка смочить водой и разложить в чашке Петри при помощи пинцета 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.

Закрывать чашку крышкой, чтобы не происходило подсыхания. Через час осторожно снять семена и облить всю пластинку слабым раствором йода.

Задание: отметить результат и сделать выводы о различающихся эффектах проросших и непроросших семян на пластинку из крахмального агара.

Работа 34. Превращение веществ при прорастании семян

Семена различных растений в большом количестве накапливают запасные питательные вещества, в основном белки, жиры и углеводы. В семенах одних растений, например, клещевины, подсолнечника и др., жиры преобладают над углеводами (маслянистые семена), у других, например, злаков – основным запасным веществом служит полисахарид крахмал, у бобовых – белки. При прорастании семян сложные запасные вещества при участии специфических ферментов превращаются в более простые (моносахара, жирные кислоты, аминокислоты и т.д.), которые используются в процессах роста и дыхания растений. Для установления, каким превращениям подвергаются запасные вещества при прорастании, нужно сопоставить химический состав проросших и непроросших семян растений одного вида. Проращивание необходимо проводить в темноте, чтобы исключить новообразование органических веществ в процессе фотосинтеза.

Ход работы: растереть в разных ступках проросшие и непроросшие семена – крахмалистые (пшеницы) и маслянистые (льна, клещевины или подсолнечника). Маслянистые семена перед измельчением очистить от кожуры. Поместить материал в разные пробирки, подписать их, залить небольшим количеством воды, нагреть в кипящей бане. Слить вытяжки в чистые подписанные пробирки, прилить к вытяжкам равный объем фелинговой жидкости и довести на бане до кипения. По количеству образовавшейся закиси меди дать оценку содержания редуцирующих сахаров. К оставшемуся в пробирках материалу (мезге) крахмалистых семян прилить раствор йода в йодистом калии (раствор Люголя) и по интенсивности посинения дать оценку содержания крахмала. Сделать тонкие срезы проросших и непроросших маслянистых семян, поместить их на предметное стекло в каплю раствора судан-III, закрыв покровным стеклом. Через 5 минут промыть срезы водой, не снимая покровного стекла, рассмотреть под микроскопом и дать оценку содержания жира по количеству и размерам капель, окрашенных в красный или оранжевый цвет. Упрощенно эту работу можно провести с растертой массой проросших и непроросших семян, капнув на нее раствор судана-III и по степени покраснения оценить количество

жира. Нанести в каплю воды на предметные стекла небольшое количество эндосперма проросших и непроросших семян пшеницы, рассмотреть в микроскоп и зарисовать крахмальные зерна.

Задание: результаты записать в таблицу, оценивая содержание соответствующих веществ знаками «плюс» и «минус». Сделать вывод о превращении веществ при прорастании крахмалистых и маслянистых семян.

Семена	Крахмал	Жир	Редуцирующие сахара
Крахмалистые непроросшие			
Крахмалистые проросшие			
Маслянистые непроросшие			
Маслянистые проросшие			

Работа 35. Кислотный гидролиз крахмала при разных температурах

Крахмал представляет собой сложное полимерное соединение, состоящее из двух компонентов: амилозы и амилопектина. Под действием фермента амилазы крахмал расщепляется до конечного продукта – глюкозы, которая является структурным мономером всего крахмала. Крахмал нерастворим в холодной воде, в горячей образует коллоидный раствор – крахмальный кластер. При кипячении крахмального клейстера с минеральной кислотой крахмал гидролизуется до глюкозы через ряд промежуточных продуктов с уменьшающейся молекулярной массой, так называемых декстринов. Проследить за процессом гидролиза крахмала можно при помощи реакции с раствором йода. Каждый декстрин имеет измененную окраску от сине-фиолетовой и фиолетовой до бесцветной. Йод окрашивает крахмал в синий цвет, амилодекстрин – в фиолетовый, эритродекстрин – в красно-бурый, ахродекстрин – в оранжевый, мальтодекстрин – от зеленоватого до желтоватого, мальтоза и глюкоза – бесцветны. Это называется шкалой гидролиза крахмала. Такой ступенчатый распад крахмала имеет важное биологическое значение, так как обеспечивает постепенное и эффективное использование запасного вещества. С помощью амилазы, полученной из солода проросших семян злаков (ячменя, пшеницы), в которых она очень активна, можно убедиться в распаде крахмала, скорость которого зависит от температуры. Если в пробирки с одинаковым количеством крахмального клейстера налить одинаковое количество раствора амилазы и крахмального клейстера, выдержать их при разных температурах и периодически делать пробы с йодом, то по скорости появления промежуточных продуктов с разной окраской можно судить об активности фермента и ступенчатом гидролизе крахмала.

Ход работы: в конической колбе на 250 мл приготовить крахмальный клейстер, нагрев на плитке 2 г крахмала и 200 мл дистиллированной воды. Поставить в штатив 6-7 пробирок. В первую пробирку налить 4-5 мл крахмального клейстера. Добавить в колбу с крахмалом 2 мл 20% соляной кислоты и нагревать на электроплитке. При появлении первых пузырьков (начало кипения) от-

лить из колбы 4-5 мл клейстера 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 остыть, разбавить их водой и добавить по 5 капель раствора йода в калий йоде. При отсутствии окрашивания йода 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 объём жидкости Фелинга и довести до кипения.

Задание: сделать вывод о причинах изменения окраски раствора, указать время, в течение которого произошел полный гидролиз крахмала. Заполнить таблицу.

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

Работа 36. Обнаружение вторичных веществ у древесных растений

Первичными метаболитами являются молекулы (белки, липиды и углеводы, нуклеиновые кислоты), синтезирующиеся во всех клетках растения и участвующие в их жизнедеятельности.

Вторичные метаболиты – органические вещества, образуемые растениями в отдельных клетках и тканях при их взаимодействии с абиотическими и биотическими факторами среды. Они выполняют защитную функцию и не участвуют в основных процессах роста, развития растений.

Ход работы:

а) Дубильные вещества. Помещают в пробирку небольшие кусочки гладкой коры сосны, ели, дуба или осины, прибавляют воды и экстрагируют дубильные вещества кипячением. Сливают экстракт в 2 пробирки (1 пробирка – служит в качестве контроля). Прибавляют несколько капель 1% хлорного железа ($FeCl_3$). Наблюдается зеленое или черное окрашивание («дубильные чернила»); прибавляют 1 мл 1% раствора желатина. Происходит выпадение хлопьев белка.

б) Гуттаперча и каучук. Для открытия гутты в коре корней бересклета помещают в пробирку с водой небольшие ее кусочки и размягчают кипячением. Осторожно разрывают кусочки коры. Обнаруживают упругие нити гуттаперчи.

Для открытия **каучука** в млечном соке наносят каплю его, полученную из черешка листа фикуса, на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом при увеличении объектива 10 или 40. Обнаруживают многочисленные капельки каучука. Вызывают коагуляцию эмульсии каучука просасыванием под покровным стеклом капли уксусной кислоты. Появляются хлопья каучука.

в) Эфирные масла и смолы. Для открытия эфирных масел проводятся следующие опыты:

1) растирают лист лимона — обнаруживается запах эфирного масла в связи с раздавливанием эфирноносных железок;

2) помещают в пробирку немного хвои пихты, заливают водой, присоединяют согнутую стеклянную трубочку и отгоняют кипячением пихтовое масло во вторую пробирку с водой;

3) для открытия смолы готовят небольшие поперечные срезы тонких ветвей хвойных растений и выдерживают их сутки в насыщенном водном растворе уксуснокислой меди.

При микроскопии в смоляных ходах видны голубовато-синие или зеленые капли смолы (живицы).

г) Алкалоиды. В зимнее время для работы используют размоченные в воде кусочки коры волчьего лыка или хинного дерева, стебли чемерицы, лютика едкого, черешки листьев многолетнего люпина. Растирают в ступке кусочки растительной ткани, проверяемой на наличие алкалоидов. Смачивают кашицу каплей раствора йода в йодистом калии. При наличии алкалоидов появляется коричнево-красное окрашивание. Для открытия алкалоидов также можно использовать кусочки листа диффенбахии.

д) Реакция Меуле для различения древесины хвойных и лиственных пород. Наносят на исследуемые куски древесины по капле 10% раствора перманганата калия и через минуту удаляют их с помощью фильтровальной бумаги. Смачивают те же участки древесины каплей концентрированной соляной кислоты, убирают ее и наносят каплю 25% раствора аммиака. Древесина лиственных пород окрашивается в красный цвет, древесина хвойных — не окрашивается, так как содержит разные вторичные вещества.

Задание: записать результаты наблюдений, сделать рисунки и пояснения.

Вопросы для самоконтроля:

1. Назовите примеры первичных и вторичных метаболитов клетки
2. Для каких конечных продуктов фотосинтеза непроницаема внутренняя мембрана хлоропласта? А для каких — хорошо проницаема?
3. Какой орган растения выступает первичным донором ассимилятов?
4. Какие зоны растений выступают акцепторами ассимилятов?
5. Главная транспортная форма углеводов по растению?
6. Какие основные этапы включает транспорт ассимилятов из листа
7. Какие вещества выполняют роль аттрагирующих факторов в растении?
8. Что такое редуцирующие сахара?
9. Перечислить реакции для выявления редуцирующих сахаров.
10. Может ли сохраниться в почве клубень картофеля зимой? Если может, то какой он будет на вкус весной и почему?

ЗАНЯТИЕ 9

Тема. Рост растений. I часть. Постановка экспериментов

Цель занятия: научиться определять зоны роста корня и побега растений, интенсивность их роста; оценивать основные показатели прорастания и роста в зависимости от эндогенных и экзогенных факторов.

Материалы и оборудование: непроросшие и проросшие семена растений, растение фикуса, булавки, пенопластовые брусочки, баночки с крышками, дистиллированная вода, чашки Петри, фильтровальная бумага, гелевая ручка, маркер, 0.01 % гетероауксина, гетероауксиновая паста, песок.

Рост – необратимое увеличение линейных размеров, объема и массы растения и его частей, связанное с новообразованием макромолекул и структур. Рост приурочен к зонам слабо дифференцированных клеток (меристеме), где происходит увеличение их числа, а также к зоне растяжения, где происходит преимущественное растяжения отдельных клеток. Побег и корень различаются по организации второй зоны. Следует ожидать разную скорость прироста этих органов. Рост контролируется фитогормонами. Одной из важных групп гормонов растений, являются ауксины (индолилуксусная кислота), содержание и градиент концентрации которых определяют интенсивность ростовых процессов.

Работа 37. Определение зоны роста стебля

Ход работы: на несколько побегов проросших семян выбранного растения гелевой ручкой наносят метки через 1 мм на протяжении 1 см от конуса нарастания. Проростки прикрепляют булавкой за семядоли к пенопластовому брусочку, покрытому влажной фильтровальной бумагой, чтобы растения не подсыхали. Затем помещают брусочки с проростками во влажную камеру, на дно которой наливают воду, камеру накрывают крышкой. Опыт проводят в темноте.

Задание: Через 24 часа оценить расхождение меток, измерив длину промежутков между метками.

Работа 38. Определения зоны роста корня

Ход работы: на корень нескольких проросших семян гелевой ручкой наносят метки через 1 мм на протяжении 1 см от апикальной зоны. Растения прикрепляют булавкой к пенопластовому брусочку, покрытому влажной фильтровальной бумагой, чтобы растения не подсыхали. Затем помещают брусочки с растениями во влажную камеру, на дно которой наливают воду, камеру накрывают крышкой. Опыт проводят в темноте.

Задание: Через 24 часа измерить длину промежутков между метками.

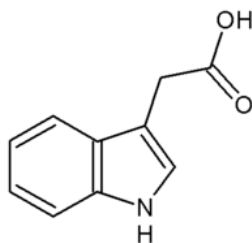
Работа 39. Наблюдение за геотропическими изгибами корня и стебля

Ход работы: проросшие семена растений помещают в сосуд с небольшим количеством воды **корнем вверх**, прикрепив за семядоли к покрытому влажной фильтровальной бумагой брусочку.

Задание: Через 24 часа отметить изменения.

Работа 40. Эпинастические и гипонастические изгибы листьев под действием гетероауксина

Ход работы: ланолиновую пасту, содержащую гетероауксин (β -индолилуксусная кислота), наносят на нижнюю сторону черешка одних листьев, на верхнюю – других. Предварительно измеряют углы отхождения черешков листьев от стебля.



β -индолилуксусная кислота

Задание: Через 24 часа измерить угол отхождения черешка. Изобразить схематически первоначальное и конечное положение черешка.

Работа 41. Действие гетероауксина на рост растений

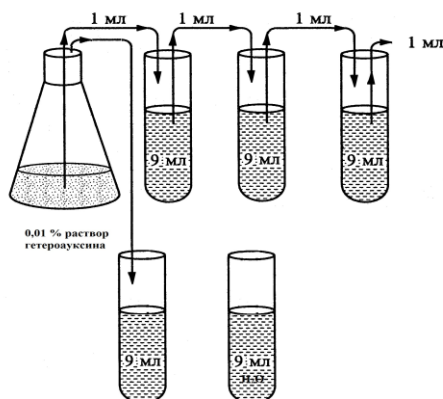
Ход работы: на середину проростка наносят ланолиновую пасту, содержащую гетероауксин. Прикрепляют его иглой к пенопластовому брусочку, покрытому фильтровальной бумагой и помещают во влажную камеру. Переносят проростки в темноту.

Задание: через 24 часа отметить произошёл ли изгиб, и с какой стороны относительно места нанесения пасты.

Работа 42. Влияние разных концентраций гетероауксина на проращивание семян и рост проростков

Ход работы: в пять чашек Петри помещают фильтровальную бумагу и смачивают её водой (контрольный вариант) или раствором гетероауксина (0.01, 0.001, 0.0001 и 0.00001%) объемом 9 мл.

Растворы гетероауксина (0.001, 0.0001 и 0.00001%) готовят из 0.01 % гетероауксина согласно приведённой ниже схеме (десятикратное разведение раствора). Например, берут 1 мл 0.01% раствора гормона и 9 мл воды – получается 0.001 % раствор и т.д.



На увлажнённую исследуемым раствором фильтровальную бумагу раскладывают по пять одинаковых по размеру и форме **хорошо промытых водой** семян растений (каждая подгруппа студентов выбирает семена растений одного вида). Чашки Петри с семенами помещают в темноту.

Задание: через семь суток оценить процент проросших семян разных видов растений, интенсивность роста стебля, корня, количество боковых корней. Выявить, какие концентрации гетероауксина стимулируют, а какие подавляют рост. Установить органо- и видоспецифичность ответа на действие экзогенного гетероауксина.

Работа 43. Зависимость величины растения от количества запасных веществ в семени

Ход работы: отбирают 12 совершенно одинаковых семян растений. Из них 3 оставляют целыми. У трех других удаляют половину семени. У третьей порции семян оставляют 1/4 семени и у остальных — 1/8 часть семени. Причем оставшиеся для опыта части должны иметь зародыш. Все семена высевают в небольшие сосуды с песком и проращивают в темноте.

Задание: через 7 суток измерить ростовые параметры растений, развившихся из семян с разным количеством запасных веществ (**занятие 10**).

Работа 44. Влияние аэрации на рост растений

Ход работы: три сосуда наполняют песком на $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ и $\frac{3}{4}$ объёма, увлажняют и помещают на поверхность по пять **хорошо промытых водой** семян. Плотнo закрывают ёмкости. Объём воздуха в банках в зависимости от количества песка будет различным.

Задание: Оценить интенсивность прорастания семян и ростовые показатели проростков через 7 суток (**занятие 10**).

ЗАНЯТИЕ 10

Тема. Рост растений. II часть. Анализ экспериментальных данных.

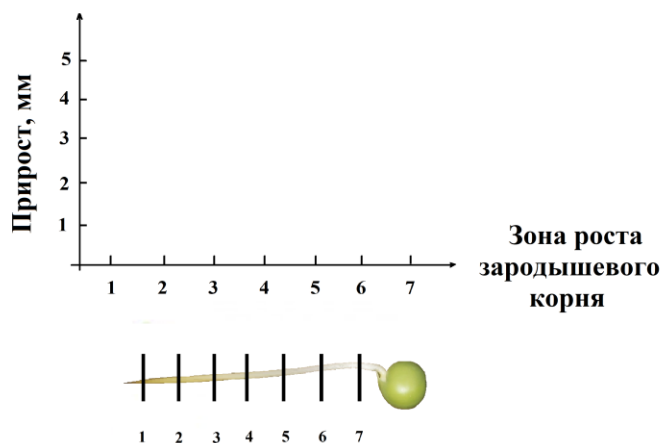
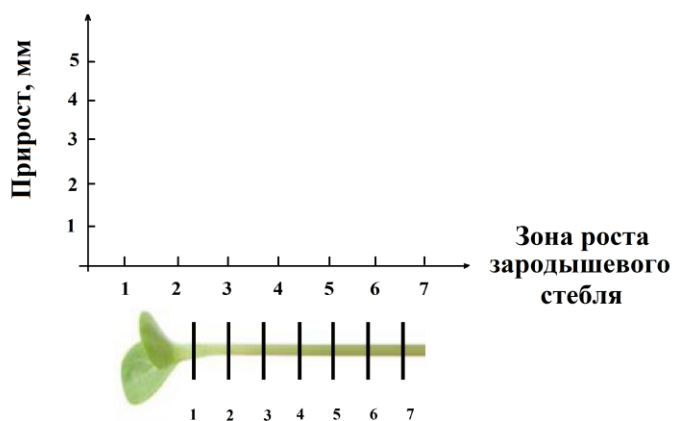
Цель занятия: научиться анализировать основные показатели прорастания семян и роста растений в зависимости от эндогенных и экзогенных факторов и описывать полученные результаты, оценивать достоверность различий между параметрами отдельных вариантов.

Материалы и оборудование: проростки растений (полученные в экспериментах 42-44), показатели проростков (полученные в экспериментах 37-41), карандаш, линейка.

Анализ результатов работ 37 и 38

Ход работы: подсчитать прирост для каждой условной зоны роста зародышевого стебля и корня, в соответствии с данными, полученными при выполнении работ 37 и 38.

Задание: Построить графики, сделать вывод о локализации зоны максимального растяжения стебля и корня.



Анализ результатов работы 39

Задание: изобразить схематически геотропический изгиб корня и стебля, сделать вывод относительно направления их геотропизма.

Анализ результатов работы 40

Задание: изобразить схематически первоначальное и конечное положение черешка и сделать вывод об эпинастических и гипонастических изгибах черешка листьев под влиянием гетероауксина.

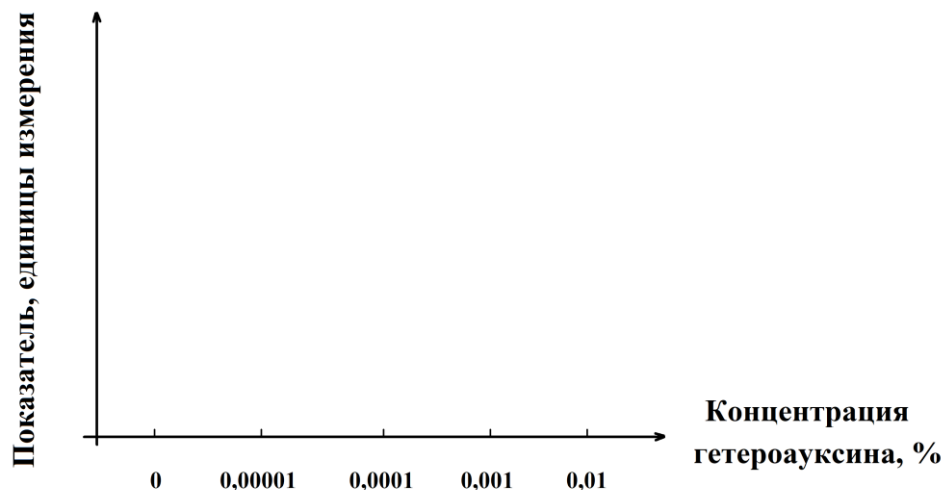
Анализ результатов работы 41

Задание: сделать вывод о действии гетероауксина на проростки растений и объяснить причину явлений.

Анализ результатов работы 42

Ход работы: Через семь суток измерить показатели растений – количество проросших семян (%), длину зародышевых стеблей и корней (мм), количество боковых корней (шт.); выявить, какие концентрации гетероауксина стимулируют, а какие подавляют рост.

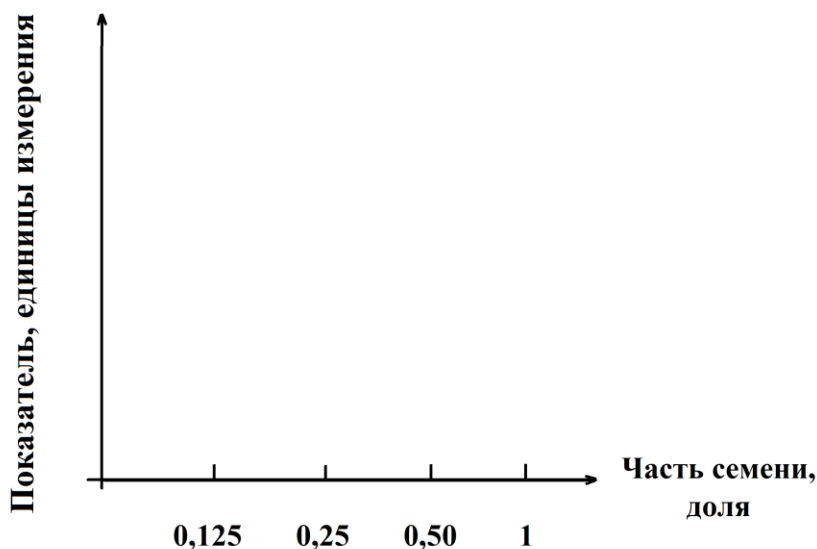
Задание: построить графики для каждого показателя, сделать выводы об органоспецифичности ростовой реакции, её направленности в зависимости от действующей концентрации синтетического стимулятора роста.



Анализ результатов работы 43

Ход работы: через 7 суток измерить ростовые показатели – длину зародышевых стеблей и корней (мм), количество боковых корней (шт.) растений, выращенных при проведении **работы 43**.

Задание: провести статическую обработку полученных данных (Приложение Г). Построить графики для каждого показателя, сделать выводы о зависимости величины показателя от количества запасных веществ в семени.

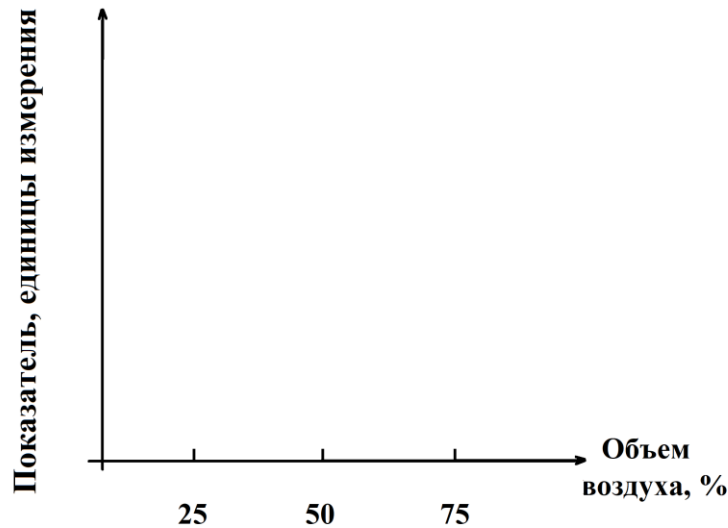


Установить зависимость ростовых процессов от количества субстрата, используемого для построения тканей и органов.

Анализ результатов работы 44

Ход работы: измерить ростовые показатели растений – длину зародышевых стеблей и корней (мм), количество боковых корней (шт.), выращенных при проведении **работы 44**.

Задание: провести статическую обработку полученных данных (Приложение Г). Построить графики для каждого ростового показателя.



Сделать выводы о зависимости роста корня и побега растений от объема доступного воздуха.

Вопросы для самоконтроля по занятиям 9 и 10:

1. Перечислите свойства гормонов.
2. Как гормоны взаимодействуют друг с другом? Приведите примеры.
3. С помощью каких фитогормонов можно получить бессемянные плоды?
4. Что такое «тройной эффект этилена».
5. S-образная кривая роста.
6. Что такое «кислый рост»?
7. Какие вещества негормональной природы регулируют рост растений?
8. От каких внешних и внутренних факторов зависит реакция растений на действие гормонов?
9. Перечислите гормоны изопреноидной природы.
10. Какой гормон можно использовать при пересадке деревьев в качестве антитранспиранта?
11. Как можно ускорить или затормозить созревание плодов.
12. Чем отличаются экзогенные гормоны от эндогенных?
13. Перечислите функции фоторецепторов синего света.
14. Фотоконверсия фитохромов, ее роль в регуляции жизнедеятельности растений.
15. В каких зонах происходит основное растяжение корня и побега?
16. Различается ли скорость прироста наземных и подземных органов?
17. Покажите зависимость интенсивности ростовых процессов от уровня фитогормонов, запасных веществ и кислорода.
18. Охарактеризуйте алгоритм проведения экспериментов для изучения зависимости ростовых процессов от уровня фитогормонов, запасных веществ и кислорода.

ЗАНЯТИЕ 11

Тема. Минеральное питание растений. I часть

Цель занятия: выявить признаки голодания растений по отдельным элементам минерального питания, ознакомится с явлением антагонизма ионов.

Материалы и оборудование: растения, выращенные в условиях дефицита азота, фосфора и калия, на полной и половинной питательной среде и воде; проростки растений, дистиллированная и бидистиллированная вода, растворы хлорида калия (9 г/л) и хлорида кальция (6,7 г/л). Линейка, стеклянные цилиндры объёмом 50 мл, воронки, затемненные ёмкости объёмом 100 мл, воронки, фильтровальная бумага, маркер.

Минеральное питание растений – это совокупность процессов поглощения, перемещения и усвоения минеральных веществ в виде ионов (анионов или катионов), необходимых для их жизнедеятельности. По содержанию химические элементы делятся на 2 основные группы: макро- и микроэлементы. Химические элементы отличаются по выполняемым функциям в растении. Макроэлементы выполняют структурную, буферную и сигнальную функции. Они влияют на проницаемость мембран, вязкость цитоплазмы и осмотический потенциал клеточного сока. Микроэлементы выполняют каталитическую функцию, выступая активаторами ферментов (Zn, Cu, Fe) или обеспечивая доступность субстрата (B).

Работа 45. Влияние элементов минерального питания на рост растений

Ход работы: снять ростовые показатели растений, предварительно выращенных на разных по химическому составу питательных средах: полной и половинной питательной средах, средах с дефицитом азота, фосфора и калия, и воде.

Задание: провести статическую обработку полученных данных (Приложение Г). Заполнить таблицу и сделать вывод о потребности растения в конкретных элементах для формирования габитуса (морфологии) побега и размеров его структурных элементов.

Ростовые параметры растений в зависимости от состава питательной среды

Состав среды	Длина стебля, см	Количество листьев, шт	Суммарная площадь листьев, см ²	Объём корневой системы, см ³	Масса, г				Внешний вид растений
					Надземная часть		Подземная часть		
					Сырая	Сухая	Сырая	Сухая	
Полная среда									
Половинная среда									
Водопроводная вода									
Среда без добавления азота									
Среда без добавления фосфора									
Среда без добавления калия									

Работа 46. Антагонизм ионов

Питательный раствор для растений должен содержать все необходимые элементы питания в усваиваемой форме и быть физиологически уравновешенными. Растворы чистых солей или несбалансированное их содержание даже в количествах оптимально необходимых для роста растений оказывают токсическое действие на рост корней и жизнедеятельность их клеток.

Антагонизмом ионов называют такое явление, когда один ион уменьшает или устраняет действие другого. Например, отдельные соли могут проявлять токсичное действие на живые клетки, тогда как их смесь оказывается нейтральной. Раствор с оптимальным соотношением ионов (максимальным антагонизмом) называется **уравновешенным**.

Антагонизм ионов проявляется и в конкуренции за переносчиков на поверхности плазмалеммы, за активные центры ферментов, а также в противопо-

ложном воздействии на гидратацию белков, на вязкость и проницаемость цитоплазмы.

Опыты по антагонизму ионов необходимо проводить с очень чистыми реактивами и посудой, так как даже небольшое загрязнение посторонними ионами может быть причиной получения неправильных результатов.

Ход работы: В четыре затемнённые ёмкости налить по 100 мл: (1) воды (контроль), (2) раствора хлорида калия, (3) раствора хлорида кальция и (4) смесь хлорида калия и кальция (86 мл раствора KCl и 14 мл раствора CaCl₂). В каждую ёмкость поместить воронку с фильтровальной бумагой и пятью проросшими семенами.

Задание: через 7 суток, после постановки эксперимента, подсчитать число боковых корней, измерить длину coleoptily и главного корня, провести статическую обработку полученных данных (Приложение Г), данные занести в таблицу.

Ростовые параметры растений в зависимости от действия отдельных солей и их смеси

Вариант опыта	Длина coleoptily		Длина главного корня		Число боковых корней	
	см	% к контролю	см	% к контролю	шт.	% к контролю
Контроль (бидистиллят)						
KCl						
CaCl ₂						
KCl + CaCl ₂						

Сделать выводы о действии отдельных солей и их смеси на рост побега и корня растений.

ЗАНЯТИЕ 12

Тема. Минеральное питание растений. II часть

Цель занятия: обнаружить ионы кальция, магния, железа, фосфора и серы в золе растений, определить концентрацию нитратов в растениях.

Материалы и оборудование: зола растений, 10% HCl, дистиллированная вода, 1% раствор серной кислоты, 10 % аммиак, 1% раствор молибдата аммония в концентрированной азотной кислоте, 1% раствор гексоцианоферрата (II) калия, 1% раствор Na_2HPO_4 , 5% раствор ацетата свинца, калибровочные растворы NaNO_3 или KNO_3 (10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 мг/л). Микроскоп, стеклянные палочки, предметные стекла, фильтровальная бумага, пипетки Пастера, пробирки, воронка, лезвие, маркер.

Работа 47. Микрохимический анализ золы

Зола, получаемая при сжигании растений, содержит большое количество макро- и микроэлементов. Для изучения химического состава золы можно использовать микрохимический метод, в основе которого лежит свойство некоторых солей образовывать кристаллы характерной формы. Для выявления ионов хлора и калия готовят водный раствор, для ионов кальция, магния, железа, фосфора и серы – солянокислый.

Ход работы: насыпать в пробирку небольшое количество золы и аккуратно залить ее примерно четырехкратным объемом 10%-ной HCl. Отфильтровать полученный раствор в чистую пробирку через бумажный фильтр. Взять пять предметных стёкол и подписать их (в соответствии с обнаруживаемым ионом). С помощью пипетки Пастера нанести по капле вытяжки на каждое предметное стекло и на расстоянии 5 мм от нее – каплю обнаруживающего реактива. **Чистой** стеклянной палочкой с заостренным концом соединяют эти капли дугообразным каналом, в месте соединения, через некоторое время, произойдет реакция. Палочку необходимо промывать дистиллированной водой после соединения капель на каждом предметном стекле и вытирать фильтровальной бумагой.

Задание: рассмотреть образующиеся кристаллы в микроскоп и зарисовать их в таблице.

Алгоритм микрохимического анализа золы

Обнаруживаемый ион	Обнаруживающий реактив	Кристаллы	Рисунок
Ca^{2+}	Серная кислота $\text{CaCl}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{CaSO}_4 + 2\text{HCl}$	Игольчатые кристаллы гипса, иногда располагающиеся группами (снежинки).	
Mg^{2+}	$\text{MgCl}_2 + \text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NH}_4\text{OH} = \text{NH}_4\text{MgPO}_4 + 2\text{NaCl}$	При медленной кристаллизации выпадают кристаллы в виде трапеций, призм и октаэдров; при быстрой – звезд, крестов и ветвящихся образований.	
Fe^{3+}	Гексоцианоферрат (II) калия $4\text{FeCl}_3 + 3\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \rightarrow \text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 + 12\text{KCl}$	Синее окрашивание осадка гексоцианоферрат (II) железа.	
PO_4^{3-}	Молибдат аммония (+азотная кислота)	Зеленовато-желтые мелкие кристаллы	
SO_4^{2-}	Ацетат свинца	Мелкие кристаллы в виде длинных игл, звезд и ромбов	

Сделать вывод о химическом составе золы растений и возможности использовать ее в качестве источника минеральных удобрений.

Работа 48. Обнаружение нитратов в растениях

По данным Министерства здравоохранения РФ, предельно допустимая доза нитратов для взрослого человека в сутки – 500 мг, токсичная – 600 мг, для грудного ребенка доза в 10 мг может быть смертельной.

Соли азотной и азотистой кислот, поглощаемые корнями из почвы, восстанавливаются в растениях до аммиака (используется для синтеза аминокислот и других соединений). Сопоставление содержания нитратов в клеточном соке тканей различных органов растений позволяет судить об их нитратовосстанавливающей активности. Реактивом для обнаружения нитратов является *дифениламин*, дающий с этим ионом соединение синего цвета. По интенсивности окрашивания можно приблизительно судить о количестве нитратов в исследуемом объекте.

Данные **таблицы** позволяют с помощью этого реактива оценить количество нитратов в растении на разных стадиях развития и сделать вывод о необ-

ходимости азотной подкормки. Малое количество нитратов в начале вегетации растений означает недостаток азотного питания. Такое же малое количество их в фазе цветения является нормой и не требует подкормки растений.

Таблица. Шкала для определения нитратов в срезах и соке растений (по Церлинг)

Балл	Окраска среза или сока	Необходимость в азотных удобрениях	
		в начале вегетации	в фазу цветения
0	Нет окраски	Очень сильная (60 кг/га)	Средняя (30 кг/га)
1	Бледно-голубая, быстро исчезает	Сильная (60 кг/га)	Слабая (30 кг/га)
2	Голубая у проводящих сосудов	Средняя (30 кг/га)	Не нуждаются
3	Голубая, исчезает через 2-3 мин	Слабая (30 кг/га)	-//-
4	Синяя, сохраняется несколько минут	-//-	-//-
5	Темно-синяя, сохраняется некоторое время	Не нуждаются	-//-
6	Темно-синяя, устойчивая	Избыток нитратов	

Нормы содержания нитратов в продуктах

Министерством здравоохранения РФ установлены следующие нормативы по содержанию нитратов в сельскохозяйственной продукции (в мг/кг, по нитрат-иону). В числителе приводятся нормы для ранних и тепличных овощей, в знаменателе – для поздней продукции открытого грунта:

лук репчатый – 80	лук-перо – 800/600	капуста – 900/500
картофель – 250	арбузы – 60	томаты – 300/150
огурцы – 400/150	дыни – 90	кабачки – 400
морковь – 400/250	перец сладкий – 200	

Ход работы: в вытяжной шкафу на белую бумагу раскладывают 12 предметных стёкол с подписанными концентрациями нитратов, наносят по капле указанного раствора, рядом наносят каплю дифениламина. Параллельно готовят капли сока на предметных стеклах и срезы тканей растений. Затем ко всем подготовленным препаратам добавляют дифениламин. Раствор дифениламина соединяют с исследуемым раствором или образцом растений. Время учета окрашивания **не должно превышать 1-1.5 минут**, так как цвет быстро меняется и исчезает. Работу проводить очень осторожно, т.к. дифениламин готовится на концентрированной серной кислоте.

Количество нитратов оценивают согласно данным концентрационной шкалы.

Задание: заполнить таблицу, оценить концентрацию нитратов в растительных образцах, сделать вывод о норме потребления изучаемой сельскохозяйственной продукции.

Концентрационная шкала окраски на нитраты

Концентрация KNO_3 или NaNO_3 , мг/л	Цвет
10	
50	
100	
200	
300	
400	
500	
600	
700	
800	
900	
1000	

Вопросы для самоконтроля по 11 и 12 занятиям:

1. Назовите основные этапы в изучении корневого питания растений. Охарактеризуйте их.
2. Перечислите функции микроэлементов.
3. Какие элементы минерального питания способны к реутилизации?
4. Что такое биогеохимические провинции?
5. Что такое зола растений? Из чего она состоит? Можно ли её использовать в качестве минерального удобрения?
6. Что такое вегетационный метод, водная культура, аэропоника, стерильная культура?
7. Какую роль играет азот в жизни растений? Что происходит при его недостатке?
8. Какую роль играет фосфор в жизни растений? Что происходит при его недостатке?
9. Какую роль играет кальций в жизни растений? Что происходит при его недостатке?
10. Какую роль играет калий в жизни растений? Что происходит при его недостатке?
11. Какую роль играет сера в жизни растений? Что происходит при ее недостатке?
12. Какую роль играет магний в жизни растений? Что происходит при его недостатке?

13. Какую роль играют микроэлементы в жизни растений? Что происходит при их дефиците?
14. Как величина pH наружного раствора влияет на поглощение ионов?

ЗАНЯТИЕ 13

Тема. Устойчивость растений к действию стрессовых величин абиотических факторов

Цель занятия: научиться сравнивать устойчивость разных растений к действию высоких температур, оценивать криопротекторные свойства сахарозы, влияние физико-химических факторов на активность сахаразы.

Материалы и оборудование: столовая свекла, листья растений, 0.5 и 1 М р-ры сахарозы, 10% раствор сахарозы, 0.1 н раствор HCl, 0.2 М раствор HCl, 0.1 н раствор NaOH, 8% р-р NaCl, дистиллированная вода, реактив Фелинга, сухие дрожжи, снег или лед; сосуд для охлаждающей смеси с примерным объёмом 3-5 литров; соль поваренная, лопаточка для перемешивания охлаждающей смеси, термометр, скальпель, пробочное сверло D=0.5 см, центрифуга или колба Бунзена с фарфоровым фильтром и насос Комовского, микроскоп, предметные и покровные стекла, маркер, фильтровальная бумага, пробирки, водяная баня, пипетки Пастера разного объёма, химический стакан с холодной водой, чашки Петри, ступки с пестиками.

Работа 49. Влияние температуры и pH среды на активность сахаразы

Фермент сахараза (инвертаза) осуществляет гидролиз сахарозы до глюкозы и фруктозы. Данный фермент есть у большинства организмов, самая высокая его активность у некоторых грибов, например дрожжей.

Ход работы: Поместить в ступку 10 г свежих или 5 г сухих дрожжей, добавить 5 мл воды и тщательно растереть. Затем добавить еще 15 мл воды, нагретой до 60 °С, и оставить на 30 минут, продолжая время от времени растирание. Слить по палочке полученную жидкость в фарфоровую воронку, отверстия которой закрыты бумажным фильтром, и профильтровать в колбу Бунзена при помощи масляного насоса, либо отцентрифугировать. (Эту часть работы можно поручить одному студенту, который готовит вытяжку для всей группы, соответственно увеличив в 5-7 раз количество дрожжей и воды.)

Пронумеровать 7 пробирок и налить во все пробирки по 0,5 мл фильтрата, после чего дополнить содержимое пробирок как указано в схеме опыта:

№ пробирки	Выполняемое действие
1	добавить 2 мл воды и поставить в снег
2	добавить 2 мл воды
3	добавить 2 мл воды и поставить в сосуд с водой, нагретой, до 40°C
4	добавить 2 мл воды и вскипятить на бане
5	добавить 2 мл 0,1 н HCl
6	добавить 0,2 мл 0,1 н HCl и 1,8 мл воды
7	добавить 2 мл 0,1 н NaOH

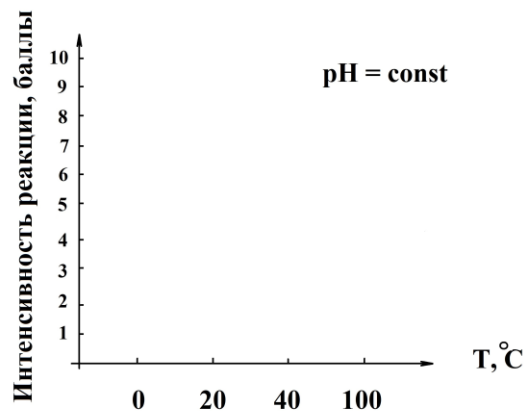
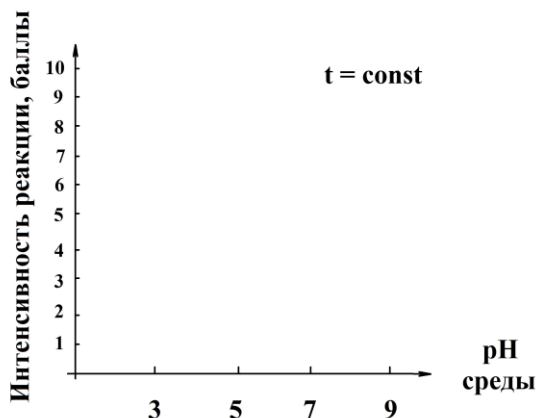
Последующие 10 минут пробирки выдержать при той температуре, которая указана в таблице:

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7
Температура, °С	0	20	40	100	20	20	20
рН среды	7	7	7	7	3	5	9
Интенсивность реакции, балл							

После этого температуру во всех пробирках довести до комнатной, добавить по 2 мл 10% сахарозы, перемешать, поместить пробирки на 15 минут в соответствующие температурные условия (см. таблицу).

Температуру во всех пробирках довести до комнатной, налить по 2 мл жидкости Фелинга (смешать в равных пропорциях растворы А и Б) и одновременно поместить на 5 минут в кипящую водяную баню. После того, как не менее чем в трёх пробирках изменится окраска, все пробирки вынуть из водяной бани. Дать оценку количества образовавшегося осадка закиси меди в баллах, расставив пробирки в ряд по степени изменения окраски (синяя, жёлтая, оранжевая, красно-коричневая) и количества осадка. Заполнить таблицу, интенсивность реакции оценивать по 10 бальной шкале, при этом ноль баллов получает синяя пробирка без осадка, а десять баллов – красно-коричневая с максимальным количеством осадка.

Задание: сделать выводы о зависимости активности сахаразы от температуры и рН, выявить оптимальные условия для активности фермента сахаразы, построить графики.



Работа 50. Защитное действие сахарозы на свойства мембран при замораживании тканей

Повреждение тканей при замораживании растений связано с образованием льда как внутри клеток, так и в межклетниках. Внеклеточный лёд вызывает дегидратацию клеток, оттягивая из них воду. Кристаллы льда внутри клетки вызывают механическое повреждение структуры цитоплазмы, нарушая полупроницаемость мембран.

Устойчивость растений к действию отрицательных температур, в основном, определяется различным содержанием углеводов, жирных кислот и белков, способных связывать свободную воду внутри клетки и снижать температуру замерзания. Повышенная морозостойкость характерна для растений с высоким накоплением сахаров (плодовые деревья, луковичные и т.д.). Вещества, повышающие морозостойкость растений, называют **криопротекторами**.

Ход работы: из корнеплода красной свёклы пробочным сверлом сделать высечку, затем из неё лезвием сделать 15 одинаковых срезов толщиной 1 мм. Тщательно промыть водой для удаления сока. Поместить по 5 срезов в три пробирки, одна из которых на одну треть заполнена водой, другие – 0.5 М и 1 М раствором сахарозы. Поместить пробирки в охлаждающую смесь (к 3 частям снега или льда добавить 1 часть поваренной соли и тщательно перемешать лопаточкой). Через 15 минут переместить пробирки в стакан с водой комнатной температуры. После оттаивания отметить окраску жидкости в пробирках и окраску срезов. Проверить жизнеспособность клеток получением плазмолиза в 8%-ном растворе NaCl с помощью микроскопа.

Задание: Установить связь между интенсивностью окрашивания растворов (степенью повреждения мембран) и концентрацией растворов, находящихся в этих пробирках. Сделать вывод о защитном действии сахарозы на протопласт при замораживании тканей растений.

Работа 51. Определение устойчивости тканей листьев растений к действию высоких температур

При экстремальных воздействиях на ткани, например, повышения температуры, клеточные мембраны, в том числе и мембраны хлоропластов, теряют свойства полупроницаемости. Вследствие этого ионы водорода, присутствующие в клетке, замещают ион магния в молекуле хлорофилла, который превращается в феофитин, имеющий бурый цвет. Чем больше хлоропластов повреждено, тем большая площадь листа буреет.

Ход работы: 5 листьев каждого вида растений поместить в водяную баню на 30 минут при 40 °С. Извлечь по одному листу каждого из растений и поместить в чашку Петри с холодной водой. Температуру в водяной бане увеличить на 10 градусов, через 10 минут вытащить следующий лист и поместить в другую чашку Петри с холодной водой. Постепенно температуру довести до 80

градусов извлекая лист через каждые 10 минут при повышении температуры на 10 градусов.

Все листья поместить в чашки Петри в 0.2 М раствор HCl на 15 минут, промыть в воде и разместить на белой поверхности в порядке увеличения площади бурой окраски.

Задание: сравнить степень повреждения листьев при действии разных температур у нескольких видов растений. Сделать рисунки и выводы об устойчивости растительных тканей к действию высоких температур. Отметить видоспецифичность растений по степени жаростойкости.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое «кросс-адаптация», «агрономическая устойчивость», «индуцируемая» и «конститутивная» устойчивость?
2. Перечислите функции белков теплового шока, пролина.
3. Чем обусловлена высокая скорость синтеза белков теплового шока?
4. Какие типы стрессоров вызывают водный дефицит у растений?
5. Перечислите негативные эффекты, вызываемые активными формами кислорода.
6. Что является причиной гибели растений под действием отрицательных температур?
7. Какие механизмы клеточной и молекулярной адаптации к избытку солей существуют?
8. Какие почвенно-климатические факторы в зимних условиях вызывают гибель растений?
9. Что такое фитоалексины?
10. Какие механизмы защиты существуют у растений от травоядных животных?
11. Чем отличаются растения-аккумуляторы ионов от растений-индикаторов?
12. Какие механизмы помогают клеткам растений снижать концентрацию тяжёлых металлов?

ЗАНЯТИЕ 14

Тема. Обнаружение вирусной инфекции в растениях методом ПЦР в реальном времени

Цель занятия: научиться обнаруживать вирусную РНК в растительных пробах.

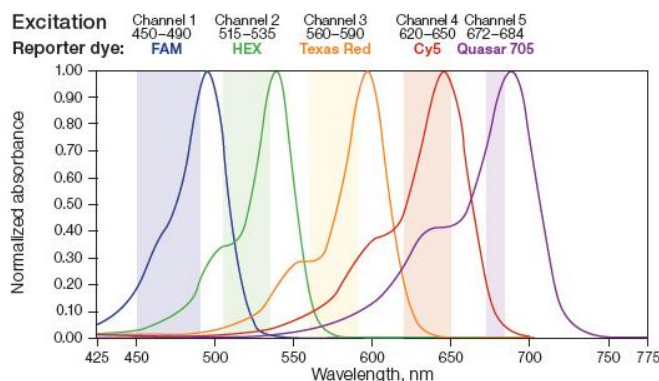
Материалы и оборудование: листья или клубни картофеля, коммерческие наборы реагентов «ФИТОСКРИН» («Синтол», Россия) для определения вирусной (X, Y, M, L, S, A вирусы картофеля) инфекции. Амплификатор, ДНК-бокс, вортекс, центрифуга с охлаждением, штатив для микропробирок, комплект микропипеток переменного объёма на 1000, 200, 20 и 2 мкл, микропробирки объёмом 1,5 мл, микропробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл, наконечники к микропипеткам.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени более чувствительный, чем обычный ПЦР. Он основан на детекции флуоресценции ПЦР-продукта по мере его накопления. Интеркалирующие красители испускают волны разной длины. Это позволяет использовать мультиканальную детекцию флуоресценции. Все каналы детекции делятся на группы, в зависимости от спектра поглощения. Для амплификатора Lightcycler'96 (Roche, Франция) эти показатели следующие:

Канал	Длина волны, нм	Интеркалирующие красители
1	470 – 514	SYBR Green I, ResoLight, FAM
2	533 – 572	VIC, Hex, Yellow555
3	577 – 620	Red610, Texas Red
4	645 – 697	Cy5



Амплификатор Lightcycler'96
(Roche, Франция)



Спектры поглощения интеркалирующих красителей

Для проведения ПЦР в реальном времени используются интеркалирующий (встраиваемый) краситель/зонд и те же компоненты, что и для обычного ПЦР. На начальных циклах флуоресценция слабая, так как продукта ещё не очень много, поэтому её трудно отличить от фоновой флуоресценции. По мере накопления продукта, сигнал возрастает экспоненциально, а затем выходит на плато. Цикл, на котором флуоресценция становится выше фоновой, называют пороговым и обозначают C_q или C_t . Чем меньше C_q , тем больше копий гена. Данный метод позволяет проводить большое количество анализов. На амплификаторе Roche отсутствуют каналы детекции ROX и R6G, но есть каналы Red610 и Hex, которые фиксируют флуоресценцию при тех же длинах волн. Поэтому для анализа используют замену детектирующих каналов ROX и R6G, на имеющиеся в данном приборе аналоги.

Работа 52. Выявление вирусной инфекции в растениях картофеля (на примере X и Y вирусов картофеля)

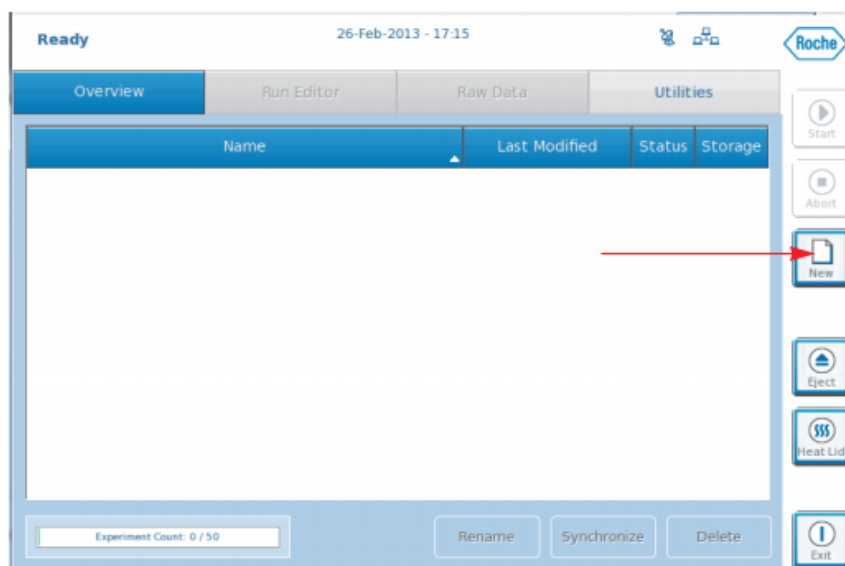
Ход работы: работа проводится в ДНК-боксе. Сначала нужно промаркировать пробирки в соответствии с протоколом исследования. Для каждой группы студентов использовать не менее 8 пробирок – две повторности положительного контрольного образца (**ПКО**), отрицательного контрольного образца (**ОКО**), внутреннего отрицательного контрольного образца (**ОКО-В**) и исследуемого образца. Для приборов, производящих измерение через крышку пробирки, маркировку наносить на стенку пробирки; для приборов, производящих измерение через стенку пробирки – на крышку.

Приготовить **рабочую реакционную смесь** (на $N+1$, где N – число проб) из расчёта – **20 мкл** реакционной смеси (предварительно разморозить, перемешать на вортексе и центрифугировать 3 секунды для сброса капель), **0,5 мкл** смеси ДНК полимеразы и обратной транскриптазы («SynTaq+RT»). Готовую смесь перемешать на вортексе и сбросить капли краткосрочным центрифугированием.

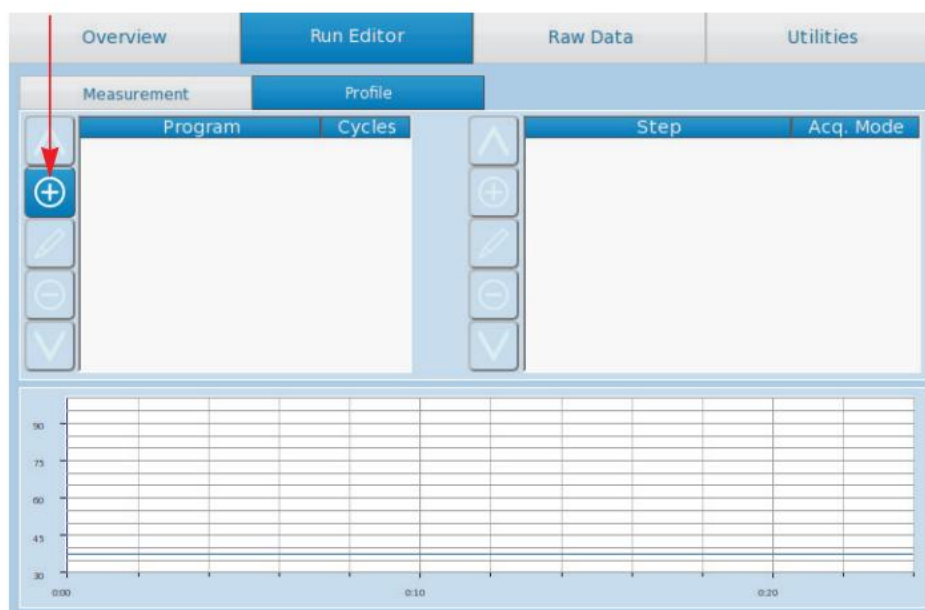
ПКО, ОКО и исследуемые образцы разморозить, перемешать на вортексе и сбросить капли краткосрочным центрифугированием.

Внести в приготовленные пробирки по 20 мкл **рабочей реакционной смеси**, 5 мкл (на дно пробирки) **ОКО** или **ОКО-В**, или **исследуемых образцов**, или **ПКО**. Пробирки центрифугировать 3-5 секунд.

Включить амплификатор, во вкладке «Overview» создать новый эксперимент – нажать на экране кнопку «New», в открывшемся окне поставить точку напротив «New empty experiment», далее ввести название эксперимента (название может включать любые знаки с клавиатуры и буквы **английского** алфавита), клавиатура появляется при установке курсива. После ввода нажать кнопку «OK» и автоматически перейти на вкладку «Run Editor».



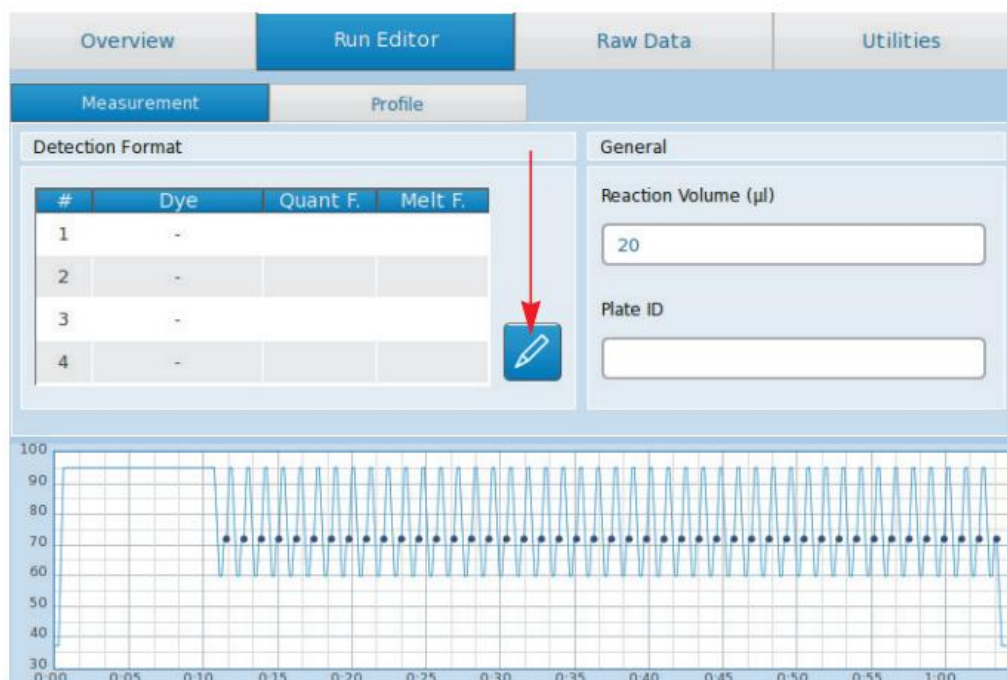
В данной вкладке создать программу эксперимента, состоящую из следующих ступеней ПЦР: преинкубация (45°C), преинкубация (95°C), двухшаговая амплификация, охлаждение. Для этого нажать на кнопку «+», расположенную слева.



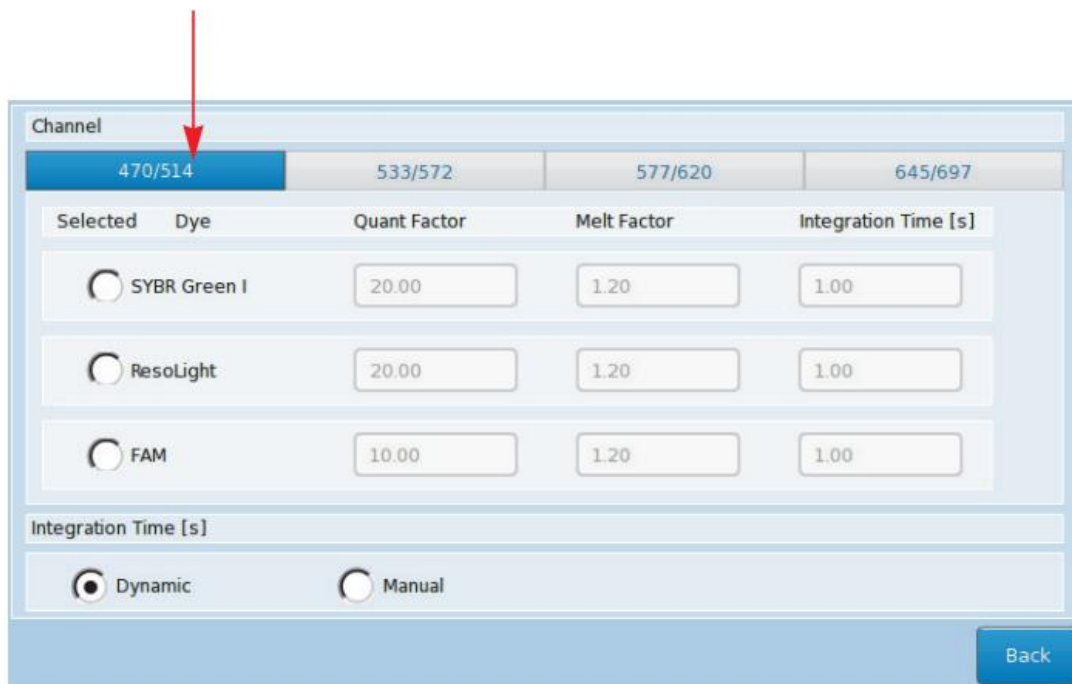
В открывшемся окне выбирают «Preincubation» и нажать кнопку «Add» (повторяют 2 раза). Потом выбирают «2 Step Amplification», нажимая «Add». Затем «Cooling», «Add» и «Back». В левом окне формируется программа с количеством циклов; время и температура каждой ступени отображается в правом окне. Для изменения программы используют кнопки на левой части экрана. Если количество циклов не соответствует таблице, то выбирают ступень программы и нажимают кнопку-карандаш, в открывшемся окне меняют число циклов на необходимое и нажимают «Back».

Номер ступени	Температура, °C	Время, с	Количество циклов	Красители
1	45	900	1	FAM R6G(Hex) ROX(Red610)
2	95	300	1	
3	60	40	45	
4	95	15		

Для изменения параметров ступеней используют панель по центру экрана. Выбирают ступень, нажимают на кнопку-карандаш, в открывшемся окне устанавливают необходимую температуру и время и нажимают «Back». Для двухшаговой амплификации необходимо выбрать на первом шаге «Continuous». Каналы детекции FAM, R6G(Hex), ROX(Red610) (для набора по обнаружению вирусов картофеля X и Y) выбирают на другой вкладке «Measurement».



Нажать на кнопку-карандаш, в открывшемся окне выбрать каналы во вкладках в зависимости от длин волн.



После выбора необходимых каналов нажимают кнопку «Back».

Вернуться на первую вкладку, затем нажать на кнопку «Eject» и поместить пробирки в амплификатор в соответствии в порядке следования образцов, приведённом в таблице:

	1 (первая группа студентов)	2 (вторая группа студентов)
A	ПКО	По аналогии с первой группой
B	ПКО	
C	ОКО	
D	ОКО	
E	ОКО-В	
F	ОКО-В	
G	исследуемый образец	
H	исследуемый образец	

Задвинуть панель, проверить выбранную программу и нажать кнопку «Start».

Интерпретация результатов анализа: в случае обнаружения положительных результатов по каналу детекции **FAM** и/или **R6G** в **ОКО** или **ОКО-В** результат анализа всех проб нельзя считать достоверным. Требуется предпринять меры по выявлению источника контаминации и повторить АНАЛИЗ ПРОБ.

Рост флуоресценции по каналу **R6G** является внутренним контролем прохождения реакции ПЦР и качества выделения РНК из образца. Рост флуоресценции по этому каналу в отсутствии роста по каналу **FAM** и **ROX** свидетельствуют об отсутствии РНК патогенов в выделенных образцах. Отсутствие роста флуоресценции, сильное отставание по Ct (пороговый цикл) или изме-

нённая форма кривой свидетельствуют о наличие ингибиторов в выделенной РНК.

Рост флуоресценции по каналу **FAM** свидетельствует о присутствии РНК *Potato virus X* (PVX) в образце. Рост флуоресценции по каналу **ROX** свидетельствует о присутствии РНК *Potato virus Y* (PVY) в образце.

Образец	Каналы прибора			Результат
	FAM	ROX (Red610)	R6G (Hex)	
ОКО	Ct<45	Ct<45	Ct<45	Ложноположительный результат, контаминация, результаты не подлежат учёту.
ОКО	-	-	Ct<36	Подтверждение отсутствия контаминации, результаты подлежат учёту.
ПКО	-	-	-	Ложноотрицательный результат, реакционная смесь не работает, результаты не подлежат учёту.
ПКО	30<Ct<34	30<Ct<34	Ct<36	Подтверждение работоспособности смеси, результаты подлежат учёту.
Образец	-	-	Ct<36	Отсутствие вирусов X и Y.
Образец	Ct<37	-	Ct<36	Обнаружен вирус X картофеля.
Образец	-	Ct<37	Ct<36	Обнаружен вирус Y картофеля.
Образец	Ct<37	Ct<37	Ct<36	Обнаружены вирусы X и Y картофеля.

Задание: оценить присутствие вирусной инфекции в растительных образцах.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое ПЦР?
2. Назовите области применения метода полимеразной цепной реакции и полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции.
3. Каковы отличия классической ПЦР от ПЦР в реальном времени?
4. Для чего используют праймеры?
5. Почему для разных пар праймеров устанавливают разную температуру отжига?
6. Какие флуоресцентные красители для ПЦР в реальном времени вы знаете?
7. Какую функцию выполняют обратная транскриптаза и ДНК полимеразы?
8. Что происходит во время обратной транскрипции, какой фермент катализирует эту реакцию?
9. Для чего проводят анализ на наличие вирусов картофеля?
10. Что должно входить в состав реакционной смеси для постановки ПЦР?
11. Что является матрицей для полимеразы при постановке ПЦР?
12. Можно ли проводить ПЦР с РНК?
13. Каково значение ПЦР в науке и практике?

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузнецов Вл.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. 4-е изд., доп. Москва : Издательство Юрайт, 2018. Т. 1. 437 с.
2. Кузнецов Вл.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. 4-е изд., доп. Москва : Издательство Юрайт, 2018. Т. 2. 459 с.
3. Кузнецов Вл.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. Москва : Абрис, 2011. 783с.
4. Зитте П., Вайлер Э.В., Кадерайт Й.В. и др. Ботаника. Т. 2. Физиология растений: учебник. Москва : Издательский центр Академия, 2008. 496 с.
5. Викторов Л.П. Малый практикум по физиологии растений : учеб. пособие. 3-е изд., доп. Москва : Высшая школа, 1968. 135 с.
6. Иванов В.Б., Плотникова И.В., Живухина Е.А. и др. Практикум по физиологии растений : учеб. пособие / под ред. В.Б. Иванова. 2-е изд. Москва : Издательский центр Академия, 2004. 144 с.
7. Ефимова М.В. Практикум по физиологии растений : учеб.-метод. пособие. Томск : Издательский Дом Томского государственного университета, 2018. 36 с.
8. Плохинский Н.А. Алгоритмы биометрии / под ред. акад. АН УССР Б.В. Гнеденко. Москва : Издательский Московского государственного университета, 1980. 150 с.
9. Головацкая И.Ф. Морфогенез растений и его регуляция. Часть 1: Фоторегуляция морфогенеза растений : учеб. пособие. Томск : Издательский Дом Томского государственного университета, 2016. 172 с.

Правила работы с микроскопом

При работе с микроскопом «Primo Star» (Carl Zeiss, Германия) необходимо соблюдать последовательность операций:

1. Работать с микроскопом следует сидя.
2. Установить микроскоп перед собой, немного слева на 2-3 см от края стола. Во время работы его не сдвигать.
3. Включить микроскоп посредством поворотной ручки (см. рисунок, 7) и отрегулировать освещение до желательной интенсивности. Выбранная установка интенсивности в пяти ступенях указывается расположенными с обеих сторон штатива синими светодиодами. **Желательно**, выключать освещение, если микроскоп не используется.
4. Работу с микроскопом всегда начинать с малого увеличения.
5. Положить микропрепарат на предметный столик (18) так, чтобы изучаемый объект находился под объективом (17). Глядя сбоку, опускать объектив при помощи макровинта (9) до тех пор, пока расстояние между нижней линзой объектива и микропрепаратом не станет 4-5 мм.
6. Смотреть одним глазом в окуляр (1) и вращать винт грубой наводки (9) на себя, плавно поднимая объектив (17) до положения, при котором хорошо будет видно изображение объекта. **Нельзя смотреть в окуляр и опускать объектив.** Фронтальная линза может раздавить покровное стекло, и на ней появятся царапины.
7. Передвигая препарат ручками привода перемещения предметного столика (10 и 11), найти нужное место, расположить его в центре поля зрения микроскопа.
8. Для изучения объекта при большом увеличении сначала нужно поставить выбранный участок в центр поля зрения микроскопа при малом увеличении. Затем поменять объектив на $\times 10$ или $\times 40$, поворачивая револьвер (20), так чтобы он занял рабочее положение. При помощи ручек фокусировки грубой (9) и точной (8) настройки добиться хорошего изображения объекта. Поворачивать ручку фокусировки точной (8) настройки более, чем на 360 градусов не рекомендуется. При несоблюдении этого правила, фокусировка точной настройки может перестать действовать.
9. По окончании работы с микроскопом, выключить его посредством поворотной ручки (7), установить объектив с малым увеличением, опустить столик, снять с него препарат, протереть чистой салфеткой все части микроскопа, накрыть его чехлом и поставить в шкаф.

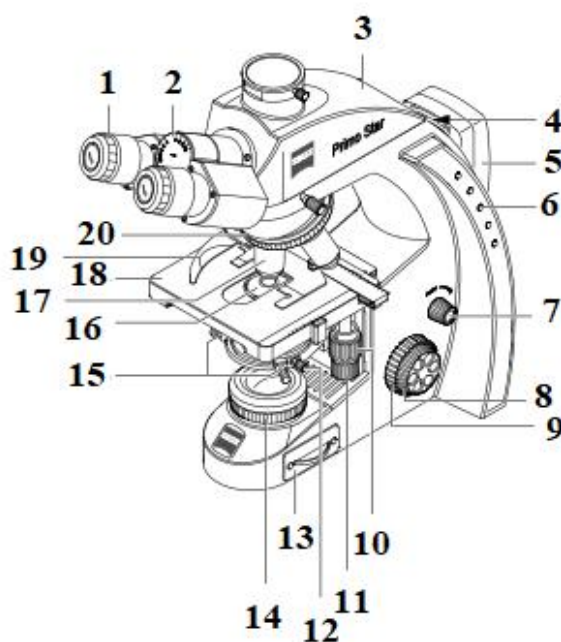
Настройка межокулярного расстояния и высоты окуляров:

Путём симметричного поворота обоих окулярных тубусов друг против друга настроить межокулярное (межзрачковое) расстояние так, чтобы оно было согласовано с индивидуальным глазным базисом наблюдателя. Межокулярное

расстояние настроено правильно, если наблюдатель, при рассмотрении через оба окуляра, видит всего лишь одно круглое изображение.

Приспособить высоту окуляров к индивидуальным нуждам наблюдателя путём поворота окулярных тубусов вверх или вниз. Оба окуляра пригодны для работы в очках. С этой целью каждый из них имеет юстировочное кольцо для компенсации аметропии глаз наблюдателя. Диоптрийная шкала помогает ему найти нужную настройку.

Элементы управления микроскопа «Primo Star»:



- 1 – Окуляры;
- 2 – Бинокулярный узел тубуса;
- 3 – Тубус;
- 4 – Ручка для ношения;
- 5 – Штекерный сетевой блок;
- 6 – Показание интенсивности освещения;
- 7 – Поворотная ручка для включения и выключения и для регулировки интенсивности освещения;
- 8 – Привод фокусировки для точной настройки (правая сторона);
- 9 – Привод фокусировки для грубой настройки (правая сторона);
- 10 – Ручка привода для перемещения предметного столика в направлении X;
- 11 – Ручка привода для перемещения предметного столика в направлении Y;
- 12 – Зажимной винт для конденсора;
- 13 – Осветитель проходящего света, на светодиоде или галогенной лампе;
- 14 – Кольцо с накаткой для перемещения полевой диафрагмы осветителя (только в варианте оснащения «Full Kohler»);
- 15 – Винты для центрировки конденсора на носителе конденсора (в варианте оснащения «Full Kohler» выполнены как винты с накаткой);
- 16 – Конденсор Аббе в варианте «Full Kohler»;
- 17 – Объектив;
- 18 – Предметный столик микроскопа;
- 19 – Подпружиненный рычаг объектодержателя;
- 20 – Кольцо с накаткой револьверной головки для объективов.

Измерение величины клеток растений

Единицей измерения величины клеток растений служит микрометр – мкм (0.001 мм). Для определения величины клеток растений применяют окулярные и объективные микрометры.



Винтовой окулярный микрометр:

1 – корпус, 2 – отсчетный барабан; 3 – окуляр с диоптрийной наводкой; 4 – винт для крепления на тубусе микроскопа; 5 – вид под микроскопом

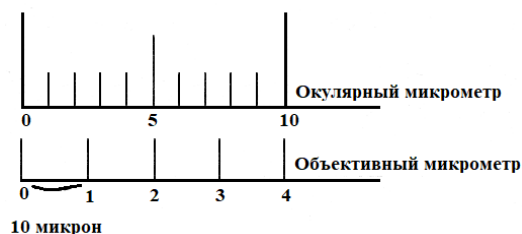
Окулярный микрометр представляет собой круглую стеклянную пластинку, на которой нанесена линейка длиной 5 мм, разделенная на десятые доли миллиметра. Окулярный микрометр может быть вставлен вместо окуляра. Он помещается на диафрагму окуляра делением вверх.

Объективный микрометр представляет собой предметное стекло, в центре которого находится специальное стекло. На него нанесена линейка длиной 1 мм. Линейка разделена на сотые доли миллиметра (одно деление равно 0.01 мм, или 10 мкм). Для установления величины деления окулярного микрометра помещают объективный микрометр на предметный столик так, чтобы линейка попала в поле зрения микроскопа.



Объективный микрометр: 1 – общий вид, 2 – деления объективного микрометра

Окулярный микрометр вставляют в окуляр и находят, какому числу его делений соответствует одно или несколько делений объективного микрометра. Зная, чему равно одно деление объективного микрометра (10 μ), можно легко определить величину деления окулярного микрометра при данном объективе и окуляре.



Пример. Два деления объективного микрометра совпали с пятью делениями окулярного микрометра.

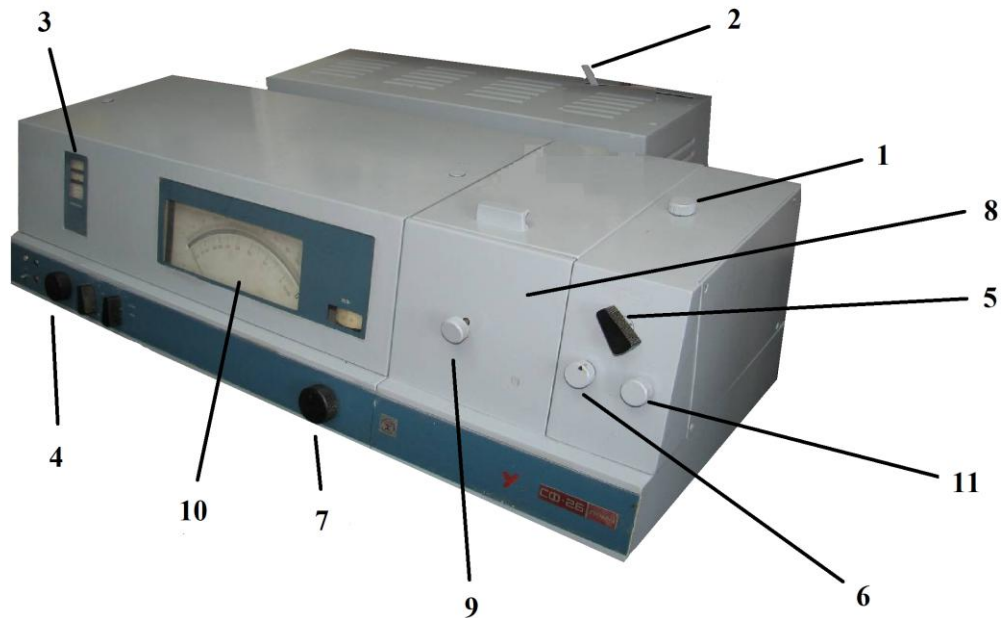
Следовательно, деление окулярного микрометра равно:

$$\frac{2 \times 10}{5} = 4 \text{ мкм}$$

Для каждой комбинации окуляра и объектива значение одного деления окулярного микрометра будет различным. Определив величину одного деления окулярного микрометра, снимают объективный микрометр и вместо него ставят препарат. По линейке окулярного микрометра вычисляют величину длинной и короткой осей клетки растений.

Приложение В

Порядок работы на спектрофотометре СФ-26 ЛОМО



1. За 30-60 минут до начала измерений включить прибор в сеть для обеспечения стабильной работы спектрофотометра.

2. Установить в рабочее положение фотоэлемент **1** (Ф – сурьмяно-цезиевый фотоэлемент применяется для измерений в области спектра от 186 до 650 нм или К – кислородно-цезиевый фотоэлемент для измерений в области спектра от 600 до 1100 нм) и источник излучения **2** (Н – лампа накаливания для работы в области спектра от 340 до 1100 нм или Д – дейтериевая лампа, предназначенная для работы в области спектра от 186 до 350 нм), соответствующие выбранному спектральному диапазону измерений.

3. Установить требуемую длину волны на шкале **3**, вращая рукоятку **4** в сторону увеличения длин волн. Если при этом шкала повернется на большую величину, то вернуть ее назад на 3-5 нм и снова подвести к требуемому делению.

4. Рукоятка **5** должна находиться в положении «**1**» (рабочее положение).

5. Закрыть фотоэлемент, поставив рукоятку **6** шторки в положение ЗАКР, и рукояткой **7** установить ширину щели примерно 0,1 мм.

6. Включить тумблер СЕТЬ, после чего должны загореться сигнальная лампа СЕТЬ и сигнальная лампа Д или сигнальная лампа Н в соответствии с выбранным источником.

7. Установить на пути потока излучения контрольный образец в кю-

ветное отделение **8**, перемещая каретку **9**.

8. Установить стрелку измерительного прибора на шкале **10** на нуль рукояткой **11** НУЛЬ.

9. Открыть фотоэлемент, поставив рукоятку **6** шторки в положение ОТКР.

10. Установить стрелку измерительного прибора на деление «100%», вращая рукоятку **7** механизма изменения ширины щели.

11. Установить в рабочее положение измеряемый образец, перемещая каретку рукояткой **9**, и снять отсчет по шкале оптической плотности D.

12. Вывести из потока излучения измеряемый образец и ввести контрольный образец, при этом стрелка измерительного прибора должна вернуться к делению «100%».

13. Закрыть фотоэлемент, поставив рукоятку **6** шторки в положение ЗАКР.

14. Выключение спектрофотометра осуществляется тумблером СЕТЬ.

Расчет описательных статистик и достоверности различий параметров

Для характеристики (описания) особенностей полученного распределения результатов используют «описательные статистики». К числу описательных статистик относятся, прежде всего, такие показатели как среднее арифметическое (M); среднее квадратичное отклонение (σ); ошибка средней арифметической (m) и другие.

$$M = (X_1 + X_2 + \dots + X_n) / n = \sum X_i / n; \quad \sigma = \sqrt{(\sum (X - M)^2 / (n - 1))}; \quad m = \sigma / \sqrt{(n - 1)},$$

где $X_1, X_2 \dots X_n$ – измеряемые параметры, n – количество измеренных параметров.

При проведении научных исследований не достаточно рассчитать описательные статистики, следует сравнить разные группы данных. Одна группа данных обычно используется как фон (изначальный уровень) для сравнения с экспериментальными данными и называется «контрольной». Другая группа данных представляет собой результаты, полученные после действия какого-то фактора на само растение, его семена или органы, и ее называют «экспериментальной». Для доказательства положительного или отрицательного действия фактора, необходимо показать существенные различия между данными контрольной и экспериментальной групп.

Для исключения субъективного толкования различий параметров двух групп в статистике разработан метод *дисперсионного анализа*, который позволяет сравнить данные двух групп и показать, что различия между ними являются достоверными, т.е. значимыми с точки зрения статистических критериев: F (критерий Фишера) и t (критерий Стьюдента).

Дисперсия – возведенное в квадрат среднее квадратичное отклонение (σ^2). Полная формула дисперсии такова:

$$\sigma^2 = \sum d^2 / N = \sum (X - M)^2 / N$$

Дисперсия может отражать степень удаленности средних арифметических (присущих отдельным группам) от их общегруппового среднего арифметического M_0 и одновременно показывать степень удаленности значений M между группами, ее принято называть «**межгрупповой**» дисперсией (between groups – BG) и обозначать как σ^2_{BG} . Дисперсия также отражает степень разброса данных внутри каждой отдельной группы (от своего среднего арифметического в группе), она носит название «**внутригрупповая**» дисперсия (within groups – WG) и обозначается как σ^2_{WG} .

F-критерий сравнивает межгрупповую и внутригрупповую дисперсии, поэтому их соотношение называют F – отношением:

$$F\text{-отношение} = \sigma_{BG}^2 / \sigma_{WG}^2$$

Пример. Оценить достоверность различий двух групп с помощью критериев Фишера и Стьюдента, если известны параметры:

$$n_1 = 25, M_1 = 232, \sigma_1 = 23; n_2 = 36, M_2 = 210, \sigma_2 = 21.$$

n_1, n_2 – объемы выборок или число параметров в группе.

1) Алгоритм расчета экспериментального F-критерия:

$$\sigma_{1,2}^2 = ((n_1 - 1) \sigma_1^2 + (n_2 - 1) \sigma_2^2) / (n_1 + n_2 - 2)$$

$$\sigma_{1,2}^2 = ((24) 23^2 + (35) 21^2) / (25 + 36 - 2) = 476.8$$

$$F_{\text{эксп}} = (d^2 / \sigma_{1,2}^2) (n_1 n_2 / (n_1 + n_2)) \geq F_{\text{крит}}$$

$$d = 22, d^2 = \text{квадрат разности средних } (M_1 - M_2)^2 = 484;$$

$$F_{\text{эксп}} = (484 / 476.8) ((25) (36) / (25 + 36)) = 14.9$$

$F_{\text{крит}}$ – стандартные значения критерия Фишера, они находятся по таблице на основе двух чисел степеней свободы для одного уровня значимости (таблица), где число степеней свободы числителя – количество сравниваемых групп: $2 - 1 = 1$, а число степеней свободы знаменателя – количество анализируемых параметров: $n_1 + n_2 - 2 = 25 + 36 - 2 = 59$.

Таблица F-отношений ($F = \sigma_{BG}^2 / \sigma_{WG}^2$) для уровней значимости $p = 0.01$ и $p = 0.05$

Число степеней свободы знаменателя	Число степеней свободы числителя			
	1	2	3	4
1	4052	4999	5625	5625
	161	200	216	225
3	34.1	30.8	29.5	28.7
	10.1	9.6	9.3	9.1
4	21.2	18.8	16.7	16.0
	7.7	6.9	6.6	6.4
5	16.3	13.3	12.1	11.4
	6.6	5.8	5.4	5.2
6	13.4	10.9	9.8	9.2
	6.0	5.1	4.8	4.5
7	12.3	9.6	8.5	7.9
	5.6	4.7	4.4	4.1
8	11.3	8.7	7.6	7.0
	5.3	4.6	4.1	3.8
9	10.6	8.0	7.0	6.4
	5.1	4.3	3.6	3.6
10	10.0	7.9	6.6	6.0
	5.0	4.1	3.7	3.5
20	8.1	5.9	4.9	4.4
	4.4	3.5	3.1	2.9

Число степеней свободы знаменателя	Число степеней свободы числителя			
	1	2	3	4
30	7.6	5.4	4.5	4.0
	4.2	3.3	2.9	2.7
50	7.2	5.1	4.2	3.7
	4.0	3.2	3.8	2.6
100	6.9	9.8	4.0	3.5
	3.9	3.1	2.7	2.5

$F_{\text{эксп}}$ равен 14.9, что выше $F_{\text{крит}}$, которые равны 7.2 (при $p=0.01$) и 4.0 (при $p=0.05$). Когда $F_{\text{эксп}}$ превышает $F_{\text{крит}}$ на уровне значимости 0.01, то можно сделать вывод о достоверности различий, и он окажется ошибочным лишь в 1-ом проценте случаев. Чем меньше процент вероятности ошибки вывода о достоверности различий, тем он надежнее.

2) Алгоритм расчета экспериментального t -критерия

Критерий Стьюдента применяется в том случае, когда требуется дать ответ: отличаются ли достоверно, т.е. надежно, результаты одной группы от результатов другой группы. **t -критерий Стьюдента** оценивает степень расхождения средних арифметических показателей двух групп данных (M_1 и M_2) относительно дисперсии σ^2 , т.е. разброса индивидуальных данных, рассчитанной применительно к этим двум группам, где количество членов соответствует N_1 и N_2 , а m_1^2 и m_2^2 – квадраты ошибок репрезентативности. Формула расчета t -критерия имеет следующий вид:

$$t_{\text{эксп}} = |d|/m_d = (M_1 - M_2) / \sqrt{(m_1^2 + m_2^2)} = |M_1 - M_2| / \sqrt{((\sigma_1^2/N_1) + (\sigma_2^2/N_2))} \geq t_{\text{крит}}$$

$$\begin{aligned} d &= |M_1 - M_2| = |210 - 232| = 22; \\ m_1^2 &= \sigma_1^2/N_1 = 23^2/25 = 21.6; & m_2^2 &= \sigma_2^2/N_2 = 21^2/36 = 12.25; \\ m_d^2 &= m_1^2 + m_2^2 = 21.6 + 12.25 = 33.41; \\ m_d &= 5.78; & t_{\text{эксп}} &= |d|/m_d = 22/5.78 = 3.8. \end{aligned}$$

Принцип анализа результатов расчета t -критерия: требуется сравнить экспериментально рассчитанное значение критерия $t_{\text{эксп}}$ с его критическим значением $t_{\text{крит}}$, взятым из таблицы, приведенной ниже.

Значение критерия $t_{\text{эксп}}$ выше критического значения $t_{\text{крит}}$, что свидетельствует о достоверности различий даже при уровне значимости $p = 0.01$.

Критерий Стьюдента относится к группе параметрических критериев, т.к. в своих расчетах опирается на «параметры» распределения (средние арифметические величины и дисперсии). Он применяется обычно для оценки достоверности различий между двумя группами данных, где имеет место **нормальное распределение** или близкое к нему. В то время как F -критерий может использоваться для сравнения сразу нескольких групп.

$t_{\text{крит}} = \{2.0 - 2.7\}$ при уровне значимости $p = 0.05$ и $p = 0.01$

Фрагмент таблицы t-критерия Стьюдента для двух уровней значимости

Число степеней свободы	Уровень значимости, p		Число степеней свободы	Уровень значимости, p	
	0.01	0.05		0.01	0.05
1	63,7	12,7	8	3,4	2,3
2	9,9	4,3	9	3,3	2,6
3	5,8	3,2	10	3,2	2,2
4	4,6	2,8	20	2,9	2,1
5	4,0	2,6	30	2,8	2,0
6	3,7	2,5	60	2,7	2,0
7	3,5	2,4	100	2,6	2,0

Издание подготовлено в авторской редакции

Отпечатано на участке цифровой печати
Издательского Дома Томского государственного университета

Заказ № 3315 от «31» июля 2018 г. Тираж 30 экз.