

**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра клеточной биологии
и биотехнологии растений**

Г. Г. Филиппова

ФОТОСИНТЕЗ

**Методические рекомендации
к лабораторным занятиям,
задания для самостоятельной работы
и контроля знаний студентов
биологического факультета**

**МИНСК
2017**

УДК 581.132(075.8)
ББК 28.57я73-1
Ф53

Рекомендовано советом
биологического факультета
13 сентября 2017 г., протокол № 1

Рецензент
кандидат биологических наук, доцент *О. В. Молчан*

Филипцова, Г. Г.
Ф53 Фотосинтез : метод. рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов биол. фак. / Г. Г. Филипцова. – Минск : БГУ, 2017. – 40 с.

Данное издание является составным элементом учебно-методического комплекса по курсу «Фотосинтез». Содержатся методические рекомендации, необходимые для выполнения лабораторных и практических работ, а также материал для самостоятельной подготовки и контроля знаний студентов.

Предназначено для студентов биологического факультета, обучающихся по специальности «Биология» направлений научно-производственная и научно-педагогическая деятельность.

УДК 581.132(075.8)
ББК 28.57я73

© БГУ, 2017

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛК – аминолевулиновая кислота
АФК – активные формы кислорода
ДТТ – дитиотрейтол
ТФДГ – тетрапирролзависимые фотодинамические гербициды
ПРОТОКС – протопорфириноген IX-оксидаза
РБФ – рибулозо-1,5-бисфосфат
Рубиско – рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза
ФГА – фосфоглицериновый альдегид
ФГК – фосфоглицериновая кислота
ФЕП – фосфоенолпировиноградная кислота
Фн – фосфат неорганический
ЩУК – щавелево-уксусная кислота
ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

ПРЕДИСЛОВИЕ

Фотосинтез представляет собой уникальный светозависимый процесс, играющий центральную роль в биоэнергетике как растительных, так и животных организмов. На уровне растения фотосинтез является основным донором метаболитов и энергии, использующихся в процессе дыхания, поглощения и ассимиляции минеральных элементов, росте и развитии. Фотосинтез служит первичным источником энергии, используемой другими живыми организмами в процессе жизнедеятельности. Он составляет основу первичной биопродуктивности в природных экосистемах и при формировании урожая сельскохозяйственных культур.

Исследование физико-химической организации фотосинтеза, механизмов поглощения и преобразования солнечной энергии, а также действия внешних и внутренних факторов на интенсивность фотосинтетических процессов имеет важное прикладное значение, так как в значительной степени способствуют развитию научных основ сельского хозяйства, экологии, биоинженерии и устойчивого развития биосферы в целом. Подготовка специалистов, обладающих знаниями по данным аспектам биологии растений, требует как теоретической, так и практической подготовки.

Методическое пособие является составным компонентом учебно-методического комплекса по специальной дисциплине «Фотосинтез» и включает описание лабораторных работ, вопросы и задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов. Цель пособия – закрепление и углубление теоретических знаний студентов, полученных в ходе лекций, знакомство с принципами современных методов изучения физиолого-биохимических аспектов фотосинтеза, приобретение навыков и освоение методических приемов при проведении исследований, активизация самостоятельной работы студентов и развитие творческого подхода в исследовательской деятельности. Знания и навыки, полученные при выполнении лабораторных работ и заданий, позволят сформировать у студентов целостную систему знаний о механизмах преобразования солнечной энергии в химическую энергию органических соединений, влиянии на этот процесс экологических факторов среды, а также связи фотосинтеза с продуктивностью растений.

Автор выражает глубокую благодарность рецензенту за конструктивный анализ и ценные критические замечания.

ЧАСТЬ I

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАНЯТИЯ

Исследование процесса фотосинтеза включает различные физиолого-биохимические аспекты: формирование пигментных систем фотосинтетического аппарата, скорость протекания фотохимических процессов, а также интенсивность ассимиляции углекислого газа и синтез углеводов. В данном пособии предложены работы по различным аспектам этого процесса, что позволяет расширить представления студентов об основных подходах и принципах методов изучения фотосинтеза.

Объектами исследования в работах могут быть растения разных видов с быстрым начальным ростом, выращенные в климатических камерах в контролируемых условиях (2-х недельные проростки ячменя, пшеницы, гороха, кукурузы), а также листья комнатных растений разных экологических групп.

Все практические задания студенты выполняют самостоятельно, соблюдая требования по технике безопасности. Перед началом работы рекомендуется изучить теоретические основы выполняемого практического задания.

Лабораторная работа № 1

Влияние фотодинамических гербицидов на уровень фотосинтетических пигментов в листьях пшеницы и гороха

Вводные замечания.

В настоящее время развитие сельского хозяйства, в частности растениеводства, тесно связано с использованием гербицидов. Их применение обеспечивает так называемую «химическую прополку», в результате которой существенно повышается урожайность выращиваемой продукции (до 40 %). Имеются данные, что около 50 % рыночной сельскохозяйственной продукции производится с применением гербицидов.

Ассортимент применяемых гербицидов постоянно изменяется. Это обусловлено поиском новых более эффективных и вместе с тем экологически безопасных препаратов. В 1984 г. американскими исследователями были открыты тетрапирролзависимые фотодинамические гербициды (ТФДГ), характеризующиеся очень низкими нормами расхода (10-300 г/га) и высокой эффективностью. Механизм действия ТФДГ связан с подавлением активности определенных ферментов биосинтеза хлорофилла и накоплением его предшественников – протопорфирина, Mg-протопорфирина, протохлорофиллида и др., являющихся мощными фотосенсебилизаторами. Энергетическая изолированность каротиноидов (главных тушителей синглетного кислорода) и предшественников хлорофилла в фотосинтетических мембранах в значительной степени способствует участию последних в генерации АФК. Порфирины, поглотив квант света, могут перейти в возбужденное триплетное состояние и взаимодействовать с невозбужденным триплетным кислородом, вызывая фотоиндуцированный рост уровня синглетного кислорода. Последний является чрезвычайно активным окислителем, он участвует в деструкции фотосинтетических пигментов, белков, липидов, нуклеиновых кислот и др. Фотосинтетические мембраны растительных клеток содержат основную массу пигментов-фотосенсебилизаторов и ненасыщенных липидов, поэтому фотодеструктивные окислительные процессы в них развиваются особенно интенсивно. Безусловно, это приводит к нарушению функционирования комплексов, разрушению мембран и, в конечном итоге, гибели клетки.

Коммерческими гербицидами, вызывающими накопление порфиринов, являются ингибиторы ключевого фермента биосинтеза хлорофилла протопорфириноген IX-оксидазы (ПРОТОКС) такие как тетрагидрофталимиды и дифенилэферы – оксифлуорфен, ацифлуорфен, оксадиазон и др. Ингибиторы ПРОТОКС не влияют на активность магний-хелатазы, но активируют синтез АЛК, в результате чего происходит значительное накопление протопорфирина IX (до 20 нмоль/г сырого веса), что является фитотоксичным. Протопорфирин, как отмечалось выше, способствует генерации АФК, которые окисляют органические молекулы, в том числе ненасыщенные жирные кислоты мембран. Показано, что при обработке растений фотодинамическими гербицидами происходят значительные нарушения структуры не только мембран хлоропластов, но и цитоплазматической мембраны и тонопласта. Показано, что липофильные гербициды, та-

кие как оксифлуорфен и метилацифлуорфен более активны, чем полярный ацифлуорфен.

Несмотря на высокую активность фотодинамических гербицидов их рынок очень ограничен из-за практически одинаковой селективности. В связи с вышесказанным, ведется поиск других классов фотодинамических гербицидов, обладающих более высокой селективностью по отношению к различным группам растений. К ним относится аминолевулиновая кислота (АЛК). Экзогенной обработкой растений АЛК вызывает сверхнакопление протохлорофиллида и генерацию синглетного кислорода. На примере растений огурца показано, что после обработки АЛК содержание хлорофилла в семядолях уменьшается на 60 % в течение 4 часов освещения. При этом скорость разрушения Хл *a* выше, чем Хл *b*, а степень повреждения ФС 2 больше, чем ФС 1. Установлено, что однодольные и двудольные растения имеют различную чувствительность к действию АЛК: растения пшеницы более устойчивы, чем растения салата. Применение АЛК в сочетании с отдельными гербицидами значительно усиливает действие последних. Это позволяет снизить концентрацию действующего вещества гербицида и, следовательно, химическую нагрузку на окружающую среду.

Фотодинамическим действием обладает также гербицид на основе глутаминовой кислоты и 1,10-фенантролина (глутафен). Опрыскивание растений данным препаратом приводит к накоплению порфиринов и развитию фотодинамических повреждений. Причем, двудольные растения гораздо чувствительнее к данному препарату, чем однодольные, что связывают с морфологическими и биохимическими особенностями растений.

Определенный интерес представляет использование солей цезия, мишенью для которых является фермент уропорфириногендекарбоксилаза. Обработка растений CsCl приводит к накоплению в хлоропластах фотохимически неактивной формы протохлорофиллида (до 100 нмоль/г сырой массы), являющегося фотосенсибилизатором, что приводит к фотодеструкции и быстрой гибели организма при освещении растений.

Целью данной работы является изучение влияния различных групп фотодинамических гербицидов на уровень фотосинтетических пигментов в проростках однодольных и двудольных растений. В качестве объектов исследования целесообразно использовать 10-14 дневные проростки пшеницы и гороха, выращенные в стандартизированных условиях (климатической камере).

Оборудование и материалы: 10-дневные проростки пшеницы и гороха, фарфоровые ступки и пестики, стеклянные фильтры, колбы Бунзена, вакуумный насос, мерные цилиндры объемом 25-50 мл, конические колбы объемом 50 мл, бумажные фильтры, ножницы, мел, песок, 100% ацетон, 10 мМ CsCl, 5 мМ АЛК, 15 мМ глутаминовая кислота, 5мМ фенантролин, спектрофотометр.

Ход работы

Работа включает несколько этапов: 1) обработка растений фотодинамическими гербицидами и последующее освещение растений; 2) извлечение пигментов из листьев; 3) спектрофотометрический анализ.

Обработка растений фотодинамическими гербицидами осуществляется за день до измерений, согласно схеме:

1. Контроль (без обработки),
2. 10 мМ CsCl,
3. 5 мМ АЛК,
4. Глутафен (15 мМ глутаминовой кислоты + 5мМ фенантролина).

После обработки проростки выдерживаются 2 часа в темноте, а затем на 16 ч помещаются на непрерывное освещение (12 Вт/м²).

Извлечение пигментов из листьев. Из всех вариантов опыта взвешивают навески листьев по 0,5 г, измельчают и помещают в фарфоровые ступки. Добавляют небольшое количество мела для нейтрализации вакуолярного сока, песка и 5 мл 100 % ацетона. Содержимое ступки растирают до однородной консистенции, добавляют еще 10 мл ацетона и переносят в стеклянный фильтр. С помощью вакуумного насоса осуществляют фильтрацию гомогената. При необходимости пигменты экстрагируют повторно, объединяя ацетоновые экстракты. Фильтрат переносят в мерный цилиндр, ацетоном доводят общий объем экстракта до 20 мл.

Спектрофотометрический анализ пигментов. Определение концентрации пигментов в ацетоновом экстракте без их предварительного разделения производят на спектрофотометре при длинах волн 662, 644 и 440 нм. Мутность раствора (zero) измеряют по ацетону.

Концентрацию пигментов (С) в мг/л вычисляют по формулам:

$$\begin{aligned}C_{\text{Хл } a} &= 9,784 \cdot E_{662} - 0,990 \cdot E_{644} \\C_{\text{Хл } b} &= 21,426 \cdot E_{644} - 4,650 \cdot E_{662} \\C_{\text{Кар}} &= 4,695 \cdot E_{440} - 0,268 \cdot C_{(\text{Хл } a + \text{Хл } b)},\end{aligned}$$

где $C_{\text{Хл } a}$ – концентрация хлорофилла a ,
 $C_{\text{Хл } b}$ – концентрация хлорофилла b ,
 $C_{\text{Кар}}$ – концентрация каротиноидов.

Количество каждого из пигментов в мг/г сырой массы рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{C \cdot V_{\text{общ}}}{1000 \cdot m}$$

где C – концентрация соответствующего пигмента в мг/л;
 $V_{\text{общ}}$ – общий объем экстракта с учетом разбавления, мл;
 m – масса навески, г.

Полученные результаты представляют в виде таблицы:

Вариант опыта	Оптическая плотность растворов, отн. ед			Концентрация пигментов, мг/л			Концентрация пигментов, мг/г сырой массы		
	E ₆₆₂	E ₆₄₄	E ₄₄₀	Хл a	Хл b	Кар	Хл a	Хл b	Кар

Делают выводы о влиянии различных фотодинамических гербицидов на содержание хлорофиллов a и b , каротиноидов в листьях, а также об избирательной устойчивости однодольных и двудольных растений к исследованным препаратам.

Лабораторная работа № 2

Выделение хлоропластов методом дифференциального центрифугирования

При проведении большинства исследований, связанных с выяснением механизмов фотохимических и биохимических процессов фотосинтеза, а также изучении биохимического состава хлоропластов требуется провести выделение функционально-активных препаратов изолированных хлоропластов. Использование различных методических приемов позволяет получить препараты с различной степенью очистки, интактности и функциональной активности. Выбор методики выделения хлоропластов определяется целями исследования.

На основе критерия морфологической целостности и функциональной активности разработана определенная номенклатура препаратов изолированных хлоропластов, согласно которой выделяют следующие их типы:

1) *Хлоропласты типа А (интактные целые хлоропласты)* имеют неповрежденную внешнюю мембрану, непроницаемую для НАДФ и искусственных акцепторов электронов. Они имеют высокую функциональную активность, так как содержат все ферменты С₃-цикла. Интактные хлоропласты используются для изучения фотовосстановления углекислого газа, механизмов транспорта метаболитов в хлоропластах и определения компартментации ферментов.

2) *Хлоропласты типа В (неразрушенные хлоропласты)* характеризуются незначительными повреждениями внешней мембраны, что ведет к частичной потере водорастворимых компонентов стромы. Скорость фиксации углекислоты у таких хлоропластов значительно снижена по сравнению с интактными.

3) *Хлоропласты типа С (разрушенные хлоропласты)* имеют значительные повреждения во внешней мембране, тогда как внутримембранная система остается интактной. Они не способны к ассимиляции углекислого газа, но проявляют фотохимическую активность, поэтому могут быть использованы для определения процессов циклического и нециклического фотофосфорилирования. Хлоропласты типа С получают механическим способом.

4) *Хлоропласты типа D (препараты свободных ламелл)* получают из хлоропластов типа А путем осмотического шока. Такие хлоропласты теряют наружную оболочку, но сохраняют интактную тилакоидную систему и проявляют фотохимическую и фотофосфорилирующую активность в присутствии экзогенных факторов.

5) *Хлоропласты типа Е (фрагменты хлоропластов)* представляют собой свободные тилакоиды, отмытые от компонентов стромы гипотоническим раствором.

6) *Хлоропласты типа F (субхлоропластные частицы)* получают при обработке хлоропластов детергентами, ультразвуком или с помощью Френч-пресса. Они используются для изучения структуры полипептидных комплексов тилакоидных мембран: ФС I, ФС II, светособирающих антенн, цитохромного b/f-комплекса, АТФ-синтазы.

Для выделения хлоропластов используют методы, основанные на механическом разрушении нативной ткани листа, либо предварительно полученных из нее протопластов. Последующее дифференциальное центрифугирование позволяет отделить хлоропласты от ос-

тального содержимого клетки. Выбор метода зависит от цели эксперимента, а также видовых особенностей растений. Согласно литературным данным, из листьев гороха и шпината удастся получить достаточно высокий выход интактных хлоропластов при механическом разрушении тканей. Предварительное получение протопластов из листьев этих растений не дает больших преимуществ, хотя в значительной степени усложняет весь процесс. При работе с пшеницей и ячменем целесообразно хлоропласты выделять из протопластов, так как это позволяет значительно увеличить выход интактных, функционально-активных хлоропластов.

Выделение интактных хлоропластов методом дифференциального центрифугирования включает следующие этапы: растирание навески листьев со средой выделения, получение гомогената и последующее центрифугирование при различных скоростях. Метод дифференциального центрифугирования позволяет отделить фракцию хлоропластов от других, более тяжелых и более легких компонентов клетки. В качестве среды выделения могут быть взяты водные растворы хлористого натрия, сахарозы с определенной величиной осмотического давления или безводные органические среды (гексан, четыреххлористый углерод).

При выделении в водной среде хлоропласты сохраняют фотохимическую активность, так как при этом не нарушаются тилакоидные структуры, но хлоропласты теряют часть водорастворимых комплексов, в частности ферменты углеродного цикла. В связи с этим хлоропласты, изолированные в водные среды, мало способны к реакциям восстановления CO_2 . При выделении в органической, безводной среде хлоропласты сохраняют целостность стромы и содержащиеся в ней водорастворимые вещества, но теряют способность к фотохимическим реакциям из-за экстракции жирорастворимых компонентов тилакоидных мембран (хинонов, каротиноидов) и нарушения систем транспорта электронов. Применение органических сред выделения эффективно при исследовании локализации в хлоропластах минеральных элементов, белков, ферментов, продуктов фотосинтеза.

При получении хлоропластов должны соблюдаться следующие требования:

1. Среда выделения должна быть изоосмотической для предотвращения набухания хлоропластов и разрыва их оболочки. Подбор подходящей осмотической концентрации среды производят, используя разные концентрации сахарозы – от 0,2 до 0,6 М, либо 0,33 М сорбитола.

2. pH среды выделения должно соответствовать значениям pH цитоплазмы. Чтобы не произошло сильного подкисления при разрушении клеток и разрыва вакуолей, в среду выделения вводятся буферные компоненты.

3. Среда должна содержать вещества, инактивирующие окислительные процессы. Чтобы оградить хлоропласты от повреждающего действия эндогенных фенолов и ферментов лизосом, следует процедуру разрушения клеток и центрифугирования проводить при пониженных температурах (4°C). Кроме того для защиты хлоропластов от действия фенолов в среду выделения добавляют высокомолекулярные адсорбирующие вещества – полиэтиленгликоль, сывороточный альбумин, ингибитор полифенолоксидаз метабисульфит калия. Наряду с адсорбирующим действием эти вещества препятствуют переходу воды из низкомолекулярных соединений через внешнюю оболочку хлоропластов в так называемое «осмотическое» пространство. Нередко в состав среды выделения вводят антиоксиданты – аскорбат, глутатион, тиоловые производные.

Целью данной работы является получение изолированных хлоропластов из листьев гороха и пшеницы для последующего определения их фотохимической активности.

Оборудование и материалы: листья проростков пшеницы и гороха, фарфоровые ступки и пестики, мерные цилиндры объемом 25-50 мл, конические колбы объемом 50 и 100 мл, стеклянные воронки, бумажные фильтры, ножницы, капроновая ткань, кисточки капроновые, пробирки центрифужные полиэтиленовые на 10 и 20 мл; *трис*-HCl, NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, KCl, сахароза, световой микроскоп.

Ход работы

Работа включает следующие этапы: 1) приготовление растворов для выделения хлоропластов; 2) выделение хлоропластов с использованием различных сред; 3) определение степени интактности полученных хлоропластов.

Подготовка сред выделения. Для выделения хлоропластов используют водные растворы следующего состава:

- 1) 0,35 М NaCl в 0,05 М *трис*-HCl буфере, pH 8,0;
- 2) 0,30 М NaCl в 0,05 М фосфатном буфере, pH 6,9;
- 3) 0,40 М сахарозы и 0,01 М KCl в 0,05 М фосфатном буфере, pH 6,9.

Растворы следует охладить до 1-2°C.

Выделение хлоропластов. Взвешивают навески листьев гороха и пшеницы по 2 г, охлаждают в течение 20 мин в полиэтиленовом пакете в холодильнике. Посуду и принадлежности, необходимые для изолирования хлоропластов, также охлаждают.

Листья растений измельчают ножницами в фарфоровые ступки, добавляют 10 мл среды выделения и гомогенизируют в течение 1–2 мин. Гомогенат фильтруют через капроновую ткань и центрифугируют 5 мин при 100 g с охлаждением (-1°C).

Супернатант (верхнюю фракцию) осторожно сливают в чистую центрифужную пробирку, а осадок, содержащий обрывки тканей, разрушенные клеточные стенки и другие фрагменты, отбрасывают.

Для осаждения хлоропластов супернатант центрифугируют 15 мин при 1000 g. Полученный осадок, содержащий хлоропласты, промывают средой выделения и повторно центрифугируют 15 мин при 1000 g.

Осадок, содержащий хлоропласты, аккуратно гомогенизируют со средой выделения с использованием кисточки и переносят в мерный цилиндр. Объем гомогената доводят средой выделения до 10–30 мл (в зависимости от целей опыта). При необходимости полученный препарат хлоропластов следует держать при температуре $0\text{--}3^{\circ}\text{C}$. В этих условиях активность хлоропластов сохраняется в течение нескольких часов.

Определение степени интактности полученных хлоропластов можно осуществить под световым микроскопом ($\times 900$). Хлоропласты типа А (интактные) идентифицируют по удлинённой форме и высокому светопреломлению. Они окружены светлым ореолом, грани внутри них неразличимы. Хлоропласты типа В, частично или полностью потерявшие ограничивающие наружную мембрану и значительную часть матрикса, выглядят более крупными, расплывшимися. Их оптическая плотность не отличается от оптической плотности среды, и они не имеют наружного светового ореола.

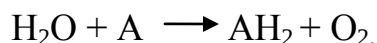
При оформлении результатов оценивают относительное количество интактных хлоропластов, полученных из листьев гороха и пшеницы, а также присутствие или отсутствие фрагментов хлоропластов. Делают вывод, какая из сред выделения является оптимальной для получения интактных хлоропластов из исследованных культур.

Лабораторная работа № 3

Влияние разобщителей ЭТЦ на фотохимическую активность хлоропластов

В хлоропластах на свету благодаря функционированию электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) осуществляется процесс переноса электронов от воды к НАДФ⁺ и восстановление последнего. Скорость образования восстановленного НАДФН определяет фотохимическую активность хлоропластов. Следовательно, фотохимическая активность хлоропластов характеризует работу первичных фотохимических стадий фотосинтеза, которые являются источником энергии для процессов темнового восстановления CO₂.

Показателем фотохимической активности изолированных хлоропластов может быть реакция Хилла, представляющая собой комплекс световых реакций фотосинтеза, связанных с фотоокислением воды и переносом электронов на введенные в реакционную смесь акцепторы (А). Фотовосстановление акцепторов (АН₂) сопровождается выделением кислорода:



Методы определения фотохимической активности изолированных хлоропластов основаны на регистрации количества выделенного кислорода (полярографический метод) или количества восстановленных акцепторов (спектрофотометрический метод). В качестве акцепторов электронов в реакции Хилла могут быть соли трехвалентного железа (например, феррицианид калия – K₃Fe(CN)₆), окислительно-восстановительные индикаторы (2,6-дихлорфенол-индофенол), физиологические акцепторы электронов (хиноны, цитохромы, пластоцианин, НАДФ⁺ и др.). В зависимости от величины окислительно-восстановительного потенциала включение акцепторов электронов в цепь может происходить на ее различных участках.

Сравнение фотохимической активности изолированных хлоропластов в присутствии и отсутствии АДФ и фосфата неорганического (Фн) позволяет оценить степень сопряжения потока электронов с процессами фотофосфорилирования.

Определение фотохимической активности хлоропластов широко применяется при исследовании механизмов действия ингибиторов транспорта электронов и разобщителей ЭТЦ, например, гербицидов.

Фитотоксическое действие гербицидов направлено на различные биохимические и физиологические процессы. Некоторые из них оказывают влияние на процессы транспорта электронов в ЭТЦ тилакоидной мембраны, ингибируя, таким образом, фотосинтез. К гербицидам, подавляющим фотосинтез, относятся производные мочевины, триазины, нитрилы, тиadiaзины и др. Механизм гербицидного действия большинства производных 1,3,5-триазина (прометрина, метамитрона, метрибузина) основан на торможении реакции Хилла и блокировании фотолиза воды. Механизм действия монурона и диурона основан на ингибировании транспорта электронов на уровне ФС II. Монурон запрещён к использованию во всех странах ЕС. В сельскохозяйственной практике и в ряде научных исследований как модельное соединение широко используются диурон. Он блокирует связывание внешнего пластохинона с ФС II, прерывая нециклический поток электронов в ЭТЦ. При этом диурон не оказывает влияния на циклический транспорт электронов в фотосистеме I.

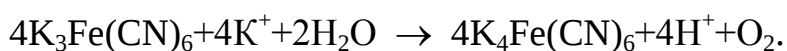
Целью данной работы является исследование влияния разобщителей ЭТЦ фотосинтеза (диурона или прометрина) на фотохимическую активность изолированных хлоропластов гороха и пшеницы (полученных в работе № 2).

Оборудование и материалы: суспензия хлоропластов, мерные цилиндры объемом 25-50 мл, конические колбы объемом 50 и 100 мл, 100% ацетон, $K_3Fe(CN)_6$, 10^{-2} М растворы диурона и прометрина, спектрофотометр, световая установка.

Ход работы

Работа включает следующие этапы: 1) определение скорости фотовосстановления феррицианида калия без добавления и с добавлением разобщителей ЭТЦ; 2) определение содержания хлорофилла в суспензии хлоропластов; 3) оценка фотохимической активности изолированных хлоропластов по скорости реакции Хилла.

Определение скорости фотовосстановления феррицианида калия. На свету с участием компонентов ЭТЦ хлоропластов осуществляется реакция восстановления феррицианида калия согласно уравнению:



Следовательно, изменение оптической плотности раствора при освещении хлоропластов в присутствии экзогенно введенного $K_3Fe(CN)_6$ позволяет судить о фотохимической активности хлоропластов.

Для определения скорости восстановления феррицианида калия готовят суспензию хлоропластов, содержащую примерно 20 мкг хлорофилла в 1 мл. Берут 4 одинаковые колбы и в каждую из них вносят реакционную смесь: 4 мл суспензии хлоропластов и 1 мл водного раствора $K_3Fe(CN)_6$, содержащего 15 микромоль акцептора. В две из пробирок добавляют 10^{-4} М диурана или прометрина.

Затем две колбы (без добавления и с добавлением гербицида) ставят в темноту (темновые варианты), другие две освещают в течение 5 минут (световые варианты). По истечении указанного времени измеряют оптические плотности растворов при длине волны 420 нм в темновых и световых вариантах.

Определение содержания хлорофилла в суспензии хлоропластов. В мерную пробирку вносят 1 мл суспензии хлоропластов, 1 мл дистиллированной воды и доводят объем 100 % ацетоном до 10 мл. Определяют оптическую плотность раствора при длине волны 652 нм (контроль – 80 % ацетон). Содержание хлорофилла в суспензии хлоропластов (мг/л) вычисляют по формуле Арнона:

$$C_{Хл\ a+b} = E_{652} \cdot 1000/34,5 = 29,0 \cdot E_{652}.$$

Учитывая разбавление, содержание хлорофилла в 1 мл суспензии хлоропластов (мг/мл) будет составлять:

$$C_{Хл} = 0,29 \cdot E_{652}.$$

Оценка фотохимической активности изолированных хлоропластов по скорости реакции Хилла. Активность переноса электронов в ЭТЦ хлоропластов выражают в микромолях восстановленного $K_3Fe(CN)_6$, отнесенного к количеству хлорофилла за единицу времени (мкМ/мг·ч). Для расчета активности реакции Хилла используют формулу:

$$A = (\Delta E_{420} \cdot V) / (C_{Хл} \cdot 1,04 \cdot t),$$

где ΔE_{420} – разность значений оптической плотности раствора в темноте и на свету,

V – объем суспензии хлоропластов в пробе, мл

$C_{\text{Хл}}$ – концентрация хлорофилла в пробе, мг/мл

t – время освещения, час

1,04 – миллимолярный коэффициент поглощения $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

Результаты оформляют в виде таблицы:

Вариант		E_{420} , темнота	E_{420} , свет	ΔE_{420} , темнота- свет	$C_{\text{Хл}}$, мг/мл	Активность, мкМ/мг·ч
Горох	Контроль					
	Диурон					
Пшеница	Контроль					
	Диурон					

Делают вывод о влиянии разобщителей ЭТЦ на фотохимическую активность хлоропластов гороха и пшеницы, а также о восприимчивости однодольных и двудольных растений к исследованному препарату.

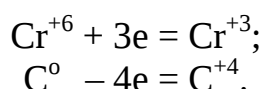
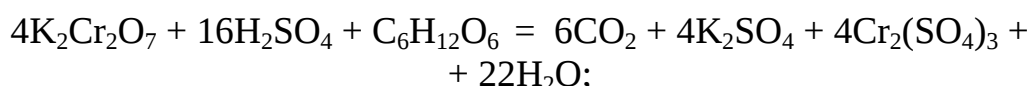
Лабораторная работа № 4

Влияние интенсивности освещения на скорость накопления органических веществ C_3 - и C_4 - растениями

Скорость фотоассимиляции углекислого газа и накопления органических веществ растениями является интегральным показателем, который зависит от многих факторов: скорости фотофизических процессов фотосинтеза, а, следовательно, интенсивности света, соотношения $\text{НАДФ}^+/\text{НАДФН}$ и $\text{АДФ}/\text{АТФ}$ в листе, концентрации CO_2 , а также физиологических особенностей растений.

Зависимость между интенсивностью света и скоростью фотоассимиляции CO_2 имеет нелинейный характер. Прямая зависимость между этими величинами наблюдается только при низком уровне освещения. При повышении данного показателя происходит насыщение. Скорость фотосинтеза в области насыщающих интенсивностей света характеризует мощность системы ассимиляции CO_2 , данные показатели существенно различаются у C_3 - и C_4 - растений.

Для характеристики интенсивности фотосинтеза могут быть использованы разные показатели: интенсивность газообмена, энергетическая эффективность фотосинтеза, накопление органических веществ. Для оценки скорости фотоассимиляции углерода листьями часто используют спектрофотометрический метод, основанный на регистрации количества окисленной глюкозы. При сжигании растительного материала в хромовой смеси происходит окисление углеводов, например глюкозы. Соответствующее уравнение реакции имеет следующий вид:



При окислении глюкозы ионы Cr^{+6} желтого цвета восстанавливаются до ионов Cr^{+3} синего цвета. Количество образовавшихся ионов Cr^{+3} находится в линейной зависимости от количества окисленной глюкозы. Определение изменения оптической плотности раствора хромовой смеси после сжигания в ней растительного материала лежит в основе спектрофотометрического метода для расчета содержания углерода в листьях растений.

Целью данной работы является исследование влияния интенсивности света на скорость ассимиляции углекислого газа и накопление углеводов C_3 - и C_4 - растениями. В качестве объектов исследования целесообразно использовать 10-14 дневные проростки пшеницы и кукурузы, выращенные в стандартизированных условиях.

Оборудование и материалы: 10-14-дневные проростки пшеницы и кукурузы, сульфат меди (CuSO_4), серная кислота (конц.), двуххромовокислый калий ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), глюкоза (х. ч.), химические стаканы, стеклянная колба объемом 1 л, мерные колбы объемом 50 мл, пробирки на 20 мл, спектрофотометр, песчаная баня, световая установка.

Ход работы

Работа включает несколько этапов: 1) воздействие на растения света различной интенсивности; 2) приготовление хромовой смеси; 3) построение калибровочной кривой; 4) определение количества органических веществ в листьях.

Воздействие на растения света различной интенсивности осуществляется за 3 дня до планируемых измерений, согласно схеме:

1. Контроль (интенсивность света $200 \text{ мкмоль/м}^2\cdot\text{с}$, фотопериод 16 ч – свет, 8 ч – темнота),
2. Низкая освещенность (интенсивность света $100 \text{ мкмоль/м}^2\cdot\text{с}$, фотопериод 16 ч – свет, 8 ч - темнота),
3. Высокая освещенность (интенсивность света $500 \text{ мкмоль/м}^2\cdot\text{с}$, фотопериод 16 ч – свет, 8 ч - темнота),

Приготовление хромовой смеси. Для приготовления 1 л 0,4 н раствора хромовокислого калия ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) навеску (19,61 г) растворяют в мерной колбе на 1 л примерно в 500 мл воды. В качестве катализатора приливают 10 мл 10 % CuSO_4 , и раствор доводят водой до объема в 1 л. Хромовую смесь 0,2 н концентрации, необходимую для спектрофотометрического анализа, получают разбавлением 0,4 н раствора $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ концентрированной H_2SO_4 в соотношении 1:1.

Построение калибровочной кривой. Для определения количества углерода в растительном материале необходимо построить калибровочную кривую. Для этого в десять пробирок приливают от 0,1 до 1,0 мл стандартного раствора глюкозы (10 мг/мл) и 10 мл хромовой смеси. Реакционную смесь кипятят в течение 5 мин на песчаной бане. После охлаждения растворы из пробирок переносят в мерные колбы и доводят водой до 50 мл, перемешивают и измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 530 нм.

По экспериментальным точкам строят калибровочную кривую, представляющую собой зависимость оптической плотности раствора от количества глюкозы (см. рис.). По тангенсу угла наклона полученной кривой находят коэффициент для глюкозы ($K_{\text{гл}}$), он равен отношению a/b . Например, оптическая плотность E_{530} равна 0,23, это соответствует 4,1 мг глюкозы: $K_{\text{гл}} = 4,1/0,23 = 17,8$.

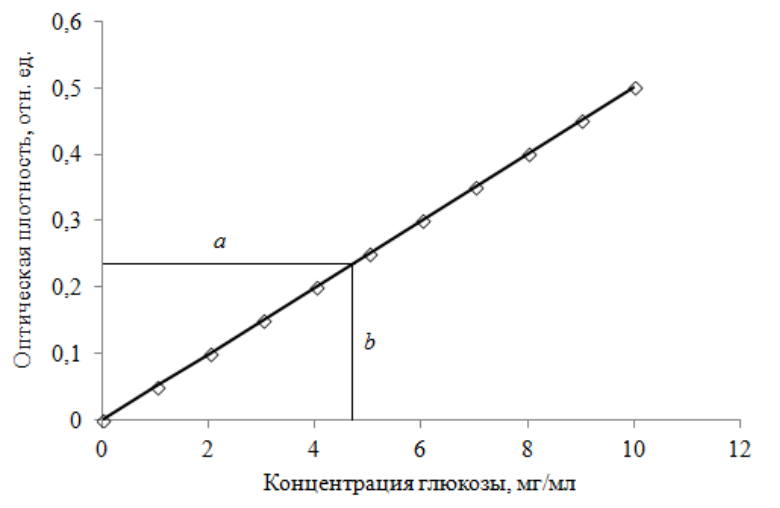


Рис. 1. Калибровочная кривая
для определения количества глюкозы в растворе

Определение количества органических веществ в листьях. Из всех вариантов опыта взвешивают навески листьев по 0,2-0,5 г (или вырезают диски общей площадью 10 см²), измельчают ножницами и помещают в стеклянные пробирки. Приливают 10 мл хромовой смеси и кипятят на песчаной бане в течение 5 мин. После полного охлаждения раствор из пробирки переносят в мерную колбу и доводят водой до на 50 мл, тщательно перемешивают. Определяют оптическую плотность полученных растворов на спектрофотометре при длине волны 530 нм. В качестве контроля используется чистая хромовая смесь.

Имея данные оптической плотности чистой хромовой смеси ($E_{\text{контр.}}$) и хромовой смеси после сжигания навески листьев ($E_{\text{изм.}}$), рассчитывают количество органического вещества в анализируемых пробах листьев в пересчете на глюкозу по формуле:

$$M_{\text{гл}} = K_{\text{гл}} \cdot (E_{\text{изм}} - E_{\text{контр.}}),$$

где $M_{\text{гл}}$ – количество глюкозы, соответствующее содержанию органического вещества в растительной пробе, мг;

$E_{\text{изм}}$ – оптическая плотность хромовой смеси после сжигания листьев;

$E_{\text{контр.}}$ – оптическая плотность чистой хромовой смеси.

Исходя из соотношения атомных (или молекулярных масс), можно произвести пересчет органического вещества на углерод (M_{C}) или на углекислый газ (M_{CO_2}):

$$M_C = 0,4 M_{\text{гл}} = 0,4 \cdot K_{\text{гл}} \cdot (E_{\text{изм}} - E_{\text{контр}}),$$

$$M_{\text{CO}_2} = 1,47 M_{\text{гл}} = 1,47 \cdot K_{\text{гл}} \cdot (E_{\text{изм}} - E_{\text{контр}}),$$

где 0,4 и 1,47 – коэффициенты пересчета соответственно на углерод и диоксид углерода.

Затем необходимо произвести пересчет количества углерода и поглощенного углекислого газа на единицу сырой массы (либо на единицу площади листа). Количество органического вещества, содержащегося в единице массы листьев (мг/г), рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{0,4 \cdot M_{\text{гл}}}{m},$$

где m – масса навески листьев, г.

Полученные данные оформляют в виде таблицы:

Вариант опыта	Оптическая плотность		Количество органических веществ в пересчете на			Количество орг. веществ в единице массы, мг/г
	$E_{\text{изм}}$	$E_{\text{изм}} - E_{\text{контр}}$	глюкозу	углерод	углекислый газ	

Проводят анализ полученных данных. Делают выводы о влиянии условий освещения на скорость накопления органических веществ C_3 - и C_4 -растениями. Дают объяснение, с чем связаны полученные различия в интенсивности фотосинтеза.

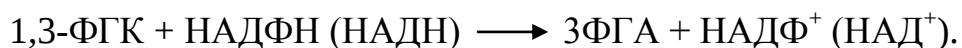
Лабораторная работа № 5

Определение активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы

Основным путем фотосинтетической ассимиляции углекислого газа у высших растений, водорослей и фотосинтезирующих бактерий является восстановительный пентозофосфатный цикл. Скорость биосинтеза углеводов в данном цикле во многом определяется активностью работы фермента рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (Руби-

ско), осуществляющего реакцию взаимодействия углекислого газа с первичным акцептором рибулозо-1,5-бисфосфатом (РБФ). При этом образуется 3-фосфоглицериновая кислота (3-ФГК), которая затем фосфорилируется (1,3-ФГК) и восстанавливается до фосфоглицеринового альдегида (ФГА) с использованием продуктов световой стадии фотосинтеза (АТФ и НАДФН). Дальнейшее преобразование ФГА приводит к синтезу конечных продуктов и регенерации акцептора.

Реакция карбоксилирования РБФ является самой медленной, скорость определяющей стадией во всем цикле. Следовательно, определение активности Рубиско позволяет судить о скорости метаболизма углекислого газа в процессе фотосинтеза C_3 -растений. Для определения активности данного фермента обычно применяют два способа: 1) радиометрический, который основан на использовании меченого углекислого газа $^{14}CO_2$, и 2) спектрофотометрический, основанный на регистрации скорости окисления НАДФН или НАДН в реакции восстановления ФГК:



Целью данной работы является определение активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы в листьях различных видов растений спектрофотометрическим методом. В качестве объектов исследования целесообразно использовать комнатные растения или 2-3-недельные проростки пшеницы, ячменя, гороха и др., выращенные в стандартизированных условиях.

Оборудование и материалы: листья опытных растений, *трис*-HCl буфер (pH 8,0), $MgCl_2$, дитиотрейтол или меркаптоэтанол, ЭДТА, -5-фосфат (P-5-Ф), АТФ, $NaHCO_3$, НАДФН или НАДН, ступки с пестиками, кварцевый песок, ножницы, центрифужные пробирки на 10 мл, химические стаканы, воронки, секундомер, спектрофотометр.

Ход работы

Работа включает следующие этапы: 1) приготовление среды выделения и гомогенизация листьев; 2) приготовление инкубационной смеси и запуск реакции; 3) определение активности фермента.

Приготовление среды выделения и гомогенизация листьев. Для извлечения фермента Рубиско из листьев и перевода его в растворенное состояние готовят среду выделения (100 мл) следующего состава: 100 мМ *трис*-HCl (pH=8,0), 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ ДТТ

или меркаптоэтанола. Полученный раствор охлаждают в холодильнике до температуры 1-2°C.

Взвешивают навески листьев C_3 -растений массой 0,5 г, измельчают ножницами и помещают в охлажденные фарфоровые ступки. Быстро гомогенизируют листья в 5 мл среды выделения, количественно переносят гомогенат в центрифужные пробирки и центрифугируют 20 мин при 10 000 g и температуре 2-4°C. Прозрачный супернатант используют для определения активности фермента.

Приготовление инкубационной смеси и запуск реакции. Готовят инкубационную смесь, содержащую 100 mM *трис*-HCl (pH 8,0), 10 mM $MgCl_2$, 5 mM ДТТ, 10 mM $NaHCO_3$. Непосредственно перед измерением в этот раствор добавляют 1 mM НАДФН или НАДН, 0,5 mM рибулозо-5-фосфата и 2 mM АТФ.

Для запуска реакции карбоксилирования, катализируемой ферментом Рубиско, к 0,5 мл экстракта добавляют 4,5 мл инкубационной смеси и засекают время.

Определение активности фермента осуществляют спектрофотометрически. Для этого через 1, 2, 3, 4 и 5 минут измеряют оптическую плотность растворов при 340 нм (максимум поглощения НАДФН и НАДН). Строят график зависимости оптической плотности (E_{340}) от времени прохождения реакции.

За единицу активности фермента принимают изменение оптической плотности (ΔE). Пересчет активности с единиц оптической плотности в микромоли НАДФН (НАДН) осуществляют по формуле, используя коэффициент молярной экстинкции кофакторов (6,22):

$$N = \frac{\Delta E \cdot V}{6,22},$$

где N – активность фермента в микромолях НАДФН,
 ΔE – изменение оптической плотности раствора при 340 нм,
 V – объем пробы экстракта при спектрофотометрировании, мл
6,22 – коэффициент экстинкции НАДФН.

Осуществляют пересчет активности фермента на единицу исходной массы листьев и единицу времени (мкМ/г·с):

$$A = \frac{N}{t \cdot m},$$

где N – активность фермента в микромолях НАДФН,
 t – время инкубации опытного раствора, мин
 m – масса навески листьев, г.

Делают вывод об активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы у разных видов растений. Чем могут быть обусловлены различия в активности фермента, и какие факторы влияют на этот показатель?

Лабораторная работа № 6

Определение активности фосфоенолпируваткарбоксилазы

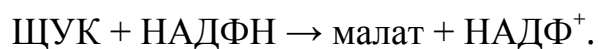
У некоторых тропических растений в процессе адаптации к условиям высокой температуры и высокой интенсивности света возник C_4 -путь ассимиляции углекислого газа. Он характерен для относительно небольшого числа видов (около 3 % всех наземных видов растений), среди которых важные сельскохозяйственные культуры: кукуруза, сахарный тростник, просо, сорго, а также некоторые сорные растения (например, лебеда).

C_4 -растения имеют ряд биохимических и анатомических особенностей. Для листьев этих растений характерно наличие двух групп фотосинтезирующих клеток: рыхло расположенные клетки мезофилла и плотно упакованные клетки обкладки. В клетках мезофилла осуществляется фиксация атмосферной углекислоты по C_4 -пути. При этом углекислый газ в виде $НСО_3^-$ с участием фермента фосфоенолпируваткарбоксилазы (ФЕП-карбоксилазы) взаимодействует с фосфоенолпируватом (ФЕП) и образуется щавелево-уксусная кислота (ЩУК):



ФЕП-карбоксилаза имеет высокое сродство к углекислоте, благодаря чему осуществляется эффективная фиксация CO_2 даже при слабо открытых устьицах.

Далее у растений малатного типа ЩУК восстанавливается до яблочной кислоты, при этом используется продукт светового цикла фотосинтеза – восстановленный НАДФН:



Данная реакция лежит в основе спектрофотометрического метода определения активности ФЕП-карбоксилазы, суть которого заключается в регистрации скорости окисления НАДФН.

Целью данной работы является определение активности ФЕП-карбоксилазы в листьях C_4 -растений (кукурузы).

Оборудование и материалы: листья кукурузы, *трис*-HCl буфер (pH=8,0), $MgCl_2$, дитиотрейтол или меркаптоэтанол, ЭДТА, фосфоенолпировиноградная кислота, $NaHCO_3$, НАДФН или НАДН, ступки с пестиками, кварцевый песок, ножницы, центрифужные пробирки на 10 мл, химические стаканы, воронки, секундомер, спектрофотометр.

Ход работы

Определение активности ФЕП-карбоксилазы включает те же этапы, что и предыдущая работа: 1) приготовление среды выделения и гомогенизация листьев; 2) приготовление инкубационной смеси и запуск реакции; 3) определение активности фермента.

Приготовление среды выделения и гомогенизация листьев. Для извлечения фермента ФЕП-карбоксилазы из листьев C_4 -растений готовят среду выделения (100 мл) следующего состава: 50 мМ *трис*-HCl (pH 8,0), содержащем 1 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ ЭДТА, 10 мкМ меркаптоэтанол или ДТТ. Полученный раствор охлаждают в холодильнике до температуры 1-2°C.

Взвешивают навеску листьев кукурузы массой 0,5 г, измельчают ножницами и помещают в охлажденные фарфоровые ступки. Быстро гомогенизируют листья в 5 мл среды выделения, количественно переносят гомогенат в центрифужные пробирки и центрифугируют 20 мин при 10 000 g и температуре 2-4°C. Прозрачный супернатант используют для определения активности фермента.

Приготовление инкубационной смеси и запуск реакции. Готовят инкубационную смесь, содержащую *трис*-HCl буфер – 100 мкМ, $MgCl_2$ – 5 мкМ, $NaHCO_3$ – 50 мкМ, НАДФН или НАДН – 0,25 мкМ, ФЕП – 10 мкМ. Для определения активности ФЕП карбоксилазы в чистую пробирку наливают 2 мл инкубационной смеси и 1 мл экстракта, засекают секундомер. В контрольную пробу вносят все компоненты, за исключением субстрата (ФЕП).

Определение активности фермента осуществляют спектрофотометрически. Для этого через 1, 2, 3, 4 и 5 минут измеряют оптиче-

скую плотность растворов при 340 нм (максимум поглощения НАДФН и НАДН). Строят график зависимости оптической плотности (E_{340}) от времени прохождения реакции.

Расчет производят аналогично расчету активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы (работа 5).

Делают вывод об активности ФЕП-карбоксилазы у C_4 -растений. Объясните, что является источником ФЕП для фиксации CO_2 у растений C_4 -типа?

ЧАСТЬ II

ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ ДЛЯ КОНТРОЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

ТЕМЫ РЕФЕРАТОВ

1. Фотосинтез как основа биологического круговорота энергии и веществ на Земле.
2. Белорусские исследователи процесса фотосинтеза и их вклад в раскрытие данного процесса.
3. Эволюция пигментных систем растений.
4. Роль циклических тетрапирролов в метаболизме животных, бактериальных и растительных клеток.
5. Роль каротиноидов в молекулярной организации фотосинтетического аппарата.
6. Механизмы генетической регуляции биосинтеза фотосинтетических пигментов.
7. Катаболизм фотосинтетических пигментов: молекулярные механизмы и физиологическая роль.
8. Роль различных фотосинтетических пигментов в функционировании фотосинтетического аппарата растений.
9. Особенности пигментного состава различных групп водорослей и фотосинтезирующих бактерий.
10. Особенности строения и эволюция хлоропластного генома.
11. Взаимодействие хлоропластов с другими органеллами клетки: механизмы антероградной и ретроградной регуляции.
12. Молекулярная структура лабильной светособирающей антенны, ее роль в адаптации растений к изменяющимся условиям среды.
13. Принципы организации, функционирование и эволюция реакционных центров различных групп фотосинтезирующих организмов.
14. Роль белковых компонентов макромолекулярных пигмент-белковых комплексов в электронном транспорте.
15. Принципы регуляции работы электрон-транспортной цепи фотосинтеза.

16. Альтернативные пути транспорта электронов в фотосинтезе: молекулярные механизмы и физиологические функции.
17. Пути образования активных форм кислорода при функционировании ЭТЦ фотосинтеза. Механизмы инактивации АФК.
18. Структура, молекулярные механизмы функционирования и регуляции работы АТФ-синтазного комплекса.
19. Механизмы регуляции восстановительного пентозофосфатного цикла (C_3 -цикла).
20. Эволюционные причины возникновения C_4 -метаболизма углерода в фотосинтезе и механизмы регуляции данного цикла.
21. Сущность фотодыхания, его физиологическая роль.
22. Теория фотосинтетической продуктивности растений.
23. Фотосинтетическая продуктивность биосферы: глобальная первичная продуктивность и первичная продукция, используемая человеком.
24. Причины и последствия изменения содержания CO_2 в атмосфере.
25. Эволюция фотосинтеза.
26. Фотодеструкция фотосинтетического аппарата, механизмы устойчивости растений к высокой интенсивности света.
27. Фоторецепторные системы растений, их роль в регуляции фотосинтетических процессов.
28. Влияние интенсивности и спектрального состава света на скорость фотосинтеза и накопление конечных продуктов.
29. Физиологические основы поиска новых групп гербицидов. Механизмы гербицидных эффектов.
30. Влияние температуры на фотосинтез. Механизмы адаптации фотосинтетических систем к резкой смене температурного режима.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Суть и глобальное значение фотосинтеза.
2. Уровни организации фотосинтетического аппарата растений.
3. Особенности строения листа как основного органа фотосинтеза.
4. Характеристика пластид растений. Строение хлоропластов. Биогенез хлоропластов.
5. Особенности генетического аппарата пластид.
6. Структурно-функциональная характеристика основных компонентов тилакоидной мембраны. Особенности липидного и жирнокислотного состава тилакоидной мембраны.

7. Хлорофиллы: структура, физико-химические свойства, функции.
8. Биосинтез хлорофилла *a* в растениях.
9. Хлорофилл *b*: строение, функции, особенности биосинтеза.
10. Пути катаболизма хлорофиллов в растениях.
11. Электронно-возбужденное состояние хлорофилла и типы его дезактивации.
12. Каротиноиды: структура, физико-химические свойства, функции.
13. Механизмы защитной функции каротиноидов.
14. Зеаксантиновый цикл: механизм преобразования ксантофиллов и его физиологическая роль.
15. Основные этапы биосинтеза каротиноидов в растениях.
16. Фикобилины: структура, физико-химические свойства, функции.
17. Структурно-функциональная организация светособирающей антенны.
18. Строение и функции лабильной ССА.
19. Механизмы миграции энергии.
20. Структурно-функциональная организация реакционных центров P₆₈₀ и P₇₀₀.
21. Структура и функции фотосистемы I.
22. Структура и функции фотосистемы II.
23. Механизм окисления воды при фотосинтезе. Структура Mn-кластера.
24. Структурно-функциональная характеристика цитохром *b/f*-комплекса. Функционирование Q-окисляющего сайта.
25. Механизм фотовосстановления НАДФ. Z-схема фотосинтеза.
26. Фотофосфорилирование и его типы.
27. Нециклический поток электронов в тилакоидной мембране, механизм формирования электрохимического потенциала.
28. Циклический транспорт электронов в ЭТЦ фотосинтеза.
29. Альтернативные пути переноса электронов в ЭТЦ тилакоидной мембраны и их функциональное значение.
30. Структура и механизм работы АТФ-синтазного комплекса в хлоропластах.
31. Молекулярные механизмы регуляции световых стадий фотосинтеза.
32. Устьичный аппарат и регуляция газообмена при фотосинтезе.
33. Характеристика растений, осуществляющих различные типы метаболизма углерода.
34. C₃-цикл фотосинтеза.

35. Структурно-функциональная характеристика Рубиско, механизмы регуляции его активности.
36. Химизм и физиологическая роль фотодыхания.
37. Анатомо-биохимические особенности C_4 -растений. Локализация основных ферментов C_4 -цикла. Механизмы регуляции цикла.
38. C_4 -цикл фотосинтеза. Особенности работы декарбоксилирующих ферментов у различных представителей C_4 -растений.
39. Особенности САМ-цикла фотосинтеза.
40. Механизмы регуляции активности ферментов фотосинтеза.
41. Зависимость фотосинтеза от концентрации CO_2 и O_2 в атмосфере.
42. Влияние интенсивности и спектрального состава света на фотосинтез. Фотоингибирование.
43. Пути образования и механизмы детоксикации активных форм кислорода в хлоропласте.
44. Зависимость фотосинтеза от температуры. Механизмы термоустойчивости растений.
45. Взаимосвязь фотосинтеза и продуктивности растений. Теория донорно-акцепторных отношений органов в растениях.

ЗАДАЧИ

1. Сколько органического вещества выработает растение за 60 минут, если известно, что интенсивность фотосинтеза составляет 16 мг на 1 дм²/ч, а поверхность листьев составляет 0,5 м².
2. За 5 суток в процессе фотосинтеза растение с площадью листьев 250 дм² накопило 42 г сухой массы. Вычислите чистую продуктивность фотосинтеза.
3. За 1 час в процессе фотосинтеза растение усвоило 480 мг углекислого газа и накопило 0,55 г сухой массы. Вычислите коэффициент эффективности фотосинтеза.
4. За какое время растение с листовой поверхностью 0,8 м² и интенсивностью фотосинтеза равной 34 мг сухого вещества на 1 дм²/ч накопит 200 г сухого вещества.
5. Энергетический выход процесса фотосинтеза равен 0,16. Рассчитайте запасенную энергию, если поглощенная энергия составляет 820 ккал.

6. Чему равен квантовый выход, если при поглощении 1,6 эйнштейн (моль) квантов красного света пигментами фотосинтетического аппарата, синтезировалось 0,02 моль $C_6H_{12}O_6$.
7. Растение с площадью листьев 12 дм^2 усвоило 400 мг CO_2 за 6 часов. Рассчитайте интенсивность фотосинтеза данного растения.
8. Чистая продуктивность фотосинтеза растения с площадью листьев 25 дм^2 составляет $2,8 \text{ г/м}^2 \text{ сут}$. Рассчитать, сколько грамм сухого вещества накопит данное растение в течение суток.
9. Рассчитайте суточный прирост растения в граммах, если известно, что количество ассимилированного растением CO_2 составляет 320 мг/час , коэффициент эффективности фотосинтеза – 2,4, а площадь листьев – $2,8 \text{ м}^2$.
10. Рассчитайте величину хозяйственного урожая растений, если известно, что их биологический урожай равен 45 ц/га , а коэффициент хозяйственной годности – 0,65.
11. Определите величину ассимиляционного числа листа, площадью $0,45 \text{ дм}^2$, который содержит $5,28 \text{ мг/дм}^2$ хлорофилла и поглощает $360 \text{ мг } CO_2$ за 6 часов.
12. Определите количество накопленной органической массы растением с площадью листьев 62 м^2 в течение светового дня (16 часов), если в течение часа образовалось $0,44 \text{ мг}$ сухого вещества на 1 м^2 листовой поверхности, а на дыхание затрачивается 30 % органического вещества.
13. Ассимиляционное число листьев растения равно 6,5. Определите интенсивность фотосинтеза ($\text{мг } CO_2/\text{г ткани}$), если содержание хлорофилла в ткани листа составляет $5,2 \text{ мг/г}$.
14. Рассчитайте, какое количество молей АТФ и НАДФН расходуется растением при образовании 100 г глюкозы по C_3 -пути фотосинтеза.
15. Рассчитайте КПД световых реакций фотосинтеза, если при образовании 2 моль НАДФН поглощается по 12 эйнштейн (моль) квантов синего и красного света ($G_{\text{НАДФН}} = 52,5 \text{ ккал/моль}$; $h\nu_{\text{кр}} = 40 \text{ ккал/моль}$; $h\nu_{\text{син}} = 72 \text{ ккал/моль}$).
16. Рассчитайте КПД темновых реакций фотосинтеза C_4 -растений, если при образовании 1 моль глюкозы, расходуется 5 моль АТФ и 2 моль НАДФН. Сравните с эффективностью темновых реакций фотосинтеза C_3 - и САМ-растений, ($G_{\text{НАДФН}} = 52,5 \text{ ккал/моль}$; $G_{\text{АТФ}} = 11 \text{ ккал/моль}$).

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Химическая природа хлорофиллов
 1. Тетратерпены
 2. Тетрапирролы
 3. Гликозиды
 4. Эфиры
 5. Магний порфирины
2. Сколько сопряженных двойных связей включает молекула хлорофилла *a*
 1. 3
 2. 5
 3. 10
 4. 12
 5. 15
 6. 18
3. Отличия химической структуры хлорофилла *b* от хлорофилла *a*
 1. Наличие альдегидной группы вместо метильной во втором пиррольном кольце
 2. Наличие этильной группы вместо метильной во втором пиррольном кольце
 3. Отсутствие оксогруппы в третьем кольце
 4. Седьмая и восьмая связи в четвертом кольце не гидрированы
4. Какие особенности хлорофилла связаны с наличием радикала спирта фитола $C_{20}H_{39}OH$?
 1. Определяет цвет пигмента;
 2. Имеет способность к выборочному поглощению света;
 3. Способствует пространственной ориентации молекул хлорофилла в мембране хлоропласта.
5. На какие свойства хлорофиллов влияет атом магния в центре тетрапиррольного кольца
 1. Определяет растворимость в полярных и неполярных растворителях
 2. Изменяет спектральные свойства
 3. Формирует заряд молекулы хлорофилла
 4. Определяет закрепление молекулы в мембране
6. Какая часть молекулы хлорофилла является хромофорной
 1. Атом магния;
 2. Фитольный “хвост”;
 3. Порфириновое кольцо, замкнутое через атомы азота на атом магния.
7. Где осуществляется синтез хлорофилла
 1. В цитоплазме
 2. В строме хлоропласта
 3. В люмене
 4. На тилакоидной мембране

8. Какое соединение является исходным при синтезе 5-аминолевулиновой кислоты у высших растений

1. Глицин
2. Сукцинил-КоА
3. Ацетат
4. Глутаминовая кислота

9. Какое соединение образуется при циклизации двух молекул аминолевулиновой кислоты

1. Копропорфириноген
2. Уропорфириноген
3. Порфобилиноген
4. Протопорфирин

10. Химическая природа каротиноидов

1. Производные пиррола
2. Производные изопрена
3. Тетратерпены
4. Гликозиды

11. Отличия ксантофиллов от каротинов

1. Содержат иононовые кольца
2. Не содержат двойных связей
3. Не содержат остатков изопрена
4. Содержат гидроксигруппы
5. Содержат эпоксигруппы

12. Функции каротиноидов в растении

1. Поглощение солнечной энергии
2. Участие в миграции энергии к реакционному центру
3. Запуск фотохимической реакции
4. Защита от фотодинамического повреждения мембраны
5. «Тушение» триплетного хлорофилла и синглетного кислорода.

13. Химическая природа фикобилинов

1. Циклические тетрапирролы
2. Нециклические тетрапирролы
3. Белки
4. Гликозиды

14. Для каких групп растений характерны фикобилины

1. Высшие растения
2. Зеленые водоросли
3. Синезеленые водоросли
4. Бурые водоросли
5. Красные водоросли

15. Какие фотосинтетические пигменты образуют ковалентные связи с белками
1. Хлорофилл *a*
 2. Хлорофилл *b*
 3. Хлорофилл *c*
 4. Каротиноиды
 5. Фикобилины
16. На какие энергетические уровни переходит электрон при поглощении кванта света молекулой хлорофилла
1. S_0
 2. S_1
 3. S_2
 4. T_1
17. К излучательным процессам дезактивации молекулы хлорофилла относятся
1. Флюоресценция
 2. Фосфоресценция
 3. Превращение энергии возбуждения в тепло
 4. Перенос фотона на другую молекулу
 5. Запуск фотохимической реакции
18. Квант света, испускаемый при фосфоресценции, отличается от кванта света при флуоресценции
1. Меньшей энергией
 2. Большей энергией
 3. Не отличается
19. Излучательный процесс дезактивации молекулы хлорофилла из триплетного возбужденного состояния называется
1. Хемилюминесценцией
 2. Флуоресценцией
 3. Фосфоресценцией
20. Основные липиды тилакоидной мембраны
1. Фосфолипиды
 2. Гликолипиды
 3. Сульфолипиды
21. Каким образом изменяется величина окислительно-восстановительного потенциала переносчиков фотосистем при движении возбужденного электрона?
1. Возрастает;
 2. Остается без изменений;
 3. Снижается.
22. Как используется энергия электронов, движущихся по системе переносчиков фотосистем?
1. Идет на флуоресценцию;
 2. Рассеивается в виде тепла;
 3. Запасается в форме химической энергии.

23. Какие компоненты тилакоидной мембраны участвуют в циклическом фотофосфорилировании

- | | |
|--------------------------|------------------|
| 1. ФС 1 | 5. Пластоцианины |
| 2. ФС 2 | 6. Ферредоксин |
| 3. цитохром b/f-комплекс | 7. Вода |
| 4. Пластохиноны | 8. Кислород |

24. Какие компоненты тилакоидной мембраны участвуют в нециклическом фотофосфорилировании

- | | |
|--------------------------|------------------|
| 1. ФС 1 | 5. Пластоцианины |
| 2. ФС 2 | 6. Ферредоксин |
| 3. цитохром b/f-комплекс | 7. Вода |
| 4. Пластохиноны | 8. Кислород |

25. Назовите продукты нециклического фотофосфорилирования

- | | |
|-----------|----------|
| 1. H_2O | 4. АТФ |
| 2. O_2 | 5. НАДН |
| 3. CO_2 | 6. НАДФН |

26. Назовите продукты циклического фотофосфорилирования

- | | |
|-----------|----------|
| 1. H_2O | 4. АТФ |
| 2. O_2 | 5. НАДН |
| 3. CO_2 | 6. НАДФН |

27. Назовите продукты псевдоциклического фотофосфорилирования

- | | |
|-----------|----------|
| 1. H_2O | 4. АТФ |
| 2. O_2 | 5. НАДН |
| 3. CO_2 | 6. НАДФН |

28. Каково происхождение O_2 , одного из продуктов фотосинтеза?

1. Выделяется при разложении воды;
2. Выделяется при разложении CO_2 ;
3. Образуется при синтезе АТФ.

29. Какие вещества образуются в световой фазе фотосинтеза?

- | | |
|-------------|-------------|
| 1. CO_2 | 5. O_2 ; |
| 2. H_2O | 6. $НАДФ^+$ |
| 3. Глюкоза, | 7. НАДН |
| 4. АТФ | 8. НАДФН |

30. Какие вещества образуются в темновой стадии фотосинтеза?

- | | |
|-------------|-------------|
| 1. CO_2 | 5. O_2 ; |
| 2. H_2O | 6. $НАДФ^+$ |
| 3. Глюкоза, | 7. НАДН |
| 4. АТФ | 8. НАДФН |

31. Какие компоненты входят в состав светособирающих антенн
- | | |
|----------------|---------------|
| 1. Хл а | 4. РЦ |
| 2. Хл в | 5. Белки |
| 3. Каротиноиды | 6. Мп-кластер |
32. Какие переносчики входят в состав ФС I
- | | |
|-----------------|-----------------|
| 1. Хл а | 4. Пластохинон |
| 2. Феофитин | 5. Пластоцианин |
| 3. Fe-S-кластер | 6. Мп-кластер |
33. Какие переносчики входят в состав ФС II
- | | |
|-----------------|-----------------|
| 1. Хл а | 4. Пластохинон |
| 2. Феофитин | 5. Пластоцианин |
| 3. Fe-S-кластер | 6. Ферредоксин |
34. Что служит источником электронов для восстановления РЦ ФС I
- | | |
|--------------------------|-----------------|
| 1. Вода | 4. Пластохинон |
| 2. Кислород | 5. Пластоцианин |
| 3. цитохром b/f-комплекс | 6. Ферредоксин |
35. Что служит источником электронов для восстановления РЦ ФС II
- | | |
|--------------------------|-----------------|
| 1. Вода | 4. Пластохинон |
| 2. Кислород | 5. Пластоцианин |
| 3. цитохром b/f-комплекс | 6. Ферредоксин |
36. В каких структурах тилакоидной мембраны осуществляется фотоокисление воды
- | | |
|--------------------------|-----------------|
| 1. ФС I | 4. Пластоцианин |
| 2. ФС II | 5. Fe-S-кластер |
| 3. Цитохром b/f-комплекс | 6. Мп-кластер |
37. В каких структурах происходит световая стадия фотосинтеза
- | | |
|-------------------------|----------------------------------|
| 1. Строма хлоропласта | 4. Митохондрии |
| 2. Гранальные тилакоиды | 5. Цитоплазма |
| 3. Ламеллы | 6. Наружная мембрана хлоропласта |
38. В каких структурах происходит темновая стадия фотосинтеза
- | | |
|-------------------------|----------------|
| 1. Строма хлоропласта | 4. Митохондрии |
| 2. Гранальные тилакоиды | 5. Цитоплазма |
| 3. Ламеллы | 6. Вакуоль |
39. Какую функцию выполняет АТФ-синтаза
1. Формирование градиента протонов на тилакоидной мембране
 2. Сопряжение транспорта электронов с синтезом АТФ
 3. Гидролиз АТФ в ходе фиксации CO₂
 4. Транспорт электронов в ЭТЦ

40. За счет чего происходит формирование градиента протонов на тилакоидной мембране

1. Работы Fe-S-кластера
2. Работы пула пластохинонов
3. Работы АТФ-синтазы
4. Фотоокисления воды

41. Какая структура фотосинтетической мембраны ответственна за сопряжение транспорта электронов с синтезом АТФ?

- | | |
|--------------------------|------------------------|
| 1. Марганцевый кластер | 4. Пластоцианины |
| 2. Цитохром b/f-комплекс | 5. Фосфолипиды мембран |
| 3. Пластохиноны | 6. АТФ-синтаза |

42. Какие процессы происходят в световых стадиях фотосинтеза

1. Поглощение квантов света
2. Поглощение углекислого газа
3. Выделение кислорода
4. Синтез АТФ
5. Синтез сахаров
6. Восстановление НАДФ⁺

43. Назовите акцептор CO₂ в C₄-цикле

1. Яблочная кислота
2. Фосфоглицериновая кислота
3. Рибулозобисфосфат
4. Фосфоенолпируват

44. Назовите акцептор CO₂ в C₃-цикле

1. Щавелево-уксусная кислота
2. Яблочная кислота
3. Фосфоглицериновая кислота
4. Рибулозобисфосфат
5. Фосфоенолпируват

45. Назовите первичные продукты C₄-цикла

1. Щавелево-уксусная кислота
2. Яблочная кислота
3. Фосфоглицериновая кислота
4. Рибулозобисфосфат
5. Фосфоенолпируват

46. Назовите первичные продукты C₃-цикла

1. Щавелево-уксусная кислота
2. Яблочная кислота
3. Фосфоглицериновая кислота
4. Рибулозобисфосфат
5. Фосфоенолпируват

47. Какие вещества накапливаются у САМ-растений ночью
1. Щавелево-уксусная кислота
 2. Яблочная кислота
 3. Фосфоглицериновая кислота
 4. Рибулозобисфосфат
 5. Фосфоенолпируват
48. Назовите фермент, осуществляющий реакцию карбоксилирования в САМ-цикле
1. Рибулозобисфосфаткарбоксилаза
 2. ФЕП-карбоксикиназа
 3. ФЕП-карбоксилаза
 4. Рибулозобисфосфатдегидрогеназа
 5. Малатдегидрогеназа
49. Какие из перечисленных растений относятся к САМ-растениям
- | | |
|--------------|----------------------|
| 1. Молочай | 4. Финиковая пальма |
| 2. Толстянка | 5. Сахарный тростник |
| 3. Кукуруза | 6. Агава |
50. Какие из перечисленных растений относятся к C_4 -растениям
- | | |
|-------------|----------------------|
| 1. Кактусы | 4. Яблоня |
| 2. Орхидеи | 5. Сахарный тростник |
| 3. Кукуруза | 6. Агава |

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Аверина Н.Г.* Биосинтез тетрапирролов в растениях / Н.Г. Аверина, Е.Б. Яронская. – Минск: Беларус. навука. 2012. – 413 с.
2. *Аликов Х. К.* Фотоколориметрический метод определения содержания углерода в листьях мокрым сжиганием в хромовой смеси // Методы комплексного изучения фотосинтеза. Л., 1983. С. 6–14.
3. *Андрианов Ю.Е.* Хлорофилл и продуктивность растений / Ю.Е. Андрианов, И.А. Тарчевский. – М.: Наука. 2000. – 327 с.
4. *Владимиров Ю.А.* Физико-химические основы фотобиологических процессов / Ю.А. Владимиров, А.Я. Потапенко – М.: Высшая школа, 1989.
5. *Гудвин Т.* Введение в биохимию растений / Т. Гудвин, Э. Мерсер. – М.: Мир. 1986. Т. 1-2.
6. *Клейтон Р.* Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели. – М.: Мир, 1984. – 350 с.
7. *Кочубей С.М.* Организация фотосинтетического аппарата высших растений. – Киев: Альтерпресс. 2001. – 231 с.

8. Мокроносов А.Т. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты / А.Т. Мокроносов, В.Ф. Гавриленко, Т.В. Жигалова. – М.: Академия. 2006. – 448 с.
9. Рубин А.Б. Регуляция первичных процессов фотосинтеза / А.Б. Рубин, Т.Е. Кренделева // Успехи биологической химии. – Т. 43. 2003. – С. 225-266.
10. Третьяков Н. Н., Карнаухова Т. В., Паничкин Л. А. Практикум по физиологии растений. М.: Агропромиздат, 1990. С. 109–113.
11. Фотосинтез. Под ред. Говинджи. – М.: Мир. Т. 1, 2. 1987. – 743 с.
12. Хелдт Г.-В. Биохимия растений // Г.-В. Хелдт. – М. Бином. 2011. – 471 с.
13. Шалыго Н.В. Биогенез хлорофилла и фотодинамические процессы в растениях. – Мн.: ИООО «Право и экономика». 2004. – 156 с.
14. Шувалов В.А. Преобразование солнечной энергии в первичном акте разделения зарядов в реакционном центре фотосинтеза. – М.: Наука. 2000. – 50 с.
15. Эдвардс Дж. Фотосинтез C_3 - и C_4 -растений: механизмы и регуляция / Дж. Эдвардс, Д. Уокер. – М.: Мир, 1986. – 598 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	3
Предисловие	4
Часть I. ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАНЯТИЯ	
Лабораторная работа № 1. Влияние фотодинамических гербицидов на уровень фотосинтетических пигментов в листьях пшеницы и гороха	5
Лабораторная работа № 2. Выделение хлоропластов методом дифференциального центрифугирования	9
Лабораторная работа № 3. Влияние разобщителей ЭТЦ на фотохимическую активность хлоропластов	14
Лабораторная работа № 4. Влияние интенсивности освещения на скорость накопления органических веществ C_3 - и C_4 - растениями	17
Лабораторная работа № 5. Определение активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы	21
Лабораторная работа № 6. Определение активности фосфенолпируваткарбоксилазы	24
Часть II. ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ ДЛЯ КОНТРОЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ	
Темы рефератов	27
Контрольные вопросы	28
Задачи	30
Тестовые задания	32
Рекомендуемая литература	38

Учебное издание

Филипцова Галина Григорьевна

ФОТОСИНТЕЗ

**Методические рекомендации к лабораторным занятиям,
задания для самостоятельной работы и контроля знаний
студентов биологического факультета**

В авторской редакции

Ответственный за выпуск *Г. Г. Филипцова*

Подписано в печать 20.09.2017. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,0. Тираж 50 экз.

Белорусский государственный университет.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Отпечатано с оригинала-макета заказчика
на копировально-множительной технике
биологического факультета
Белорусского государственного университета.
Ул. Курчатова, 10, 220064, Минск.