

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

---

# **ВОДНЫЙ РЕЖИМ И ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ**

**Методические рекомендации  
к лабораторным занятиям по курсу  
«Физиология растений» для студентов  
биологического факультета**

МИНСК

2013

УДК 581.1(076.1)(075.8)  
ББК 28.57я73  
В62

Авторы:

**А. П. Кудряшов, Т. И. Дитченко, Г. Г. Филипцова,  
И. И. Смолич, О. В. Молчан, С. Н. Найдун,  
В. И. Левченко, М. П. Шапчиц, О. Г. Яковец**

Рекомендовано советом  
биологического факультета  
12 сентября 2012 г., протокол № 1

Рецензент  
доктор биологических наук *В.В. Карпук*

**Водный режим и дыхание растений: метод. рекоменда-**  
В62 **ции к лабораторным занятиям по курсу «Физиология рас-**  
**тений» для студентов биол. фак. / А. П. Кудряшов [и др.]. –**  
**Минск: БГУ, 2013. – 45 с.**

Данное пособие является составным элементом учебно-методического комплекса по курсу «Физиология растений». В нем приведены методические рекомендации, необходимые для выполнения лабораторных работ по темам «Водный режим» и «Дыхание растений».

Предназначено для студентов биологического факультета, обучающихся по специальностям «Биология», «Биоэкология», «Биохимия» и «Микробиология».

УДК 581.1(076.1)(075.8)  
ББК 28.57Я73

© БГУ, 2013

## ОТ АВТОРОВ

Методическое пособие включает ряд лабораторных работ, целью выполнения которых является углубление теоретических знаний, а также приобретение навыков в организации и проведении исследований в области изучения водного режима и дыхания растений. В первой части приведены лабораторные работы, которые позволят студентам ознакомиться с физиологическими процессами, связанными с водным балансом растения, поглощением воды, транспортом ее по растению и транспирацией. Во второй части пособия представлены работы по изучению основных показателей дыхания растений и активности дыхательных ферментов.

Знания и навыки, полученные при выполнении работ, их осмысление позволят стимулировать интерес студентов к физиологии растений, закрепить теоретический материал по данному курсу, а также помогут наглядно продемонстрировать соответствующие процессы при преподавании биологии в школе.

## Часть I

# ВОДНЫЙ РЕЖИМ РАСТЕНИЙ

---

Вода играет важную роль в жизни растения. Она – превосходный растворитель для полярных веществ, в водной среде протекают все реакции обмена веществ. Вода является средой, в которой происходит диффузия растворенных соединений по клеткам и тканям растения. Кроме того, вода – донор электронов и протонов при фотосинтезе.

Вода является основным компонентом большинства растительных клеток и тканей. Содержание воды в растении является видоспецифичным признаком и варьирует в зависимости от возраста и физиологического состояния, а также типа ткани. В большинстве тканей растений содержание воды составляет 80–95%. В то время как в некоторых сухих семенах уровень воды не превышает 10%. Однако для того, чтобы они стали метаболически активными, содержание воды в них должно существенно увеличиться.

Почти вся поглощаемая растением вода поступает в него через корни. Лишь незначительная часть поглощается надземной частью растения. Водобмен растений складывается из неразрывно связанных процессов: 1) поглощения воды, 2) ее передвижения по растению и 3) транспирации.

Вода поступает в растения, главным образом, за счет осмотических сил, перемещаясь от участков с высоким водным потенциалом почвы к участкам с более низким водным потенциалом корня. К клеткам надземной части растения вода доставляется благодаря восходящему току по ксилеме. Восходящий водный ток обуславливается работой верхнего (транспирация) и нижнего (корневое давление) концевых двигателей. Некоторый вклад в транспорт воды по растению оказывают капиллярные силы, возникающие в тонких проводящих сосудах.

## 1.1. ПОСТУПЛЕНИЕ ВОДЫ В РАСТИТЕЛЬНУЮ КЛЕТКУ

### *Лабораторная работа 1*

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДНОГО ПОТЕНЦИАЛА ПО ИЗМЕНЕНИЮ РАЗМЕРОВ ТКАНЕЙ

**Вводные замечания.** Существуют 3 механизма поступления воды в растительную клетку: 1) осмотический; 2) коллоидно-химический (набухание биокolloидов); 3) электроосмос (перемещение диполей воды, вызванное электрохимическим потенциалом на мембране).

Поглощение воды клетками осуществляется преимущественно осмотическим путем, а механизмом транспорта является диффузия. Под осмосом понимают диффузию растворителя через избирательно проницаемую мембрану, каковую представляет собой биологическая мембрана (см. раздел «Физиология растительной клетки»). Молекулы воды диффундируют против градиента концентрации из менее концентрированного раствора в более концентрированный, в результате чего объем концентрированного раствора увеличивается. Вода поступает в клетку за счет осмоса до тех пор, пока разность потенциалов воды по обе стороны плазмалеммы не станет равной нулю:

$$\Delta\Psi = 0 \quad (1)$$

Следовательно, водный потенциал характеризует способность воды диффундировать, поглощаться или испаряться. Он имеет размерность давления и его величину выражают в атмосферах, барах или Паскалях ( $1 \text{ атм.} = 1,013 \text{ бар} = 10^5 \text{ Па}$ ).

Малоэластичные клеточные стенки допускают увеличение объема лишь в малых пределах, поэтому вследствие осмотического поступления воды в клетке быстро возникает гидростатическое давление, называемое тургором или тургорным давлением (Т). Водный потенциал клетки (или ткани) можно выразить в виде уравнения:

$$\Psi = T - P \quad (2)$$

Следовательно, способность клетки поглощать воду является разностью осмотического (Р) и тургорного давлений (Т):

Водный потенциал клетки (ткани) колеблется в пределах от нуля (при погружении клеток (ткани) в чистую воду тургорное давление дос-

тигает максимального значения, его величина становится равной осмотическому давлению клеточного сока и водный потенциал оказывается равным нулю) до  $\Psi = -P$  (в состоянии завядания или плазмолиза тургорное давление отсутствует и водный потенциал клетки по абсолютной величине равен осмотическому давлению клеточного сока).

Клетки наземных растений, как правило, не бывают насыщены водой, и у них  $T < P$ , в результате чего вода из почвенного раствора поступает в корневую систему растений.

Таким образом, способность клетки поглощать воду зависит от осмотического давления клеточного сока, тургорного давления, которое определяется эластичностью клеточной стенки и содержанием воды в клетке, а также степени набухания биокolloидов цитоплазмы и клеточной стенки (этот механизм является основным в покоящихся семенах и в клетках меристематических тканей, в которых не развита вакуоль). В клетках с большой центральной вакуолью поглощение воды в значительной мере зависит от осмотических свойств клеток.

Водный потенциал клеток (ткани) можно определить в опытах с использованием растворов с различным осмотическим давлением.

*Цель работы:* определить водный потенциал и тургорное давление ткани клубня картофеля.

*Материалы и оборудование:* 10 пробирок объемом 10 мл, 1 М растворы NaCl или сахарозы, клубни картофеля, скальпель, миллиметровая бумага.

### Ход работы

Приготовить в пробирках по 10 мл растворов NaCl или сахарозы в следующих концентрациях: 1,0; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1, смешивая соответствующие количества молярного раствора и дистиллированной воды (см. табл. 1). В одну пробирку налить 10 мл дистиллированной воды.

Таблица 1

Концентрация опытного раствора, М	Количество 1 М раствора, мл	Количество дистиллированной воды, мл
0,8	8,0	2,0
0,7	7,0	3,0
0,6	6,0	4,0
0,5	5,0	5,0
0,4	4,0	6,0
0,3	3,0	7,0
0,2	2,0	8,0
0,1	1,0	9,0

Вырезать из клубня картофеля пластинку толщиной 3–4 мм (резать рекомендуется поперек клубня). Из этой пластинки вырезать прямоугольник длиной 40–60 мм, после чего разрезать его вдоль на несколько (по числу приготовленных растворов) одинаковых по длине полосок шириной 2–3 мм. Измерить их исходную длину ( $l_0$ ) и погрузить в приготовленные растворы. Это необходимо делать быстро, не допуская увядания полосок картофеля. Через 30 мин достать полоски из растворов и измерить их длину ( $l_n$ ), используя миллиметровую бумагу. Результаты занести в таблицу 2.

На основании измерений рассчитать изменения длины полосок (%) в каждом растворе по формуле:

$$\Delta l = \frac{l_n - l_0}{l_0} \cdot 100\% \quad (3)$$

Таблица 2

Концентрация растворов, М	1,0	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	H <sub>2</sub> O
Исходная длина полоски, ( $l_0$ )										
Длина полоски через 30 мин, ( $l_n$ )										
$\Delta l$ , %										

Используя полученные данные, построить график зависимости изменения длины полосок от концентрации наружного раствора (рис. 1).

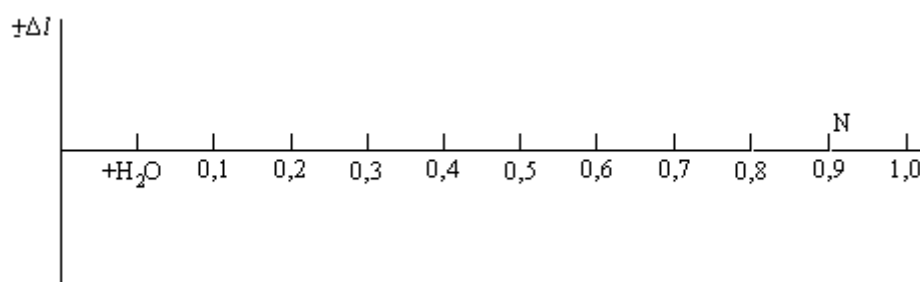


Рис. 1. Изменение длины полосок в зависимости от концентрации наружного раствора

На основании графика установить концентрации растворов, где клетки находятся в состоянии полного тургора, частичного тургора и его отсутствия. Определить гипертонические, гипотонические и изотониче-

скую концентрации наружного раствора по отношению к концентрации клеточного сока клубня картофеля используя уравнение Вант-Гоффа:

$$P = iCRT \quad (4)$$

где  $i$  – изотонический коэффициент;  $C$  – концентрация;  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $T$  – абсолютная температура.

Для определения зависимости величины водного потенциала от степени насыщения клеток водой рассчитывают водный потенциал, осмотическое и тургорное давления, характеризующие состояние тканей клубня после пребывания их в растворах, и данные заносят в таблицу 3.

Таблица 3

Концентрация растворов, М	1,0	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	H <sub>2</sub> O
Длина полоски, мм, ( $l_n$ )	$l_1$	$l_2$	$l_3$	$l_4$	$l_5$	$l_6$	$l_7$	$l_8$	$l_9$	$l_{10}$
Водный потенциал, атм. ( $\Psi$ )	$S_1$	$S_2$	$S_3$	$S_4$	$S_5$	$S_6$	$S_7$	$S_8$	$S_9$	$S_{10}$
Осмотическое давление клеток, атм. ( $P$ )	$P_1$	$P_2$	$P_3$	$P_4$	$P_5$	$P_6$	$P_7$	$P_8$	$P_9$	$P_{10}$
Тургорное давление, атм. ( $T$ )	$T_1$	$T_2$	$T_3$	$T_4$	$T_5$	$T_6$	$T_7$	$T_8$	$T_9$	$T_{10}$

*Длина полосок, ( $l_n$ ).* В таблицу заносят длину полосок после пребывания их в растворах. В случае совпадения длины полосок в нескольких самых концентрированных растворах (например, 1,0; 0,8; 0,7; 0,6 М) для последующих расчетов берут величину, относящуюся к наиболее слабому из них (в приведенном примере – 0,6 М, поскольку уже при этой концентрации клеточные стенки достигли предела сокращений).

*Водный потенциал, ( $\Psi$ ).* Поскольку полоски достаточно долго пролежали в растворах и перестали изменяться в длине, считается, что  $\Psi$  клеток сравнялся по абсолютной величине с осмотическим давлением соответствующего раствора ( $\Psi = -P$ ). Поэтому водный потенциал клеток вычисляется по уравнению Вант-Гоффа для каждого раствора.

*Осмотическое давление клеточного сока, ( $P$ ).* Для самой короткой полоски характерно отсутствие тургора, следовательно,  $T_1 = 0$ , а исходя из уравнения  $\Psi = T - P$ ,  $\Psi_1 = -P_1$ . Остальные полоски имеют все более разбавленный клеточный сок, поэтому  $P$  уменьшается обратно пропорционально длине полосок. Таким образом, осмотическое давление ( $P$ ) вычисляется по формуле:



$$P_2 = \frac{P_1 \cdot l_1}{l_2}, \quad P_3 = \frac{P_1 \cdot l_1}{l_3} \text{ и т. д.}$$

Тургорное давление клеток ( $T$ ) Тургорное давление находят по формуле  $\Psi = T - P$ , откуда  $T_1 = 0$ ,  $T_2 = P_2 - S_2$ ,  $T_3 = P_3 - S_3$  и т. д.

Используя данные таблицы 3, необходимо построить диаграмму. Для этого на оси абсцисс отложить длину полосок (от  $l_1$  до  $l_{10}$ ) в мм, причем точку пересечения осей обозначить  $l_1$ , а на оси ординат обозначить сначала величину  $P$ , соответствующую каждой длине полоски, затем значения  $T$ . Нанесенные точки соединить линиями. Получатся графики зависимости  $P$  и  $T$  от степени насыщения клеток водой. Образец диаграммы показан на рис. 2.

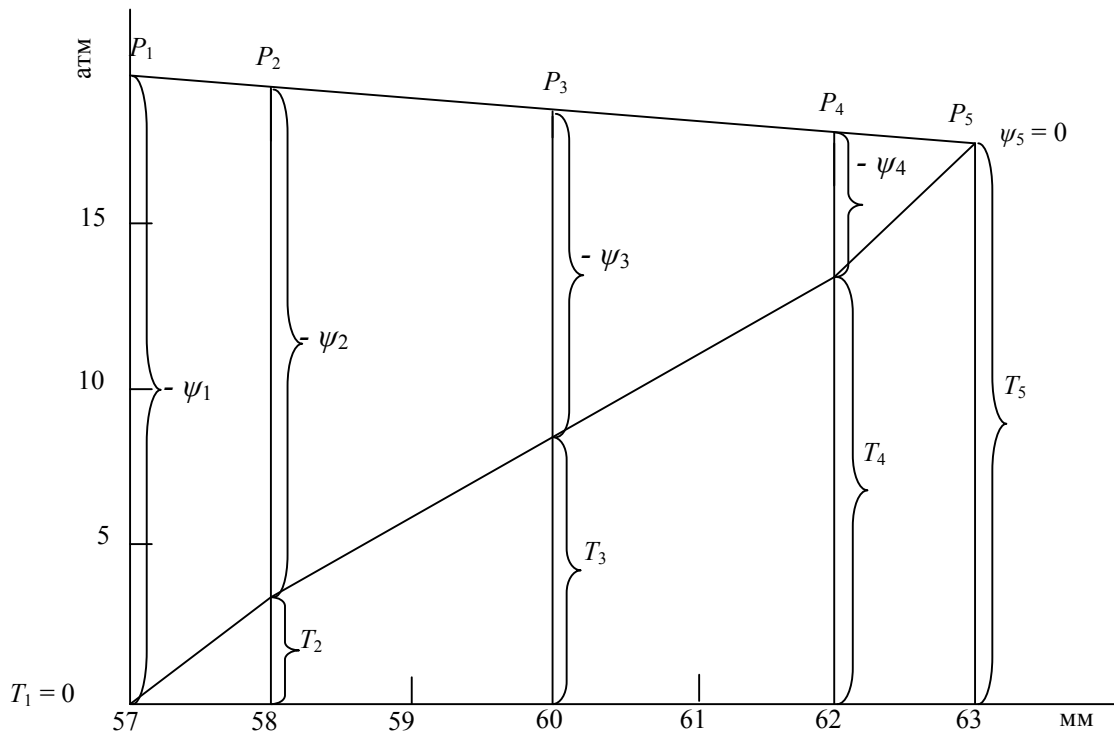


Рис. 2. Изменение водного потенциала и тургорного давления растительной ткани в зависимости от концентрации наружного раствора

### Контрольные вопросы

1. Какую роль играет вода в жизни растения?
2. Что такое водный потенциал, и от каких факторов он зависит?
3. Как соотносятся водный потенциал, осмотическое и тургорное давление в клетке?

## Лабораторная работа 2

# ВЛИЯНИЕ ДИНИТРОФЕНОЛА НА ПОСТУПЛЕНИЕ ВОДЫ В ТКАНЬ КЛУБНЯ КАРТОФЕЛЯ

**Вводные замечания.** Поступление воды в растительную ткань обусловлено как осмотической, так и метаболической составляющей. Показано, что факторы, стимулирующие дыхание, стимулируют и поступление  $H_2O$  в клетку, а факторы, ингибирующие дыхание или разобщающие этот процесс и синтез АТФ, уменьшают поступление  $H_2O$ .

В процессе дыхания происходит сопряженный с окислительно-восстановительными реакциями синтез АТФ. Наиболее «энергодающей» стадией дыхания является работа электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий и сопряженный с ней синтез АТФ (окислительное фосфорилирование). Разобщение потока электронов и синтеза АТФ может быть достигнуто искусственно, при использовании специфических веществ – разобщителей фосфорилирования. Одно из них – 2,4-динитрофенол (ДНФ). ДНФ не изменяет или даже несколько усиливает интенсивность окисления субстрата при дыхании, но подавляет синтез АТФ в митохондриях, т. е. разобщает процессы окисления и фосфорилирования. Поэтому ДНФ используют как средство установления зависимости того или иного процесса от энергии дыхания.

**Цель работы:** установить влияние интенсивности процесса дыхания на скорость поступления воды в растительную ткань.

**Материалы и оборудование.** Клубни картофеля, скальпель или нож, дощечка кулинарная для резки, пинцет, бюксы, стеклянные пипетки на 10 мл или мерные цилиндры, фильтровальная бумага,  $10^{-2}$  М раствор ДНФ, весы.

### Ход работы

Из клубня картофеля приготовьте 15 пластинок длиной и шириной около 1,5 см и толщиной 2–3 мм. Разделите их на три группы, каждую взвесьте и поместите в бюксы. Одну группу пластинок залейте 15 мл воды, вторую – 15 мл раствора ДНФ концентрацией  $10^{-2}$  М, третью – 15 мл раствора ДНФ концентрацией  $10^{-3}$  М, оставьте в открытых бюксах при комнатной температуре на 1,5–2 ч. По истечении указанного времени выньте пластинки, просушите фильтровальной бумагой и снова взвесьте.

Рассчитайте разность конечной ( $m_n$ ) и исходной массы ( $m_0$ ), которая показывает, сколько воды поступило в ткань в каждом варианте опыта.

$$\Delta m = \frac{m_n - m_0}{m_0} \cdot 100\%$$

Таблица 4

Условия	Масса пластинок из ткани клубня, г		Прибавка в весе, %
	Исходная масса, $m_0$	Конечная масса, $m_n$	
Вода			
$10^{-2}$ М 2,4-ДНФ			
$10^{-3}$ М 2,4-ДНФ			

На основании полученных данных сделайте вывод о влиянии 2,4-ДНФ на поступление воды в ткань клубня картофеля и роли метаболических процессов в транспорте воды.

### **Контрольные вопросы**

1. Каким образом 2,4-ДНФ влияет на поступление воды в растения?
2. Зависит ли способность клеток поглощать и удерживать воду от АТФ?

### **Лабораторная работа 3**

## **РОЛЬ ОСМОТИЧЕСКИХ ЯВЛЕНИЙ В ПРОЦЕССАХ ПОСТУПЛЕНИЯ ВОДЫ В РАСТИТЕЛЬНУЮ КЛЕТКУ**

**Вводные замечания.** Плазматическая мембрана, окружающая живую клетку избирательно проницаема: она хорошо пропускает воду и избирательно пропускает вещества, растворенные в ней. Как уже отмечалось, осмотические явления играют главенствующую роль в процессах поступления воды в растения. За счет осмотических сил вода поглощается растительной клеткой, если концентрация осмотически активных веществ в цитозоле выше, чем в среде.

Для демонстрации закономерностей поглощения воды растительной клеткой можно воспользоваться модельной системой – гигантскими клетками междуузлий харовых водорослей *Nitella flexilis*. Для харовых водорослей характерен уникальный таллом, имеющий мутовчатое строение. Клетки междуузлий *Nitella flexilis* могут достигать в длину 10 см, а в ширину 1–2 мм. Внутри клеток создается высокое гидростатическое давление (тургор), благодаря чему они остаются упругими и не «переламываются» после извлечения из воды.

**Цель работы:** изучить взаимосвязь между осмотической силой наружного раствора и скоростью потока воды в клетку.

**Материалы и оборудование.** Клетки междуузлий харовой водоросли *Nitella flexilis*, дистиллированная вода, 1 М раствор сахарозы или NaCl, секундомер, предметные стекла, препаровальная игла.

### Ход работы

Кончиком препаровальной иглы возьмите 3 клетки междуузлий *Nitella flexilis* за остатки «листьев», извлеките их из воды. Клетки в воздухе должны сохранять форму и пружиняще противостоять принудительному сгибанию (рис. 3). Аккуратно удалите с поверхности клеток капельки воды фильтровальной бумагой и положите каждую отдельно на сухое предметное стекло на 3–5 мин. За указанный период времени часть воды, содержащейся внутри клеток, испарится, что приведет к потере тургора. Такие клетки после сгибания уже не восстанавливают форму. Произведите небольшой изгиб на всех клетках (эту процедуру следует делать весьма аккуратно, что не смять клеточную стенку, в противном случае изгиб нарушит целостность плазматической мембраны).

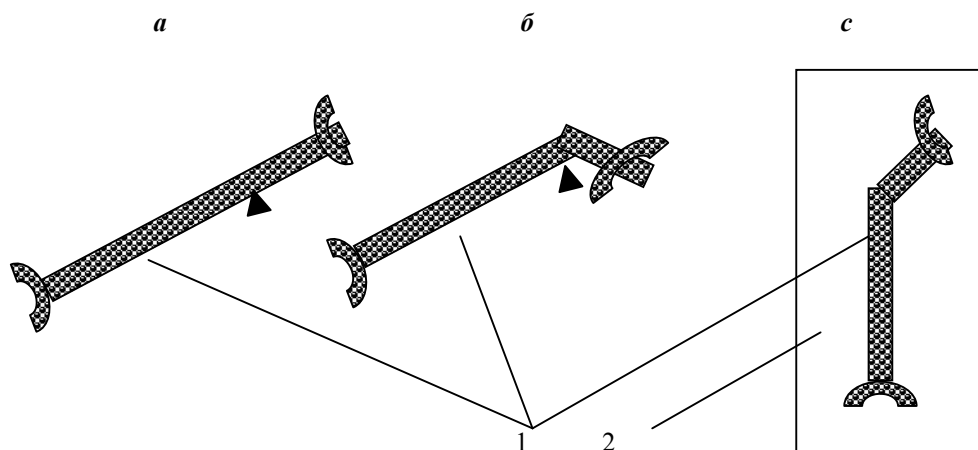


Рис. 3. Положение в пространстве только что вынутой из воды (а) и «подсушенной» (б) клетки междуузлия харовой водоросли, с – схема опыта (пояснения в тексте).

1 – клетка междуузлия харовой водоросли; 2 – предметное стекло.

Если такую клетку опустить в гипотонический раствор, вода станет поступать внутрь клетки, и она вновь станет тургесцентной, что проявляется в выпрямлении междуузлия. Причем скорость поступления воду в клетку зависит от разности осмотических давлений по обе стороны плазмалеммы. Если клетку поместить в гипертонический раствор NaCl или сахарозы (концентрация 0,5 М), она не выпрямится.

Смочите одну из клеток дистиллированной водой, другую – 0,1 М, а третью – 0,5 М раствором сахарозы. Определите время, от момента сма-

чивания до выпрямления клеток, в результате восстановления тургорного давления. Результаты занесите в таблицу.

Таблица 5

Время, сек	Вариант опыта			Примечание
	Дистиллированная вода	0,1 М сахара	0,5 М сахара	

### **Контрольные вопросы**

1. Какие процессы вызывают появление тургорного давления?
2. Какова роль клеточной стенки в процессах поступления воды внутрь растения?
3. Почему деформированные клетки, помещенные в раствор сахара, выпрямляются медленнее, чем погруженные в дистиллированную воду?

## **1.2. ПЕРЕДВИЖЕНИЕ ВОДЫ ПО РАСТЕНИЮ**

Поглощенная клетками корней вода способна передвигаться по всему растению. Происходит это благодаря работе верхнего и нижнего концевых двигателей. Транспорт воды и веществ в тканях одного органа (например, от поверхности корня к проводящим сосудам) называют *ближним* или *радиальным*, а между органами – *дальним*. Ближний транспорт идет по неспециализированным тканям, а для дальнего имеются специальные проводящие ткани – ксилема и флоэма. Радиальный транспорт воды осуществляется как непосредственно через клетки, так и по *апобласту* тканей корня, представляющих собой совокупность клеточных стенок и межклетников. Вода может пересекать мембраны клеток тканей корня вплоть до проводящих сосудов – *трансмембранный* путь, или идти по непрерывному цитоплазматическому пути через соединяющие соседние клетки плазмодесмы – *симпластный* путь.

В результате контактов наземных органов растения с ненасыщенной водой атмосферой происходит транспирация – испарение воды с поверхности растения. Поскольку листья растения формируют большую часть его надземной поверхности, транспирация происходит в основном через листья. Потеря воды в ходе транспирации вызывает снижение водного потенциала поверхностных клеток листа, что, в свою очередь, приводит к транспорту воды из соседних более глубоко лежащих клеток.

Наряду с присасывающим действием транспирации, в поглощении и передвижении воды по растению участвует также нижний концевой дви-

гатель, или корневое давление. Существование корневого давления наглядно проявляется в случае снижения транспирации. Так, при насыщении атмосферы водяными парами наблюдается *гуттация* – выделение капелек воды через гидатоды (водные железы). Если срезать надземную часть растения (или повредить проводящие пучки), на пеньке выделяется жидкость – пасока, вытекающая из сосудов ксилемы. Это явление называют «плачем» растений.

#### *Лабораторная работа 4*

### **ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА СКОРОСТЬ ПЕРЕДВИЖЕНИЯ ВОДЫ ПО РАСТЕНИЮ**

**Вводные пояснения.** Скорость поступления и передвижение воды по растению зависит от ряда внешних факторов. В первую очередь это те факторы, которые прямо или косвенно воздействуют на устьичный аппарат: условия водоснабжения, влажность воздуха, температура, интенсивность света.

Свет оказывает на устьичные движения как прямое, так и косвенное влияние через участие в процессах фотосинтеза. Днем в результате транспирации и накопления водорастворимых продуктов фотосинтеза происходит возрастание осмотического потенциала в клетках листьев, это приводит к снижению их водного потенциала и увеличению скорости поглощения воды растением. Косвенное влияние света на транспирацию связано, прежде всего, с изменениями температуры.

Температура влияет на скорость открывания устьиц. Действие температуры на движение устьиц опосредовано через ее влияние на фотосинтез и дыхание. Зависимость поглощения воды растением от температуры выражается одновершинной кривой. Для большинства растений умеренной зоны оптимальной является температура 25–30°C. При снижении температуры устьица открываются очень медленно и не полностью, происходит уменьшение скорости поступления воды в корневую систему растения, что связано с торможением дыхания и уменьшением водопроницаемости мембран. Так на холодных болотистых почвах наблюдается явление, получившее название физиологической засухи: несмотря на большое количество воды, растения испытывают ее недостаток из-за подавления поглотительной деятельности корней в результате плохой аэрации и низкой температуры. При температуре выше 30°C ин-

тенсивность дыхания выше интенсивности фотосинтеза, в результате чего в межклетниках накапливается  $\text{CO}_2$  и устьица закрываются.

Одним из простейших способов наблюдения за передвижением воды по растению является помещение растения или его части в окрашенный раствор. Рассмотрение срезов стебля, сделанных на различной высоте, под микроскопом позволяет определить высоту поднятия жидкости за определенный промежуток времени.

*Цель работы:* определить влияние температуры воздуха и освещения на скорость передвижения воды по растению.

*Материалы и оборудование:* ветки растений (бальзамин, бегония, колеус), стеклянные стаканы (100 мл), фуксин, микроскоп, предметные и покровные стекла, скальпель или лезвие.

### ***Ход работы***

В 3 стакана налить по 50 мл воды и добавить 3–4 капли фуксина. В подкрашенную жидкость поместить одинаковые свежесрезанные веточки растений и поставить стаканы с ветками в различные условия: 1 стакан – на свет при комнатной температуре, 2 – в темноту, 3 – в холодильник. Через 1,5–2 часа достать веточки из жидкости и сделать поперечные срезы стебля через каждые 5 мм от нижнего края. Рассмотреть срезы под микроскопом и отметить, какая часть стебля окрашена: кора, древесина или сердцевина. Установить, на какую высоту поднялась подкрашенная жидкость, и рассчитать скорость передвижения воды по растению в каждом из вариантов опыта. Результаты эксперимента занести в таблицу. Сделать выводы о влиянии исследуемых факторов среды на скорость передвижения воды по растению.

*Таблица 6*

№	Условия эксперимента	Высота, на которую поднялась подкрашенная жидкость	Скорость передвижения воды, см/ч

### ***Контрольные вопросы***

1. Что является движущей силой передвижения воды по растению?
2. Как изменяется осмотический потенциал в разных частях растения?
3. Назовите внешние факторы, влияющие на скорость поступления и передвижение воды по растению.
4. Как свет влияет на скорость передвижения воды по растению?
5. Чем определяется влияние температуры на скорость поступления воды в растение?

## Лабораторная работа 5

# ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОСМОТИЧЕСКОЙ СИЛЫ НАРУЖНОГО РАСТВОРА НА СКОРОСТЬ ПОГЛОЩЕНИЯ ВОДЫ РАСТЕНИЯМИ

**Вводные замечания.** Поглощение воды корневой системой и ее передвижение по растению осуществляется по градиенту водного потенциала. Т.е. вода поступает в корень только в том случае, если водный потенциал клеток корней меньше водного потенциала почвенного раствора. Например, после дождя почва находится в состоянии *полевой влагоемкости*, ее водный потенциал близок к нулю и вода легко поступает в корни. Понятие полевой влагоемкости применяется для характеристики максимальных размеров запаса почвенной влаги. Показателем минимальных размеров запаса воды является величина *влажности устойчивого завядания*. Под влажностью устойчивого завядания понимают такую влажность почвы, при которой растения остаются увядшими пока в почву не поступит вода.

Выделяют несколько форм почвенной влаги, различающиеся по степени доступности для растений. *Гравитационная вода*, хорошо доступная для растений, заполняет крупные промежутки между частицами почвы. *Капиллярная вода*, заполняет тонкие капилляры в почве и удерживается силами, легко преодолеваемыми корнями. Вода, удерживаемая на поверхности почвенных частиц силами адсорбции, делится на *прочносвязанную (гигроскопическую)* недоступную для растений и *рыхлосвязанную (пленочную)* частично доступную для растений. В среднем легкодоступная для растений влага удерживается в почве с силой до 0,5 МПа, среднедоступная – до 1,0–1,2 МПа, а труднодоступная – до 2,5–3,0 МПа. Количество доступной для растений воды во многом определяет скорость ее поступления в корневую систему растений.

Для определения скорости поглощения воды растением используют приборы, называемые потометрами (рис. 4).

Потометр состоит из цилиндрического сосуда, в который помещается корневая система растения, и отходящей от него тонкой U-образной градуированной трубки. При поглощении воды растением, объем воды в сосуде уменьшается, что отражается на уровне жидкости в отводной трубке. По количеству поглощенной жидкости можно судить о скорости поглощения воды растением.





Рис. 4. Схема установки для измерения скорости поглощения воды растением (потометр).

Для изменения осмотической силы наружного раствора в лабораторных экспериментах широко используется полиэтиленгликоль (ПЭГ) с большой молекулярной массой (3000 г). Данное вещество не может проникнуть ни в апопласт, ни в симпласт корня, не влияет на транспортные системы клеток корней, и поэтому наиболее верно отражает влияние осмотической силы наружного раствора на величину водного потока.

**Цель работы:** изучить зависимость скорости поглощения воды растением от осмотической силы наружного раствора.

**Материалы и оборудование:** проростки ячменя, кукурузы, фасоли, выращенные в водной культуре, потометры, резиновые пробки для потометров, ПЭГ, вазелин.

### Ход работы

Один потометр доверху заполните кипяченой водой. Аккуратно, чтобы не повредить корневую систему, поместите проросток ячменя в прорези резиновой пробки, смажьте ее вазелином и закройте потометр таким образом, чтобы вся корневая система растения была погружена в воду. В приборе не должно содержаться пузырьков воздуха. Второй и третий потометры заполните растворами ПЭГ с концентрацией 0,04 и 0,08 моль/л (осмотическая сила этих растворов равна соответственно 1 и 2 МПа). Соберите потометры как описано выше, поместите в сосуды с ватой и отметьте исходное положение менисков в отводных трубках каждого из них. Через 30 мин определите количество воды, поглощенное проростком, в каждой серии эксперимента. Рассчитайте скорость погло-

щения воды растением в зависимости от осмотической силы наружного раствора. Результаты занесите в таблицу. Сделайте выводы.

Таблица 7

№	Экспериментальный раствор	Осмотическое давление раствора	Скорость поглощения воды растением
1	Вода		
2	0,04 М ПЭГ		
3	0,08 М ПЭГ		

### **Контрольные вопросы**

1. Назовите формы почвенной влаги, доступной для растений.
2. Дайте определение понятиям «полевая влагоемкость» и «влажность устойчивого завядания».
3. Как корень регулирует скорость движения воды?

### **Лабораторная работа 6**

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВКЛАДОВ ВЕРХНЕГО И НИЖНЕГО КОНЦЕВЫХ ДВИГАТЕЛЕЙ В ПОСТУПЛЕНИЕ ВОДЫ В ПРОРОСТКИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР**

**Вводные пояснения.** Как было указано выше, поглощение воды корневой системой и ее передвижение по растению осуществляется за счет работы верхнего и нижнего концевых двигателей. Вклад данных механизмов в поступление и передвижение воды по растению зависит от многих факторов, как внешних (температура, влажность воздуха, свет), так и внутренних (активность процессов дыхания и фотосинтеза, уровень фитогормонов, период онтогенеза растения). Например, при высокой влажности воздуха транспирация практически отсутствует и транспорт воды по растению осуществляется за счет работы нижнего концевого двигателя. Такая же картина наблюдается у многолетних листопадных растений весной, когда листья еще не распустились и испарение воды с поверхности растения относительно невысокое.

**Цель работы:** определить скорость поглощения воды и оценить вклад верхнего и нижнего концевых двигателей проростков различных сельскохозяйственных культур с помощью потометрического метода.

**Материалы и оборудование:** 7-10 дневные проростки ячменя, кукурузы фасоли, выращенные в водной культуре, потометры, резиновые пробки для потометров, вазелин.

## Ход работы

Как и в предыдущей работе, потометр необходимо доверху заполнить кипяченой водой. Аккуратно, чтобы не повредить корневую систему, поместите проросток в прорези резиновой пробки, смажьте ее вазелином и плотно закройте потометр, вся корневая система должна быть погружена в воду. Для поддержания постоянной температуры прибор следует поместить в сосуд с ватой. Отметьте исходное положение мениска в отводной трубке. Через 30 минут определите количество воды, поглощенное проростком. После чего осторожно срежьте надземную часть растения и определите количество воды, поглощенное изолированной корневой системой (как и в предыдущем случае через 30 минут). Рассчитайте скорость поглощения воды целым растением и изолированной корневой системой, а так же определите долю нижнего (НКД) и верхнего (ВКД) концевых двигателей в поглощении воды растением. Долю нижнего концевого двигателя ( $A$ , %) рассчитайте по формуле:

$$A = \frac{V_2}{V_1} \cdot 100\%,$$

где  $V_1$  – объем воды, поглощенной целым растением, мл;

$V_2$  – объем воды, поглощенной изолированной корневой системой за тот же промежуток времени, мл.

Результаты занесите в таблицу.

Таблица 8

№	Объект	Объем поглощенной жидкости, мл		Скорость поглощения воды, мл/ч		Доля поглощенной воды, %	
		Целое растение	Корневая система	Целое растение	Корневая система	НКД	ВКД
1	Ячмень						
2	Кукуруза						
3	Фасоль						

Оцените вклад верхнего и нижнего концевых двигателей в поглощении воды разными видами сельскохозяйственных растений.

## Контрольные вопросы

1. Что такое верхний концевой двигатель? Как он работает?
2. Что такое нижний концевой двигатель?
3. Что такое гуттация, когда ее можно наблюдать?

### 1.3 ТРАСПИРАЦИЯ РАСТЕНИЙ

Ведущая роль в восходящем транспорте веществ от корня к надземным органам растения принадлежит транспирации – непрерывному испарению поглощаемой корнем воды с поверхности надземных органов растения. Основным органом транспирации растения являются листья. Высшие наземные растения эволюционно приспособились контролировать потоки воды в соответствии со своими нуждами, посредством тонкой регуляции нормы испарения воды с поверхности листьев. Для этого растения используют устьица – специальные структурные образования, сформированные попарно расположенными клетками бобовидной или гантелеобразной формы. При поступлении воды внутрь замыкающих клеток устьиц происходит увеличение их тургорного давления. Вследствие неравномерного утолщения клеточных стенок (внутренняя часть утолщена) происходит открывание устьичной щели. Снижение оводненности замыкающих клеток приводит к уменьшению тургорного давления, устьица закрываются, что предотвращает избыточную потерю воды растением.

У большинства растений транспирация осуществляется через устьица, такой вид транспирации называется *устьичной*. Процесс испарения воды с поверхности листа носит название *кутикулярной* транспирации. Кутикулярная транспирация не регулируется растением, в связи с чем, эпидермис многих растений покрыт кутикулой, предотвращающей избыточное испарение воды. Небольшое количество воды может испаряться с поверхности стеблей, цветоносов и т.д., такой вид транспирации называется *перидермальной*.

При открытых устьицах 90 % воды испаряется благодаря устьичной транспирации. Вклад кутикулярной транспирации в общее количество испаренной воды, как правило, небольшой и не превышает 10 %. Исключение составляют молодые листья, у которых еще не произошло вторичных изменений клеточных стенок и кутикулярная транспирация может достигать 50 %. Роль перидермальной транспирации в испарении воды растением очень мала, но у листопадных деревьев после сбрасывания листьев через чечевички теряется основная масса воды.

Поскольку транспирация является генератором градиента водного потенциала в системе «корень – лист», ее называют *верхним концевым двигателем* транспорта воды в растении.

## *Лабораторная работа 7*

# **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ТРАНСПИРАЦИИ И ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ТРАНСПИРАЦИИ ВЕСОВЫМ МЕТОДОМ**

Транспирация характеризуется несколькими количественными показателями: интенсивностью, продуктивностью и транспирационным коэффициентом. Интенсивность, или скорость, транспирации определяется количеством граммов воды, испаренной с единицы листовой поверхности за единицу времени ( $\text{г H}_2\text{O}/(\text{м}^2 \cdot \text{ч})$ ). Ее величина зависит от температуры, влажности воздуха и почвы, освещенности и других факторов. У большинства сельскохозяйственных растений интенсивность транспирации колеблется днем от 15 до 250  $\text{г H}_2\text{O}/(\text{м}^2 \cdot \text{ч})$ , а ночью может снижаться до 7–20  $\text{г H}_2\text{O}/(\text{м}^2 \cdot \text{ч})$ .

Для характеристики физиологической сущности транспирации пользуются параметром относительной транспирации, представляющей собой отношение интенсивности транспирации с единицы листовой поверхности к скорости испарения воды с открытой водной поверхности.

*Цель работы:* определить интенсивность транспирации и величину относительной транспирации при изменении условий освещения растений.

*Материалы и оборудование:* химические стаканчики (50–100 мл), чашки Петри, дистиллированная вода, растительное масло, весы, бумага, ножницы, линейки, комнатные растения.

### **Ход работы**

Лист комнатного растения, имеющий достаточно длинный черешок (не менее 4–5 см), поместите в химический стаканчик, заполненный дистиллированной водой, таким образом, чтобы листовая пластинка находилась над поверхностью воды. Сверху на воду необходимо добавить несколько капель растительного масла, для образования тонкой пленки, предотвращающей испарение с водной поверхности. Данную систему взвесьте с точностью до 0,01 г и поместите на хорошо освещенное место при комнатной температуре. Второй такой же стакан с листом поставьте в темноту.

Для определения скорости испарения воды со свободной поверхности взвесьте чашку Петри, заполненную водой, и поместите ее в те же условия, что и лист растения.

Через 60–90 мин необходимо повторно взвесить каждый из объектов. Убыль в весе отражает количество испаренной воды. Полученные результаты занесите в таблицу.

Таблица 9

Объект	Продолжительность опыта, мин	Вес, г		Убыль в весе, г	Площадь испаряющей поверхности, см <sup>2</sup>
		Начальный	Конечный		
Лист растения					
Чашка Петри с водой					

Для определения площади листа обведите контур листовой пластинки на бумаге, вырежьте и взвесьте бумажную фигуру. Взвесьте вырезанный из той же бумаги квадрат известной площади (например, 25 см<sup>2</sup>) и рассчитайте площадь листа растения ( $S$ ) по формуле:

$$S = \frac{a \cdot 25}{b},$$

где  $a$  – вес бумажной фигуры с контуром листовой пластинки;  
 $b$  – вес квадрата.

Для определения площади испаряющей поверхности чашки Петри определите ее внутренний радиус и найдите площадь круга ( $S = \pi \cdot r^2$ ).

Интенсивность транспирации ( $I$ ), выраженную в граммах испаренной воды на единицу площади листовой пластинки за час (г/м<sup>2</sup>·ч), вычислите по формуле:

$$I = \frac{n \cdot 60 \cdot 10000}{S \cdot t},$$

где  $n$  – количество испаренной воды, г;  
 $S$  – площадь испаряющей поверхности, см<sup>2</sup>;  
 $t$  – продолжительность опыта, мин;  
 60 – коэффициент для перевода мин в часы;  
 10 000 – коэффициент для перевода см<sup>2</sup> в м<sup>2</sup>.

Интенсивность испарения со свободной водной поверхности чашки Петри ( $E$ ) рассчитайте по той же формуле.

Определите относительную транспирацию ( $O$ ):

$$O = \frac{I}{E}$$

Результаты занесите в таблицу.

Таблица 10

Условия опыта	Интенсивность транспирации растения, г/м <sup>2</sup> ·ч	Интенсивность испарения со свободной водной поверхности, г/м <sup>2</sup> ·ч	Относительная транспирация

Сравните интенсивность транспирации растений и величины относительной транспирации на свету и в темноте, полученные для разных видов комнатных растений.

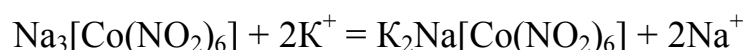
### *Контрольные вопросы*

1. Чему равна интенсивность транспирации? От чего зависит ее величина?
2. Что такое относительная транспирация? О чем свидетельствует этот показатель?
3. Может ли относительная транспирация быть равной единице?

### *Лабораторная работа 8*

## **НАБЛЮДЕНИЕ ЗА ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕМ КАЛИЯ ПРИ ДВИЖЕНИИ УСТЬИЦ**

Механизм открывания устьиц на свету связан с активацией калиевых каналов и транспортом ионов калия в замыкающие клетки. Это приводит к снижению их водного потенциала и поступлению воды в замыкающие клетки устьиц. Качественно изменения в распределении ионов K<sup>+</sup> могут быть оценены гистохимически кобальтнитриным методом. Метод основан на взаимодействии кобальтнитрина натрия с ионами калия в ткани:



При этом образуется желтый кристаллический осадок соли K<sub>2</sub>Na[Co(NO<sub>2</sub>)<sub>6</sub>]. Для более четкого обнаружения препарат обрабатывают сульфидом аммония, что приводит к образованию в местах локализации калия коричневого осадка сульфида кобальта.

Удобным объектом для наблюдений за перераспределением ионов K<sup>+</sup> при движении устьиц служат листья традесканции. Можно использовать также листья бобов, овса, кукурузы и др. Для работы необходимо иметь растения с широко открытыми и плотно закрытыми устьицами. Поэтому перед началом опыта одну часть растения поливают и выстав-

ляют на яркий свет на 1,5–2 ч, другую – выдерживают в темноте до полного закрывания устьиц.

*Цель работы:* определить локализацию ионов  $K^+$  при открытых и закрытых устьицах в замыкающих клетках устьиц и прилегающих к ним клетках эпидермиса.

*Материалы и оборудование:* среда инкубации, содержащая нитрат кобальта и нитрат натрия, дистиллированная вода, 50%-ный глицерин, насыщенный раствор сульфида аммония, лезвия, предметные стекла, покровные стекла, чашки Петри, бюксы, препаровальные иглы, микроскопы, растения (традесканция, 7-дневные проростки овса, кукурузы, бобов и других сельскохозяйственных культур).

### **Ход работы**

На нижней стороне листьев подготовленных к опыту растений острым лезвием под прямым углом к центральной жилке сделайте поверхностные надрезы через 3–4 мм и снимите в этом же направлении небольшие участки эпидермиса. Отпрепарированные эпидермальные полоски поместите на 1–2 мин в чашки Петри с охлажденной дистиллированной водой для удаления внеклеточного калия. Затем перенесите полоски эпидермиса в бюксы с охлажденной инкубационной средой. Так как кристаллы натриево-калиевой соли кобальтазотистой кислоты при комнатной температуре относительно растворимы, бюксы поместите в холодильник или сосуд со льдом на 5 мин. После чего кусочки эпидермиса промойте в чашках Петри охлажденной дистиллированной водой в течение 2–3 мин (также на холоде). Рассмотрите полученные препараты под микроскопом в смеси 50%-го глицерина и насыщенного раствора сульфида аммония (1:1). Зарисуйте устьица, отметив локализацию калия в замыкающих и прилегающих к ним клетках эпидермиса при открытых и закрытых устьицах.

### **Контрольные вопросы**

1. Опишите строение устьиц.
2. Что лежит в основе процессов открывания-закрывания устьиц?
3. Какова роль ионов калия в осуществлении устьичных движений?



## *Лабораторная работа 9*

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА УСТЬИЦ НА ЕДИНИЦЕ ПЛОЩАДИ ЛИСТА**

Регуляция водного режима растений осуществляется благодаря работе устьичного аппарата. Для растений разных экологических групп характерны значительные различия в размере и количестве устьиц на единицу площади листа. Размеры устьиц колеблются в пределах 0,01–0,06 мм. Количество устьиц на 1 мм<sup>2</sup> листовой поверхности варьирует от 10 до 700, что (наряду с другими факторами) обеспечивает приспособление растений к условиям водоснабжения. У растений умеренного климата, к которым относятся большинство культурных растений, плотность устьиц составляет 50–300 на 1 мм<sup>2</sup> листа (пшеница – 60, капуста – 240, яблоня и слива – 250, подсолнечник – 325). У обитателей засушливых мест обитания, например, кактусов на 1 мм<sup>2</sup> находится в среднем 12 устьиц, у традесканции – 7. Для листьев растений влажных мест обитания характерно наибольшее число устьиц на единицу поверхности. Например, на верхней стороне листа кувшинки находится до 500, у листьев лимона и оливкового дерева – 625 устьиц на 1 мм<sup>2</sup>.

*Цель работы:* рассмотреть устьица под микроскопом, установить особенности их строения и рассчитать количество устьиц на единице поверхности листьев растений различных экологических групп.

*Материалы и оборудование.* листья комнатных растений, бобов, ячменя, микроскоп, объект-микрометр, предметные и покровные стекла, лезвия, препаровальные иглы.

#### **Ход работы**

С нижней стороны листа при помощи лезвия сделайте поперечные надрезы и аккуратно снимите полоски эпидермиса. Кусочки эпидермиса поместите на предметное стекло в каплю дистиллированной воды, накройте покровным стеклом и рассмотрите под микроскопом. Обратите внимание на особенности строения замыкающих клеток устьиц. Зарисуйте препарат, отметив основные структурные особенности устьиц данного растения. Подсчитайте количество устьиц в поле зрения микроскопа, после чего, используя объект-микрометр, рассчитайте площадь поля зрения микроскопа. Результаты занесите в таблицу.

Таблица 11

Растение	Состояние устьиц	Количество устьиц в поле зрения микроскопа	Количество устьиц на 1 мм <sup>2</sup> листа

### **Контрольные вопросы**

1. Назовите особенности строения замыкающих клеток устьиц.
2. Какие растения содержат больше устьиц на единицу площади листа?

### **Лабораторная работа 10**

## **ВИЗУАЛЬНАЯ РЕГИСТРАЦИЯ УСТЬИЧНЫХ ДВИЖЕНИЙ ПОД МИКРОСКОПОМ**

**Вводные замечания.** Для характеристики работы замыкающих клеток устьиц высших растений в научных исследованиях широко используется метод прямой визуальной регистрации устьичных движений под микроскопом. В отличие от более производительных и технически более сложных косвенных методов макроскопического измерения транспирации, визуальное наблюдение движений индивидуальных устьиц является более информативным методом, поскольку позволяет определить ряд дополнительных параметров, относящихся к физиологии самих замыкающих клеток.

**Материалы и оборудование.** 2-х–3-х недельные растения садовых бобов в горшочках (*Vicia faba* L.), предварительно выдержанные в темноте (не менее 12 часов), микроскоп, двухсторонняя клейкая лента, предметное микроскопное стекло, веб-камера, подключенная к персональному компьютеру, контейнеры эппендорф 1,5 мл, 10<sup>-4</sup> М раствор абсцизовой кислоты (АБК), раствор фузикоцина, секундомер.

### **Ход работы**

С целого растения бобов при помощи лезвия аккуратно срежьте 2-3-й полностью распутившийся лист у самого основания, чтобы оставался черешок. Лист аккуратно перенесите на полоску двухсторонней клейкой ленты, предварительно наклеенной на предметное стекло по центру. После укладки лист следует аккуратно с небольшим усилием прижать к клейкой ленте. Черешок листа поместите в контейнер-эппендорф, наполненный дистиллированной водой.

Микроскоп сфокусируйте на поверхности листа на увеличении, достаточном для детального анализа внешнего вида устьиц, таким образом,

чтобы в поле зрения попадало не менее 5–10 устьиц. Включите веб-камеру и настройте её для получения четкого изображения поверхности листа на мониторе персонального компьютера.

После получения четкого изображения, контейнер-эппендорф с дистиллированной водой замените на такой же, содержащий раствор фузикоцина. При помощи веб-камеры сделайте снимки участка листа с расположенными на нем устьицами с интервалом 2 мин. Файлы с изображениями поверхности листа называют в соответствии со временем их получения, начав отсчет с «ФЦ-0-мин» сразу после смены раствора. По прошествии 30 минут смените раствор фузикоцина на раствор АБК, и продолжите делать снимки поверхности листа с тем же интервалом, поменяв нумерацию файлов на «АБК-0-мин» и т.д. По истечении 30 минут с начала добавления АБК получение снимков прекращают.

Во второй части работы необходимо сделать анализ изменения состояния устьиц при смене растворов по полученным снимкам. Определите ширину устьичной щели в пикселях как минимум 3-х устьиц на каждом снимке. После чего определите метрическое значение одного пикселя изображения. Для этого на столик микроскопа положите объект-микрометр и посчитайте при том же увеличении количество пикселей, приходящееся на определенное расстояние (например, на 5 или 10 делений объект-микрометра, что будет составлять 50 или 100 мкм, соответственно). Рассчитайте метрические размеры пикселя. Умножив полученное значение на количество пикселей ширины устьичной щели каждого устьица на снимках, определите размеры просвета устьичной щели в микрометрах. Полученные данные представьте в виде двух графиков, по оси абсцисс на которых отмечается время в минутах с момента добавления фузикоцина (рис. 1), или АБК (рис. 2), а по оси ординат – просвет устьичной щели в микрометрах. Сделайте выводы о влиянии фузикоцина и АБК на состояние устьиц в растении.

### ***Контрольные вопросы***

1. Какое действие оказывает фузикоцин на состояние устьиц?
2. Как изменяется состояние устьиц при добавлении раствора АБК?
3. Какое действие оказывает ауксин на состояние устьиц?

## Часть 2

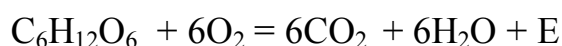
# ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ

---

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ДЫХАНИЯ РАСТЕНИЙ

Функционирование живых организмов неразрывно связано с потреблением и трансформацией энергии, источником которых служат питательные вещества. Растения синтезируют энергетически богатые органические соединения из  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  в процессе фотосинтеза. В клеточном дыхании происходит их окисление, а свободная энергия запасается в виде АТФ и НАДН.

Наиболее общими проявлениями дыхания всех живых организмов является поглощение кислорода и выделение углекислого газа. Т. е. во время дыхания происходит окисление органического субстрата кислородом, что может быть в итоге представлено в виде простого уравнения соответствующих химических превращений:



Процесс дыхания состоит из трех этапов: гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования. Гликолиз и цикл трикарбоновых кислот – представляют собой биохимические пути окисления глюкозы, протекающие, соответственно, в цитозоле и матриксе митохондрий. В биохимических реакциях синтезируются АТФ, НАДН и ФАДН<sub>2</sub>, которые на заключительном этапе окисляются в электрон-транспортной цепи, расположенной на митохондриальной мембране. Перенос электрона в цепи завершается восстановлением кислорода до воды. В процессе электронного транспорта на мембране образуется электрохимический градиент протонов, который является движущей силой синтеза АТФ – окислительного фосфорилирования.

Исходя из общего уравнения дыхания, его интенсивность может быть оценена либо по поглощению кислорода из среды, либо по выделению углекислоты живым организмом, либо по убыли его массы. При этом следует отнести соответствующий показатель к массе растения, или в величине площади поверхности органа. Последнее весьма актуально для растений, которые в отличие от животных не имеют специализированных органов дыхания. У растений также отсутствуют специализированные системы переноса кислорода по органам и тканям организма, поэтому и поглощение кислорода, и выделение углекислого газа происходит всей поверхностью растительного организма.

Таким образом, при определении интенсивности дыхания растений измеряют изменение содержания кислорода или углекислого газа за определенный период времени единицей массы растения. Для подобных целей существуют различные методы, среди которых выделяют:

- 1) газометрические, основанные на изменении соотношения кислорода и углекислого газа в воздушной среде;
- 2) физико-химические методы анализа для прямого определения поглощения кислорода и выделения углекислого газа.

### *Лабораторная работа 11*

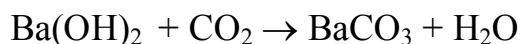
## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ДЫХАНИЯ В ЗАМКНУТОМ ПРОСТРАНСТВЕ**

**Вводные пояснения.** Количественным показателем, характеризующим дыхание как физиологический процесс, является интенсивность дыхания. Она измеряется количеством кислорода, поглощенного за 1 час одним граммом сухого (или сырого) растительного материала, а также количеством углекислого газа, выделяемого за один час одним граммом растительной массы.

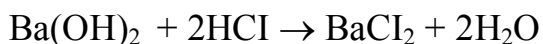
Интенсивность дыхания варьирует от 0,02–0,1 до 715 мг  $\text{CO}_2$ /г сухого веса в час и зависит от общего состояния растения, от его возраста, а также условий окружающей среды (температуры, влажности, концентрации кислорода в воздухе и т.д.). Поэтому, изучая процесс дыхания у растений, следует строго учитывать все эти факторы.

Предложенный ниже метод определения интенсивности дыхания основан на учете углекислого газа, выделяемого в процессе дыхания опытным растением в замкнутом сосуде. Для этого в замкнутый сосуд помещают навеску исследуемого материала и определенное количество

щелочи. Выделяемая в процессе дыхания углекислота реагирует со щелочью, в результате чего образуется нерастворимая соль:



Через определенное время оставшуюся в сосуде щелочь титруют кислотой:



Сравнивают полученную величину с результатами титрования такого же количества исходного раствора щелочи. Разность между результатами титрования содержимого контрольного и опытного сосудов прямо пропорциональна количеству выделенного при дыхании  $\text{CO}_2$ .

Продолжительность экспозиции зависит от размера навески и интенсивности дыхания исследуемого объекта. При очень короткой экспозиции разность между результатами титрования контрольной и опытной колб будет недостоверной. Наоборот, если в колбе останется очень мало барита, то может произойти неполное поглощение  $\text{CO}_2$ .

*Цель работы:* сравнить интенсивность дыхания разных растительных объектов.

*Материалы и оборудование:* 0,1 н раствор  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , 0,2 н раствор щавелевой кислоты, фенолфталеин, конические колбы (4 шт), резиновые пробки к колбам с крючками, резиновые пробки к колбам с отверстием для кончика бюретки, мерные цилиндры, химические стаканчики, марлевые мешочки, нитки, весы, проросшие и непроросшие семена, покоящиеся и набухшие почки, клубни картофеля, листья комнатных растений.

### Ход работы

Приготовьте навески растительного материала (по 5-10 г проросших семян, тканей клубня картофеля и др.), поместите их в отдельные марлевые мешочки. Прикрепите марлевые мешочки к пробкам для колб при помощи крючков, вставленных в пробки. Возьмите 3 колбы и налейте в них по 25 мл  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , добавьте 3-5 капель фенолфталеина до появления розовой окраски. Мешочки быстро опустите в колбы так, чтобы они не касались раствора щелочи. Колбы плотно закройте пробками. В контрольную (пустую) колбу также налейте 25 мл барита и 3-5 капель фенолфталеина и плотно закройте пробкой. Поставьте колбы с исследуемыми объектами на 1 час в одинаковые условия.

Время от времени колбы следует осторожно покачивать, чтобы разрушить пленку  $\text{BaCO}_3$ , препятствующую полноте поглощения  $\text{CO}_2$ .

Через 1 час достаньте мешочки с растительным материалом, быстро закройте колбы пробками с отверстиями и проведите титрование оставшейся щелочи 0,1 н щавелевой кислотой до обесцвечивания раствора в колбе. Разность между объемом раствора щавелевой кислоты, пошедшей на титрование в контрольной и опытной колбах, дает количество мг CO<sub>2</sub>, выделенное за время опыта исследуемым растительным материалом.

Результаты запишите в таблицу:

Таблица 12

Объект	Масса навески, г	Продолжительность опыта, ч	Объем щавелевой кислоты, пошедший на титрование, мл		Интенсивность дыхания, мг CO <sub>2</sub> / г·ч
			контроль	опыт	

Интенсивность дыхания вычисляется по формуле:

$$I = \frac{2,2 \cdot (a - b) \cdot V}{m \cdot t},$$

где *a* – количество щавелевой кислоты, пошедшей на титрование содержимого контрольной колбы, мл;

*b* – количество щавелевой кислоты, пошедшей на титрование содержимого опытной колбы, мл;

*V* – объем барита в колбе, мл;

*m* – масса навески, г;

*t* – продолжительность опыта, ч.

2,2 – количество мг CO<sub>2</sub>, титруемое 1 мл 0,1 н щавелевой кислоты.

### **Контрольные вопросы**

1. Что такое интенсивность дыхания?
2. На чем основан метод определения интенсивности дыхания в замкнутом пространстве?
3. От каких факторов зависит интенсивность дыхания растений?

### **Лабораторная работа 12**

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ДЫХАНИЯ РАСТЕНИЙ В ТОКЕ ВОЗДУХА ПО ВЫДЕЛЕНИЮ CO<sub>2</sub>**

**Вводные замечания.** Общий принцип работы подобного рода устройств заключается в том, что растительные объекты помещаются в замкнутые сосуды, через которые непрерывно прокачивается атмосфера-

ный воздух, предварительно очищенный от примесей углекислоты за счет его пропускания через колонку со щелочью ( $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  и т. п.). Выходящий из сосуда с растениями воздух поступает в поглотительный аппарат, где выделяемая растениями углекислота связывается баритом. Для количественного определения выделившегося растениями углекислого газа в последующем необходимо провести анализ изменений параметров поглотителя.

На рис. 6 представлена схема прибора. В сосуде 1 находится раствор щелочи. С помощью кранов 2 этот сосуд сообщается с поглотительными отсеками (3). Поглотительные отсеки представляют собою стеклянные трубки закрытые сверху и снизу резиновыми пробками (4 и 5). В верхних пробках 4 имеется отверстие, в которое вставлена трубка, соединяющая поглотительный отсек с аспиратором (6) – приспособлением для прокачивания дозированного количества воздуха.

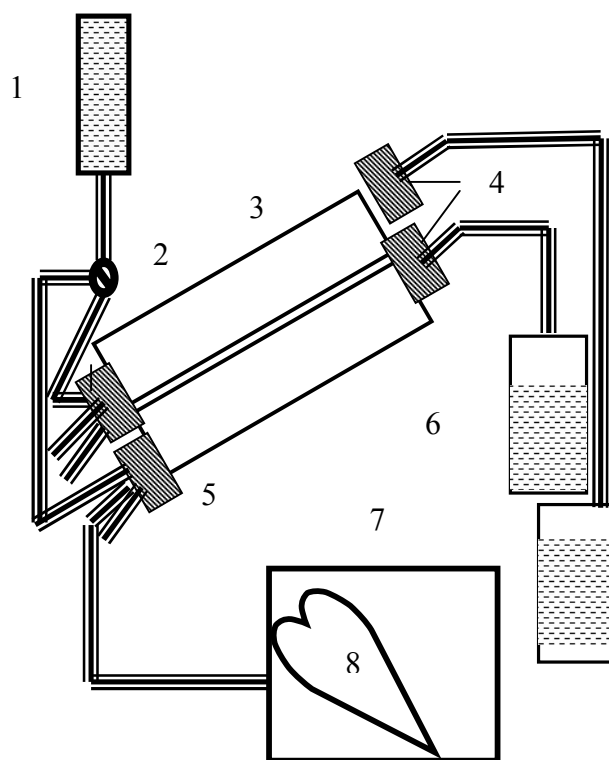


Рис. 5. Схема прибора для определения интенсивности дыхания растений токе воздуха: 1 – сосуд с раствором щелочи; 2 – кран; 3 – поглотительные отсеки; 4, 5 – резиновые пробки; 6 – аспираторы; 7 – листовая камера; 8 – лист растения.

**Материалы и оборудование.** Свежий растительный материал (клубни картофеля, прорастающие семена гороха, ячменя или льна), колба Бунзена, аспиратор, прибор для определения интенсивности дыхания, 10 % раствор  $\text{KOH}$ , децинормальные растворы едкого натра, барита и соляной кислоты, раствор фенолфталеина,



стаканы химические, вместимостью 50 мл (3 шт.), бюретка, штатив лабораторный, секундомер, кондуктометр.

### Ход работы

Заполните поглотительный отсек прибора 0,1 М раствором Ва(ОН)<sub>2</sub> до метки (соответствует 50 мл). Заполните аспиратор водой, а газольдер – 10 % раствором КОН. Поместите в колбу Бунзена предварительно взвешенный растительный материал и соедините ее с прибором через газольдер как показано на схеме. Подключите газольдер к поглотительному отсеку. Откройте кран газольдера. Вытекающая вода создаст разрежение воздуха в поглотительных отсеках прибора. Осторожно регулируя зажимы трубок, добейтесь просачивания пузырьков воздуха в поглотительный отсек. Включите секундомер. Воздух не должен идти очень медленно, но и быстрый его проток тоже не желателен, поэтому добейтесь того, чтобы пузырьки были выстроены в ряд с промежутками 0,5–1,0 см, а сами имели размер не более 0,5 см в диаметре.

По прошествии установленной экспозиции (20–30 мин) перекройте зажимами трубки, соединяющие поглотительные отсеки с листовой камерой и атмосферным воздухом и только после этого отключите аспираторы, перекрыв краны для оттока воды и сняв резиновые пробки с поглотительных отсеков. Слейте раствор щелочи из поглотительных отсеков прибора в стакан и отберите пробу экспериментального раствора щелочи объемом 25 мл для титрования. Параллельно с опытным раствором следует оттитровать такой же объем исходного раствора Ва(ОН)<sub>2</sub>, предварительно добавив 3–4 капли фенолфталеина. Титрование содержимого каждого из стаканов производят 0,1 М соляной кислотой до исчезновения окраски. Интенсивность дыхания вычислите по формуле:

$$I = \frac{2,2 \cdot (a - b) \cdot V_{\text{общ}}}{V_{\text{проб}} \cdot m \cdot t},$$

где  $a$  – количество соляной кислоты, пошедшей на титрование исходного раствора барита, мл;

$b$  – количество соляной кислоты, пошедшей на титрование опытного раствора, мл;

$V_{\text{общ}}$  – общий объем барита в поглотительном отсеке, мл;

$V_{\text{проб}}$  – объем пробы барита, взятого для титрования, мл;

$m$  – масса навески, г;

$t$  – продолжительность опыта, ч.

2,2 – количество мг СО<sub>2</sub>, титруемое 1 мл 0,1 н соляной кислоты.

Результаты занесите в таблицу.

Таблица 13

Объект	Масса навески, г	Продолжительность опыта, ч	Объем соляной кислоты, пошедший на титрование, мл		Интенсивность дыхания, мг CO <sub>2</sub> / г·ч
			контроль	опыт	

### Контрольные вопросы

1. В какое время суток отмечается выделение CO<sub>2</sub> растениями?
2. Возможно ли выделение углекислого газа растениями без поглощения кислорода?
3. На каких стадиях онтогенеза растения интенсивность дыхания максимальна, минимальна?

### Лабораторная работа 13

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ДЫХАНИЯ КЛЕТКАМИ ВОДОРОСЛИ *Chlorella* И СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРОЙ *Syringa vulgaris* НА ОСНОВЕ РЕГИСТРАЦИИ СДВИГА pH

**Вводные замечания.** Для изучения физиологических процессов растений, в том числе и дыхания, довольно часто используют одноклеточные зеленые водоросли или культуры суспендированных недифференцированных растительных клеток. Ввиду того, что клетки находятся в водном растворе, выделяемый ими углекислый газ растворяется и образуется угольная кислота.



Угольная кислота относится к слабым кислотам, поэтому степень диссоциации ее разбавленных растворов определяется в значительной мере концентрацией ионов H<sup>+</sup>, а в качестве коэффициента пропорциональности выступает константа равновесия K<sub>a</sub>

$$K_a^{\text{HCO}_3} = \{[\text{HCO}_3^-] \cdot [\text{H}^+]\} / [\text{CO}_2], \quad (2)$$

где [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>], [H<sup>+</sup>] и [CO<sub>2</sub>] – молярные концентрации бикарбонат иона, иона водорода и углекислого газа соответственно. На практике удобнее

пользоваться величинами  $pH = -\lg [H^+]$  и  $pK_a = -\lg [K_a] = 6,4$ . В этом случае уравнение (2) преобразуется к виду:

$$pH - pK_a^{HCO_3} = \lg [HCO_3^-] - \lg [CO_2] \quad (3)$$

Растворимость  $CO_2$  в воде достаточно высока. Поэтому изменение концентрации углекислоты в растворе приводит к изменению значений pH. Исходно предполагается, что величина сдвига pH водной среды, содержащей водоросли, определяется лишь концентрацией растворенного в ней  $CO_2$ . В этом случае молярная концентрация  $CO_2$ , растворенного в воде, может быть оценена по величине pH с учетом значения  $pK_a^{HCO_3}$ :

$$[CO_2]_{общ} = (10^{pK_a} + 10^{pH}) / 10^{2pH} \quad (4)$$

Следует отметить, что в соответствии с последней формулой концентрацию  $CO_2$  можно определить весьма приближенно, поскольку при ее выводе не учитывалось ни влияние других факторов на величину показателя кислотности, ни буферная емкость воды.

Цель работы: определить интенсивность дыхания клеток *Chlorella* и *Syringia vulgaris*.

**Материалы и оборудование.** Суспензионные культуры водоросли *Chlorella* и *Syringia vulgaris* известной плотности, дистиллированная вода, 0,1 М раствор сахарозы, секундомер, стаканы химические вместимостью 50 мл, pH-метр, электроды для pH-метрии, магнитная мешалка, осветитель для микроскопии, черная бумага.

### Ход работы

В один стакан налейте 30 мл суспензии клеток культуры водоросли *Chlorella*, во второй – такое же количество суспензионных клеток в 0,3 М растворе сахарозы. Стакан с клетками хлореллы поставьте на магнитную мешалку, предварительно положив в него магнитный брусок. Погрузите в стакан pH-метрические электроды и закройте сосуд полоской черной бумаги. Проследите динамику изменения pH в наружном растворе в течение 20 мин, снимая показания pH-метра через каждые 2 минуты. Аналогичные измерения проведите с клетками суспензионной культуры *Syringia vulgaris*.

Пользуясь формулой (4) определите содержание  $CO_2$  в наружном растворе суспензии в начале и конце эксперимента. Вычислите скорость поглощения углекислого газа на свету клетками водоросли и суспензионной культуры *Syringia vulgaris*. Результаты занесите в таблицу. Сделайте сравнительный анализ.

Таблица 14

Объект исследования	pH <sub>0</sub>	pH <sub>t</sub>	[CO <sub>2</sub> ] <sub>0</sub>	[CO <sub>2</sub> ] <sub>t</sub>	t

### Контрольные вопросы

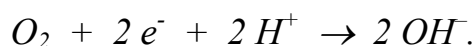
1. Какие процессы приводят к выделению углекислого газа при дыхании?
2. Почему в суспензии клеток водорослей в темноте происходит уменьшение pH?
3. Почему для регистрации дыхания клетки водоросли затеялись, а суспензионная культура *Syringa vulgaris* нет?

### Лабораторная работа 14

## ИЗМЕРЕНИЕ СКОРОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ O<sub>2</sub> КЛЕТКАМИ *Chlorella* ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

**Вводные замечания.** В настоящее время определение содержания многих веществ в растворах осуществляется электрохимическими методами. Промышленностью выпускаются многочисленные приборы и датчики. Все известные конструкции электрохимических датчиков подразделяются по регистрируемым электрическим параметрам на потенциометрические, амперометрические, кулонометрические и кондуктометрические измерительные устройства.

В предлагаемой лабораторной работе оценка концентрации кислорода, растворенного в воде, осуществляется электрохимическим методом с помощью лабораторного кислородомера. Один из главных компонентов этого прибора – электрохимический датчик кислорода. Действие датчиков кислорода основано на электрохимической реакции восстановления кислорода:



**Материалы и оборудование.** Суспензия культуры водоросли *Chlorella* известной плотности, насыщенная кислородом дистиллированная вода, секундомер, пробирки центрифужные с крышечкой вместимостью 50 мл (2 шт.), стакан химический вместимостью 50 мл, центрифуга, черная бумага, кислородомер лабораторный, штатив лабораторный.

## Ход работы

Возьмите 2 чистые центрифужные пробирки и налейте в одну из них 50 мл суспензии клеток культуры водоросли *Chlorella*, а во вторую такое же количество воды. Закройте пробирки пробками, уравновесьте и осадите клетки центрифугированием при 6000 об/мин в течение 5 мин. Осторожно слейте надосадочную жидкость и, добавив 3 мл дистиллированной воды, ресуспендируйте осадок, после чего дополните пробирку водой до 50 мл. Суспензию клеток перенесите в измерительный сосуд, предварительно погрузив в него магнитный брусок. Погрузите в сосуд электрохимический датчик кислорода, подключенный к кислородомеру. Плотно закройте сосуд пробкой оберните черной бумагой и поставьте его на магнитную мешалку.

Включите кислородомер и магнитную мешалку. В течение 10–15 мин проследите динамику изменения содержания кислорода в суспензии клеток водоросли, записывая показания прибора через каждую минуту. После указанного периода снимите полоску черной бумаги со стакана и включите осветитель. Записывайте показания кислородомера ежеминутно в течение 20 мин. Вычислите скорость выделения или поглощения кислорода клетками водоросли в каждом из вариантов эксперимента, пользуясь формулой:

$$V_{O_2} = ([O_2]_i - [O_2]_0)/(t \rho)$$

где  $t$  – время инкубации суспензии клеток водоросли на свету;  $\rho$  – плотность суспензии (г сырой массы/л);  $[O_2]_i$  и  $[O_2]_0$  концентрации кислорода (мг/л) в конце и в начале эксперимента.

Результаты занесите в таблицу.

Таблица 15

Вариант	$[O_2]_в$	$[O_2]_i$	$t$	$V_{O_2}$
свет				
темнота				

Сделайте заключение о влиянии освещения на выделение кислорода растениями.

### Контрольные вопросы

1. Почему на свету не отмечается поглощения кислорода водорослями?
2. Укажите доноры и акцепторы электронов в процессе поглощения кислорода растениями?

## 2.2. БИОХИМИЯ ДЫХАНИЯ

Окисление органических соединений в процессе дыхания осуществляется с участием ферментов класса оксиредуктаз. В нем также принимают участие переносчики электронов: хиноны, железосерных белки и цитохромы и др.

*Оксиредуктазы* – класс ферментов, катализирующих реакции биологического окисления, сопровождающиеся переносом электронов с одной молекулы (восстановителя – акцептора протонов или донора электронов) на другую (окислитель – донора протонов или акцептора электронов). В зависимости от механизма окисления основные представители оксиредуктаз делятся на дегидрогеназы, оксидазы, пероксидазы, гидроксиллазы и оксигеназы. Известно свыше двухсот оксиредуктаз. Класс насчитывает 22 подкласса. Коферментами этого класса являются НАД, НАДФ, ФАД, ФМН, убихинон, глутатион, липоевая кислота.

*Убихинон*. Название убихинон (УХ) от англ. “вездесущий хинон”, т.к. найден во всех клетках. Убихинон функционирует в цепи биологического окисления, свободно перемещаясь в липидной фазе мембран как в окисленной, так и в восстановленной форме. Убихинон окисляется без участия ферментов. Окислительно-восстановительные процессы УХ, протекающие в мембране митохондрий, сопровождаются переносом ионов  $H^+$  через нее.

Основная функция цитохромов в процессе дыхания – перенос электронов по электрон-транспортной цепи к молекулярному кислороду. Обычно цитохромы делятся на 4 группы в зависимости от природы входящего в них гема (Цх одной группы содержат одинаковые коферменты, но разные апоферменты). Железо, входящее в состав гема цитохромов может менять степень окисления с  $2^+$  на  $3^+$ .

*Электрон-транспортная цепь* – система структурно и функционально связанных трансмембранных белков и переносчиков электронов. Все участники этой цепи разделены на четыре окислительно-восстановительные системы (комплексы), связанные между собой убихиноном (CoQ) и цитохромом с.

Состав комплексов дыхательной цепи:

- I комплекс – НАДН: CoQ-оксиредуктаза. Включает ключевой фермент НАДН-дегидрогеназу и 5 железосерных кластеров (железосерные белки). Благодаря НАДН-дегидрогеназе (кофермент ФМН) и железосерным белкам комплекс I катализирует перенос атомов водорода и электронов к коэнзиму Q.

- II комплекс – *сукцинат: убихинон-оксидоредуктаза*. Включает ФАД-зависимую сукцинатдегидрогеназу, железосерные белки и катализирует перенос электронов от сукцината на коэнзим Q.
- Коэнзим Q является переносчиком электронов и протонов не только от I и II комплексов, но также и от ФАД-зависимых ферментов бета-окисления жирных кислот и других дегидрогеназ.
- III комплекс – *убихинол: цитохром с-оксидоредуктаза*. Включает цитохромы *b* и *c* и один железосерный белок. Комплекс осуществляет перенос электронов от восстановленной формы коэнзима Q к цитохрому *c*.
- IV комплекс – (*цитохром с: кислород-оксидоредуктаза; цитохромоксидаза*). Включает 2 цитохрома (*a* и *a3*), которые содержат 2 атома меди. Цитохромоксидаза *a3* катализирует конечную реакцию биологического окисления – восстановление 2 электронами кислорода и образование воды.

*Окислительное фосфорилирование* – это процесс образования АТФ из АДФ и неорганического фосфата (Фн) в процессе тканевого дыхания. Согласно хемиосмотической теории Митчелла синтез АТФ осуществляется за счет электрохимического потенциала ионов  $H^+$ , который создается на внутренней мембране митохондрий. Функционирование  $H^+$ -АТФ-синтазы обеспечивает сопряжение транспорта  $H^+$  с синтезом АТФ.

### *Лабораторная работа 15*

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЛИЧИНЫ ДЫХАТЕЛЬНОГО КОЭФФИЦИЕНТА**

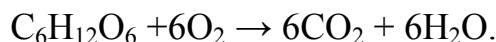
**Вводные замечания.** Дыхательным коэффициентом (ДК) называется отношение объема выделенного при дыхании  $CO_2$  к поглощенному за этот же промежуток времени  $O_2$  (с учетом того, что моль любого газа при данных температуре и давлении занимает один и тот же объем) или отношение числа молей выделенного углекислого газа к числу молей кислорода:

$$ДК = CO_2/O_2$$

Дыхательный коэффициент дает представление о природе дыхательного субстрата и о типе метаболизма: его величина зависит от окисляемо-

го материала и от типа дыхания (аэробное или анаэробное). При нормальном доступе кислорода величина ДК зависит от субстрата дыхания.

Если в процессе дыхания используются углеводы, то процесс идет согласно уравнению:



В этом случае ДК равен единице:  $6CO_2/6O_2 = 1$ . Однако если разложению в процессе дыхания подвергаются вещества более окисленные, чем углеводы (например, органические кислоты), поглощение кислорода уменьшается, ДК становится больше единицы. Так, если в качестве субстрата дыхания используется яблочная кислота, то  $ДК = 1,33$ .

При окислении в процессе дыхания соединений менее окисленных, чем углеводы (например, жиры или белки), требуется больше кислорода и ДК становится меньше единицы. Так, при использовании жиров  $ДК = 0,7$ , а при использовании белков –  $0,8$ .

В пшеничных зернах много крахмала, значительно меньше белка и совсем мало жира. В семенах фасоли, гороха, бобов много белков, но мало крахмала. В семенах масличных растений преобладают растительные масла.

Определение дыхательных коэффициентов разных тканей растений показывает, что в нормальных условиях он близок к единице. Это дает основание считать, что в первую очередь растение использует в качестве дыхательного материала углеводы. При недостатке углеводов могут быть использованы и другие субстраты. Особенно ярко это проявляется на проростках, развивающихся из семян, в которых в качестве запасного питательного вещества содержатся жиры или белки. При использовании в качестве дыхательного материала жиров происходит их расщепление до глицерина и жирных кислот. Жирные кислоты могут быть превращены в углеводы через глиоксилатный цикл. Использованию белков в качестве субстрата дыхания предшествует их расщепление до аминокислот.

*Цель работы:* определить дыхательный коэффициент в прорастающих семенах различных культур.

*Материалы и оборудование.* Наклюнувшиеся семена сельскохозяйственных растений: ячменя, гороха, рапса; 20% раствор КОН или NaOH; прибор для дыхания; стакан с ватой, в которой сделано углубление для пробирки или термостат; термометр; полоски фильтровальной бумаги; пинцет; вазелиновое масло; пипетка.



## Ход работы

В пробирку до половины объема насыпьте проросшие семена одного из указанных растений и плотно закройте пробирку пробкой (рис. 6).

Для создания оптимальных температурных условий весь прибор поставьте в термостат при  $30^{\circ}\text{C}$  или в стакан с ватой. Для создания замкнутого пространства в приборе в конец измерительной трубки с помощью пипетки введите каплю вазелинового масла или воды. Через 5 (10) мин (смотря по скорости движения капли) отметьте, насколько переместилась капля внутри трубки, еще через 5 (10) мин. – повторите отсчет. Вычислите среднее расстояние, пройденное каплей за это время (А), которое соответствует разности между объемами поглощенного кислорода и выделенного углекислого газа за данный промежуток времени. Если объемы  $\text{O}_2$  и  $\text{CO}_2$  при дыхании газов равны ( $\text{ДК}=1$ ), то капля в трубке не будет двигаться. Если же величина дыхательного коэффициента меньше или больше единицы, то будет наблюдаться перемещение жидкости в трубке, соответствующее разности между объемами поглощенного  $\text{O}_2$  и выделенного  $\text{CO}_2$ .

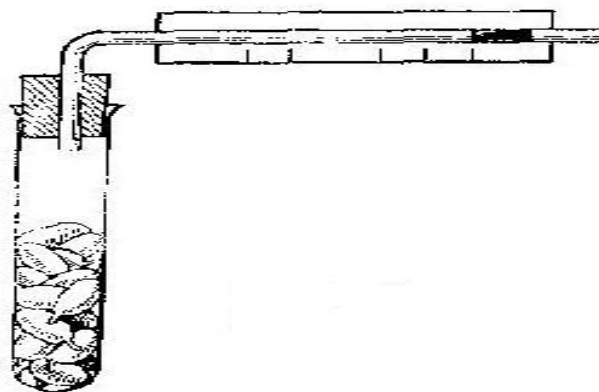


Рис. 6. Установка для определения дыхательного коэффициента.

После проведения опыта выньте пробку из пробирки с семенами, выдуйте каплю масла (воды) на фильтровальную бумагу, проветрите пробирку и вложите в ее верхнюю часть с помощью пинцета кольцо фильтровальной бумаги, смоченной 20% раствором щелочи (диаметр кольца должен быть больше диаметра пробирки, иначе оно не будет держаться). Закройте пробирку пробкой и повторите измерения, вычисляя среднюю величину (В), т. е. объем поглощенного  $\text{O}_2$ . Объем выде-

ленного  $\text{CO}_2$  равняется разности  $B - A$ . На основании этих данных можно найти дыхательный коэффициент:

$$\begin{aligned} A &= \text{O}_2 - \text{CO}_2, \\ B &= \text{O}_2, \\ \text{CO}_2 &= B - A, \\ \text{ДК} &= \text{CO}_2/\text{O}_2 = (B - A)/B \end{aligned}$$

Рассчитайте величину дыхательного коэффициента семян различных сельскохозяйственных культур. Сделайте выводы о природе дыхательного субстрата.

Таблица 16

Объект	Расстояние, пройденное каплей за 5 (10) мин						ДК, $\text{CO}_2/\text{O}_2$
	без щелочи (A)			с щелочью (B)			
	1	2	среднее	1	2	среднее	

### Контрольные вопросы

1. Что такое дыхательный коэффициент?
2. Чему равен дыхательный коэффициент у прорастающих семян растений, богатых крахмалом?
3. Проведите расчет ДК при полном окислении следующих веществ: линолевого триглицерида ( $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_2$ ); сахарозы ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ); щавелевой кислоты ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ ); триолеина  $\text{C}_{57}\text{H}_{104}\text{O}_6$ .

### Лабораторная работа 16

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ДЫХАНИЯ

**Вводные пояснения.** Метод определения функциональной активности ферментов дыхания основан на использовании их ингибиторов: соли синильной кислоты, азид натрия и др., избирательно реагирующих с некоторыми металлами, главным образом с железом и медью. В связи с этим синильная кислота и азид натрия ингибируют многие железо- и медьсодержащие ферменты, к числу которых относятся дыхательные ферменты. Соли ртути, препараты мышьяка, йодацетамид и некоторые другие вещества специфически реагируют с сульфгидрильными группами, угнетая активность ферментов, в состав активного центра которых

входят SH-группы. Также в качестве ингибиторов могут использоваться и разобщители дыхания. К ним в частности относится 2,4-ДНФ.

Для изучения влияния ингибиторов митохондриальных ферментов и разобщителей фосфорилирования на процессы дыхания вполне подходит культура клеток хлореллы, интенсивность дыхания которой может быть оценена по сдвигу рН.

*Цель работы:* установить действие ингибитора митохондриальных ферментов – азид натрия и разобщителя фосфорилирования – 2,4-ДНФ на интенсивность дыхания.

*Материалы и оборудование:* суспензия клеток культуры хлореллы, 0,5 мМ раствор азид натрия  $\text{NaN}_3$ , 1 мМ раствор 2,4-динитрофенол, центрифужные пробирки (2 шт.), стаканы стеклянные (4 шт.), рН-метр, фильтровальная бумага,.

### Ход работы

Суспензию клеток хлореллы разлейте в 3 стеклянные стакана (по 30 мл в каждый). После этого в один из стаканов внесите азид натрия до концентрации 0,05 мМ, а в другой 2,4-ДНФ (0,1 мМ). Измерьте исходное значение рН в каждом стакане результаты занесите в таблицу. Проинкубируйте водоросли в течение 90 мин в темноте. Контролем служит культура клеток хлореллы без ингибиторов и разобщителей. По истечении указанного времени определите значение рН контрольного и опытных образцов. Результаты запишите в таблицу. Сделайте выводы.

Таблица 17

Условия опыта	Время, мин	Исходное рН	рН после инкубации	$\Delta$ рН
контроль				
ДНФ				
азид натрия				

### Контрольные вопросы

1. Какие реакции осуществляют ферменты оксидоредуктазы?
2. Назовите основные подклассы оксидоредуктаз.
3. Назовите основные компоненты электрон-транспортной цепи митохондриальной мембраны.
4. Каков механизм действия разобщителей фосфорилирования?

## СОДЕРЖАНИЕ

От авторов.....	3
<b>Часть 1. ВОДНЫЙ РЕЖИМ РАСТЕНИЙ .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. ПОСТУПЛЕНИЕ ВОДЫ В РАСТИТЕЛЬНУЮ КЛЕТКУ.....</b>	<b>5</b>
<i>Лабораторная работа 1.</i> Определение водного потенциала по изменению размеров тканей .....	5
<i>Лабораторная работа 2.</i> Влияние динитрофенола на поступление воды в ткань клубня картофеля.....	10
<i>Лабораторная работа 3.</i> Роль осмотических явлений в процессах поступления воды в растительную клетку .....	11
<b>1.2. ПЕРЕДВИЖЕНИЕ ВОДЫ ПО РАСТЕНИЮ .....</b>	<b>13</b>
<i>Лабораторная работа 4.</i> Влияние физических факторов среды на скорость передвижения воды по растению .....	14
<i>Лабораторная работа 5.</i> Исследование влияния осмотической силы наружного раствора на скорость поглощения воды растениями .....	16
<i>Лабораторная работа 6.</i> Определение вкладов верхнего и нижнего концевых двигателей в поступление воды в проростки сельскохозяйственных культур ...	18
<b>1.3 ТРАСПИРАЦИЯ РАСТЕНИЙ.....</b>	<b>20</b>
<i>Лабораторная работа 7.</i> Определение интенсивности транспирации и относительной транспирации весовым методом .....	21
<i>Лабораторная работа 8.</i> Наблюдение за перераспределением калия при движении устьиц .....	23
<i>Лабораторная работа 9.</i> Определение числа устьиц и единице площади листа .....	25
<i>Лабораторная работа 10.</i> Визуальная регистрация устьичных движений под микроскопом .....	26
<b>Часть 2. ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ.....</b>	<b>28</b>
<b>2.1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ДЫХАНИЯ РАСТЕНИЙ.....</b>	<b>28</b>
<i>Лабораторная работа 11.</i> Определение интенсивности дыхания в замкнутом пространстве .....	29
<i>Лабораторная работа 12.</i> Определение интенсивности дыхания растений в токе воздуха по выделению CO <sub>2</sub> .....	31
<i>Лабораторная работа 13.</i> Определение интенсивности дыхания клетками водоросли <i>Chlorella</i> и суспензионной культурой <i>Syringa vulgaris</i> на основе регистрации сдвига рН.....	34
<i>Лабораторная работа 14.</i> Измерение скорости поглощения O <sub>2</sub> клетками <i>Chlorella</i> , электрохимическим методом .....	36
<b>2.2. БИОХИМИЯ ДЫХАНИЯ.....</b>	<b>38</b>
<i>Лабораторная работа 15.</i> Определение величины дыхательного коэффициента ..	39
<i>Лабораторная работа 16.</i> Определение функциональной активности ферментов дыхания .....	42

Учебное издание

**Кудряшов** Анатолий Петрович  
**Дитченко** Татьяна Ивановна  
**Филипцова** Галина Григорьевна  
и др.

## **ВОДНЫЙ РЕЖИМ И ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ**

**Методические рекомендации к лабораторным занятиям по курсу  
«Физиология растений» для студентов биологического факультета**

В авторской редакции

Ответственный за выпуск  
*А. П. Кудряшов*

Подписано в печать 20. 06. 2013.  
Формат 60×84/16. Бумага офсетная.  
Усл. печ. л. 2,56. Уч.-изд. л. 2,09.  
Тираж 50 экз. Заказ

Белорусский государственный университет  
ЛИ № 02330/0494425 от 08. 04. 2009.  
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск

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