

Лабораторная работа № 1

Тема: Выделение запасных белков и изучение их свойств.

Цель:

Материалы и оборудование: 1) гороховая мука, 2) 10 % - ный раствор $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 3) (NaCl) (сухая соль), 4) концентрированная HNO_3 в капельнице с притертой пипеткой (хранить в вытяжном шкафу), 5) концентрированный раствор NH_3 в капельнице, 6) 10% - ный раствор NaOH , 7) 1% - ный раствор CuSO_4 . в капельнице, 8) 5% - ный раствор уксуснокислого свинца в капельнице, 9) технические весы с разновесом, 10) колбы конические на 100 – 150 мл (3 шт.), 11) воронка, 12) штатив с пробирками (7 шт), 13) мерные цилиндры, 14) калька, 15) фильтр бумажный, 16) спиртовка, 17) держалка для пробирок, 18) спички.

Белки - важнейшие компоненты всех живых клеток. Макромолекулы белка имеют молекулярную массу от 10000 до нескольких миллионов и состоят из одной или нескольких полипептидных цепей, построенных из юльшого количества аминокислотных остатков.

По растворимости белки делятся на четыре группы: 1) альбумины (растворимы в воде), 2) глобулины (в слабых растворах нейтральных солей), 3) проламины (в 60 – 80% - ном этиловом спирте), 4) глютелины (в слабых растворах щелочей).

Белки – гидрофильные вещества: каждая молекула белка удерживает до 18 тыс. молекул воды. Дегидратация белков (утрата ими гидратных оболочек) приводит к их коагуляции (выпадению в осадок).

Очень богаты белками семена бобовых. Основные запасные белки этих семя – глобулины.

Ход работы. Отвесить на куске кальки 5 г гороховой муки, перенести в колбу и залить 30 мл 10% - ного раствора $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. Взбалтывать в течение 3 мин и дать отстояться. Через 30 мин профильтровать через складчатый бумажный фильтр, смоченный тем же раствором $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. Первые мутные порции фильтрата слить обратно на фильтр. Полученный прозрачный раствор глобулина разлить по 2 – 3 мл в пробирку и проделать следующее:

I. Осаждение белка.

1. К раствору белка прилить избыток воды. Появляется муть вследствие нерастворимости данного белка в воде. Прибавить раствор $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. Исчезает ли муть?

2. Нагреть раствор белка до кипения. Растворяется ли осадок после охлаждения?

3. Высаливание белка. Всыпать в пробирку с раствором белка сухую соль (NaCl) до появления мути, а затем прилить воды. Переходит ли осадок в раствор?

4. Добавлять к раствору белка по каплям концентрированную HNO_3 (реакцию проводить в вытяжном шкафу) до выпадения осадка вследствие денатурации белка. Растворяется ли осадок после добавления раствора $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$?

II. Цветные реакции на белок.

1. Ксантопротеиновая реакция на присутствие в белке ароматических аминокислот (тирозин, фенилаланина, триптофана). Добавить к раствору белка крепкую HNO_3 и осторожно нагреть до кипячения. Отмерить окраску сгустка белка. После охлаждения осторожно добавить по каплям (по стенке пробирки) раствор аммиака и отметить изменение окраски.

2. Биуретовая реакция на пептидную связь – $\text{CO} - \text{NH}$. Прилить к раствору белка вдвое меньший объем 10% - ного раствора NaOH и 1 – 2 капли 1% - ного раствора CuSO_4 . В какой цвет окрашивается раствор?

3. Реакция на серу аминокислот цистеина и цистина. К раствору белка добавить вдвое больший объем 10% - ного раствора NaOH и осторожно кипятить 2 – 3 мин. Затем внести несколько капель раствора уксуснокислого свинца и продолжить нагревание до выпадения черного осадка. Написать уравнение реакции между Na_2S , образующимся при вытеснении серы из белка щелочью, и уксуснокислым свинцом. Описать реакции с соответствующими объяснениями.

Лабораторная работа № 1.

Тема: Явления плазмолиза и деплазмолиза. Осмотическое явление в клетке.

Цель: Рассматривать растительную клетку как осмотическую систему, в которой роль раствора осмотически действующих веществ играет клеточный сок. Изучить плазмолиз – обратимый процесс, исчезновения плазмолиза - деплазмолизом.

Теоретическое положение темы.

Растительную клетку можно рассматривать как осмотическую систему, в которой роль раствора осмотически действующих веществ играет клеточный сок, а роль полупроницаемой перепонки – цитоплазматические мембраны. Клеточный сок, как любой раствор, обладает потенциальным осмотическим давлением, которое прямо пропорционально числу частиц в единице объема независимо от размеров и характера этих частиц (молекулы, ионы). Раствор, отделенный от чистой воды полупроницаемой перепонкой (пропускающей воду и непроницаемой для растворенных веществ), сосет воду с силой, численно равной его потенциальному осмотическому давлению, т. е. давлению, которое нужно приложить, чтобы воспрепятствовать передвижению воды в сторону раствора. Для каждой клетки можно подобрать следующие растворы: 1) гипотонический, осмотическое давление которого меньше осмотического давления клеточного сока, 2) изотонический, имеющий осмотическое давление, равное осмотическому давлению клеточного сока, 3) гипертонический, осмотическое давление которого больше чем давления клеточного сока

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

Материалы и оборудование: 1) луковица синего лука или листья традесканции, 2) 1 М раствор сахарозы в капельнице, 3) лезвие бритвы, 4) скальпель, 5) пинцет, 6) препаровальная игла, 7) микроскоп, 8) предметные и покровные стекла, 9) стакан с кипяченой водопроводной водой, 10)

стеклянная палочка, 11) кусочки фильтровальной бумаги, 12) спиртовка, 13) спички.

Техника безопасности и охрана труда. Соблюдать правила и технику безопасности при работе с хим. реактивами и хим. посудой.

Ход работы. Срезать бритвой кусочек эпидермиса, клетки которого содержат антоциан. Во избежание повреждения клеток эпидермиса желательно, чтобы срез состоял из 2 слоев клеток.

Поместить срез в каплю, воды на предметное стекло накрыть покровным стеклом и рассмотреть в микроскоп клетки с окрашенным клеточным соком. Заменить воду 1М раствором сахарозы, для чего на предметное стекло рядом с покровным нанести большую каплю раствора и отсосать воду кусочком фильтровальной бумаги, прикладывая его с другой стороны покровного стекла. Повторить этот прием 2- 3 раза до полной замены воды раствором. Все время следить в микроскоп за тем, что происходит в клетках.

Сделать схематичные рисунки клеток в состоянии тургора, углового, вогнутого и выпуклого плазмолиза, обозначив основные составные части клеток

Ввести под покровное стекло 2-3 капли воды, отсасывая раствор фильтровальной бумаги, и немедленно приступить к наблюдению деплазмолиза клеток. После окончания деплазмолиза убить клетки, держа край предметного стекла пинцетом и осторожно нагревая препарат на пламени спиртовки, не допуская испарения воды. Затем воду на 1М раствор сахарозы и, рассматривая препарат в микроскоп установить, происходит ли плазмолиз

Записать результаты наблюдения ответить на следующие вопросы.

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

Лабораторная работа № 2.

Тема: Определение жизнеспособности семян методом окрашивания (по Д. Н. Нелюбову)

Материалы и оборудование: 1) семена гороха, намоченные в воде за 10 – 15 ч до занятия, 2) 0,1% - ный раствор индигокармина (1 г на 1 л дистиллированной воды), 3) чашки фарфоровые (2 шт), 4) стакан химический, 5) стакан фаянсовый с влажными опилками, 6) тарелка, 7) препаровальная игла, 8) электроплитка, 9) карандаш по стеклу.

Метод окрашивания семян для определения их всхожести на непроницаемости живой цитоплазмы для некоторых красок (индигокармин, кислый фуксин), тогда как мертвая цитоплазма легко прокрашивается. Бывают случаи, когда зародыш мертвый и тем не менее при погружении семени в раствор краски он не окрашивается из-за того, что окружающие зародыш части семени не пропускают краску. В связи с этим необходимо предварительно обнажить зародыш, у семян с эндоспермом удалить семенные покровы.

Подготовленные описанным способом семена выдерживаются в растворе краски от 1 до 3 ч (в зависимости от вида растений) и оценивают жизнеспособность семян: семена с плотностью окрашенными зародышами или с окрашенными корешками считают невсхожими, семена неокрашенные или с частично окрашенными семядолями относят к числу жизнеспособных.

Данный метод используют для быстрой оценки всхожести семян гороха, фасоли, люпина, льна, конопли, тыквенных.

Ход работы. Отсчитать, не выбирая, две порции по 10 набухших семян гороха. Одну порцию поместить в стакан с водой и прокипятить в течение 5 мин. Осторожно, не повреждая семядоли, очистить препаровальной иглой семена обеих порций от кожуры, поместить в фарфоровые чашки, залить раствором индигокармина и выдержать 1 ч, после чего слить краску обратно в бутылочку, а семена отмыть водой от избытка красителя.

Отметить окраску семян, убитых кипячением. В опытной порции подсчитать количество окрашенных, частично окрашенных и неокрашенных семян. Для проверки всхожести высадить все 10 семян в стакан с влажными опилками (перед набивкой стакана отжать из опилок избыток воды) поставить в темный шкаф и ежедневно поливать. Через несколько дней подсчитать количество проросших семян. Результаты записать в таблицу.

Объект	Кол-во взятых семян, шт.	Количество семян, шт.				
		Окрашенны х полностью	Окрашенны х частично	Неокрашенных	проросши х	непроросших

Сопоставить результаты, полученные методом окрашивания и методом проращивания.

Лабораторная работа № 3.

Тема: Накопление метиленовой синей в клетках элодеи

Материалы и оборудование: 1) побеги элодеи длиной около 10 см, 2) раствор метиленовой синей 1:50000 (20 мг в 1 л водопроводной воды), 3) 1 М раствор KNO_3 в капельнице, 4) пинцет, 5) штатив с пробирками (2 шт), 6) микроскоп, 7) предметное и покровное стекло, 8) полоски фильтровальной бумаги.

В предыдущих работах было продемонстрировано важнейшее свойство цитоплазмы – полупроницаемость, т. Е. способность легко пропускать воду и задерживать растворенные вещества. Однако цитоплазма не обладает идеальной полупроницаемостью, она пропускает не только воду, но и многие вещества, причем некоторые из них со значительной скоростью. К числу таких веществ относится метиленовая синяя, которая довольно быстро проникает в растительные клетки. Ткани некоторых растений способны накапливать большое количество метиленовой синей вплоть до почти полного извлечения ее из наружного раствора вследствие химического связывания краски содержащимися в клетках дубильными веществами, причем нередко образуются небольшие синие кристаллы.

Ход работы. Заполнить две пробирки раствором метиленовой синей. Поместить в одну пробирку 2- 3 побега элодеи, вторую оставить в качестве контроля. Через 2-3 ч (или через сутки) отметить изменение интенсивности окраски в сосуде с растениями по сравнению с контролем (рассматривать на светлом фоне). Поместить 1-2 интенсивно окрашенных листочка на предметное стекло в каплю 1 М раствора KNO_3 , накрыть покровным стеклом и через 15-20 мин рассмотреть в микроскоп при большом увеличении. Зарисовать плазмолизированную клетку.

Ответить на следующие вопросы.

1. В какой части клетки накапливается метиленовая синяя?
2. Как объяснить отсутствие обратной диффузии поглощенной краски из клеток в наружный раствор?
3. Остаются ли клетки живыми после накопления в них метиленовой синей?

Лабораторная работа № 4.

Тема: Различная проницаемость плазмалеммы и тонопласта

Материалы и оборудование: 1) луковица обыкновенного лука, 2) 1 М раствор KNO_3 с эозином в капельнице, 3) микроскоп, 4) лезвие бритвы, 5) препаровальная игла, 6) предметные и покровные стекла, 7) цветные карандаши.

Наружная цитоплазматическая мембрана (плазмалемма) обладает более высокой проницаемостью, чем тонопласт. В этом можно убедиться, наблюдая набухание цитоплазмы под влиянием накапливающихся в ней ионов калия.

Ход работы. Нанести на предметное стекло большую каплю 1М раствора KNO_3 с эозином, погрузить в нее 2-3 кусочка бесцветного эпидермиса мясистой чешуи лука и закрыть покровным стеклом. Через 3 мин начать наблюдения под микроскопом плазмолизированных клеток. Не допускать подсыхания препарата, вводя время от времени свежие капли раствора.

Сначала цитоплазма окружает вакуоль тонким слоем, но вскоре начинается ее набухание (колпачковый плазмолиз), а затем постепенно отмирание и окрашивание под действием эозина, проникшего через плазмалемму. Увеличивается ли при этом объем вакуоли и окрашивается ли клеточный сок?

Описать наблюдаемые явления, зарисовать клетку в состоянии колпачкового плазмолиза и раскрасить цветным карандашом.

В выводах сопоставить проницаемость плазмалеммы и тонопласта для ионов калия и эозина и объяснить причины набухания цитоплазмы.

Работа 7. Определение вязкости цитоплазмы по времени плазмолиза

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

Промежуток времени от момента погружения клеток в гипертонический раствор до появления выпуклого плазмолиза называют временем плазмолиза. Это время зависит от вязкости цитоплазмы: чем меньше вязкости, тем легче цитоплазма отстает от клеточной стенки и тем быстрее вогнутый плазмолиз переходит в выпуклый. Вязкость цитоплазмы зависит от степени дисперсности и гидратации коллоидов, содержания в клетке воды и ряда других факторов. Цитоплазма растущих клеток и клеток, закончивших рост, имеет разную вязкость.

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

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

Лабораторная работа № 8.

Тема: Зависимость набухания семян от характера запасных веществ

Материалы и оборудование: 1) семена пшеницы, гороха и других растений; 2) технические весы с разновесами; 3) химические стаканы на 100-200 мл (2 шт.); 4) марлевые салфетки 12x12 см; 5) фильтровальная бумага.

При соприкосновении с влажным субстратом сухие семена быстро поглощают воду и увеличиваются в объеме благодаря набуханию белков, крахмала и других гидрофильных коллоидов, причем у некоторых семян возникает большое давление (до 100 МПа). В основе набухания лежит гидратация коллоидов- взаимодействие веществ с водой приводящее к уменьшению ее подвижности. Главную роль в процессе набухания семян играют белки- наиболее гидрофильные вещества. Гидратация белков включает три процесса: 1) электронейтральную гидратацию путем образования водородных связей между атомами О и N полярных групп (карбоксильной, спиртовой, аминной, амидной и др.) и водородом воды (наиболее важный процесс, приводящий к значительному увеличению объема и повышению температуры); 2) ионную гидратацию – притяжение диполей воды ионизированными группами белка - COO^- и NH_3^+ ; 3) иммобилизацию молекул воды, попадающих в замкнутые полости белковых глобул. Набухание белков имеет большое значение для биохимической активности клетки.

Задача данной работы – сравнение процесса набухания семян, отличающихся разным содержанием основных запасных веществ – крахмала и белка (в семенах пшеницы содержится в среднем около 16 % белка и 70 % крахмала, в семенах гороха – до 34 % белка и 48 % крахмала).

Ход работы. Навески (2-5 г) семян пшеницы, гороха или других растений завернуть в марлевые салфетки и погрузить в водопроводную воду, налитую в стаканчики. Через 3 ч (или через сутки) извлечь семена из марлевых мешочков, быстро обсушить фильтровальной бумагой и взвесить. Увеличение массы семян выразить в процентах от исходной.

Результаты записать в таблицу:

Растение	Масса семян, г		Увеличение массы семян	
	исходная	После набухания	г	% исходной
Пшеница				
Горох				

Ответить на вопросы:

1. Как происходит набухание семян?
2. Какова зависимость этого процесса от содержания основных веществ?

Работа 23. Влияние концентрации раствора на прорастание семян

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

Первый этап поступления воды в сухие семена обусловлен набуханием гидрофильных коллоидов, особенно белков, притягивающих воду с силой до 100 МПа. По мере увеличения количества воды в клетках эта сила быстро уменьшается и у вполне насыщенных водой семян падает почти до нуля. Дальнейшее поступление воды в семена происходит осмотически. На прорастание семян и рост проростков большое влияние оказывает концентрация растворимых солей в почве, точнее, разность между осмотическим давлением клеточного содержимого и почвенного раствора: чем больше эта разность, тем легче поступает вода в клетки.

Для понимания результатов данного опыта нужно иметь в виду, что осмотическое давление клеточного сока у молодых проростков обычно не превышает 1 МПа.

Ход работы. Насыпать в четыре чашки Петри по 50 г песка, снабдить чашки этикетками и смочить песок в 1-й чашке 1М раствора NaCl, во 2-й 10 мл 0,1 М раствора NaCl, в 3-й 10 мл 0,01 М раствора NaCl, в 4-й 10 мл воды. Отобрать на разборной доске 4 порции по 20 шт. неповрежденных и по возможности одинаковых семян. Поместить семена в чашки, разложив их равномерно по поверхности песка, закрыть чашки крышками и поставить в темное место.

Держать чашки закрытыми 2-3 дня, затем открыть крышки и ежедневно поливать соответствующими растворами. Через неделю определить размеры проростков, для чего взять из каждой чашки 10 проростков (подряд, не выбирая), измерить длину надземных частей и корешков (если у одного проростка несколько корешков, измерить один самый длинный) и найти среднее арифметическое из всех 10 измерений.

Вычислить осмотическое давление растворов по формуле $\pi = RTC_i$ (изотонические коэффициенты приведены в работе 18). Результаты записать в таблицу:

Растение	Концентрация раствора, моль/л	Осмотическое давление раствора, МПа	Длина, мм	
			надземных частей	корешков

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

Лабораторная работа № 5.

Тема: Влияние внешних условий на процесс гуттации

Материалы и оборудование: 1) 5-8-дневные проростки кукурузы овса или пшеницы, выращенные в темноте в глиняных горшочках или металлических стаканчиках с почвой (для опыта требуются 4 таких сосуда); 2) кристаллизаторы (3 шт.); 3) большие стеклянные химические стаканы с отверстием в дне (3 шт.) ; 4) снег или битый лед; 5) колба; 6) электроплитка; 7) термометр; 8) кусочки фильтровальной бумаги; 9) кусок проволоки.

Корневая система не только всасывает воду из почвы но и активно нагнетает ее в стебель с определенной силой называемой корневым давлением. Если количество воды, нагнетаемой корневым давлением, больше количества воды, испаряемой надземными органами, то наблюдается гуттация - выделение капель жидкости на кончиках листьев. Задача данной работы — изучение влияния температуры почвы и влажности воздуха на процесс гуттации.

Ход работы. Взять 4 сосуда с одинаковыми проростками, политыми за час до начала работы. Поставить три сосуда в кристаллизаторы. один заполнить снегом или битым льдом, во второй налить воду комнатной температуры (уровень воды должен быть ниже края сосуда с проростками) в третий — воду, нагретую до 30° С. Четвертый сосуд вить на столе. Удалить кусочками фильтровальной бумаги имеющиеся на проростках капли, после чего закрыть три первых сосуда стеклянными колпаками (рис. 4).

Наблюдать за скоростью выделения капель на концах проростков. Для большей точности после появления капель рекомендуется снять их через отверстие в дне колпака кусочком фильтровальной бумаги, прикрепленной к концу проволоки, и отметить, через какой промежуток времени появятся новые капли,

Результаты записать в таблицу, оценивая интенсивность гуттации по пятибалльной системе:

№ варианта	Условия опыта	Интенсивность гуттации, балл
1	Под колпаком, 0°С	
2	То же, комнатная t°	
3	То же, 30°С	

В выводах объяснить, почему интенсивность гуттации неодинакова в разных условиях опыта, сопоставив варианты 1,2 и 3, а затем варианты 2 и 4.

Работа 27. Определение интенсивности кутикулярной транспирации

Материалы и оборудование: 1) свежие листья плюща, фуксии, цикламена, сирени или других растений с гипостоматическими листьями, 2) вазелин в фарфоровой чашке; 3) аналитические или технические весы, 4) скальпель 5) пробирки (2 шт.); 6) водяная баня.

Различают транспирацию устьичную; (диффузию водяного пара, образовавшегося в межклетниках листа) и кутикулярную (испарение воды клетками эпидермиса). При открытых устьечных щелях одновременно осуществляются обе формы транспирации, при закрытых — только кутикулярная. Если у гипостоматического листа, Имеющего устьица только на нижней стороне, замазать эту сторону вазелином то можно определить интенсивность кутикулярной транспирации. С амфистоматическими листьями (имеющими устьица на двух сторонах) таких растений, как подсолнечник, бобы, кукуруза, этот опыт провести нельзя.

Ход работы. Срезать два одинаковых гипостатических листа и смазать нижнюю сторону одного из них тонким слоем вазелина, слегка разогретого на водяной бане. Взвесит листья на аналитических или технических весах, отметив время, и поставить их черешками в пустые пробирки. Через 10—15 мин повторить взвешивание. Уменьшение массы необработанного листа (а) характеризует общую транспирацию (устьичную+кутикулярную). Для определения доли кутикулярной транспирации следует потерю воды листом со смазанной нижней поверхностью (б) умножить на 2, так как у первого листа испаряют оба эпидермиса (верхний и нижний), и выразить в процентах от общей по формуле $x = (2b/a) 100\%$.

Результаты исследования разных объектов записать в таблицу:

Растение	Вариант опыта	Масса листа, г		Испарено воды, г	Транспирация, %	
		исходная	В конце опыта		кутикулярная	устьичная

Без вазелина С вазелином В выводах сопоставить интенсивность кутикулярной транспирации листьев разных растений, а также молодых и старых листьев одного и того же

Лабораторная работа № 6.

Тема: Сравнение транспирации верхней и нижней сторон листа хлоркобальтовым методом

Материалы к оборудованию: 1) свежие листья каких-либо растений (гортензии, фуксии, традесканции и др.); 2) куски хлоркобальтовой бумаги размером 8X10 см; 3) одинаковые стеклянные пластинки 6X9 см. (2шт.); 4) резиновые кольца для перевязывания стеклянных пластинок (2 шт.); 5) электроплитка; б) пинцет; 7) микроскоп; 8) лезвие бритвы; 9) предметные и покровные стекла; 10) препаровальная игла; 11) стаканчик с водой.

Если прижать к листу предварительно высушенный кусок фильтровальной бумаги, пропитанной раствором хлорида кобальта, то бумага, поглощая выделяющиеся в процессе транспирации водяные пары, будет менять окраску из голубой (цвет сухого CoCl_2) в розовую (цвет $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). По скорости порозовения можно приблизительно судить об интенсивности транспирации.

Ход работы. Просушить над электроплиткой сложенный пополам кусок хлоркобальтовой бумаги до появления ярко-голубого цвета и немедленно приложить его к двум сторонам листа (свежесорванного или непосредственно на растении). Хлоркобальтовые бумажки следует держать пинцетом, не дотрагиваясь до них пальцами, от которых могут остаться розовые пятна. Чтобы устранить действие атмосферной влаги, осторожно зажать лист вместе с наложенной на него бумагой между двумя стеклянными пластинками и перевязать их резиновыми кольцами. Наблюдать за изменением окраски хлоркобальтовой бумаги и записать результат.

Сделать срезы верхнего и нижнего эпидермиса исследованного листа (или другого листа этого же растения), рассмотреть их в микроскоп при большом увеличении и зарисовать

Сделать выводы о причинах различной интенсивности транспирации верхней и нижней сторон листа данного растения и о соотношении устьичной и кутикулярной транспирации.

Лабораторная работа № 6.

Тема: Наблюдение за устьичными движениями под микроскопом

Материалы и оборудование: 1) свежие листья гортензии, амариллиса, тюльпана или традесканции; 2) 1 М раствор сахарозы в капельнице; 3) 5-%ный раствор глицерина в капельнице; 4) лезвие бритвы; 5) препаровальная игла; 6) микроскоп; 7) предметные и покровные стекла; 8) стакан с водой; 9) стеклянная палочка; 10) кусочки фильтровальной бумаги.

Газообмен между межклетниками листа и наружной атмосферой регулируется устьицами. Каждое устьице состоит из двух замыкающих клеток, у которых стенки, примыкающие к устьичной щели, сильно утолщены, тогда как наружные части оболочки остаются тонкими. Неодинаковая толщина наружных и внутренних стенок замыкающих клеток приводит к тому, что при изменении тургора замыкающие клетки способны искривляться или распрямляться, открывая или закрывая при этом устьичную щель.

Ход работы. Опыт 1. Срез нижнего эпидермиса листа какого-либо растения рассмотреть в капле воды при большом увеличении микроскопа. Зарисовать одно устьице, отметив утолщения клеточных стенок замыкающих клеток. Нанести рядом с покровным стеклом 2-3 капли 1 М раствора сахарозы, приложив с другой стороны кусочек фильтровальной бумаги, и сразу приступить к наблюдению за изменением ширины устьичных щелей. Зарисовать устьице в закрытом состоянии. Снова заменить раствор водой и наблюдать постепенное открывание устьиц.

Опыт 2. Приготовить срез эпидермиса листа какого-либо растения, поместить в каплю 5%-го раствора глицерина на предметное стекло, накрыть покровным стеклом и сразу начать наблюдения плазмолиза под микроскопом как в замыкающих клетках, так и в остальных клетках эпидермиса. Устьичные щели при этом закрываются.

Через некоторое время, вследствие того что глицерин начинает проникать через цитоплазму в клеточный сок, наступает деплазмолиз и устьица открываются.

Заменить глицерин водой, для чего нанести рядом с покровным стеклом каплю воды, а с другой стороны оттянуть глицерин фильтровальной бумагой. При этом устьица открываются еще шире, чем это было в начале

опыта, так как вследствие проникновения глицерина в клеточный сок осмотическое давление в замыкающих клетках повысилось.

Записать результаты наблюдений и объяснить причины устьичных движений.

Работа 30. Влияние внешних условий на состояние устьиц (по Молищу)

Материалы и оборудование: 1) разные комнатные растения; 2) петролейный эфир, ксилол и этиловый спирт в пузырьках, закрытых пробками, в которые вставлены петли из тонкой проволоки.

Межклетники листа обычно заполнены воздухом, благодаря чему при рассмотрении на лист кажется матовым. Если произойдет инфильтрация, т.е. заполнение межклетников какой-либо жидкостью, то соответствующие участки лист становятся прозрачными.

Определение состояния устьиц методом инфильтрации основано на способности жидкостей, смачивающих клеточные стенки, проникать в силу капиллярности через открытые устьичные щели в ближайшие межклетники, вытесняя из них воздух, в чем легко убедиться по появлению на листе прозрачных пятен. Жидкости проникают в устьичные щели в зависимости от их ширины : петролейный эфир- через слабо открытые устьица, ксилол- через средне открытые, а этиловый спирт- только через широко открытые. Данный метод очень прост и вполне применим даже в полевых условиях.

Ход работы. На нижнюю поверхность листа нанести отдельно маленькие капли петролейного эфира, ксилола и этилового спирта. Держать лист в горизонтальном положении до полного исчезновения капель, которые могут либо испариться, либо проникнуть внутрь листа, и рассмотреть лист на свет.

Результаты записать в таблицу, отмечая проникновение жидкости знаком «+», а отсутствие проникновения знаком «-»:

Объект	Условия опыта	Петролейный эфир	Ксилол	Спирт	Состояние устьиц

Сделать выводы о влиянии внешних условий на устьичные движения.

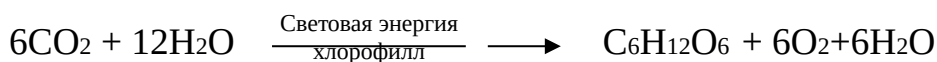
Лабораторная работа №

Тема: Получение вытяжки пигментов зеленого листа.

Цель:

Материалы и оборудование: 1)свежие или сушеные листья крапивы, примулы, плюща или других растений; 2)85%-ный этиловый спирт; 3)Са СОз; 4)кварцевый песок или толченое стекло; 5)вазелин; 6)ножницы; 7)фарфоровые ступки(2шт); 8)колбы (2шт); 9)воронки (2шт); 10)стеклянная палочка; 11)бумажные фильтры.

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



Фотосинтез происходит в хлоропластах, которые окружены двумя белково-липидными мембранами. Хлоропласт включает систему ламеллярных двойных мембран – тилакоидов, образованных внутренней мембраной. В тилакоидах осуществляется световая фаза фотосинтеза, т.е. преобразование энергии световых лучей в химическую энергию молекул АТФ и НАДФ·Н₂, а биохимические реакции восстановления СО₂ и синтеза углеводов происходят в межтилакоидном пространстве.

В мембранах тилакоидов содержатся следующие пигменты: хлорофилл а (С₅₅Н₇₂О₅Н₄Мg) – зеленый с синеватым оттенком; хлорофилл b (С₅₅Н₇₀О₆Н₄Мg) – зеленый с желтоватым оттенком; каротин (С₄₀Н₅₆) – желто-оранжевый; ксантофилл (С₄₀Н₅₆О₂) – золотисто-желтые.

Все эти пигменты не растворимы в воде, но растворяются в органических растворителях (спирте, ацетоне и др.).

По химической природе хлорофилл представляет собой сложный эфир дикарбоновой кислоты хлорофиллина и двух спиртов – метанола СН₃ОН и фитола С₂₀Н₃₉ОН. Хлорофиллин содержит порфириновое ядро, состоящее из четырех пиррольных колец, соединенных друг с другом метиновыми мостиками = СН-. В центре порфиринового ядра расположен атом магния, соединенный с атомами азота пиррольных колец. Кроме того, в ядре молекулы хлорофилла имеется пятое кольцо – циклопентановое, содержащее карбонильную группу. Хлорофилл b отличается от хлорофилла а лишь тем, что у второго пиррольного кольца вместо метильной группы имеется альдегидная.

Порфириновое ядро имеет гидрофильный характер и связано с белками мембран. В то же время длинный гидрофобный «мост». Образованный остатком фитола, обращен в сторону липидных слоев тилакоидов и обуславливает хорошую растворимость хлорофилла в неполярных растворителях (бензин, петролейный эфир). Однако для полного извлечения хлорофилла из листьев используют не эти безводные растворители, а спирт или ацетон, содержащие небольшое количество воды, необходимой для гидролиза хлорофилл-белкового комплекса. Наряду с хлорофиллами а и b в хлоропластах содержатся каротиноиды- группа желтых пигментов, являющихся по химической природе тетратерпеноидами (8 остатков изопрена C_5H_8). Каротины (в основном β -каротин)-непредельные углеводороды, содержащие два симметрично расположенных иононовых кольца, соединенных длиной углеводородной цепью (рис. 8). Среди ксантофиллов, являющихся кислородсодержащими производными каротина, преобладает лютеин, имеющий в каждом иононовом кольце спиртовую группу.

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

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

Сделать вывод о растворимости пластидных пигментов в воде и в органическом растворителе (спирте). Использовать спиртовую вытяжку в следующих работах.

Лабораторная работа №

Тема: Разделение пигментов по Краусу.

Цель:

Материалы и оборудование: 1)спиртовая вытяжка пигментов зеленого листа; 2)бензин;3)этиловый спирт; 4)пробирка с притертой пробкой; 5)цветные карандаши.

Метод Крауса основан на разной растворимости пигментов в спирте и бензине: хлорофилл, имеющий длинный углеводородный «хвост», и каротин, являющийся углеводородом, имеют большое средство к неполярному растворителю, тогда как ксантофилл (лютеин), будучи двухосновным спиртом, почти нерастворим в бензине.

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

Лабораторная работа №

Тема: Омыление хлорофилла щелочью.

Цель:

Материалы и оборудование: 1)спиртовая вытяжка пигментов; 2)20%-ный раствор КОН в капельнице; 3)бензин; 4) пробирка с протертой пробкой; 5)цветные карандаши.

При добавлении щелочи к раствору хлорофилла происходит реакция омыления: отщепляются спирты - метанол и фитол, а двухосновная кислота хлорофиллин образует соль.

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

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

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

|

Лабораторная работа №

Тема: Получение феофитина и восстановление металлорганической связи.

Цель:

Материалы и оборудование: 1)спиртовая вытяжка пигментов; 2)10%-ная соляная кислота в капельнице; 3)уксуснокислый цинк; 4)пробирки (2 шт.); 5)скальпель; 6)держалка для пробирок; 7)спиртовка; 8)спички; 9)цветные карандаши.

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

Ход работы. Налить в две пробирки по 3-4 мл спиртовой вытяжки пигментов зеленого листа и добавить в них по 2-3 капли 10%-ной соляной кислоты. Отметить окраску полученного продукта реакции.

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

Флуоресценция хлорофилла.

Материалы и оборудование: 1)спиртовая вытяжка пигментов зеленого листа в конической колбе или пробирке; 2)проектор или настольная лампа; 3)кусочек черной ткани или бумаги.

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

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

Ход работы. Вытяжку пигментов в конической колбе или пробирке поместить на темном фоне у настольной лампы или осветить пучком света

проекционного фонаря. Рассмотреть вытяжку с той стороны, откуда падает свет.

Отменить окраску раствора и сделать вывод о причине флуоресценции.

Обнаружение фотосинтеза методом крахмальной пробы.

Материалы и оборудование: 1)пеларгония (желательно пестролистная), выдержанная в течение 2-3 суток в темноте; 2)96%-ный этанол; 3)раствор I и KL (концентрированный раствор, разбавленный в 3 раза водой); 4)30%-ный раствор щелочи; 5)лампа электрическая на 200-300 Вт; 6)ножницы; 7)пинцет; 8)штатив с 2 пробирками; 9)спиртовка; 10)коническая колбочка; 11)фарфоровая чашка; 12)водяная баня; 13)2 пробковых кружка диаметром 1-1,5 см с булавкой; 14)электроплитка; 15)колпак стеклянный, установленный в куске стекла; 16)ланолин или вазелин; 17)маленькие стаканчики (2 шт.); 18)воронка; 19)держалка для пробирок; 20)бритва; 21)спички; 22)цветные карандаши; 23)картон; 24)канцелярские скрепки.

Наиболее простой метод обнаружения фотосинтеза- крахмальная проба. Она состоит в том, что лист, выдержанный на свету, обезбачивают спиртом, а затем обрабатывают раствором иода, окрашивающего образовавшийся в хлоропластах крахмал в темно-синий цвет. Опыт рекомендуется проводить со срезанными и поставленными в воду листьями, у которых крахмал накапливается быстрее, так как отток отсутствует.

Для наблюдения за процессом образования первичного крахмала необходимо, чтобы в начале опыта листья не содержали этого вещества. Обескрахмаливания листьев можно достичь, выдерживая их в течение нескольких дней в темноте; за это время весь имевшийся в листьях крахмал превратится в сахара, которые будут частично отведены в стебель, а частично на дыхание клеток листа.

Ход работы. Обильно полить растение и выдержать его в течение 2-3 дней в темноте (или закрыть отдельные листья светонепроницаемыми чехлами).

Проверить полноту обескрахмаливания листа, для чего отрезать кусочек листа, поместить в пробирку и кипятить его с водой, чтобы убить клетки. Воду слить, прилить спирт и кипятить на водяной бане до полного извлечения пигментов. Нагреть следует осторожно, так как при бурном кипении может произойти выплескивание спирта из пробирки. Слить спирт, размягчить кусочек листа, наливая на него небольшое количество воды (после действия спирта ткани становятся хрупкими), поместить его в фарфоровую чашку и облить раствором иода. Отсутствие синего окрашивания покажет, что крахмала в листе нет; если же проба с йодом окажется положительной, то с данным листом ставить опыт не следует, так как в этом случае будет трудно наблюдать за образованием нового крахмала.

Срезать лист, обновить бритвой срез под водой и опустить черешок в пробирку с водой. Затемнить часть листовой пластинки, для чего наложить на верхнюю поверхности листа пробковые кружки точно один против другого и закрепить их на листе булавкой.

Можно поставить опыт иначе: покрыть лист с обеих сторон кусками картона с вырезанной в них фигурой или приложить к листу контрастный, не очень темный фотонегатив, прикрепив к листу канцелярскими скрепками.

Другой лист (также проверенный на отсутствие крахмала) поставить черешок в стаканчик с водой и поместить в атмосферу, лишенную диоксида углерода, для чего рядом с листом поставить сосуд с крепким раствором щелочи и закрыть стеклянным колпаком. Для полной герметичности следует поставить стакан с листом и сосуд с щелочью на кусок стекла, а края колпака смазать ланолином или вазелином. Выставить оба листа на яркий солнечный или электрический свет (при использовании лампы накаливания 200-300 Вт во избежание перегрева лист должен находиться на расстоянии не менее 30 см от лампы).

Через 2 ч (или более) обработать листья так же, как и кусочки, в которых проверяли полноту обескрахмаливания: погрузить на несколько минут в кипящую воду, затем обесцветить спиртом, нагревая на водяной бане колбу, закрытую воронкой, используемой в качестве обратного холодильника.

Слить окрашенный спирт. Если не произошло полного обесцвечивания листа, налить в колбу еще немного спирта и продолжить нагревание. Размягчить лист водой, расправить его в фарфоровой чашке и облить раствором иода.

Записать результаты, отмечая, в каких частях листа образовался крахмал (для пестрого листа обратить внимание на белые участки), и сделать соответствующие рисунки. Обработанный раствором иода лист можно сохранить, засушив его между кусками бумаги под прессом.

В выводах указать, какие условия необходимы для процесса фотосинтеза.