

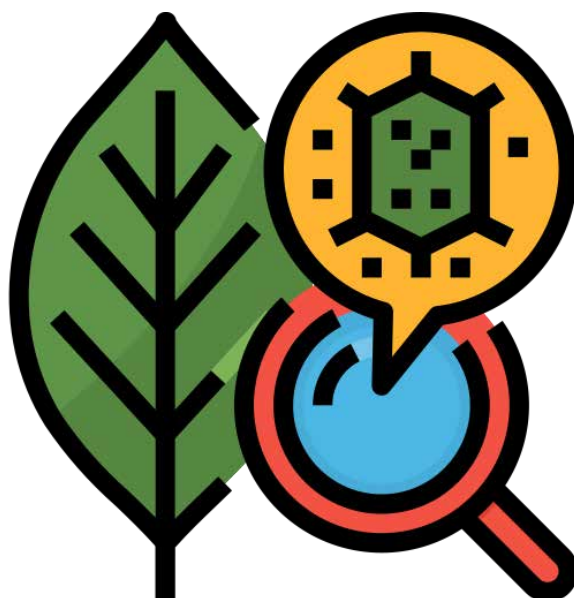
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ ТА ЕКОЛОГІЇ

Кафедра фізіології, біохімії рослин та біоенергетики

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

для виконання лабораторних робіт з дисципліни
«ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН З ОСНОВАМИ БІОХІМІЇ»
для студентів ОС «Бакалавр» очної форми навчання зі спеціальностей
202 «Захист і карантин рослин»



Київ 2025

УДК 581.1

Наведено методичні вказівки щодо підготовки та проведення лабораторних робіт з курсу «Фізіологія рослин з основами біохімії» та коротке теоретичне обґрунтування кожного досліду. Містить контрольні питання з теорії та практичної частини на самостійне опрацювання. Подано перелік літературних джерел, рекомендованих для самостійного опрацювання студентами.

Рекомендовано до друку Вченою радою факультету захисту рослин, біотехнологій та екології НУБіП України (протокол № 8 від 20 березня 2025 р.)

Укладачі:

Нестерова Наталія Георгіївна – доц., к. с.-г. н., доцент кафедри фізіології, біохімії рослин та біоенергетики НУБіП України

Бабицький Андрій Ігорович – доц., к. б. н., доцент кафедри фізіології, біохімії рослин та біоенергетики НУБіП України

Рецензенти:

Кляченко Оксана Леонідівна – проф., д.с.-г.н., професор кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України

Ліханов Артур Федорович – доц., д.б.н., професор кафедри ботаніки, дендрології та лісової селекції НУБіП України

Навчальне видання

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

для виконання лабораторних робіт з дисципліни
«ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН З ОСНОВАМИ БІОХІМІЇ»
для студентів ОС «Бакалавр» очної форми навчання зі спеціальностей
202 «Захист і карантин рослин»

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА.....	4
ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ.....	6
<i>Лабораторна робота № 1</i> Визначення явищ плазмолізу/деплазмолізу та потенційного осмотичного тиску у клітинах цибулі.....	9
<i>Лабораторна робота № 2</i> Визначення проникності живого і мертвого протопласту для клітинного соку.....	17
<i>Лабораторна робота № 3</i> Визначення життєздатності насіння за фарбуванням цитоплазми (за Л. О. Івановим).....	21
<i>Лабораторна робота № 4</i> Вивчення стану продихового апарату рослин.....	25
<i>Лабораторна робота № 5</i> Фізичні та хімічні властивості пігментів.....	30
<i>Лабораторна робота № 6</i> Розподіл пігментів методом одномірної паперової хроматографії.....	37
<i>Лабораторна робота № 7</i> Фотосенсибілізуюча дія хлорофілу на реакцію перенесення водню (за О. А. Гуревичем)	42
<i>Лабораторна робота № 8</i> Виявлення активності ферментів пероксидази і каталази у рослинному матеріалі	46
<i>Лабораторна робота № 9</i> Мікрохімічний аналіз золи рослин	51
<i>Лабораторна робота № 10</i> Виявлення нітратів у рослинному матеріалі	57
<i>Лабораторна робота № 11</i> Періодичність росту деревних рослин	61
<i>Лабораторна робота № 12</i> Визначення жаростійкості рослин (за Ф. П. Мацковим)	64
ДОДАТОК. ПРИГОТУВАННЯ ДЕЯКИХ РОЗЧИНІВ І РЕАКТИВІВ	67
РЕКОМЕНДОВАНІ ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ	69

ПЕРЕДМОВА

Лабораторно-практичні заняття є обов'язковим видом навчального процесу, який дозволяє студентам закріпити теоретичні знання основного матеріалу лекційного курсу. Фізіологія рослин – як фундаментальна наука пов'язана з класичною біологією, а як експериментальна – з практикою сільського господарства, тому викладання цього курсу передбачає обов'язкове виконання певних практичних завдань. Важливим моментом у проведенні лабораторних занять є поєднання навчального процесу з науковою роботою, а тому переважну більшість лабораторних робіт необхідно виконувати на стандартизованих дослідних рослинах, з використанням сучасних методів досліджень. Налагоджені, таким чином, лабораторно-практичні заняття стимулюють індивідуальну роботу студентів, підвищують їх інтерес до конкретних питань фізіології рослин, сприяють кращому оволодінню матеріалом дисципліни на підставі свідомого засвоєння та власних експериментальних результатів.

До кожної лабораторної роботи подається коротке теоретичне пояснення і методичні вказівки щодо виконання, а також поставлені контрольні запитання для самостійного опрацювання.

Рівень теоретичної підготовки до занять перевіряється шляхом опитування перед початком виконання робіт та під час індивідуальних бесід зі студентами. Після виконання кожного завдання викладач перевіряє якість роботи і знання її теоретичного змісту, після чого підписує і зараховує її виконання..

Метою вивчення навчальної дисципліни «Фізіологія рослин з основами біохімії» є пізнання закономірностей життєвих функцій рослин, розкриття їх механізмів, формування уявлення про структурно-функціональну організацію рослинних систем різних рівнів та вироблення шляхів керування рослинним організмом.

Основними завданнями вивчення навчальної дисципліни є:

- закріплення знань щодо теоретичних засад фізіолого-біохімічних процесів та механізмів, що лежать в основі життєдіяльності рослин;

- опрацювання практичного досвіду щодо росту і розвитку основних порід, сортів декоративних, плодово-ягідних та лікарських рослин;
- вивчення процесів водного режиму та його регуляції;
- формування сучасних розумінь про фотосинтез як фізіологічної функції, що становить основу біоенергетики та продуктивності культур;
- засвоєння уявлень про метаболічні системи, що становлять основу життєдіяльності рослин та забезпечують їх існування у різноманітних умовах середовища;
- опрацювання основ мінерального живлення рослин та практичне дослідження зразків;
- деталізувати уявлення щодо механізми стійкості рослин до дії стресорів.

У результаті вивчення навчальної дисципліни «Фізіологія рослин з основами біохімії» студент повинен:

знати: загальні закономірності росту та розвитку рослин; фізіолого-біохімічні основи застосування добрив та препаратів; насінневого та вегетативного розмноження сільськогосподарських, декоративних та лікарських рослин; роль окремих макро- та мікроелементів у життєдіяльності овочевих і плодових культур.

вміти: самостійно аналізувати наукову літературу; проводити моніторинг стану рослин та виявляти причини порушення їх життєдіяльності; застосовувати органічні, мінеральні та бактеріальні добрива залежно від фази онтогенезу рослин; проводити підготовку насіння та посадкового матеріалу до посіву та посадки.

володіти навичками: застосування знань із фізіології рослин з основами біохімії у науковій та освітній діяльності, а також для вирішення практичних завдань у сфері використання, відтворення та охорони садових насаджень, формування рекреаційних зон; способами вегетативного та насінневого розмноження польових та садових культур; оцінювати якість плодів та насіння декоративних і плодових культур.

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

1. До роботи в лабораторії допускаються студенти, які пройшли інструктаж з техніки безпеки та розписалися у відповідному журналі. Роботи слід виконувати у спецодязі (халатах). Під час роботи з великими об'ємами концентрованих кислот та лугів доцільно додатково також використовувати захисні окуляри та гумові рукавички.

2. Перед проведенням досліджень необхідно ретельно вивчити методику та підготувати робоче місце. Роботу слід виконувати так, щоб не заважати сусіду. Виконуючи дослід слід дотримуватися певної послідовності операцій, незаплановані реакції проводити заборонено.

3. Під час роботи з реактивами не можна торкатися обличчя, очей та відкритих ділянок шкіри. Роботи, пов'язані з виділенням газів, потрібно проводити лише під витяжною шафою. Для приготування розчинів, речовини слід відбирати шпателем, кількісно переносити їх у мірні стакани чи колби. Готові реактиви належить зберігати в закритому посуді з етикетками, на яких позначено назву або формулу сполуки, концентрацію та дату приготування. Забороняється працювати з розбитим посудом, користуватися реактивами із банок без етикеток або невідомого походження.

4. У лабораторії заборонено вживати будь-яку їжу, напої та палити. Заборонено пробувати реактиви на смак, вдихати леткі речовини – вони можуть бути отруйними. Отруйні та вибухонебезпечні речовини слід зберігати у сейфі. Зливати залишки реактивів назад у склянку з якої їх було взято – не допускається.

4. Для відбору кислот, лугів та отруйних реактивів використовувати циліндри, піпетки з гумовою грушею/ватним тампоном або спеціальними піпет-дозаторами. При роботі з їдкими речовинами слід додатково одягати запобіжні окуляри, гумові рукавички та фартухи. Для нагрівання горючих та летких

реактивів потрібно користуватися водяними банями, які не можна нагрівати на відкритому вогні або поблизу полум'я.

5. У випадку потрапляння на шкіру кислот чи лугів уражені ділянки слід негайно промити великою кількістю (струменем) води та нейтралізувати відповідним розчином 3 % двовуглекислого натрію (питної соди) для кислоти, або розчином 5 % оцтової кислоти для лугу. У разі опіку очей використовувати розчин 2 % борної кислоти і негайно звернутися до лікаря.

6. У лабораторії повинні бути в наявності протипожежні засоби (вогнегасник, пісок, вода), аптечка для надання першої медичної допомоги та засоби особистого захисту (гумові рукавички, захисні окуляри та ін). Щоб привести в дію порошковий вогнегасник ОП-5 треба висмикнути чеку, спрямувати сопло на вогонь і натиснути поршень.

7. ЗАБОРОНЕНО:

- працювати на несправному обладнанні та при вентиляції, що не працює;
- зливати пожежонебезпечні рідини в каналізацію, спалювати матеріали;
- проводити роботи у приміщенні за відсутності вогнегасника;
- залишати без догляду електронагрівальні прилади;
- використовувати не за призначенням засоби пожежогасіння;
- за виникнення ознак горіння або пожежі необхідно:

1. криком «Пожежа» повідомити усіх присутніх у приміщенні;
2. відключити обладнання від електромережі на щитку;
3. негайно повідомити про це пожежну охорону за тел. 01, при цьому назвати адресу, кількість поверхів будівлі, місце виникнення пожежі, обстановку та наявність людей і назвати своє прізвище. Потім сповістити викладача та вжити заходи щодо евакуації людей, збереження матеріальних цінностей, гасіння (локалізації) пожежі.

8. Після закінчення роботи привести до ладу робоче місце (прибрати зі столу реактиви та обладнання, із ящиків столу – сміття, стіл вимити, протерти сухою ганчіркою) і здати черговому.

9. Після закінчення роботи вимкнути електроприлади та опустити вимикач.

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ОФОРМЛЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Лабораторні заняття з фізіології рослин з основами біохімії є продовженням лекційного курсу та є обов'язковими для закріплення та розширення теоретичних знань студентів. Навички експериментальної роботи сприятимуть грамотній постановці фізіологічних дослідів у польових умовах та закладанні дослідів із біології.

Дані методичні рекомендації містять опис лабораторних робіт за наступними розділами лекційного курсу: «Фізіологія рослинної клітини», «Водний обмін рослин», «Фотосинтез», «Дихання», «Мінеральне живлення», «Ріст і розвиток рослин» та «Фізіологічні основи стійкості рослин». Водночас, у рекомендаціях є роботи двох типів: досліді, що ілюструють теоретичні положення лекційного курсу та експериментальні роботи, пов'язані з кількісним визначенням фізіологічних показників.

Перед початком виконання лабораторної роботи проводиться попередній колоквиум із теоретичних питань, з'ясовуються мета та завдання експерименту, що виконується, обговорюється хід роботи, а в кінці заняття проводиться аналіз, формуються висновки та підбиваються підсумки отриманих результатів.

Вимоги до таблиць та малюнків. Якщо результати роботи необхідно висвітлити у вигляді таблиці чи малюнку/графіку, то у таблиці мають бути зазначені об'єкти дослідження, варіанти досліду та одиниці виміру. На графіках мають бути зазначені назви осей координат чи стовпців діаграм, об'єкти дослідження чи варіанти досліду, одиниці виміру. Малюнок має бути створений студентом власноруч за допомогою кольорових олівців або з вклеєним відповідним фото у кольорі.

Вимоги до аналізу результатів. У кінці роботи сформулювати висновки відповідно до поставленої мети лабораторної роботи та отриманих результатів експериментальних досліджень. Окремо дати відповіді на контрольні запитання.

Лабораторна робота № 1

Визначення явищ плазмолізу/деплазмолізу та потенційного осмотичного тиску у клітинах цибулі

Опис роботи. На даний час явище плазмолізу широко використовується в експериментальній цитології та фізіології рослин для визначення осмотичного потенціалу, в'язкості цитоплазми, клітинної проникності, доведення життєздатності рослинних клітин тощо. Для спостереження явища плазмолізу клітини поміщають у розчин плазмолітика, наприклад, у гіпертонічний сольовий розчин (коли концентрація зовнішнього розчину вища за концентрацію клітинного соку).

У цьому випадку виникає осмотичний тиск води з клітин, що призводить до зменшення об'єму протопластів і їх відокремлення від клітинних стінок (власне плазмоліз). Еластична цитоплазма поступово скорочується за вакуолею, а клітинна оболонка лише втрачає напружений стан, але не скорочується, тому між нею і протопластом виникає проміжок, що заповнюється зовнішнім розчином.

Плазмоліз, процес характерний тільки живим клітинам, є оборотним. Отже, **плазмоліз** – це зменшення об'єму протопласту живої клітини з подальшим відставанням цитоплазми від оболонки, що відбувається за дії гіпертонічних розчинів.

Час плазмолізу – це проміжок часу від занурення клітин у гіпертонічний розчин до появи опуклого плазмолізу у понад половини клітин в полі зору мікроскопа.

Час плазмолізу знаходиться у прямій залежності від в'язкості цитоплазми. Чим нижче в'язкість, тим легше цитоплазма відстає від клітинної оболонки і проміжний, увігнутий плазмоліз швидше переходить в опуклий, тобто час плазмолізу менше (рис. 1.1).

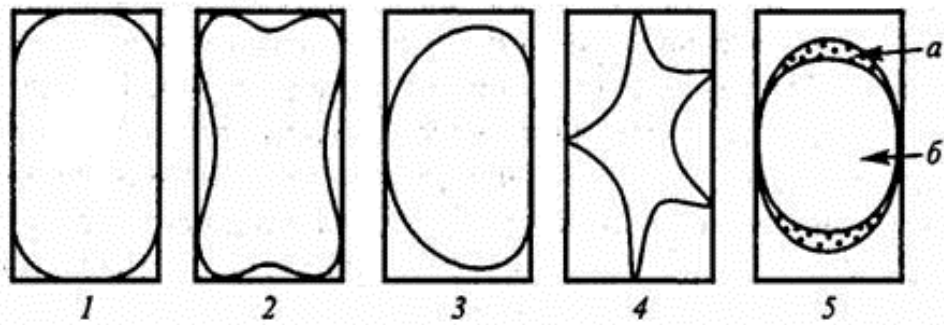


Рис. 1.1 Форми плазмолізу: 1 – кутовий; 2 – увігнутий; 3 – опуклий; 4 – спазматичний; 5 – ковпачковий (а – цитоплазма, б – вакуоля).

У разі створення гіпотонічного розчину (коли концентрація зовнішнього розчину нижча за концентрацію клітинного соку) за допомогою води, градієнт водного потенціалу змінює свій напрямок, вода починає надходити з розчину у вакуоль, тобто у клітині відбувається **деплазмоліз** – відновлення протопластом попереднього стану, порушеного плазмолізом.

Однак, подібне явище може виникати і в тому випадку, коли клітина знаходиться в розчині плазмолітика тривалий час, а розмір його молекул невеликий (наприклад, гліцерин і сечовина), вони проникають через пограничні мембрани цитоплазми (плазмалему і тонопласт), накопичуються у вакуолі, підвищують концентрацію клітинного соку і викликають зворотний тік води у клітину, тобто відбувається явище самовільного деплазмолізу.

У зів'ялих рослин плазмоліз не відбувається, натомість спостерігається явище **циторизу**, коли плазмалема не відокремлюється від оболонки і клітина зморщується. Плазмоліз доцільно спостерігати у рослин із забарвленим клітинним соком, тому що сама цитоплазма безбарвна.

Клітинний сік – водний розчин різних органічних і неорганічних речовин. Потенційне значення осмотичного тиску залежить від числа частинок, що знаходяться у цьому розчині, тобто від концентрації і ступеня дисоціації розчинених молекул. Потенційний осмотичний тиск виражає максимальну здатність клітини втягувати воду. Величина цього показника вказує на можливість рослини зростати на ґрунтах різної водоутримуючої сили.

Підвищення осмотичного тиску за дії посухи служить критерієм зневоднення рослин і необхідності негайного поливу. Даний метод заснований на підборі такої концентрації зовнішнього розчину, яка викликає найбільший початковий (кутовий) плазмоліз у клітинах досліджуваної тканини. В цьому випадку осмотичний тиск розчину приблизно дорівнює осмотичному тиску клітинного соку. Такий зовнішній розчин називають **ізотонічним**.

Залежно від в'язкості цитоплазми у клітинах луски синьої цибулі осмотичний тиск має значення, як правило, від 300 до 1300 кПа. Потенційний осмотичний тиск визначається за **формулою Вант-Гоффа**:

$$P = R \cdot T \cdot c \cdot i, \text{ де}$$

R – універсальна газова стала, 8,314 Дж/моль · К;

T – абсолютна температура К (273 + t°C);

c – ізотонічна концентрація розчину, М;

i – ізотонічний коефіцієнт Вант-Гоффа.

Коефіцієнт Вант-Гоффа характеризує іонізацію розчинів:

$$I = 1 + \alpha \cdot (n - 1), \text{ де}$$

α – ступінь дисоціації розчину даної концентрації;

n – кількість іонів, на яку дисоціює сіль.

Так як неелектроліти **не дисоціюють**, для сахарози i = 1. Ступінь дисоціації NaCl різної концентрації становить:

Концентрація	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Коефіцієнт Вант-Гоффа	0,65	0,71	0,74	0,76	0,79	0,83

Мета роботи: визначити особливості проходження явища плазмолізу і деплазмолізу у рослинних клітинах та порахувати потенційний осмотичний тиск клітинного соку синьої цибулі плазмолітичним методом.

Об'єкти: синя цибуля з лусками.

Реактиви та обладнання: 1М NaCl, 1М розчин сахарози або KNO₃, гліцерин, вода, препарувальні голки, безпечне лезо бритви, піпетки Пастера, градуйовані піпетки на 10 мл, смужки фільтрувального паперу, пінцети, предметні та покривні стекла, термометр, мікроскоп, годинник.

Хід роботи:

1. Відокремити шматочок тонкої зовнішньої плівки досліджуваного об'єкта – зріз епідермісу опуклої сторони луски синьої цибулі. Помістити на предметне скло у краплю води, накрити накривним склом і розглянути початковий стан клітин під мікроскопом.

2. З однієї сторони препарату фільтрувальним папером відтягнути воду, а з протилежного нанести піпеткою краплину 1 М розчину NaCl. Поступово плазмолітик почне надходити у клітину – настає плазмоліз. Піпеткою біля накривного скла нанести воду і фільтрувальним папером протягнути воду крізь препарат. Вода поглинається клітинами і внутрішній вміст поступово заповнює всю клітину, яка повертається до свого попереднього стану – деплазмоліз, а стан клітини називається **тургесцентним**.

3. Результати роботи занести у таблицю 1.1 (зробити малюнки клітин у стані плазмолізу та деплазмолізу, відзначити час їх настання).

Таблиця 1.1

Розчин	Загальний вид клітини (малюнок)	Час плазмолізу, хв		Час деплазмолізу, хв	
		(1)	(2)	(1)	(2)
1 М NaCl	Синя цибуля				

Вода						
------	--	--	--	--	--	--

4. Приготувати 6 розчинів NaCl, сахарози чи KNO₃ по 10 мл з концентрацією від 0,6 до 0,1 моль/л. Для цього необхідно взяти відповідний концентрований розчин і розбавити необхідною кількістю дистильованої води, щоб отримати відповідні концентрації (табл. 1.2). Розчини ретельно перемішати, закрити пробками, щоб попередити випаровування і залишити на лабораторному столі у порядку зниження концентрації.

Таблиця 1.2

Концентрація розчину, моль/л	1 М розчин NaCl (сахарози чи KNO ₃), мл	Дистильована вода, мл
0,6	6	4
0,5	5	5
0,4	4	6
0,3	3	7
0,2	2	8
0,1	1	9

5. Зробити 6 зрізів епідерми луски синьої цибулі розміром до 25 мм² з середньої оптимально забарвленої ділянки. Зрізи одразу помістити у відповідні пробірки з розчинами різних концентрацій починаючи з найвищої, щоб зразки не підсихали на повітрі.

6. Через 25 хвилин зрізи дістати у тій послідовності, в якій вони поміщалися у пробірки по черзі. Помістити зразки на предметне скло у краплю того розчину у якому вони містилися, накрити покривним і розглянути під мікроскопом.

Визначити стадію плазмолізу клітин і знайти ізотонічну концентрацію, яка буде мати середнє значення між концентрацією, при якій плазмоліз тільки почався, і концентрацією, яка вже не викликає плазмолізу.

4. Результати занести у таблицю 1.3, зробити відповідні малюнки, на основі визначеної ізотонічної концентрації розрахувати осмотичний тиск.

Таблиця 1.3

Концентрація розчину, моль/л	Ступінь плазмолізу	Малюнок	Тип розчину
0,6			
0,5			
0,4			
0,3			
0,2			
0,1			

Визначення осмотичного тиску у клітинах синьої цибулі враховує температуру у кімнати на рівні $+20^{\circ}\text{C}$. Залежно від в'язкості цитоплазми у клітинах луски цибулі осмотичний тиск варіює, як правило, від 300 до 1300 кПа.

Висновок:

Контрольні питання:

1. Чому плазмоліз спостерігається тільки в живих клітинах та чи можна спостерігати плазмоліз у тваринних клітинах і чому?
2. Поясніть поняття «осмос», «осмотичний тиск», «тургор» і «сисна сила»? Які існують методи для їх визначення?
3. Чому у рослин посушливих, сухих місць зростання в'язкість цитоплазми, як правило вища, ніж у мезофітів?
3. Чому під час тривалих дощів плоди абрикосу та вишні розтріскуються?

Лабораторна робота № 2

Визначення проникності живого і мертвого протопласту для клітинного соку

Опис роботи. Мембрани – система динамічних спеціалізованих структур, що відокремлюють клітину від зовнішнього середовища та утворюють у клітині відсіки, відносно ізольовані один від одного. Мембрани складають 2/3 сухої маси клітини і складаються, переважно, з білків та ліпідів згідно з рідинно-мозаїчною теорією розвитку.

Проникність протопласта пов'язана з його структурною різноякісністю. У протопласті живої клітини є три обмежених шари: **зовнішній**, що прилягає до целюлозної оболонки клітини – плазмалема, **середній** – мезоплазма і **внутрішній**, який являє собою мембрану вакуолі – тонопласт. Плазмалема і тонопласт мають мембранну будову і володіють властивістю напівпроникності. Проникність протопласта непостійна, вона залежить від зовнішніх чинників і фізіологічного стану самої клітини. Таким чином, живий протопласт здатний регулювати транспорт речовин і утримувати деякі з них у складі клітинного соку всередині вакуолі. При пошкодженні протопласт втрачає властивість вибіркової проникності, і тому речовини, що містяться у клітинному соку, вільно виходять з клітини. **Коагуляцію або згортання протопласта** викликають такі чинники як високі і низькі температури, наркотичні речовини, активні хімічні сполуки, отрути тощо.

Мета роботи: визначити проникність протопласту клітин столового буряка за дії температури та хімічних речовин.

Об'єкти: проморожений та свіжий коренеплід столового буряка.

Реактиви та обладнання: дистильована вода, 50% спирт, 30% розчин оцтової кислоти, 50-% розчин гліцерину, ацетон, 75-% розчин перекису водню, 50-% розчин ТХО (3-хлороцтової кислоти), розчин концентрованої соляної кислоти, пробкове свердло, ступки, штатив, пробірки, мірні циліндри, водяна баня, сірники, тримач для пробірок, ніж або скальпель.

Хід роботи:

1. Із свіжого коренеплоду столового буряка нарізати пластинки товщиною 0,5 – 0,8 мм, а потім свердлом вирізати квадрати 0,5*0,5 мм і аналогічно зробити квадрат з коренеплоду, що 24 години знаходився у морозильній камері. Ретельно промити отримані зразки водою поки вода не стане безбарвною, для вимивання β-аланінів із пошкоджених клітин.

2. Отримані зразки помістити у 10 пробірок, до яких додати:

- 1 пробірка – 6 мл дистильованої води зі свіжим зразком (контроль);
- 2 пробірка – 6 мл дистильованої води зі зразком з морозильної камери;
- 3 пробірка – 6 мл дистильованої води і нагріти на водяній бані, гарячу воду злити і залити холодною;
- 4 пробірка – 6 мл 30-% оцтової кислоти;
- 5 пробірка – 6 мл 50-% етилового спирту;
- 6 пробірка – 6 мл 50-% гліцерину;
- 7 пробірка – 6 мл ацетону;
- 8 пробірка – 6 мл 75-% перекису водню;
- 9 пробірка – 6 мл 50-% ТХО (3-хлороцтової кислоти);
- 10 пробірка – 6 мл концентрованої соляної кислоти.

3. Пробірки перемішати на початку експерименту і відзначити початкове зафарбування розчину та через 20 хвилин. Заповнити таблицю 2.1 відповідними позначками:

"–" - рідина безбарвна;

"+" - рідина слабо забарвлена;

"++" - рідина достатньо зафарбована і має певний відтінок;

"+++" - рідина сильно забарвлена та має яскравий виразний колір.

4. Окремо замалювати штатив із пробірками або вклеїти відповідне роздруковане фото.

Таблиця 2.1

Варіант досліджу	Інтенсивність забарвлення рідини	
	Початкова	Дослідна (20 хв)
Контроль		
Вода + ↓ температура		
Вода + ↑ температура		
30-% оцтова кислота		
50-% етиловий спирт		
50-% гліцерин		
Ацетон		
75-% перекис водню		
50-% ТХО		
Соляна кислота (конц.)		

Висновок:

Лабораторна робота № 3

Визначення життєздатності насіння за фарбуванням цитоплазми (за Л. О. Івановим)

Опис роботи. Одним із найважливіших ознак продуктивності насіння зернових культур є показник їх життєздатності. **Життєздатність насіння** – це властивість насіння зберігати здатність до проростання на високому рівні. Цей показник якості характеризує відсотковий вміст живого насіння у партії і є одним з основних щодо якості насіння, важливих для сільського господарства. Визначають його за умови тривалого періоду проростання насіння, а також за необхідності термінового висіву або транспортування насіння, яке перебуває у стані вимушеного спокою.

Найточнішим та надійним способом визначення життєздатності насіння зернових культур вважається **тетразольний спосіб**. Він заснований на тому, що у живих клітинах і тканинах безбарвна в розчині сіль тетразолу відновлюється під дією дихальних ферментів групи дегідрогеназ і утворює яскраво-червону сполуку – **формазан**. У життєздатного насіння всі частини зародка мають бути пофарбовані. За допомогою тетразольного методу можна визначити не тільки фізіологічно живе насіння, але й виявити ослаблене з різних причин. Для цього розроблено **топографічний тетразольний метод**, коли живі, здорові тканини забарвлюються у світло-вишневий колір, а пошкоджені мають темно-бордові, брудно-червоні та інші відтінки. Проте, поряд із точністю, цей метод є досить дороговартісним, а тому зазвичай використовується у разі діагностики значних об'ємів зерна.

Значно простішими – **методом Нелюбова** (для дводольних культур) встановлюють життєздатність насіння гороху, квасолі, люпину, льону, конопель та гарбузових культур, і при цьому використовується барвник індигокармін та **методом Іванова** (для однодольних культур) визначають життєздатність насіння пшениці із розчином кислого фуксину. Дані методи фарбування насіння з метою визначення їх життєздатності засновані на властивості живої протоплазми не пропускати барвники в клітину, тобто на непроникності живої протоплазми для

фарб, тоді як мертва протоплазма швидко та добре забарвлюється, оскільки у мертвої та пошкодженої тканини змінюється структура протоплазми та збільшується її спорідненість із барвниками.

Так, фарбують зародки розчином барвників індигокарміну чи кислого фуксину, тому при фарбуванні кількість живих зародків, що визначається такими методами, приблизно дорівнює кількості пророслого насіння. Недоліком методів Нелюбова та Іванова є те, що застосуванням цих методів можливо лише визначити життєздатність насіння, які містять дубильні речовини. Наприклад, насіння дуба, скумпії містять значні кількості дубильних речовин і не забарвлюються індигокарміном чи кислим фуксином, тому ці методи саме для них є непридатний.

Мета роботи: визначити життєздатність насіння дводольних рослин за методом Іванова.

Об'єкти дослідження: насіння пшениці, кукурудзи, сорго, жито чи інших однодольних культур.

Реактиви та обладнання: дистильована вода, термостат, бюкси, термометри, леза, чашки Петрі або ступки, скляні стаканчики, пробірки, фільтрувальний папір, водяна баня, тримачі для пробірок, 0,2% розчин кислого фуксину або 0,1% розчин індигокарміну.

Хід роботи:

1. Беруть дві партії насіння дослідних культур, кожна по десять штук. Першу партію попередньо інактивують кип'ятінням (кип'ятити в пробірках з водою 2–3 хвилини на водяній бані). Потім обидві партії насіння попередньо замочують у воді протягом 10 годин за кімнатної температури.
2. Після замочування насіння розрізають лезом вздовж борозенки навпіл і поміщають на 15 хвилин у склянку або бюкс з 0,2% розчином кислого фуксину або 0,1% розчином індигокарміну. Фарбу зливають, промивають насіння водою,

розміщують пінцетом у чашці Петрі або на фільтрувальному папері і визначають їх життєздатність.

3. У життєздатного насіння зародки не забарвлені, а у мертвих або сильно пошкоджених – пофарбовані досить інтенсивно і мають яскравий характерний колір.

4. Визначення життєздатного та нежиттєздатного насіння проводиться за формулою:

$$\text{ЖЗН} = (a - 100/v) * 100, \text{ де}$$

ЖЗН – життєздатність насіння, %;

a – кількість насіння, у якого зародок не зафарбований;

v – загальна кількість насіння, що взяте для аналізу.

5. Розрахувати ЖЗН окремо для дослідних культур і результати дослідів занести у таблицю 3.1. Сформулювати висновки з роботи щодо придатності насіння для посівів, враховуючи, що життєздатність насіння має бути не нижчою, ніж 90-95% для бобових та зернових культур.

Таблиця 3.1

Об'єкт дослідження	Загальна кількість насіння для аналізу	Кількість насіння із зафарбованим зародком	ЖЗН, %

Висновок:

Лабораторна робота № 4

Вивчення стану продихового апарату рослин

Опис роботи. Процес випаровування води надземними органами рослини називається **транспірація**. Транспірація відбувається через продихи (**продихова**), кутикулу (**кутикулярна**) і сочевички (**лентикулярна**), а також, інколи, через репродуктивні органи. Однак основну роль відіграє **регульована продихова транспірація**. Частка кутикулярної транспірації залежить від «потужності» кутикули, яка визначається видовою специфікою рослини та умовами зростання. Вона є досить високою у молодих органах, але з віком рослини – знижується. Інтенсивність продихової транспірації залежить від кількості продихів, що знаходяться на одиниці поверхні листка, і від ширини продихової щілини. Чинники зовнішнього і внутрішнього середовища прямо чи опосередковано впливають на продиховий апарат, викликаючи в замикаючих клітинах перетворення, що призводять до зміни тургору. Із зовнішніх чинників на рухи продихів найбільше впливають вологість повітря і умови водопостачання, світло і температура, а з внутрішніх – парціальний тиск CO_2 у системі міжклітинників, стан гідратації рослини, іонний баланс і фітогормони, з яких цитокінін сприяє відкриванню продихів, а абсцизова кислота – закриванню. Також, на стан продихів впливають вік рослини і ендогенні добові ритми.

Уявлення про стан продихового апарату має практичне значення: за ступенем відкриття продихів визначається потреба рослин у воді для встановлення термінів поливу.

Метод Шталя або хлоркобальтовий метод спостереження за продиховим апаратом базується на зміні кольору фільтрувального паперу, просоченого хлоридом кобальту, при поглинанні папером парів води, що випаровуються поверхнею листка. За часом, що необхідний для переходу забарвлення хлоркобальтового паперу з блакитного (колір сухого CoCl_2) у рожевий (колір $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), судять про відносну транспірацію рослин.

Метод інфільтрації за Молішем заснований на здатності рідин, що змочують клітинні стінки, проникати крізь відкриті продихові щілини у

найближчі міжклітинники, витісняючи з останніх повітря. При успішній інфільтрації міжклітинників відповідні ділянки листа стають прозорими. У якості інфільтруючих розчинів беруть органічні рідини, що володіють різною в'язкістю і неоднаковою здатністю змочувати клітинні стінки і тому по-різному проникати крізь продихові отвори в міжклітинники. Міжклітинники листка заповнені повітрям, при розгляданні листка на світлі він здається матовим. У разі інфільтрації, тобто заповнення міжклітинників рідиною, то відповідні ділянки листка стають прозорими. Рідини проникають у продихові щілини залежно від їх ширини: ксилол – через слабо відкриті продихи, бензол – середньо відкриті, етиловий спирт - повністю відкриті продихи.

Метод відбитків за Полаччі - Молотковським заснований на отриманні тонкої прозорої плівки з відбитками (репліками) продихів. Розглядаючи їх під мікроскопом, можна визначити число продихів на одиницю листової поверхні та їх розмір. Для виготовлення реплік застосовуються речовини, що утворюють плівку при випаровуванні розчинника або в результаті полімеризації.

Мета роботи: визначити стан продихів різних груп рослин різними методами.

Об'єкти: листки квіткових та декоративних рослин.

Реактиви та обладнання: розчин 5% хлоркобальту, бензол, ксилол чи петролейний ефір, етиловий спирт у крапельницях, безбарвний манікюрний лак; смужки фільтрувального паперу, предметне скло, гумові кільця чи затискачі, пінцет, мікроскоп, лезо бритви, препарувальні голки, спиртівки, сірники, вентилятор, лампа 200 Вт.

Хід роботи:

Дослід за Шталем:

1. Приготувати хлоркобальтовий папір, для чого смужки фільтрувального паперу, тримаючи пінцетом, занурюють у 5% розчин хлоркобальту. Коли папір

просочиться розчином (набуває рожевого забарвлення) – його дістають, а потім папір підсушують над спиртівкою до появи блакитного забарвлення.

2. Прикласти до листка дослідних рослин із двох сторін дві смужки хлоркобальтового паперу. Для усунення дії атмосферної вологи листок обережно затиснути разом із папером між предметним склом, перев'язати гумовими кільцями чи затискачем.

3. Відмітити швидкість зміни забарвлення з блакитного на рожевий, що дає можливість судити щодо відносної інтенсивності транспірації, а результати (швидкість зміни забарвлення у хв) – занести у таблицю 4.1.

Дослід за Молішем:

1. Відібрати листки дослідних рослин і розкласти їх на столі нижньою стороною догори.

2. На нижню сторону кожного листка нанести по черзі по 1 краплі ксилолу/ефіру, бензолу та етилового спирту, так щоб вони не зливалися між собою. Витримати листок у горизонтальному положенні до повного зникнення крапель, які можуть або випаруватися, або проникнути всередину.

3. Через 5 хвилин розглянути листок проти світла. Відзначити ступінь відкриття продихів за тією речовиною, яка проникла крізь щілину і утворила прозору масну пляму; якщо плями взагалі не утворюються, то продихи закриті. У таблиці 4.2 знаком «+» відмітити проникнення рідини, знаком «-» – відсутність інфільтрації.

Дослід за Полаччі-Молотковським:

1. На поверхню листка нанести тонкий мазок розчину безбарвного лаку в ацетоні і дати лаку добре висохнути. Після випаровування розчинника утворюється плівка, на якій добре видно епідерміс з продихами.

2. Підсохлий відбиток акуратно зняти з листка, помістити в краплю води на предметне скло, накрити покривним, розглянути під мікроскопом. Визначити кількість і стан продихів у полі зору об'єктива. У таблиці 4.3 замалювати по 1 продиху з кожного варіанту з відміткою про ступінь відкриття продихів та їх кількість.

Таблиця 4.1

Об'єкт дослідження	Варіант досліджу	Інтенсивність транспірації	
		Нижня сторона листка	Верхня сторона листка

Таблиця 4.2

Об'єкт дослідження	Інфільтрація			Висновки про стан продихів
	Ксилол / Ефір	Бензол	Етиловий спирт	

Таблиця 4.3

Об'єкт дослідження	Кількість продихів	Відсоток відкритих продихів	Малюнок

Лабораторна робота № 5

Фізичні та хімічні властивості пігментів

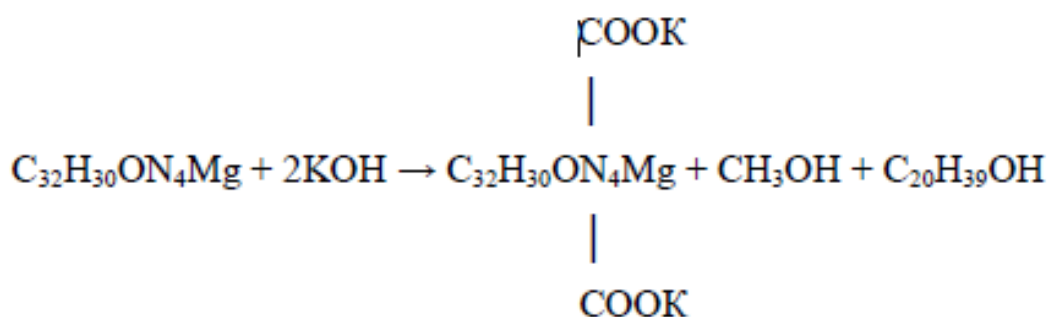
Опис роботи. Фотосинтетичні пігменти – хлорофіл і каротиноїди (каротин та ксантофіл) – знаходяться у живому листку у тісному взаємозв'язку з білково-ліпоїдними компонентами мембран хлоропластів. Характер цього зв'язку остаточно сьогодні не з'ясований. Відомо, що він менш міцний, ніж ковалентний (можливо, адсорбційний, просторовий), і легко руйнується за дії на листок полярних органічних розчинників (спирт чи ацетон), що викликають денатурацію білкової частини фотосинтетичної мембрани. Певну роль в підтримці природного структурного стану пігментів в живому листку відіграє вода. З абсолютно сухого листка хлорофіл неможливо вилучити безводним розчинником, тому зазвичай використовують 85 % ацетон або етиловий спирт.

Неполярні розчинники (бензин, петролейний ефір) не можуть розірвати зв'язок хлорофілу з білками мембран і вилучити чистий пігмент. Вода також не здатна порушити зв'язок хлорофілу з білком. Каротин на відміну від ксантофілів менш міцно пов'язані з білком і, перебуваючи у ліпоїдному оточенні, легше, ніж хлорофіл, вилучаються неполярними розчинниками.

Хлорофіли – обумовлюють зелений колір рослини і, хімічно, є складними ефірами дикарбонової хлорофілінової кислоти із залишками двох спиртів: метилового і фітолу. Основний пігмент, що забезпечує проходження процесу фотосинтезу – **хлорофіл а** ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$), що поглинає сонячну енергію і трансформує її в енергію хімічних зв'язків. Допоміжним пігментом є **хлорофіл б** ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$), а також **каротиноїди** (жовтого, оранжевого чи червоного кольору) – $C_{40}H_{56}$.

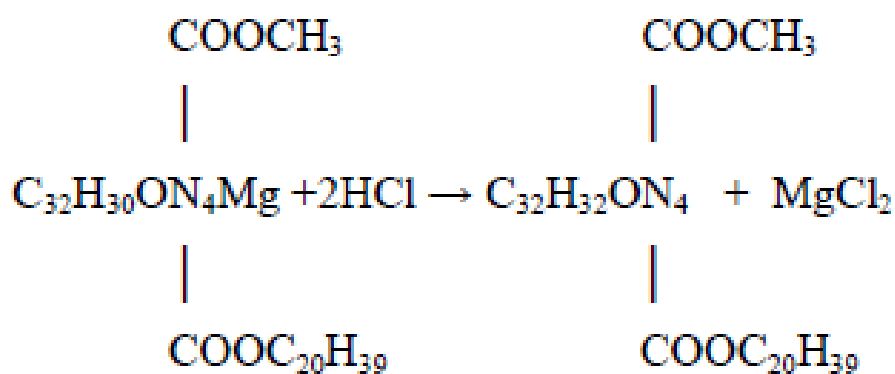
Відокремити ксантофіли від хлорофілів у загальній суміші можна **за методом Крауса**. Вони, як двоатомні спирти, мають вищу гідрофільність і тому значно гірше за інші пігменти розчинні у бензині. Каротин легше відокремити від суміші пігментів шляхом **омилення хлорофілів**. Хлорофіл завдяки наявності фітольного «хвоста» має високу розчинність в бензині. При омиленні його розчином лугу відбувається відщеплення спиртів: фітолу і метанолу. Частина

молекули, що залишилася – **двохосновна кислота хлорофілін** - утворює сіль хлорофіліну з калієм, яка, як і всі солі взагалі, розчинна у воді, тобто гідрофільна, і нерозчинна у бензині. В результаті, після омилення в бензині залишається тільки високоліпофільний каротин. Реакція омилення йде наступним чином:

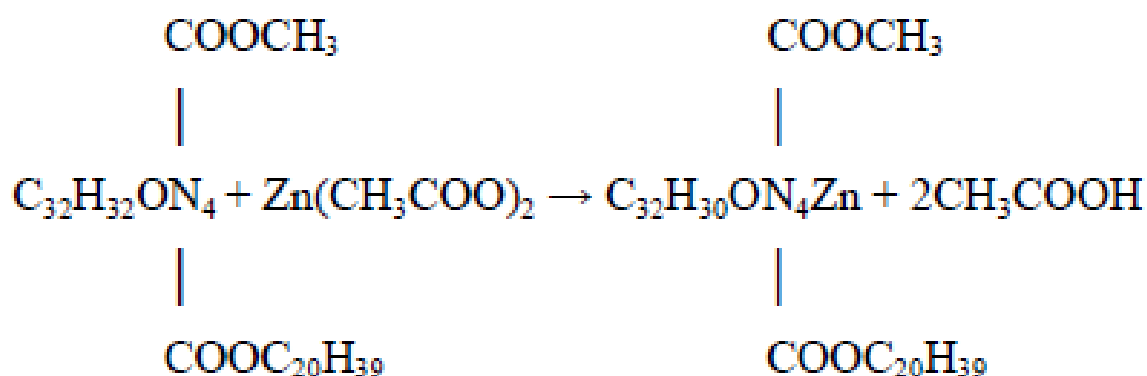


Солі хлорофілу, як і хлорофіл, мають зелене забарвлення, оскільки при омиленні не зачіпається структура порфіринового ядра, що надає молекулі зелений колір. Здатність хлорофілу до реакції омилення показує, що він є складним ефіром і, як всі інші складні ефіри (наприклад, жири), здатний розщеплюватися під дією лугу з утворенням солей. При цьому, жовті пігменти з лугами не реагують.

У центрі порфіринового ядра молекули хлорофілу знаходиться атом магнію. Активним впливом розведених і слабких кислот атом магнію можна замінити на водень. Утворюється безмагнієве похідне хлорофілу оливкового кольору – **феофітин**:



Реакція феофітинізації показує, що зелене забарвлення хлорофілу значною мірою пов'язане із присутністю атома металу магнію. Про це також свідчить реакція **відновлення металоорганічного зв'язку**. Реакція між феофітином і сіллю будь-якого металу, наприклад, оцтовокислою міддю, призводить до заміщення водню металом і відновленню зеленого забарвлення. Отримана сполука – **мідьпохідне хлорофілу**, яке, однак, вже не має властивостей хлорофілу:



Отже, участь хлорофілу в процесі фотосинтезу обумовлена його вибірковою здатністю поглинати світлову енергію, яка необхідна рослині для синтезу органічних сполук з води і вуглекислого газу. Поглинання світла хлорофілом є не суцільним, а вибірковим. У цьому можна переконатися, пропускаючи біле світло через розчин хлорофілу, а потім розкладаючи його за допомогою призми. Окремі ділянки спектра виявляються поглиненими, а на їх місці буде видно темні смуги. Отриманий спектр називається **спектром поглинання**. Також, хлорофіл має здатність до **флуоресценції**. При поглинанні світла молекулами хлорофілу а реакційних центрів (РЦ), то фотосистеми I і II переходять у збуджений стан, а повернення їх до звичайного стану супроводжується випромінюванням раніше поглиненої енергії у вигляді тепла, міграції енергії, хімічної енергії та червоної флуоресценції. Флуоресценція виявляється за червоним кольором розчину хлорофілу, що розглядається у відбитому світлі на темному фоні. Незалежно від

довжини хвилі збуджуючого світла хлорофіл флуоресціює тільки червоним світлом.

В живому листку основним флуоресціюючим пігментом є **хлорофіл а**. При цьому, у нативному листку флуоресценція виражена значно слабше, ніж в розчині, так як частина поглиненої енергії використовується на сенсibilіювання фотохімічних реакцій. Тому зростання інтенсивності фотосинтезу, як правило, тягне за собою і ослаблення флуоресценції. За її інтенсивністю можна судити про стан хлорофілу і його участь у фотосинтезі.

Мета роботи: вивчити оптичні та хімічні властивості хлорофілу у листках дослідних рослин.

Об'єкти: свіжі листки китайської троянди (гібіскусу) чи бальзаміну.

Реактиви та обладнання: бензин Калоша, вода, крейда, 96% етиловий спирт, 20% КОН або NaOH, 20% HCl, оцтовокислий цинк чи мідь у порошок, настільна лампа, ступка з маточкою, пробірки, воронка, паперовий фільтр, медичний шприц, дистильована вода, пінцети, пробірки, скальпелі або металеві шпателі, сірники, спиртівка, водяна баня.

Хід роботи:

- 1. Одержання спиртового екстракту пігментів.** Для цього наважку (2-3 г) зелених листків дрібно нарізати, розтерти у ступці до однорідної маси. На кінчику скальпеля додати крейди для нейтралізації кислот клітинного соку. У ступку до гомогенної маси додати 7 мл 96% етилового спирту, перемішати скляною паличкою та профільтрувати. Одержаний спиртовий екстракт повинен мати концентрований зелений прозорий колір. Одразу розділити отриманий екстракт на 2 пробірки приблизно однакового об'єму.
- 2. Розділення пігментів за Краусом.** До 3 мл спиртової витяжки додати рівну кількість бензину, перемішати, внести 2-3 краплі води (для кращого розподілу шарів), знову обережно перемішати (сильне перемішування є небажаним, так як утворюється стійка емульсія і розчин стає мутним) і дати відстоятися. У


результаті відбувається розподіл вмісту пробірки на два шари: верхній (бензиновий), зафарбований у зелений колір, бо містить хлорофіл, а також каротин), і нижній (спиртовий), зафарбований у жовтий колір, бо містить ксантофіл. Якщо обидва шари зафарбовані у зелений колір, то розподіл проведено невдало. В такому випадку слід додати ще трохи бензину, добре перемішати пробірку, внести 2 краплі води і знову дати відстоятися. А якщо нижній шар недостатньо прозорий внаслідок надлишку води, то додати трохи спирту.

3. Реакція омилення хлорофілу. До пробірки після проведення реакції Крауса додати 2-3 краплі 20% КОН чи NaOH, багаторазово перемішують і дати відстоятися, поки не відбудеться чітке розділення суміші на дві зони: верхню (жовтого кольору), що містить каротин, і нижню (зеленого кольору), що містить калієву сіль хлорофілу – хлорофілін. Тобто, зовні, шари міняються місцями.

4. Реакція феофітинізації. Реакція феофітинізації доводить наявність атому магнію у молекулі хлорофілу. В окрему пробірку з 2-3 мл спиртової витяжки пігментів додати по 2-3 краплі 20 % HCl і перемішати (концентрованіші кислоти непридатні, тому що викликають необоротне руйнування порфіринового ядра хлорофілу). Під дією кислоти утворюється феофітин оливково-бурого кольору.

5. Реакція відновлення металоорганічного зв'язку показує, що зелене забарвлення хлорофілу обумовлено наявністю у його складі саме металу. Для цього в пробірку із розчином феофітину внести на кінчику скальпеля оцтовокислий цинк чи мідь і доводять до кипіння. Якщо забарвлення не зміниться, слід додати ще трохи солі цинку чи міді і знову нагріти. Відбувається зміна оливковою забарвлення на смарагдово-зелене. У таблиці 5.1 оформити результати кожного досліду разом з графічним відображенням.

6. Флуоресценція. Спиртовий екстракт пігментів розглянути на рівні очей – розчин буде зеленого кольору. Потім пробірку розмістити перед темним папером біля електричної лампи і розглянути її у відбитому світлі. Розчин матиме темно-червоний колір. Результати замалювати на малюнку 5.1

Вихідна сполука	Доданий реактив	Малюнок	Отримана сполука
1.			
2.			
3.			
4.			

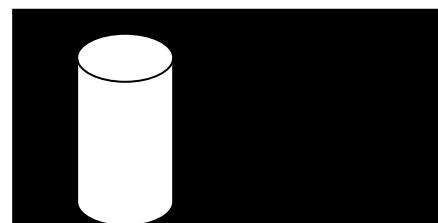
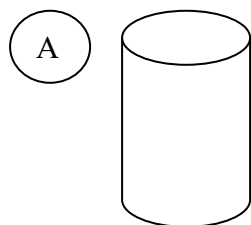


Рис. 5.1 Флуоресценція: а – спиртовий розчин; б – спиртовий розчин перед темним папером у відбитому світлі

Лабораторна робота № 6

Розподіл пігментів методом одномірної паперової хроматографії

Опис роботи. До основних фотосинтетичним пігментів листка відносяться **хлорофіли** і жовті пігменти – **каротиноїди**, які відповідно до їх хімічної будови поділяються на дві групи: **каротини** ($C_{40}H_{56}$) і окисленіші **ксантофіли** ($C_{40}H_{56}O_n$). Одні й другі являють собою суміш декількох пігментів подібної будови, яку можна розділити на окремі компоненти за допомогою методу хроматографії.

Метод паперової хроматографії був запропонований російським вченим М.С. Цветом у 1906 році і зараз широко використовується для якісного поділу суміші пігментів. Всі хроматографічні системи складаються в основному з двох фаз: **нерухомої** і **рухомої**. Зазвичай рухома фаза переміщається по нерухомій або пропускається через неї.

Метод хроматографії заснований на різній рухливості (R_f) кожного компонента на певному адсорбенті. **Адсорбент** – тверда речовина, що здатна утримувати на своїй поверхні певні молекули. У якості адсорбентів можна використовувати сахарозу, оксид магнію, крохмаль, силікагель, папір тощо. Рухливість речовини залежить від її розчинності безпосередньо в розчиннику, пропущеного через адсорбент, і відсотку адсорбції на даному адсорбенті. **Чим вищою** є розчинність пігменту в розчиннику і **чим гірше** він адсорбується на адсорбенті, **тим більшою** є його рухливість, і **тим далі** він буде розташований від стартової смуги. Застосовуючи різні комбінації розчинників і адсорбенти різної природи, можна досягти високого ступеня розділення і очищення пігментів.

Одним з адсорбентів при хроматографії є папір. Хроматографічне розділення на папері проводять у **висхідному** або **низхідному напрямку**. При **висхідній хроматографії** паперову смугу підвішують вертикально; при цьому нижній її кінець, на який нанесена суміш пігментів, занурюють у розчинник. По мірі руху розчинника під дією капілярних сил вертикально вгору відбувається поділ розчинених речовин (Рис. 6.1).

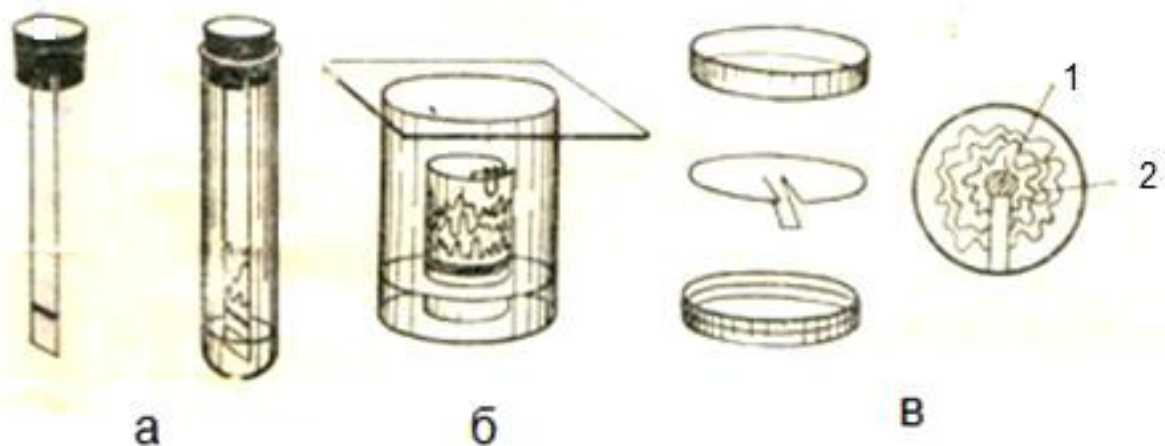


Рис. 6.1 Схема паперової висхідної хроматографії

а – вузька смужка паперу; б – циліндрична хроматограма; в – кругова хроматографа (1-стартова пляма; 2-розділені групи пігментів)

При **низхідній хроматографії** верхній кінець паперової смуги з сумішшю пігментів, нанесених недалеко від краю паперу, закріплюють у лотку, який розміщують у верхній частині камери. Нижній кінець паперу розташовується так, щоб він не торкався налитого на дно камери розчинника. В результаті дії капілярних сил і сили тяжіння розчинник починає пересуватися вниз по паперовій смугі і в результаті чого суміш розділяється.

Хроматографію проводять у герметично закритих посудинах, де підтримують насичену парами розчинників атмосферу, що запобігає їх випаровування з паперу. Для ефективного розподілу пігментів папір повинен бути досить щільної рівномірної товщини.

Для характеристики положення плям використовують величину R_f – коефіцієнт рухомості:

$$R_f = l / L, \text{ де}$$

l – відстань між стартом і положенням центру плями на хроматографі;

L – відстань між стартом і фронтом руху розчинника

Мета роботи: поділити суміш пігментів методом одномірної паперової висхідної хроматографії.

Об'єкти: свіжі листки різних кімнатних рослин.

Реактиви та обладнання: ацетон, 96% етиловий спирт, бензин Калоша, крейда у порошку або вуглекислий кальцій, дистильована вода; фарфорові ступки з маточкою, піпетки, скальпелі, скляні стаканчики, пробірки або хроматографічні циліндри з пробками, штатив для пробірок, пробкові свердла діаметром 0,8-1см, чашки Петрі, хроматографічний та фільтрувальний папір, скляні палички.

Хід роботи:

- 1. Одержання спиртового екстракту пігментів.** Для цього наважку (2-3 г) зелених листків дрібно нарізати, розтерти у ступці до однорідної маси. На кінчику скальпеля додати крейди для нейтралізації кислот клітинного соку. У ступку до гомогенної маси додати 5 мл 96-% етилового спирту, перемішати скляною паличкою та профільтрувати. Одержаний спиртовий екстракт повинен мати концентрований зелений прозорий колір.
- 2.** На смужку хроматографічного паперу (**2x12 см**) простим олівцем нанести стартову лінію (від краю смужки **1-1,5 см**), занурити цим кінцем у спиртову витяжку пігментів на глибину **1-1,5 см**, висушити на повітрі. Операцію повторити до тих пір (**15 разів**), поки зона занурення не набуде інтенсивного зеленого кольору. Потім опустити цей кінець кілька разів у чистий ацетон на глибину **2 мм**, зігнати все пігменти у рівень стартової смуги (**ширина 2-3 мм**), просушити і вставити протилежним кінцем у крюк пробки. Закрити пробкою пробірку, на дно якої внести бензин Калоша, так щоб папір у нього не занурювався (**до 2 мм**).
- 3.** Смужка паперу повинна знаходитися у вертикальному положенні, а її нижній край необхідно занурити у розчинник так, щоб останній не торкався стартової смуги (рис. 6.1). До і після занурення хроматограми пробірка повинна бути закрита щільно пробкою і перебувати на слабкому світлі для уникнення

фоторуйнування пігментів. Коли розчинник досягне верхнього краю хроматограми, смужку паперу вийняти і просушити на повітрі. На хроматограмі відзначити положення плям, які відповідають певним групам пігментів.

4. На хроматограмі пігменти будуть розташовуються у певному порядку. Слабо-зелена зона, яка іноді спостерігається на місці стартової смуги, являє собою **хлорофілід** – бесфітольні похідні хлорофілу, нерозчинні в бензині. Безпосередньо над стартовою смугою знаходиться **хлорофіл b** жовтувато-зеленого кольору, над ним – **хлорофіл a** блакитно-зеленого кольору. Далі розміщуються **ксантофіли**, що не поділені на окремі компоненти при такому способі хроматографії, і ще вище, разом з фронтом розчинника – **оранжевий каротин**.

5. На отриманій хроматограмі відзначити зони розташування пігментів, позначити їх цифрами і злегка підфарбувати в відповідний колір, так як на повітрі вони швидко вицвітають. Розрізати хроматографу на відповідну кількість студентів, що виконували дослід, розшифрувати її і вклеїти в зошит. Стрілкою вказати напрямок руху розчинника і розрахувати R_f для кожної з груп пігментів. Результати внести у таблицю 6.1

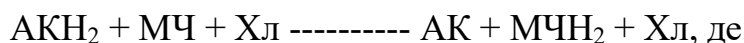
Таблиця 6.1

	Коефіцієнт рухомості R_f

Лабораторна робота № 7

Фотосенсибілізуюча дія хлорофілу на реакцію перенесення водню **(за О. А. Гуревичем)**

У 1948 р. академік О. А. Красновський простим експериментом довів, що хлорофіл у фотосинтезі є учасником та ініціатором окисно-відновлювальних реакцій, тобто виконує роль фотосенсибілізатора окисно-відновної реакції перенесення електрона від первинного донора до первинного акцептора. Цю реакцію можна спостерігати у модельних системах з використанням штучних донорів та акцепторів електронів. У якості донора електронів найчастіше використовується аскорбінова кислота (АК), а як акцептор – будь-який барвник, який у відновленому стані переходить у лейкоформу, наприклад метиловий червоний (МЧ):



AKH₂ – аскорбінова кислота;

МЧ – метиловий червоний;

МЧH₂ – лейкоформа метилового червоного;

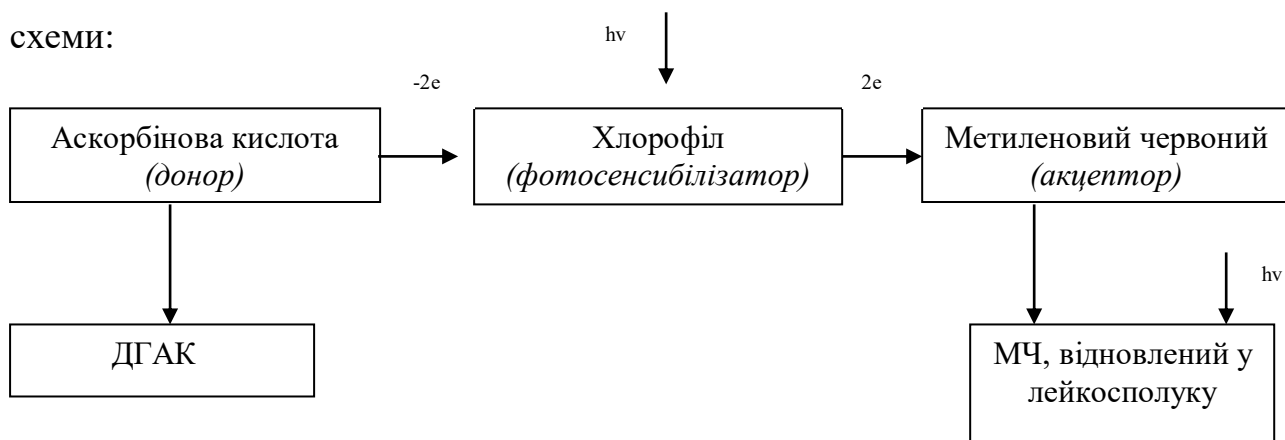
Хл – хлорофіл.

Аскорбінова кислота здатна до незворотної окисно-відновної реакції з утворенням дигідроаскорбінової кислоти (ДГАК), що супроводжується перенесенням електрона до акцептора.

У цьому полягає найважливіша функція АК у клітинах живих організмів, де вона виступає як джерело енергії, віддаючи електрони та протони у дихальний електрон-транспортний ланцюг (ДЕТЛ). Окисно-відновний потенціал (E₀) АК дорівнює 0,1 еВ (при рН 5,75). АК є відновником, а у цій реакції – донором електронів.

Метиловий червоний також має окислювально-відновні властивості, його E₀=0,8 еВ. Як окислювач, МЧ, враховуючи велику різницю потенціалів (ΔE₀=0,7 еВ) неспроможний окислювати АК спонтанно. Проте, здійснити відновлення він може за допомогою фотосенсибілізатора, тобто речовини, що

використовує енергію світла та стимулює хімічну реакцію, але не бере безпосередню участь у ній. Транспорт в окислювально-відновній реакції за участю фотосенсибілізатора (збудженого хлорофілу) можна подати у вигляді схеми:



У тилакоїдній мембрані хлоропласту завдяки високоенергетичному електрону (\bar{e}) хлорофіл має властивості сильного відновника і спроможний відновлювати редокс-системи з великим негативним потенціалом. Електрон, що віддається при цьому, залишається високоенергетичним і може свою енергію витратити на наступні окислювально-відновні реакції, спрямовані на трансфер протонів із зовнішнього боку мембрани тилакоїда на внутрішню для подальшого синтезу АТФ.

Мета роботи: за допомогою модельного досліду продемонструвати фотосенсибілізуючу активність хлорофілу.

Об'єкти: зелені листки будь-яких кімнатних рослин.

Реактиви та обладнання: лампа 100W, штатив, пробірки, ступка, маточка, чорний папір, етанол, кристалічна аскорбінова кислота, насичений спиртовий розчин метилового червоного.

Хід роботи:

1. Приготувати спиртовий розчин хлорофілу (див. лабораторну роботу №5). Якщо забарвлення розчину виявиться занадто темним і тому погано помітним, його слід розбавити спиртом, щоб зелений колір хлорофілової витяжки став прозорим. Загальний обсяг витяжки має бути близько 15 мл.

2. Дослід закладають у п'яти варіантах:

Таблиця 7.1

Варіант дослід	Компоненти середовища+ освітлення	Початковий колір	Зміна кольору	Причини зміни кольору або її відсутності
1	Хл + МЧ + АК + $h\nu$			
2	Хл + МЧ + АК + темрява			
3	Хл + МЧ + $h\nu$			
4	Хл + АК + $h\nu$			
5	Етиловий спирт + МЧ + АК + $h\nu$			

3. Взяти штатив з 5 пробірками. У перші 4 пробірки наливають по 3 мл спиртової витяжки хлорофілу, а в 5-у – 3 мл етанолу. Потім у пробірки 1, 2, 3 додають однакову кількість спиртового розчину метилового червоного (МЧ), поки зелене забарвлення не набуде бурого кольору. У пробірку 5 додають таку кількість МЧ, поки зелене забарвлення не набуде червоного кольору (але багато додавати МЧ не варто). У пробірки 1, 2, 4 і 5 додають по 30 мг (на кінчику скальпеля) кристалічної аскорбінової кислоти (АК) і струшують. Окремо, у другому варіанті пробірку закривають чорним папером.

4. Штатив із пробірками ставлять безпосередньо перед яскравою лампою, помістивши між ними посудину з водою з плоскопаралельними стінками, щоб запобігти нагріванню розчинів.

5. Через 20 хв від початку експозиції відмітити зміни, які відбулися у пробірках, заповнити таблицю 7.1, відобразивши зміни кольорів у пробірках та причини цього явища.

Лабораторна робота № 8

Виявлення активності ферментів пероксидази і каталази у рослинному матеріалі

Опис роботи. Дихання складається з ряду окисно-відновних реакцій, у процесі яких водень дихального субстрату відновлює кисень повітря з утворенням H_2O чи H_2O_2 . На утворення води витрачається 4 електрони, перекису водню – 2 електрони. Оскільки кисень виступає кінцевим акцептором електронів, то окиснення за його участю називають **термінальним**. Різноманітність дихальних ланцюгів визначається термінальними ланками окислювального ланцюга і дає можливість мобілізувати електрони від багатьох субстратів, а також при зміні умов середовища дозволяє компенсувати функції однієї системи іншими (рис. 8.1).

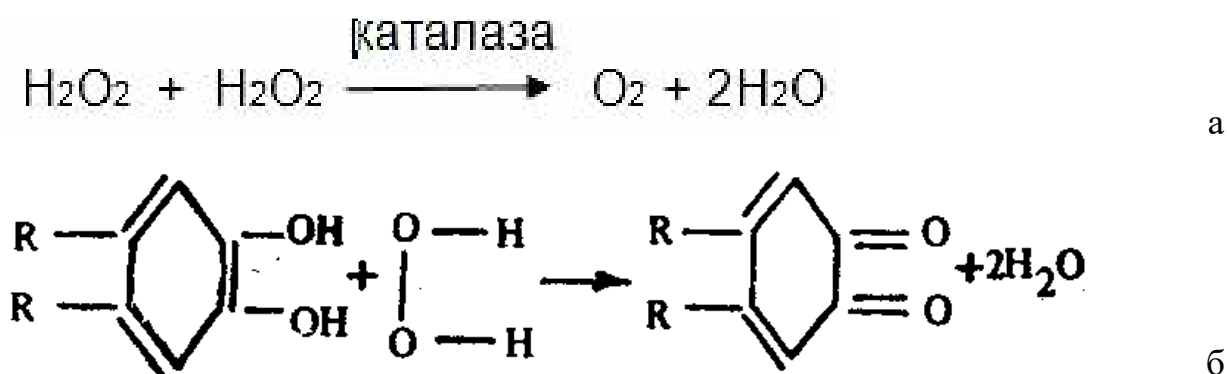


Рис. 8.1 Реакція розщеплення перекису водню ферментом каталазою (а),
перетворення фенолів у хінони за участі пероксидази (б)

Ферменти, що каталізують перенесення електронів і протонів по електронтранспортних ланцюгах, поділяють на 3 групи: **дегідрогенази** (активують і переносять кисень), **оксидази** і **оксигенази** (активують власне кисень) і ферменти, що виконують роль проміжних переносників електронів.

Дегідрогенази каталізують дегідрування дихального субстрату. Акцептуючи водень і електрони, деякі з них виконують функції оксидаз, передаючи елементарні частки безпосередньо на кисень. Такі дегідрогенази називають **аеробними**, до складу їх коферменту входять похідні рибофлавіну (вітаміну B_2).

Представниками коферментів є флавінаденіндинуклеотид (ФАД) і флавінмононуклеотид (ФМН). **Анаеробні**, або піридинові, дегідрогенази, що є коферментами нікотинаміддинуклеотид (НАД) і нікотинаміддинуклеотидфосфат (НАДФ) не можуть передавати електрони і протони на кисень.

Оксидази каталізують перенесення електронів безпосередньо на кисень, усі вони є термінальними ферментами. До складу коферментів одних оксидаз входить залізо (пероксидаза, цитохромоксидаза, цитохром P₄₅₀), до інших – мідь (поліфенолоксидаза, аскорбіноксидаза).

Між дегідрогеназами і термінальними оксидазами мітохондріального дихального ланцюга знаходяться проміжні переносники електронів: флавопротеїновий комплекс, коензим Q, ланцюг цитохромів b, c, c₁, a, a₃.

Оксигенази каталізують пряме включення кисню в молекулу субстрату. Таке окиснення (становить близько 5 % від загального окиснення) можуть здійснювати пероксидаза і поліфенолоксидаза, поруч з оксидазними функціями. Знання активності того чи іншого ферменту діє уявлення про функціональну значущість окремих дихальних ланцюгів при старінні чи в конкретних умовах середовища.

Пероксидаза є протеїдом, що складається з білка та простетичної групи – залізопорфірину. Встановлено, що пероксидаза каталізує окиснення різних циклічних (феноли, ароматичні аміни) та гетероциклічних сполук киснем перекису водню, який утворюється в клітині як побічний продукт каталітичної діяльності флавінових дегідрогеназ в електронно-транспортному ланцюзі (ЕТЛ) дихання. Таким чином, діяльність пероксидази з утилізації токсичної для клітини перекису водню опосередковано пов'язана з ЕТЛ дихання. Разом з тим, встановлено, що пероксидаза здатна функціонувати і як типова оксидаза, каталізуючи окиснення субстрату киснем повітря. Так, пероксидаза з одного боку може окислювати киснем повітря НАД*Н, з іншого – передавати електрони, отримані від нього, на різні акцептори (наприклад, на цитохром c). В обох випадках пероксидаза є ланкою ЕТЛ дихання.

Фермент **каталаза** належить до класу **оксидоредуктаз**. Це залізопротеїд, небілкова частина якого, як у пероксидази, представлена залізопорфірином. Діяльність каталази у живій клітині пов'язана з активністю флавопротеїдів – найважливішої ланки ЕТЛ дихання. Каталаза розщеплює токсичний для живої клітини перекис водню, що утворюється як побічний продукт діяльності флавопротеїдів у пероксисомах. Існує гіпотеза, що у тканинах, що позбавлені достатнього доступу кисню, каталаза відіграє роль саме постачальника кисню, генеруючи його з перекису водню.

Мета роботи: виявити та оцінити активність пероксидази і каталази у різних рослинних об'єктах.

Об'єкти: листки та проростки кімнатних рослин, бульби, коренеплоди та сухе та проросле насіння.

Реактиви та обладнання: 0,3% та 3% H_2O_2 , 1,5% розчин бензидину, пробірки, воронки, піпетки на 2 мл, циліндри на 10 мл, штативи та тримачі для пробірок, фарфорові ступки, леза, фільтрувальний папір, пробірки, воронки, пробкові свердла.

Хід роботи:

1. При визначенні **активності пероксидази** рослинну тканину (близько 200 мг) розтерти у ступці із 5 мл води. Отриману суміш профільтрувати пробірку через зволожений складчастий фільтр. *Важливо:* для порівняння активності пероксидази у різних об'єктах слід брати рівну по сухій масі кількість матеріалу. Кількість фільтрату (витяжки) має бути близько 2 мл. У якості варіантів використати: сухе насіння та проросле; м'якоть картоплі, яблука та моркви; молоді та зрілі листки гібіскуса.
2. До отриманої витяжки додати 2 мл 0,3% перекису водню та 2 мл 1,5% розчину бензидину. Перемішати пробірку і через 1 хв визначити інтенсивність посиніння за 4-бальною шкалою: **інтенсивне** – 4 бали, **помірне** – 3, **слабке** – 2, **дуже**

слабке – 1 бал, **відсутність посиніння** – 0 балів. Результати занести у таблицю 8.1.

3. При визначенні активності **каталази** з листків дослідних рослин пробковим свердлом з діаметром 1 см зробити 3 висічки, не захоплюючи великі жилки. Під час роботи із бульбами і коренеплодами, слід нарізати тканину пластинками товщиною 4-5 мм, а потім робити висічки. Матеріал розтерти у ступці з додаванням невеликої кількості води (до 1 мл), але якщо тканина тверда, додати ще трохи піску. До розтертої кашеподібної маси додати 5 мл води ретельно перемішати та профільтрувати в чисту пробірку через зволожений складчастий фільтр. Для роботи буде достатньо 3-4 мл витяжки. *Важливо:* для порівняння активності каталази в різних об'єктах слід брати рівну за сухою масою кількість матеріалу. У якості варіантів використати: сухе насіння та проросле; м'якоть картоплі, яблука та моркви; молоді та зрілі листки гібіскуса.

4. Додати до витяжки 2 мл 3% перекису водню. В результаті розкладу перекису водню ферментом виділяються бульбашки кисню, що формують помітну піну. Активність ферменту оцінюється в балах: **інтенсивне утворення піни** – 4 бали, **помірне** – 3, **слабке** – 2, **дуже слабке** – 1 бал, **відсутність піни** – 0 балів. Результати занести у таблицю 8.1.

Таблиця 8.1

Об'єкт дослідження	Варіант досліду	Активність	
		Пероксидази	Каталази
Насіння			
Бульби/коренеплоди			
Листки			

Лабораторна робота № 9

Мікрохімічний аналіз золи рослин

Опис роботи. Мінеральний склад рослин зазвичай характеризується аналізом складу золи, що залишається після спалювання рослинних тканин. При спалюванні рослин 4 елементи-органогени (C, H, O, N) випаровуються у вигляді газоподібних сполук. Неспалюваний залишок називається зола. Елементи, які в ній містяться, називаються зольними і на їх частку припадає близько 5 %. Усі мінеральні елементи поділяються на 3 групи:

- **Макроелементи** (C, H, O, N, Ca, P, K, Fe, Mg, Na, Cl, S) – до 10 % сухої маси;
- **Мікроелементи** (Cu, Co, Ni, Mn, Zn, Cr, F, I) – до 0,01 % сухої маси;
- **Ультрамикроелементи** (Cs, Cd, Hg, Ag, Au та ін.) – до 10^{-12} % сухої маси

Органи рослин суттєво відрізняються за кількісним складом золи. Зольні елементи зосереджені в тих органах, рівень життєдіяльності яких є досить високий. Так, **в насінні** – близько 3 %, в коренях і стеблах трав'янистих рослин – 4-5, **листках** – 10-15 % золи. Найменше її міститься у **деревині** (близько 1 %), що складається майже з одних мертвих клітинних стінок.

Найбільше золи в живих активно-функціонуючих тканинах, наприклад **в мезофілі листка**, в клітинах якого є хлорофіл і безліч ферментів, що містять такі елементи, як магній, залізо, мідь та ін. У зв'язку з високою метаболічною активністю живих тканин у них також виявляється значна кількість калію (близько 80 % зосереджено в вакуолях), фосфору (входить до складу нуклеїнових кислот, фосфоліпідів) та інших елементів.

Відрізняються органи рослин і за якісним складом золи. Насіння є багатшим на фосфор і калій, стебла і листки – кальцій і магній, бульби і коріння – калій. У старих органах накопичується кальцій, в той час як калій зосереджений у молодих ростучих тканинах.

Вміст золи залежить і від складу ґрунту, на якому зростає рослина, від його віку і генетичних особливостей, які обумовлюють потребу в елементах мінерального живлення. Внаслідок цього рослини різних видів, що ростуть на

однакових ґрунтах, накопичують різну кількість зольних елементів. Наприклад, вегетативні органи злаків накопичують велику кількість кремнію, а конюшина і гречка – калію і кальцію.

Для вивчення хімічного складу золи можна використовувати **мікрохімічний метод**, для якого потрібна невелика кількість матеріалу. Мікрохімічний метод дозволяє виявити в золі рослин цілий ряд елементів. В його основі лежить здатність деяких реактивів при взаємодії із зольними елементами давати сполуки, що відрізняються специфічним забарвленням або формою кристалів.

Мета роботи: визначити склад золи рослин мікрохімічним методом.

Об'єкти: зола, одержана при спалюванні листків, насіння, деревини.

Реактиви та обладнання: 20% розчини HCl і NH₄OH, 1% розчини наступних солей у крапельниці: H₂SO₄, Na₂HPO₄, NaHC₄H₄O₆, K₄[F(CN)₆], (NH₄)₂MoO₄ в 1% HNO₃, пробірки, предметні скельця, піпетки, паперові фільтри, стаканчики з дистильованою водою, світлові мікроскопи, спиртівки, сірники.

Хід роботи:

1. **Приготувати солянокислий та водний розчини золи.** Насипати у 1 пробірку 3 мл золи та обережно по краплях 7 мл 20 %-го розчину соляної кислоти, а у пробірку 2 – 3 мл золи та 7 мл дистильованої води. Перемішати скляною паличкою, дати настоятися 5 хв, профільтрувати через складчастий фільтр.
2. **Усі реакції проводити на предметному склі**, на яке тупим кінцем скляної палички або піпеткою нанести краплю витяжки, а на відстані 2 см від неї – краплю відповідного реактиву (Рис. 9.1).

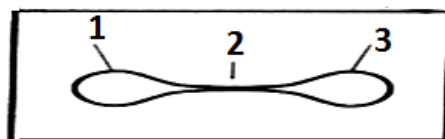
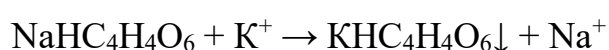


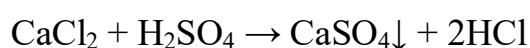
Рис. 11.1 Технологія нанесення речовин: 1 – крапля зольної витяжки, 2 – «місток» між реактивом і витяжкою, 3 – крапля реактиву

Кожен реактив наноситься окремою піпеткою. З'єднати скляною паличкою дві краплі (самовільне змішування двох крапель небажано, тому що внаслідок швидкої кристалізації утворюються дрібні нетипові кристали, крім того, при висиханні краплі можуть утворитися кристали вихідних солей). У місці з'єднання розчинів відбувається реакція і утворюються характерні кристали. Дуже важливо правильно підсушити препарат – тримати слід високо над полум'ям пальника і підігріти до повного випаровування води, трохи перемістивши з одного боку в інший. Підсушування припиняють, як тільки зникне остання крапля рідини. Після цього краплі, що залишилися, прибрати зі скла шматочком фільтрувального паперу і розглянути кристали під мікроскопом без покривного скла. Скляні палички після нанесення кожного реактиву вимити і витерти насухо фільтрувальним папером. Кристали розглядають під мікроскопом (усі, крім реакції 9 – на залізо) на сухому препараті без покривного скла, замальовують і порівнюють з контрольним варіантом.

3. Виявлення калію. До краплі **водної витяжки** додати 1 % розчин виннокислого натрію. При повільному випаровуванні випадають кристали виннокислого калію $\text{KHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, мають вигляд великих призм і пластинок (рис. 9.2А). Кристали гідротартрату добре розчиняються в кислотах і лугах, тому для визначення іона калію беруть саме водний екстракт:



4. Виявлення кальцію. На предметне скло нанести краплю **солянокислої витяжки** і сполучити її з 1 % розчином H_2SO_4 . При цьому хлорид кальцію, що міститься у зольній витяжці, реагує із сірчаною кислотою, і утворюються великі кристали гіпсу голчастої форми, поодинокі або у вигляді зрощених пучків (рис. 9.Б):



5. Виявлення магнію. До краплі **солянокислої витяжки** спочатку додати краплю 20 % розчину гідроксиду амонію, а потім з'єднати отриманий розчин з краплею 1 % фосфорнокислого натрію. В результаті реакції утворюється

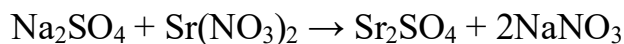
фосфорно-аміачно-магнезіальна сіль у вигляді плоских безбарвних кристалів у формі прямокутників, крил, паличок, зірочок тощо (рис. 9.2В):



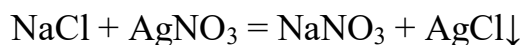
6. **Виявлення фосфору.** З'єднати краплю **солянокислої** витяжки з 1% розчином молібдату амонію в HNO_3 . Утворюється зеленувато-жовтий осад фосфорно-молібденовокислого амонію у вигляді дрібних грудочок (рис. 9.2Г):



7. **Виявлення сірки.** До краплі **солянокислої** витяжки додати 1 % розчин нітрату стронцію. При цьому випадає осад дрібних кристалів сульфату стронцію (рис. 9.2Д).



8. **Виявлення хлору.** До краплі **водної** витяжки додати 1 % розчин нітрату срібла. Під час взаємодії хлору з цим реактивом випадає світло-жовтий осад:



9. **Виявлення заліза.** На предметне скло у краплю **солянокислої чи водної** витяжки додати краплю 1 % жовтої кров'яної солі. Скло розмістити на білому фоні, а в результаті реакції утворюється синій осад (берлінська лазур):

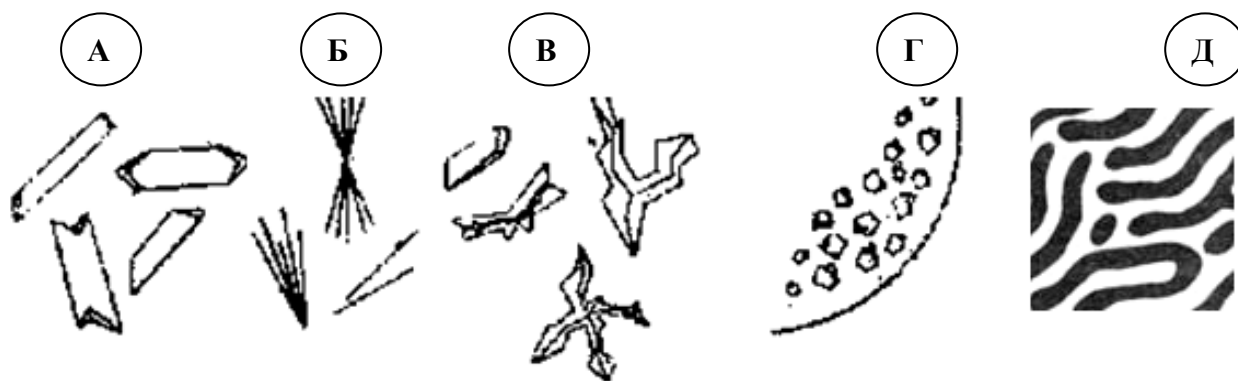
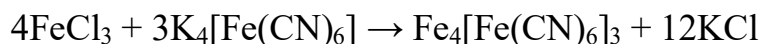
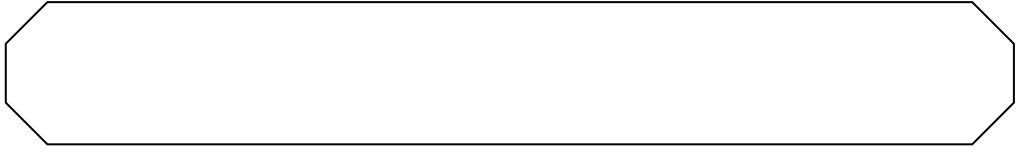


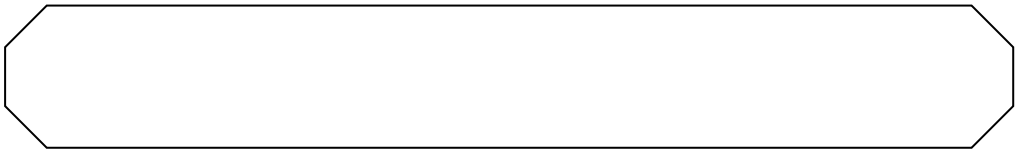

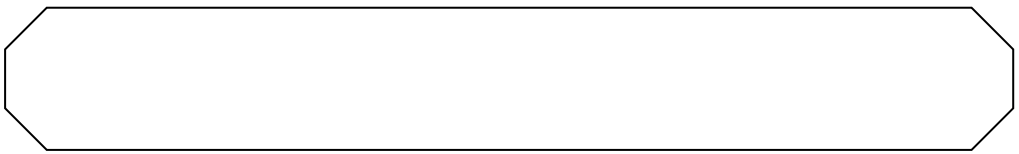
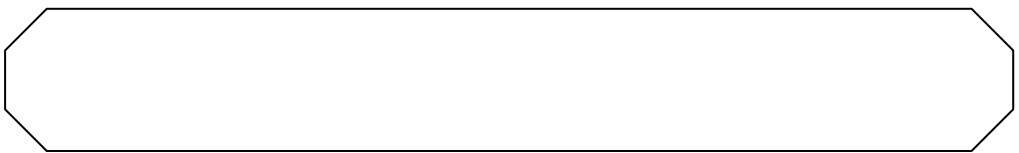


Рис. 9.2 Типові форми кристалів: А – виннокислого натрію; Б – гіпсу; В – фосфорно-аміачно-магнезіальної солі; Г – фосфорно-молібденового аміаку; Д – сульфату стронцію.

Заповнити таблицю 9.1 відповідними малюнками виявлених елементів:

Таблиця 9.1

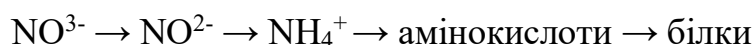
Елемент	Графічне зображення
K^+	
Ca^{2+}	
Mg^{2+}	
P^{2+}	
S^{2+}	
Cl^-	
Fe^{2+}	

Висновок:

Лабораторна робота № 10

Виявлення нітратів у рослинному матеріалі

Опис роботи. Солі азотної (нітратної) кислоти – нітрати – одні з основних сполук, з яких, у тому числі, рослини засвоюють азот або нітроген. Нітрати, що поглинаються корінням із ґрунту, відновлюються у рослині до аміаку, що використовується на синтез органічних азотистих сполук:



Безумовно, для відновлення нітратів потрібно АТФ, що утворюється у процесі окисного або фотосинтетичного фосфорилування.

За умови достатніх кількостей розчинних вуглеводів та високої активності відповідних ферментів, перелічені біохімічні процеси відбуваються у **клітинах кореневої системи**. Однак, за несприятливих умов частина нітратів (нерідко – значна) може перейти через паренхіму кори кореня у нетрансформованому вигляді. У цьому випадку нітрати потрапляють до судин ксилеми і піднімаються з висхідним потоком до листків, де відбувається їх відновлення.

Визначення вмісту нітратів з соку, що віджятий зі стебел, черешків і пластинок листків, дозволяє формувати висновки щодо відновлення нітратів у коренях: чим менше у соці виявляється нітрат-іонів, тим активніше відбувається цей процес у клітинах кореня. Зіставлення вмісту нітратів у різних органах рослини дає уявлення про нітратредуктазну активність цих частин рослинного організму. Основною причиною надмірного накопичення нітратів в овочах є порушення технологій застосування добрив: внесення підвищених доз азотних (нітратних) добрив, нерівномірний їх розподіл поверхнею поля тощо.

Нітратна форма азоту здатна накопичуватися у рослинах в значних кількостях, не завдаючи їм шкоди. Проте, якщо вміст нітратів у кормовій сировині, овочах та інших продуктах рослинного походження переважає гранично допустимий рівень, що визначений для харчових продуктів, він стає токсичним і небезпечним для здоров'я людини і тварин.

Для оперативного виявлення нітратів використовується **якісна реакція з дифеніламіном**, який у присутності іона NO_3^- дає синє забарвлення. За

інтенсивністю посиніння можна судити про потенційні кількості нітратів у досліджуваному об'єкті.

Мета роботи: порівняти вміст нітратів у різних груп рослин якісним методом.

Об'єкти: овочеві культури (качан капусти, бульба картоплі, коренеплід моркви та буряків, плоди огірка та томату), зелень (петрушки, кріп, листки салату); овочі термо-, холодо-/без обробки (вимочування у холодній воді протягом 1 год/доба, кип'ятіння протягом 5 хв/15 хв).

Реактиви та обладнання: 1% розчин дифеніламіну в концентрованій сірчаній кислоті в крапельниці, вода в хімічних склянках, чашки Петрі, скляні палички, ножі, дошки для нарізки овочів, піпетки Пастера, шкала інтенсивності фарбування дифеніламіном, фільтрувальний папір.

Хід роботи:

1. Взяти досліджувані об'єкти, відрізати невеликі, однакові за розмірами шматочки (25 мг), помістити їх у чашки Петрі, розтерти паличкою до однорідної маси (паличку після кожного варіанту сполоснути водою і промокнути фільтрувальним папером).
2. До отриманої маси додати 3-4 краплі розчину дифеніламіну. Через 2 та 5 хв визначити забарвлення тканин, оцінивши її за 6-бальною **шкалою інтенсивності фарбування дифеніламіну** (мг/кг сирової маси):

- **6 балів** – сік або зріз забарвлюються швидко і інтенсивно у синювато-чорний колір – забарвлення стійке і не пропадає. Вміст нітратів > 3000;
- **5 балів** – сік або зріз забарвлюються у темно-синій колір – забарвлення зберігається деякий час. Вміст нітратів = 3000;
- **4 бали** – сік або зріз забарвлюються у синій колір – забарвлення настає не відразу. Вміст нітратів = 1000;
- **3 бали** – забарвлення світло-синє і зникає через 2-3 хв. Вміст нітратів = 500

- **2 бали** – забарвлення швидко зникає, фарбуються головним чином провідні пучки. Вміст нітратів =250;
- **1 бал** – спостерігаються сліди блакитного кольору, забарвлення швидко зникає. Вміст нітратів =100;
- **0 балів** – немає ні блакитного, ні синього забарвлення – на окремих ділянках можливе формування рожевого кольору. Нітрати відсутні.

3. Результати оформити у вигляді таблиці 10.1:

Таблиця 10.1

Об'єкт дослідження	Орган рослини	Умови досліду (термо-, холодо-/без обробки)	Вміст нітратів, мг/кг			
			2 хв		5 хв	
			бал	мг/кг	бал	мг/кг

Висновок:

Лабораторна робота № 11

Періодичність росту деревних рослин

Опис роботи. За визначенням Д.А. Сабініна, **ріст** – це процес новоутворення елементів структури організму, до яких відносяться макромолекули, органели, клітини, органи і системи органів. Ріст пагона, як і окремих його частин, відбувається нерівномірно. Спочатку спостерігається повільне зростання, потім його швидкість збільшується, досягаючи максимуму, потім знову настає етап уповільнення росту і, нарешті, він припиняється. Ця періодичність росту отримала назву **великий кривої росту**, або **кривої Сакса**. Відповідно до цього закону відбувається ріст органел, клітин, тканин, органів і організму в цілому.

Періодичність росту пагонів проявляється в тому, що міжвузля, що утворюються по мірі росту бруньок, мають неоднакову довжину – вона збільшується від його утворення до середини, де досягає максимальної величини, а у напрямку до верхівки знову зменшується. Проте, ця закономірність може бути порушена зовнішніми чинниками. Наприклад, під впливом посухи формуються коротші міжвузля.

Мета роботи: дослідити динаміку росту пагона деревних рослин.

Об'єкти: 4 однорічні пагони дерев та чагарників (верба, береза, вільха, тополя тощо).

Реактиви та обладнання: лінійка, калькулятор.

Хід роботи:

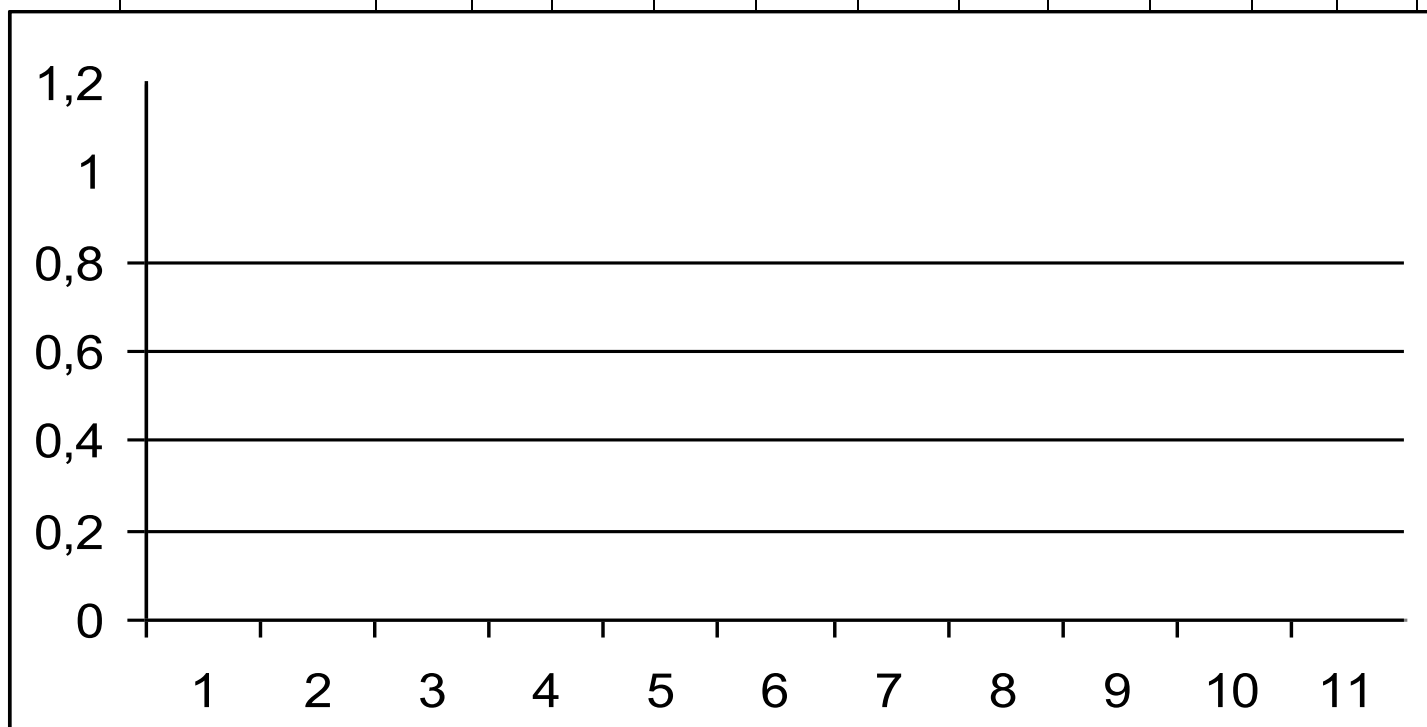
1. Взяти однорічний пагін деревної породи і виміряти довжину кожного міжвузля, починаючи з основи пагона – місця, де була торішня верхівкова брунька. Важливо не випустити з уваги зближені рубці в основі та на верхівці пагона.

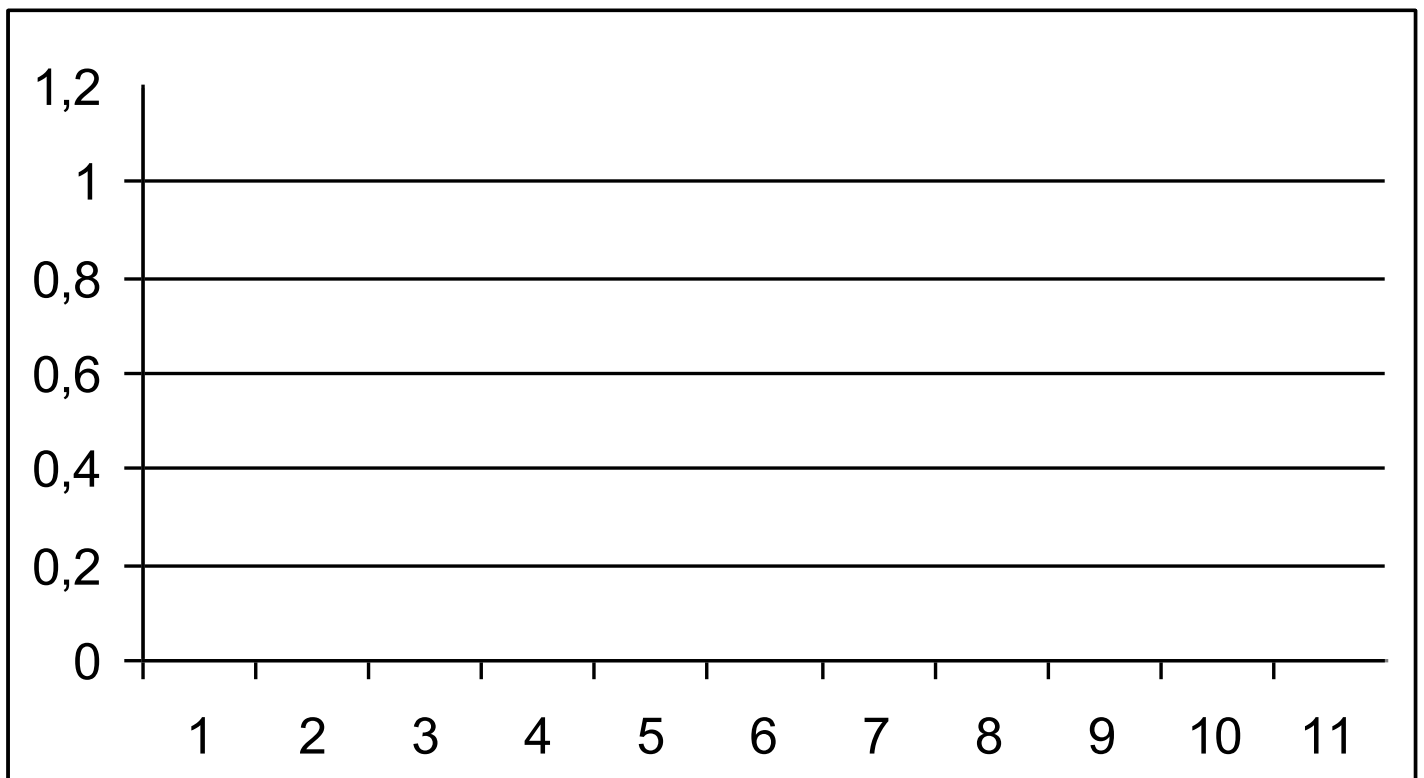
2. Одночасно зробити два виміри: довжини міжвузлів (відстані між двома сусідніми листовими рубцями) і пагона (відстані між першим рубцем і кожним наступним). Дані занести у таблицю 11.1

3. Побудувати 2 графіки: **криву ритмічності росту** (за довжиною міжвузлів) і **велику криву росту** (за довжиною пагона від основи до кожного наступного листкового рубця). Для другого графіка підібрати відповідний масштаб.

Таблиця 11.1

Довжина, мм	Порядковий номер міжвузля/пагона										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Довжина міжвузля											
Довжина пагона											





Висновок:

Контрольні питання:

1. Які відмінності у ритмічності росту деревних рослин у тропічному та континентальному кліматі?

Лабораторна робота № 12

Визначення жаростійкості рослин (за Ф. П. Мацковим)

Опис роботи. Жаростійкість – це здатність рослин переносити тривалі високі температури. При підвищенні температури навколишнього середовища вище оптимальної в рослинах порушується обмін речовин і, як наслідок цього, накопичуються отруйні речовини.

При вищих температурах різко підвищується проникність протоплазми за рахунок руйнування білково-ліпідного комплексу цитоплазматичних мембран, потім настає коагуляція білків і відмирання клітин.

Жаростійкі рослини в більшості випадків мають в'язчу, а, отже, і стійкішу протоплазму і здатні зберігати при високих температурах оптимальний обмін речовин.

Якщо піддати листок дії високої температури, а потім занурити у слабкий розчин соляної кислоти, то пошкоджені і мертві клітини побуріють внаслідок вільного проникнення в них кислот (мембрани клітини, в тому числі і мембрани хлоропластів, втрачають властивість напівпроникності).

Іони H^+ , присутні в клітині, заміщають іон Mg^{2+} в молекулі хлорофілу, що перетворюється у феофитин бурого кольору (**реакція феофитинізації**). Неушкоджені клітини залишаються зеленими. Чим більше залишається непошкоджених ділянок тканин, тим вищою є жаростійкість рослини.

У рослин з кислим клітинним соком феофитинізація може проходити і без обробки соляною кислотою, тому що при порушенні властивості напівпроникності тонопласта органічні кислоти проникають з клітинного соку в цитоплазму і витісняють магній з молекули хлорофілу.

Мета роботи: оцінити жаростійкість різних видів рослин.

Об'єкти: свіжі листки дослідних рослин.

Реактиви та обладнання: 20% HCl, водяна баня, термометр, пінцет, чашки Петрі, склянка з водою..

Хід роботи:

1. Нагріти водяну баню до 40⁰С, занурити в неї 16 листків досліджуваних рослин (по 4 шт для 4 проб) і витримати їх протягом 7 хв, підтримуючи температуру на рівні 40⁰С. Потім взяти першу пробу (по одному листку кожного виду) і помістити їх в чашку Петрі з холодною водою. Підняти температуру в водяній бані до 60⁰С, і через 7 хв витримування при даній температурі взяти другу пробу листків і перенести їх в нову чашку Петрі з холодною водою. Поступово температуру довести до 80⁰С, беручи проби через кожні 7 хв при підвищенні температури до максимальної. Після настання кипіння води (t=> 80⁰С), витримати ще 7 хв і теж дістати у чашку Петрі.

2. Замінити холодну воду в чашках 20-% розчином соляної кислоти і через 10 хв порахувати ступінь пошкодження листків за кількістю і площею бурих плям. Результати занести у таблицю 12.1; позначивши повну відсутність побуріння знаком «-», слабке побуріння – «+», побуріння понад 50 % площі листка – «++» і суцільне побуріння – «+++».

Таблиця 13.1

Вид рослини	Ступінь пошкодження листків при температурі, %			
	40 ⁰ С	60 ⁰ С	80 ⁰ С	> 80 ⁰ С

Висновок:

ДОДАТОК

ПРИГОТУВАННЯ ДЕЯКИХ РОЗЧИНІВ І РЕАКТИВІВ

Кварцевий пісок для розтирання рослинної тканини

Чистий річковий пісок промити проточною водою для видалення мулистих частинок. Залити на добу концентрованою соляною кислотою HCl. Відмити HCl, перевіряючи рН за допомогою універсального індикаторного паперу. Прожарити у муфельній печі протягом 2-3 годин до рожевого кольору.

Хлоркобальтовий папір

Шматочки фільтрувального паперу 5x10 см помістити на 5 хв у 5% розчин $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, потім акуратно розкласти на склі, трохи обсушити і помістити у сушильну шафу при $t=40-45^\circ\text{C}$ до появи блакитного кольору. Пересушувати папір не можна, тому що він втрачає при цьому гігроскопічність. Зберігати хлоркобальтовий папір потрібно в ексікаторі над хлористим кальцієм. Під дією парів води CoCl_2 перетворюється на $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Розчин для зняття відбитків з епідермісу

Нітроцелюлозний клей БФ-6 розчинити в ацетоні у співвідношенні 1:4 до сиропоподібного стану і зберігати у склянці з притертою кришкою.

Розчин йоду в йодистому калії (I_2/KI)

2 г KI та 1 г кристалічного йоду добре розмішати у 10 мл H_2O до повного розчинення і довести водою у циліндрі до 300 мл.

Реактив Фелінга

Приготувати безпосередньо перед використанням шляхом змішування в рівних обсягах двох розчинів:

- 1) 40 г CuSO_4 (мідний купорос) розчинити у невеликій кількості води, довести до 1 л у мірній колбі;
- 2) 200 г $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (сегнетова сіль) розчинити у дистильованій воді, додати 150 мг KOH або NaOH, довести дистильованою водою до 1 л.

Розчин бензидину

У мірну колбу на 200 мл налити близько 100 мл дистильованої води, додати 2,3 мл оцтової кислоти (льодяної) та 184 мг бензидину. Суміш нагріти на водяній

бані при 60⁰С, постійно збовтуючи, після повного розчинення бензидину додати 5,45 г оцтовокислого натрію. Перемішати, охолодити, і об'єм довести до мітки. Зберігати у холодильнику не більше 5 діб.

Фенолфталеїн

0,5 г фенолфталеїну розчинити у 100 мл 96% етилового спирту. Індикатор змінює забарвлення від безбарвного до малинового в межах рН 8,2-10,0.

Гетероауксин (0,01% розчин)

100 мг гетероауксину розчинити у хімічній склянці в 1 мл 96% етилового спирту, додати 5-10 мл води, перенести у мірну колбу на 100 мл і довести водою до мітки. Щоб отримати істинний 0,01% розчин гетероауксину, необхідно цей розчин розвести в 10 разів, внівши 10 мл його у мірну колбу на 100 мл і довівши водою до мітки.

Метилловий червоний

0,01г препарату розчинити у 30мл 96 % етилового спирту і додати 20мл води, суміш добре перемішати. Зберігати індикатор у темному місці під притертою пробкою.

Нейтральний червоний

0,1 г препарату розчинити у 50 мл 96% етилового спирту та довести об'єм розчину водою до 100 мл.

Індігокармін

0,1 г препарату розчинити у 50 мл 96% етилового спирту та довести об'єм розчину водою до 100 мл.

Дифеніламін

1 г препарату розчинити у 100 мл сірчаної кислоти.

Отримання золи з рослин та витяжки елементів із неї

Порцію висушеного матеріалу (дерев'яні тріски, листя та подрібнене насіння) помістити в тигель, додати кілька мл спирту та підпалити. Процедуру повторити 2-3 рази. Потім тигель перенести в муфельну піч і прожарити, поки обвуглений матеріал не набуде попелясто-сірого кольору. Залишки вугілля треба випалити, помістивши тигель у муфельну піч на 20 хв.

РЕКОМЕНДОВАНІ ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ

1. Фізіологія рослин. Ч1 : навчальний посібник / С.В. Прилуцька, А.І. Бабицький, Н.Г. Нестерова, Т.А. Ткаченко, П.Ю. Дрозд. – Київ: НУБіП України, 2023. – 224 с.
2. Фізіологія рослин. Ч2 : навчальний посібник / С.В. Прилуцька, А.І. Бабицький, Н.Г. Нестерова, Т.А. Ткаченко, О.А. Бойко, А.В. Дащенко. – Київ: НУБіП України, 2024. – 215 с.
3. Самойленко Т.Г., Самойленко М.О., Рожок О.Ф. Практикум з фізіології рослин: Навч. посібник. – Миколаїв: МНАУ, 2013. – 431 с.
4. Романюк Н.Д., Цвілинюк О.М., Микієвич І.М., Терек О.І. Фізіологія рослин: Навч. посібник для студентів біологічних факультетів вищих навчальних закладів освіти. – Л.: Піраміда, 2005. – 160 с.
5. Ніколайчук В.І., Белчгазі В.Й. Фізіологія і біохімія рослин: Навч.-метод. посібник для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів. – Ужгород: УжНУ, 2008. – 192 с.
6. Негода О.В. Методичні рекомендації до лабораторних занять з дисципліни «Фізіологія рослин» для студентів аграрних університетів агрономічних спеціальностей. – К.: Фітосоціоцентр, 2000. – 64 с.
7. Казаков Є.О. Методологічні основи постановки експерименту з фізіології рослин. – К.: Фітосоціоцентр, 2000. – 272 с.
8. Красноштан І.В. Фізіологія рослин : навчально-методичний посібник. / І.В. Красноштан. – Умань : ПП Жовтий, 2010. – 128 с.
9. Грицаєнко З.М., Грицаєнко О.А., Карпенко В.П. Методи біологічних та агрохімічних досліджень рослин і ґрунтів. – К.: ЗАТ «Нічлава», 2003. – 320 с.
10. Мусієнко М.М., Паршикова Т.В., Славний П.С. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 200 с.
11. Красноштан І.В. Загальна цитологія і гістологія (практикум). Навчально-методичний посібник для студентів природничо-географічних факультетів

педагогічних вузів). / І.В.Красноштан, Т.М.Миронюк, М.І. Пащенко– Вінниця: ФОП Горбачук І.П., 2010. – с. 123.

Інформаційні ресурси

- 1.Фізіологія рослин <https://goo-gl.su/W4tYoy>
- 2.*Plant Physiology* <http://www.plantphysiol.org/>
- 3.*Photosynthesis* https://www.youtube.com/watch?v=sQK3Yr4Sc_k
- 4.*Mineral nutrition of plants* https://www.youtube.com/playlist?list=PLKIDmFiIyAljqtM4XB1ojpOC_iw1s3fN