

малый
практикум
по физиологии
растений



ИЗДАТЕЛЬСТВО
МОСКОВСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА

581.1
M-202

Малый практикум по физиологии растений

8-е ПЕРЕРАБОТАННОЕ
ИЗДАНИЕ

Под ред. М. В. Гусева

Библиотека
Сам СХИ
ИНВ.

ИЗДАТЕЛЬСТВО
МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
1982

УДК 581.12

Малый практикум по физиологии растений: Практ. пособие / Под ред. М. В. Гусева. — 8-е изд. — М.: Изд-во МГУ, 1982. — 192 с.

Основная цель практикума — углубить и расширить знания студентов по теоретическому курсу, познакомить их с методами исследования в области физиологии растений. В книге даны теоретические основы и практические задачи по шести основным разделам физиологии растений: физиологии растительной клетки, фотосинтезу, дыханию, водообмену, минеральному питанию, росту и развитию. Студенты знакомятся с такими свойствами живой протоплазмы, как движение, вязкость, полупроницаемость, с пигментами и основными функциями фотосинтетического аппарата (реакция Хилла, фотофосфорилирование), с многозначностью процесса дыхания и альтернативностью дыхательных путей, с показателями состояния воды в растениях и транспирацией, поглощением ионов, с общими закономерностями роста, действием фитогормонов, процессами старения.

Для студентов-биологов университетов, а также педагогических и сельскохозяйственных вузов.

Библиогр. 54 назв. Ил. 27. Табл. 23.

Печатается по постановлению
Редакционно-издательского совета
Московского университета

Рецензенты:

докт. биол. наук, профессор Т. В. Лихолат;
канд. биол. наук Т. Е. Кренделева

М $\frac{2306000000-103}{077(02)-82}$ 159-82

© Издательство Московского университета, 1982 г.

Быстрое развитие теоретических работ в области физиологии растений и разработка новых экспериментальных методов исследования требуют постоянного совершенствования методической подготовки студентов-биологов. На кафедре физиологии растений МГУ в последние годы значительно перестроены и модернизированы программа и методика проведения Малого практикума с использованием довольно сложной аппаратуры и оригинальных установок, многие из которых собраны и налажены инженером кафедры Б. А. Соловьевым. В отличие от предыдущих настоящее издание рассчитано на индивидуальную работу студентов, которым предлагаются более сложные физиологические задачи с использованием методов автоматической регистрации показателей. Немалое внимание уделено также расширению объектов исследования, изучению специфики метаболизма у различных в эволюционном отношении групп растений.

8-е издание Малого практикума составлено на базе общего курса физиологии растений и включает следующие разделы: физиология растительной клетки, фотосинтез, дыхание, минеральное питание, водный режим, рост и развитие. Каждый раздел состоит из теоретической и методической части. Задачи рассчитаны на 4-часовые занятия. Основная цель практикума — углубить и расширить знания студентов по теоретическому курсу и познакомить их с методами исследования в области физиологии растений.

Раздел I

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Все организмы на нашей планете состоят из клеток. Каждая из них обладает такими свойствами живого, как способность к самовоспроизведению и движению, метаболизм, раздражимость, рост, изменчивость и адаптация к внешней среде. Клетки имеют сложную специфическую организацию. На ее основе еще в прошлом столетии они были разделены на две группы, или типа: прокариоты и эукариоты. Из названия типов следует, что в основу классификации клеток положена организация ядра. Однако последующие исследования субклеточной структуры, особенно при использовании электронной микроскопии и дифференциального центрифугирования, показали более значительные различия между типами клеток.

Прокариоты (бактерии, сине-зеленые водоросли, микоплазмы), как правило, невелики, диаметром не более 10 мкм, имеют относительно простое строение, лишены морфологически оформленного ядра, специализированных клеточных мембранных систем: пластид, митохондрий, эндоплазматической сети, аппарата Гольджи и т. п. Генетический аппарат прокариотов представлен единственной хромосомой, состоящей из ДНК, не связанной с белками. Полифункциональная плазматическая мембрана может образовывать различного рода впячивания, например мезосомы у бактерий. Специализация мембран у прокариотов лишь слегка намечена, и внутренние мембранные структуры имеют изменчивую, эволюционно неустоявшуюся форму. Основные компоненты растительной клетки эукариотов и их главные функции представлены в табл. 1.

Таблица 1

Физиологические функции структурных компонентов растительной клетки

Структурные компоненты клетки	Основные физиологические функции
Клеточная оболочка	Обеспечение прочности, защита, опорная функция
Вакуоли	Осморегуляция, запасание веществ, переваривание
Ядро	Хранение и передача генетической информации
Ядрышко	Синтез и перераспределение РНК
Митохондрии	Дыхание
Хлоропласты	Фотосинтез
Аппарат Гольджи	Накопление углеводов, секреция, образование клеточной оболочки
Эндоплазматическая сеть	Транспорт веществ, образование метаболических центров
Лизосомы	Внутриклеточное пищеварение
Сфериосомы	Накопление и хранение жира
Микротела, пероксисомы, глиоксисомы	Фотодыхание, глиоксилатный цикл
Микротрубочки	Ориентация микрофибрилл целлюлозы
Рибосомы	Синтез белка
Плазмалемма	Контроль за транспортом веществ, защита, рецепция
Скелетная плазма	Гликолиз

Наряду с особенностями в структуре клеток эукариотов и эукариотов имеются и общие черты организации, что позволяет говорить о сходстве функциональной деятельности. Так как именно функциональная деятельность организмов, происходящая в живых организмах, органы, тканях, клетках, лежат в центре внимания биологов, то, чтобы понять физиологию растений, прежде всего должны быть изучены свойства, отличающие живые клетки растений от неживых.

Одно из самых распространенных и легко обнаруживаемых в живых клетках явлений — движение протоплазмы. Скорость его можно использовать для оценки уровня жизнедеятельности клетки. О наличии движения протоплазмы и его скорости судят по перемещению органелл клетки (пластид, сферосом), взвешенных в цей. Исключительный интерес представляют автономные движения компонентов клетки: хлоропластов под действием света, хромосом при митозе. Топография органелл и их взаимное расположение в клетке непрерывно меняются.

Об уровне жизнедеятельности клетки можно также судить по вязкости клетки, от влияния внешних условий, температуры, влажности, минерального питания и т. д. Для характеристики жизненного состояния клетки, кроме определения абсолютной вязкости протоплазмы, большое значение придают и определению структурной вязкости, о которой судят по минимальной величине центростремительного ускорения, необходимого для смещения структурных элементов протоплазмы.

Типичным для всех клеток является наличие на поверхности протоплазмы тонкой невидимой в световой микроскоп структуры, так называемой плазматической мембраны, или плазмалеммы. Эта пограничная мембрана обладает замечательным свойством полупроницаемости, или избирательной проницаемости, т. е. выполняет барьерную функцию, не пропуская или почти не пропуская молекулы крупнее, чем молекулы воды. Однако такой барьер существует только в живых клетках. Когда клетка теряет свойство полупроницаемости, все растворенные вещества быстро выходят наружу и клетка гибнет. Существуют два простых метода определения, сохраняет ли клетка полупроницаемость: плазмоллиз, открытый более столетия назад, и — витальное, или прижизненное, окрашивание. Сейчас общепринято, что мембранный принцип организации характерен не только для плазмалеммы, но и для всех основных клеточных органелл.

ДВИЖЕНИЕ ПРОТОПЛАЗМЫ

Броуновское или почти незаметное движение протоплазмы, которое происходит в клетках в естественных условиях, называют первичным. Движение же, вызванное каким-либо фактором внешней среды (светом, температурой, химическим или механическим воздействием и т. п.), — вторичным. Скорость движения протоплазмы растет с повышением температуры до определенного предела (чаще всего 27—37°). При дальнейшем увеличении температуры движение замедляется и в конце концов прекращается. Свет может либо ускорить движение (фотокинез), либо замедлить и остановить его. Характер реакции зависит от количества и качественного состава световой энергии. Различные химические агенты, физические обработки, механическое давление также влияют на движение протоплазмы.

Как и живых, так и в мертвых клетках можно наблюдать броуновское движение частиц, вызванное кинетической энергией молекул. В отличие от него движение протоплазмы обусловлено наличием свободной энергии, вырабатываемой живой клеткой. Кроме того, в броуновском движении частицы не могут двигаться в каком-либо одном определенном направлении, как при движении протоплазмы, а осуществляют случайные движения во всех направлениях около постоянного среднего положения.

Выделяют несколько типов движения протоплазмы. Наиболее широко распространенное *колебательное* считается наименее упорядоченным, так как в этом случае одни частицы находятся в покое, другие скользят к периферии, третьи — к центру клетки. Движение имеет неустойчивый, случайный характер. *Циркуляционное* движение характерно для клеток, имеющих протоплазматические тали, пересекающие центральную вакуоль. Направление и скорость движения частиц, находящихся внутри или на поверхности слоя протоплаз-

мы, а также в протоплазматических телях, не постоянны. При *ротационном* движении протоплазма находится только на периферии клетки и движется подобно приводному ремню. Движение этого типа, в отличие от циркуляционного, имеет более или менее постоянный и упорядоченный характер, поэтому удобно для количественного изучения. Оно часто встречается в клетках листьев водных растений (элодея, валлиснерия и др.).

Помимо перечисленных выделяют еще ряд типов движения, например фонтанирующее и челночное. Типы движения различаются между собой условно и в одной и той же клетке могут переходить от одного к другому.

Японские исследователи Камия и Курода (Камия, 1962), анализируя распределение скоростей в движущейся протоплазме клеток харовой водоросли нителлы, пришли к заключению, что механизм, приводящий в движение протоплазму, находится на поверхности раздела эктоплазмы и эндоплазмы. Эктоплазма, или кортикальная протоплазма (кортекс), — это наружный слой протоплазмы, стационарный гель. Эндоплазма — внутренний жидкий золеобразный слой. В очень тонком слое, близком к внутренней поверхности коркового геля, был обнаружен резкий градиент скорости, а фактически вся эндоплазма течет с одной и той же скоростью. Этот механизм получил название активного скольжения, поскольку эндоплазма скользит, как целое, по внутренней поверхности коркового слоя. Генераторами движущей силы, по мнению ряда исследователей, являются субкортикальные фибриллы, представляющие собой связки микрофиламентов).

Клетки междоузлий нителлы — объект многих исследований по движению протоплазмы — могут служить хорошей иллюстрацией для понимания механизма движения. Они имеют цилиндрическую форму и большую центральную вакуоль. Под клеточной стенкой и плазмалеммой находится эктоплазма со стационарными хлоропластами, образующими спиральные ряды. Субкортикальные фибриллы проходят параллельно рядам хлоропластов

■ **механизм движения** (рис. 1). Эндоплазма движется **также** параллельно рядам хлоропластов.

Другой механизм возникновения движущей **силы** был предложен на том основании, что в **эндоплазме** находятся отдельные или объединенные в **ряды** микронити (рис. 1), одним концом как бы **закрепленные** на «якорях» в кортексе. Эти микронити **вытягиваются** от субкортикальных фибрилл, и в **движении** в **эндоплазме** их свободные концы со-

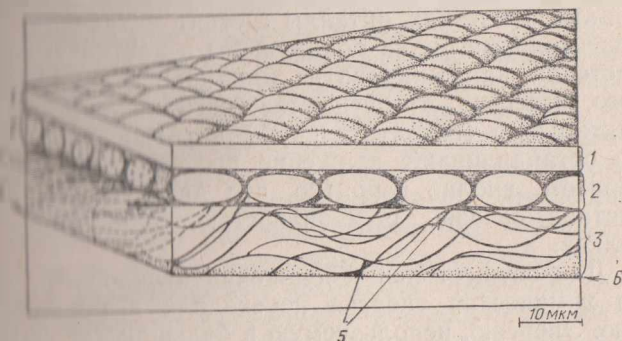


Рис. 1. Схема строения клетки междоузлия пиявки (по Аллен, 1974): 1 — клеточная оболочка; 2 — ряды хлоропластов и эктоплазма; 3 — эндоплазма; 4 — субкортикальные фибриллы; 5 — микронити; 6 — тонопласт

приводят полибообразные колебания. Аллен (Allen, 1974), применив гидродинамические уравнения, рассчитанные для колебаний жгутиков, пришла к выводу, что «взбывание» эндоплазмы микронитями может приводить ее в движение.

Вопрос о природе движущей силы окончательно не решен до настоящего времени. Хаксли (Huxley, 1973) предположил, что в основе всех типов движения живых организмов лежит один и тот же молекулярный механизм, возникший на раннем этапе эволюции: взаимодействие двух типов белков — актина и миозина, напоминающее процесс, происходящий в мышцах. В настоящее время это предположение находит все больше подтверждений. Обнаружено, что в плазмодии миксомицетов

фибриллы состоят из белков, аналогичных белкам мышц: актину — F-актин и миозину — миксомиозину. Локальное сжатие фибриллы вызывает волнообразные изменения, подобные деполяризационным волнам в мышечных волокнах и нервных клетках. При активном сокращении в эктоплазме миксомиозита можно видеть нити плазмы шириной от 4 до 21 нм. Эти нити сокращаются в присутствии АТФ и проявляют АТФазную активность.

Относительно недавно было показано, что микронити в клетках нителлы состоят из актина. Сократительные белки обнаружены в клетках многих растений как микронити толщиной 5 нм. Кроме того, известно, что вещества, ингибирующие контрактильную (сократительную) активность, обратно останавливают движение протоплазмы. Таким образом, вполне вероятно, что движение во всех клетках связано с активностью сократительных белков.

Для осуществления движения необходимо, чтобы химическая энергия переходила в механическую. Энергию, используемую в большинстве физиологических процессов, доставляет АТФ. Источником энергии для движения протоплазмы также служит АТФ. Скорость движения определяется не средним уровнем АТФ в клетке, а количеством АТФ в месте нахождения механико-химической системы, так как там, где возникает движущая сила, движение обычно усиливается с повышением концентрации АТФ до определенного уровня. Дальнейшее увеличение концентрации приводит к значительному увеличению вязкости протоплазмы и вследствие этого замедлению и остановке движения.

Поскольку движущая сила возникает в основном в веществе протоплазмы, где протекает гликолиз, энергия, запасаемая в этом процессе, может быть легко использована для движения. В то же время АТФ, образуемая в митохондриях в процессе окислительного фосфорилирования, менее доступна. Степень использования энергии дыхания в процессе движения будет зависеть от скорости диффузии АТФ из митохондрий к месту возникнове-

иной движущей силы. Ускорять движение протоплазмы может также АДФ, но не АМФ.

Различные ингибиторы и разобщители дыхания тормозят движение во многих растительных клетках, что также свидетельствует об энергозависимости процесса. 2,4-динитрофенол (ДНФ), широко применяемый разобщитель дыхания и фосфорилирования, тормозит движение протоплазмы в концентрации 10^{-4} — 10^{-3} М. Действие его обратимо, так как после удаления реагента скорость движения восстанавливается. Олигомицин — ингибитор неспецифического фосфорилирования — заметно замедляет движение протоплазмы и снимает ускоряющее действие АТФ и АДФ. Этот антибиотик ингибирует не только процесс образования АТФ, но и активность АТФазы, очевидно, подавляя таким образом деятельность сократительных белков.

Высшее значение движения протоплазмы состоит в том, что оно способствует переносу веществ от одной части клетки к другой. Помимо этого размножение у некоторых водорослей связано с процессом движения, с движением связан рост грибов у грибов. У миксомицетов, амёб, диатомовых водорослей движение протоплазмы и передвижение органоидов — два неразрывных процесса. Большое значение имеет движение протоплазмы для поглощения и выделения веществ, путем эндо- и экзоцитоза. Перемещения в клетке окруженных мембраной пузырьков, образованных в результате деятельности эндоплазматической сети и аппарата Гольджи, по-видимому, также осуществляется с помощью движения протоплазмы.

Стимуляция движения протоплазмы, возможно, является показателем возрастания активности клетки. Как уже упоминалось ранее, разные внешние воздействия способны изменять скорость движения протоплазмы. Ускорение движения под влиянием химических веществ называют хемодинамизмом. Большим интересом представляет тот факт, что хемодинамизм возникает при действии минимальных физиологических концентраций метаболитов растительных клеток, гормонов, некоторых аминокислот.

Таким образом, возможна регуляция скорости передвижения протоплазмы продуктами метаболизма клетки.

Усиление движения протоплазмы может служить показателем особого состояния клеток: например, проникновение фитофторы, гриба-паразита, в клетки листьев картофеля вызывает бурное движение протоплазмы, свидетельствующее о перестройках, происходящих в клетках. Движение протоплазмы в замыкающих клетках устьиц тесно связано с регуляцией изменения ширины устьичной щели.

Несмотря на то что остается много неясного в отношении физиологического значения движения протоплазмы, несомненно, оно играет важную роль в осуществлении обмена и распределения веществ клетки, в реакциях раздражимости.

Движение протоплазмы можно охарактеризовать, определив его скорость. Однако нельзя забывать о том, что она зависит не только от движущей силы, но и от вязкости протоплазмы. Скорость движения протоплазмы можно измерить под микроскопом при помощи частиц, увлекаемых при ее движении.

Цель работы: показать, что скорость движения протоплазмы неразрывно связана с уровнем жизнедеятельности клетки, с затратой энергии.

Объект исследования: листья элодеи (*Elodea canadensis*) или валлиснерии (*Vallisneria spiralis*).

Ход работы. Недалеко от верхушечной почки стебля отделяют лист элодеи или отрезают кусок листа валлиснерии, кладут на предметное стекло в каплю воды, взятой из сосуда, в котором было растение. Через 10 мин, когда установится стационарный уровень движения протоплазмы, клетки листа рассматривают под микроскопом. Выбирают наиболее легко просматриваемые участки (у элодеи это чаще всего клетки средней жилки) и следят за движением протоплазмы по движению хлоропластов.

Определяют скорость движения хлоропластов, измеряя путь, который проходит органелла в единицу времени. Для большей точности измерения

равно 10 делениям окуляр-микрометра. Измерения проводят для 5 органелл в 5 клетках и полученные данные статистически обрабатывают.

$$M = \frac{\sum a}{n},$$

где M — среднее арифметическое; $\sum a$ — сумма отдельных измерений; n — число измерений;

$$s = \sqrt{\frac{\sum (a - M)^2}{n}} \text{ — среднее квадратичное;}$$

$$m = \frac{s}{\sqrt{n}} \text{ — средняя ошибка.}$$

Помещают каплю раствора АТФ в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М с одной стороны покровного стекла и одновременно оттягивают фильтровальной бумагой воду из под стекла с другой стороны. Когда лист окажется в растворе АТФ, определяют скорость движения протоплазмы. Подобный опыт проводят, помещая лист в раствор $5 \cdot 10^{-4}$ М ДНФ. Листочку элодеи или лист валлиснерии опускают в стакан с водой, который находится в термостате при 37° и оставляют там на 20 мин. Затем отделяют лист и, положив его на предметное стекло в каплю воды, быстро определяют скорость движе-

Оформление работы. Каждую задачу практикума описывают в следующем порядке: 1. Цель работы; 2. Объект исследования; 3. Ход определения; 4. Результаты; 5. Выводы. Результаты, полученные при определении скорости движения протоплазмы, оформляют в виде таблицы (табл. 2).

Таблица 2
Схема оформления результатов

Варианты	Скорость движения, мм/с
	$M \pm m$
1. Температура 20°	
2. Температура 37°	
3. 10^{-4} М АТФ	
4. 10^{-4} М ДНФ	

Задача 2

ВЯЗКОСТЬ ПРОТОПЛАЗМЫ

Вязкость, или внутреннее трение, — это сила, необходимая для перемещения одного слоя жидкости относительно другого. Вязкость нормальной жидкости (так называемая ньютоновская жидкость) обуславливается сцеплением молекул жидкости друг с другом и не зависит от величины действующей на нее силы. В жидкостях, обладающих структурой, в силу свойственного им расположения макромолекул и их связи друг с другом вызвать смещение слоев можно, лишь приложив некоторую пороговую минимальную силу. Сопротивление, оказываемое движению частиц лабильными элементами структуры жидкости, принято называть структурной вязкостью, которая является одним из важных показателей физико-химических свойств протоплазмы.

Определение вязкости производят методом центрифугирования. При вычислении пользуются уравнением Стокса, по которому скорость падения шарообразной частицы (при постоянном значении радиуса частицы и плотности частицы жидкости) обратно пропорциональна вязкости. Мерой структурной вязкости протоплазмы может являться минимальная величина центробежного ускорения в единицах g , при котором центрифугирование в течение 10—20 мин вызывает смещение хлоропластов у 50% клеток.

Центробежное ускорение C может быть определено из отношения центробежной силы к силе тяжести, т. е.

$$C = \frac{m(2\pi rN)^2}{rmg} = \frac{(2\pi N)^2 r}{g},$$

где N — число оборотов центрифуги в секунду; r — радиус центрифуги; g — ускорение силы тяжести (981 см/с^2); m — масса тела.

Для сравнительных опытов определяют относительную вязкость. Мерой относительной вязкости может быть число оборотов центрифуги, необходимое для одинакового смещения хлоропластов, в такой же степени смещения хлоропластов при одинаковой продолжительности центрифугирования.

Наша работа: сравнить структурную вязкость протоплазмы клеток в основании и верхушке листа элодеи.

Объект исследования: листья элодеи (*Elodea canadensis*, *E. densa*).

Ход работы. От веточки элодеи отделяют 10 листочков с муговок, находящихся на расстоянии 1 см от верхушки побега, и помещают их на 10-20 мин в стакан с водой, взятой из сосуда, в котором находилось растение. Затем в стеклянные патрончики с помощью кисточки помещают по 2 листочка вместе с несколькими каплями воды, ориентируя их верхушкой в одну сторону. Патрончики переносят в центрифужные пробирки, которые уравнивают на весах, приливая в них по 1 мл воды из стакана с листьями. Пробирки помещают в центрифугу, и одну из них центрифугируют со скоростью 1000 об/мин, вторую — 2000 об/мин, третью — 3000 об/мин. После центрифугирования листочки быстро, чтобы не изменилась картина смещения хлоропластов, вынимают из патрончиков с помощью препаровальной иглы и переносят в фиксирующую смесь, состоящую из 1%-ного раствора хромовой кислоты и 4%-ного раствора формалина, смешанных в соотношении 1:1. Затем листья из фиксирующей смеси переносят на предметное стекло в каплю воды и проинкривают под микроскопом, отмечая смещение хлоропластов в одну сторону клетки в нижней части листа, где клетки моложе, и в верхушке листа — более старыми клетками. Если при 3000 об/мин смещения хлоропластов еще не наблюдается, то центрифугируют при 4000 об/мин. Находят порог скорости, вызывающей начало смещения хлоропластов у 50% клеток.

Обработка работы. Рассчитывают структурную вязкость протоплазмы в клетках основания

и верхушки листа, делают выводы. Подробное оформление задачи см. с. 13.

Задача 3

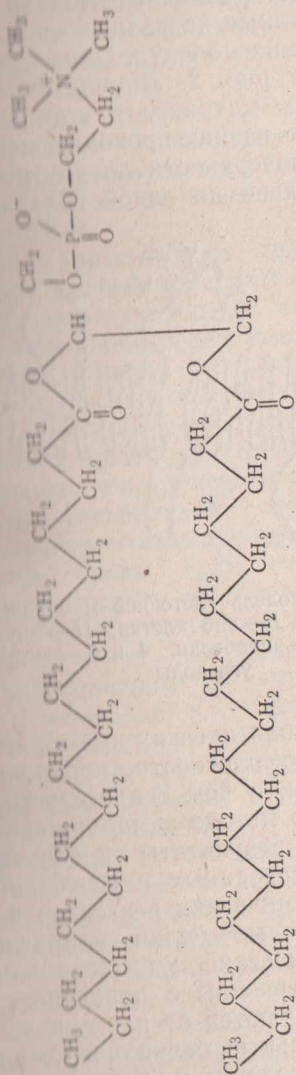
ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Все важнейшие проявления жизнедеятельности клетки связаны с цитомембранами. Мембраны составляют от $2/3$ и более сухой массы клеток и построены в основном из липидов и белков. Липидная молекула состоит из двух частей: полярной головки и длинных углеводородных хвостов, не несущих электрического заряда. Компактные гидрофильные головки могут иметь различный состав, но для липидов мембран наиболее характерны производные сахаров — гликолипиды или производные фосфорной кислоты — фосфолипиды. Углеводородные гидрофобные хвосты представляют собой неразветвленные цепи с числом атомов углерода от 14 до 24. Молекула липида имеет обычно два хвоста. Связующим звеном между головкой и хвостом может быть глицерин (тогда это глицеролипиды), сфингозин (эти вещества называют сфинголипидами) и некоторые другие спирты.

При высокой концентрации липидов в воде молекулы образуют двойной слой таким образом, что гидрофобные хвосты направлены друг к другу, гидрофильные головки к воде. Подобный бимолекулярный слой образуют липиды в мембране.

Белковая молекула имеет, как и липид, полярные и неполярные группы. В воде белковая цепь стремится принять такую форму, при которой неполярные участки взаимодействуют друг с другом, полярные с водой. В мембране полярная часть белка контактирует с водой или полярными головками липидов, неполярная, гидрофобная, — с углеводородными хвостами липидов.

Функциональная активность клеток определяется пространственной организацией молекул, составляющих мембраны, их контактами, способами



полярная головка

Молекула фосфатидилхолина

гидрофобный хвост

Библиотека
Сам СХИ
ИНВ.

соединения, взаимодействиями на поверхности раздела. Существуют различные модели архитектуры мембран, основанные на разных способах соединения образующих их молекул. Одна из этих моделей представлена на рис. 2. Липидный двойной слой образует вязкий матрикс, в который включены белки, некоторые из них проходят через мембрану от внешней ее поверхности до внутренней, другие расположены только на одной поверхности.

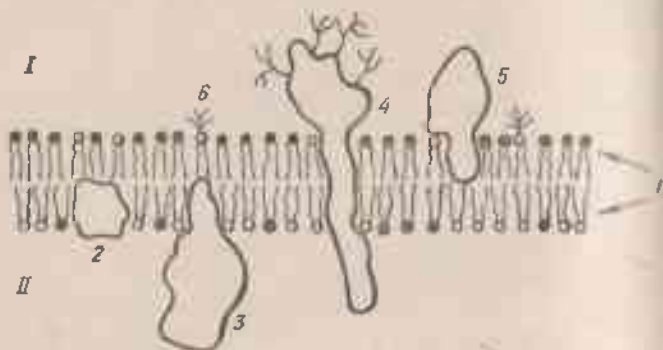


Рис. 2. Мозаичная модель клеточной мембраны (по Rollin, Lenard, 1977): I — вне клетки; II — внутри клетки; 1 — липиды, 2 и 3 — эндобелки, 4 и 5 — экзобелки, 6 — углеводы

Компоненты биологических мембран асимметричны относительно плоскости, проходящей через середину мембраны, о чем свидетельствует исследование с помощью метода замораживания со сканированием, а также результаты определения активности ферментов, связанных с мембраной, по их доступности для химических реагентов и действию протеиназ. Мембранные белки подразделяют на два типа: периферические и интегральные. Периферические белки связаны с поверхностями мембраны и легко отделяются от нее при мягких воздействиях. Интегральные белки погружены в толщу мембраны, и выделение их возможно лишь при разрушении мембранных структур с помощью органических растворителей, детергентов, ферментов. Асимметрия в распределении мембранных белков

и наличием проницаемости доказана, например, гормоночувствительность локализованных с наружной стороны плазматической мембраны, ферменты энергетического обмена — внутри, транспортные белки пересекают ее.

Липиды также обладают относительной асимметрией, что вытекает из следующего: почти каждый тип липидов присутствует на обеих сторонах мембраны, а количество его может варьировать в широких пределах.

Мембраны представляют собой механические барьеры, окружающие клетку и ее органеллы. Эти барьеры обладают гибкостью, способностью к деформации. Мембраны делят клетку эукариотов на различные литонимные отсеки, или компартменты. Подобное разделение позволяет увеличить эффективность взаимодействия участников отдельных метаболических процессов (субстратов и ферментов), разделить пространственно прямые и обратные реакции метаболизма, синтез и деградацию веществ, конкурентные процессы; создать локальные условия среды (рН, концентрации ионов и т.д.), регулировать скорости отдельных процессов и всего метаболизма клетки. Ферментные системы клетки могут находиться внутри компартмента в растворенном состоянии, быть прикрепленными к мембране или входить в ее состав. В мембранах обнаружены многочисленные мультиферментные системы (например, цепи переноса электронов при дыхании в митохондриях и при фотосинтезе в хлоропластах).

Поверхностная клеточная мембрана, плазмалемма, непосредственно связана с окружающей клетку внешней средой, и этим определяются ее положение в клетке, ее структура и функции. В плазмалемме заключены специальные механизмы узнавания и реакции на воздействие самых разнообразных факторов. Поступление любого вещества в клетку контролируется плазмалеммой. Плазмалемма, как и любая клеточная мембрана, обладает избирательной проницаемостью. Плазмалемма выполняет защитную функцию в клетке, участвует в узнавании клетками

друг друга, агрегации, адгезии, обмене информацией между клетками, восприятию различных химических и физических воздействий, на ней протекают биоэлектрические реакции.

Мембраны живых клеток возникают, развиваются и разрушаются на протяжении всей жизни клетки. Состав, структура и свойства мембран определяются их природой и, как уже указывалось выше, зависят от условий окружающей среды. Изменчивость мембран играет важную роль в жизнедеятельности клетки.

Одним из наиболее общих, неспецифических и быстрых ответов растительного организма на воздействия различных факторов внешней среды является изменение проницаемости клеточных мембран. Степень проницаемости мембран меняется при прорастании семян, росте растений, старении тканей, хранении плодов, при внесении удобрений, под влиянием регуляторов роста, света, температуры, фитопатогенных возбудителей и т. д.

Во взаимодействии живой клетки с внешней средой большое значение имеет газообмен, особенно поглощение и выделение O_2 и CO_2 . Мембраны клеток проницаемы для этих газов. У зеленых растений выполнение главной их функции — связывания солнечной энергии и создания органического вещества — неразрывно связано с газообменом. Однако интерес представляет проницаемость мембран не только для O_2 и CO_2 , но и для других газообразных веществ. В окружающей среде много и вредных газов, причем содержание их с каждым годом возрастает, поэтому проблема проникновения газообразных веществ в клетку и ее реакция на них становится все более актуальной. При изучении скорости поступления, выделения и передвижения газов в растении широко используется изотопная методика.

В то же время проникновение аммиака и паров соляной кислоты в клетку можно показать с помощью очень простого и наглядного опыта. Если ярко-красный цветок герани поместить в пары аммиака, лепестки его посинеют, и, наоборот, если синие клетки живокости или фиалки поместить в

некоторое время он проникает в вакуоль и происходит деплазмолиз. Скорость деплазмолиза зависит от проницаемости мембран для данного вещества, поэтому ее можно использовать при определении проницаемости мембраны.

Цель работы: показать различие свойств плазмалеммы и тонопласта.

Объект исследования: клетки эпидермиса бесцветного и окрашенного лука (*Allium cepa*).

Опыт 1

Обнаружение тонопласта (по Де Фризу)

Ход работы. Эпидермис вогнутой (морфологически верхней) стороны чешуи бесцветного лука помещают на предметном стекле в каплю 1 М (10%-ного) раствора KNO_3 с эозином. Через 3—5 мин начинают наблюдения под микроскопом. Хорошо заметно уменьшение объема вакуоли. Вначале протоплазма окружает вакуоль тонким слоем, но очень быстро начинается набухание протоплазмы, а затем отмирание протоплазмы и ядра, вызванные совместным действием KNO_3 и эозина, которые проникли в мезоплазму. Участки отмершей протоплазмы, окрашенные в ярко-розовый цвет, хорошо заметны. В течение длительного времени вакуоль остается сократившейся и не окрашенной в розовый цвет. Следовательно, ни KNO_3 , ни эозин не проникают через тонопласт в вакуоль.

Опыт 2

Колпачковый плазмолиз

Ход работы. Срез эпидермиса выпуклой стороны чешуи окрашенной луковицы помещают в 1 М раствор KNO_3 . Через 1—1,5 ч просматривают срез под микроскопом. Поскольку взят гипертонический раствор KNO_3 , во всех клетках наблюдается сильный плазмолиз. Слой протоплазмы, окружающий сократившуюся вакуоль в данном опыте, имеет заметную толщину. Со стороны поперечных стенок протоплазма имеет вид колпачков. Ядро также сильно увеличено. Увеличение объема протоплазмы и ядра — следствие набухания, которое вызвано прониканием ионов K^+ и NO_3^- через плазма-

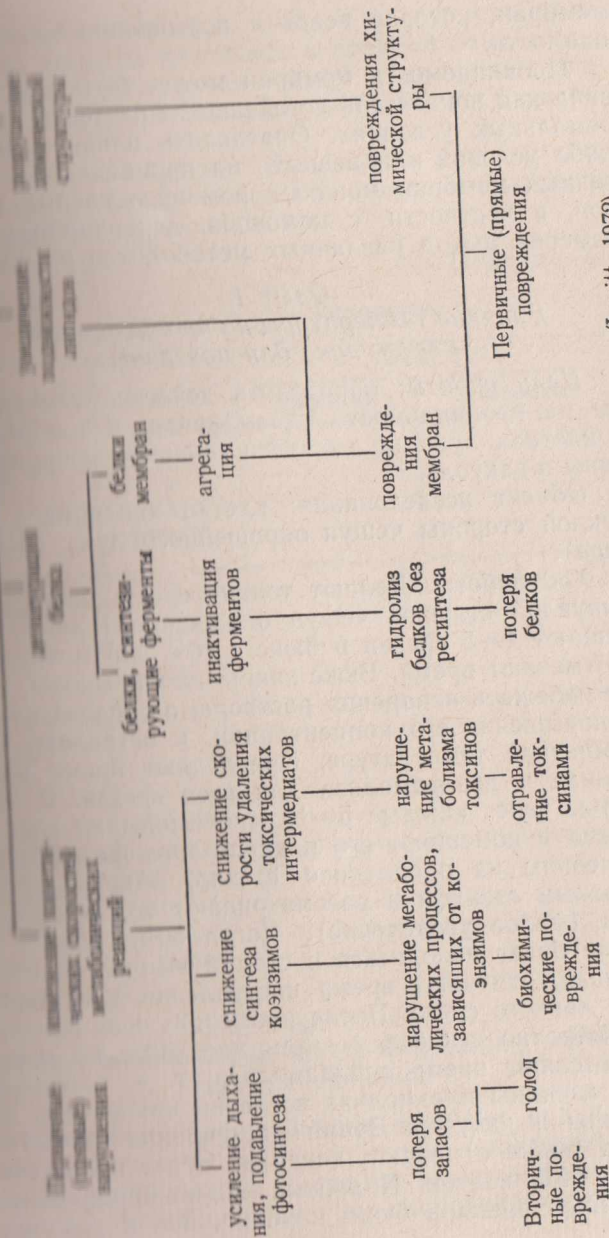
ное пространство клетки, создается впечатление деплазмозиса. Однако размеры вакуоли не увеличиваются, следовательно, тонопласт остался непроницаем для KCNS. Одновременно с образованием колпачкового и тонопластного плазмозиса изменяется структура клеточного ядра. Сначала оно набухает, затем разрушается ядерная оболочка. Таким образом, плазмалемма и ядерная оболочка проницаемы для KCNS, тогда как тонопласт сохраняет свою полупроницаемость.

Оформление работы. Зарисовывают наблюдаемые картины в опытах 1, 2, 3, делают выводы. Подробно оформление задачи см. с. 13.

Задача 4

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Одним из факторов внешней среды, определяющих степень проницаемости клеточных мембран, является температура. Левитт (Levitt, 1972), обобщая данные по действию субоптимальных температур на растение (см. схему), указывает, что повреждение мембран является первичным (прямым) действием повышения температуры. Повреждение может быть вызвано дегидратацией молекул белков в мембранах, нарушением водородных и S—S-связей. Увеличение кинетической энергии молекул воды может привести к тому, что ранее адсорбированные молекулы переходят в свободную форму. Это позволяет молекулам белка сблизиться настолько, что могут возникнуть новые связи и произойти агрегация молекул. Кроме того, изменение температуры приводит к изменению состояния липидов в клеточных мембранах. Ферментативная активность многих мембранных белков, проницаемость и транспортная активность мембран резко меняются при переходе липидов из «жидкого» состояния в «твердое». Повреждения растений при низких положительных температурах также характеризуются изменением физического состояния



Повреждения растений, индуцированные тепловым стрессом (Levitt, 1972)

мембран, которое ведет к повышению их проницаемости.

Проницаемость мембран может быть использована как показатель устойчивости растений и их корневых систем в неблагоприятных условиях. Определить влияние каких-либо условий или веществ на проницаемость различных мембран можно с помощью разных методов, в частности с помощью деплазмолиза и измеряя выход различных метаболитов из клеток.

Опыт 1

Влияние температуры на проницаемость клеток лука для мочевины

Цель работы: определить действие температуры на проницаемость плазмалеммы и тонопласта в клетках лука по скорости проникновения мочевины в вакуоль.

Объект исследования: клетки эпидермиса на выпуклой стороне чешуи окрашенного лука (*Allium cepa*).

Ход работы. Делают тонкие срезы эпидермиса на выпуклой стороне чешуи окрашенного лука. Помещают 4—5 срезов в бюкс с 10%-ной мочевиной и отмечают время. Бюкс закрывают крышкой, чтобы избежать испарения раствора, а следовательно, и повышения его концентрации, и оставляют при комнатной температуре. Определяют время плазмолиза и деплазмолиза для всех срезов. С этой целью через каждые 5—10 мин вынимают срез из бюкса и помещают его в капле того же раствора мочевины на предметное стекло, закрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом (малое увеличение). Когда 50% клеток на срезе будет находиться в стадии выпуклого плазмолиза, отмечают время наступления плазмолиза для данного среза. После просмотра срез помещают обратно в бюкс и затем для этих же срезов определяют время деплазмолиза, т. е. исчезновения картины плазмолиза после проникновения мочевины в вакуоль. Время наступления деплазмолиза также отмечают, когда он будет наблюдаться у 50% клеток. Подобные опыты проводят, помещая срезы в бюкс, находящийся в холодильнике.

клетки, где температура $+3^{\circ}$, и в две пробирки, одна из которых находится в водяной бане с температурой $+35^{\circ}$, другая — $+45^{\circ}$. Определяют время плазмолиза и деплазмолиза при этих температурах.

Оформление работы. Результаты дают в виде таблицы (табл. 3) и делают выводы. Подробно оформление задачи см. с. 13.

Таблица 3

Схема оформления результатов

Температура	№ срезов	Время, мин	
		плазмолиза	деплазмолиза
$+3^{\circ}$	1		
	2		
	3		
	среднее		
$+35^{\circ}$	1		
	2		
	3		
	среднее		
$+45^{\circ}$	1		
	2		
	3		
	среднее		
$+45^{\circ}$	1		
	2		
	3		
	среднее		

Опыт 2

Влияние температуры на проницаемость мембран для электролитов

Измерение проницаемости мембран под влиянием того или иного фактора можно определить по выходу электролитов из клеток в окружающий их раствор. Метод основан на измерении удельной

электропроводности раствора при помощи специальной установки (рис. 3).

От генератора сигналов переменный ток с частотой 10 кГц при напряжении 2,5 В проходит соответственно через двухполупериодный диодный

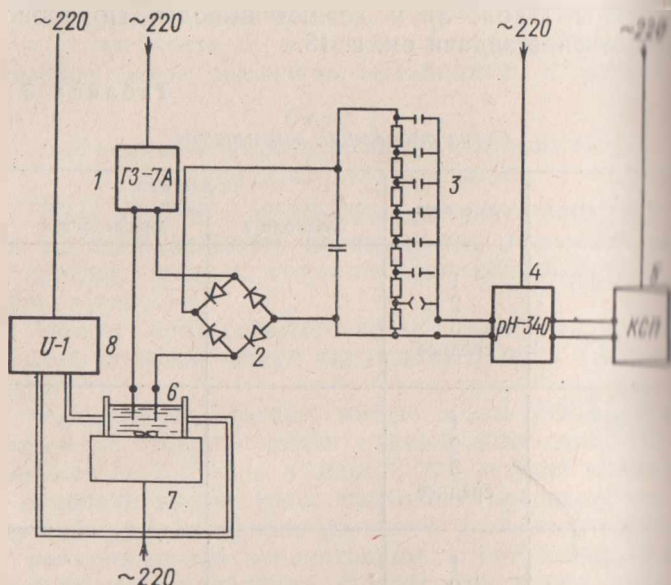


Рис. 3. Блок-схема установки для измерения и регистрации кинетики электропроводности водных растворов: 1 — генератор сигналов ГЗ-7А, 2 — выпрямитель с фильтром, 3 — сопротивления нагрузки с переключателем, 4 — потенциометр pH-340, 5 — электронный самопишущий потенциометр КСП-4, 6 — ячейка, 7 — магнитная мешалка, 8 — ультратермостат

выпрямитель и исследуемый раствор, являющийся в схеме основным сопротивлением в цепи. Выпрямленный ток, величина которого зависит от сопротивления исследуемого раствора, проходит через нагрузочное сопротивление, выполненное в виде ступенчатого делителя. Падение напряжения с одного или нескольких (в зависимости от сопротивления исследуемого раствора) звеньев делителя

соединяют со выходом лабораторного потенциометра рН 340, выполняющего роль усилителя мощности сигнала и компенсатора. С выхода потенциометра сигнал поступает на электронный регистрирующий прибор модели РЭН 4.

Ячейка представляет собой стеклянный сосуд, объемом 10 л, имеющий двойную стенку для термостатирования. Определенная температура в ячейке поддерживается с помощью ультратермостата. Для перемешивания раствора используют магнитную мешалку. Измерение электропроводности проводят с помощью платиновых электродов, укрепленных в герметичную крышку.

Применяемый в данном опыте метод широко известен, чтобы определить влияние различных факторов внешней среды на проницаемость клеточной мембраны. Метод может быть использован также для различных объектов: кусочков ткани, высушенных органов, суспензий клеток и протоплас-

Цель работы: определить характер влияния изменения температуры окружающей среды на проницаемость клеточных мембран для электролитов.

Объект исследования: клубень картофеля (*Solanum tuberosum*).

Ход работы. Клубень картофеля разрезают пополам ножом, а затем специальным ножом вырезают пластины, толщиной 3 мм, из которых затем вырезают 50—60 дисков диаметром 4 мм. Для изучения содержимого поврежденных клеток диски промывают водопроводной водой в течение 10 мин, предварительно поместив их в воронку Бюхнера, закрытую марлей, закрепленной резиновой лентой, и установленную в сосуд под струю холодной воды. Промытые диски хранят под влажной фильтровальной бумагой.

В ячейку опускают электроды и наливают дистиллированную воду. Затем с помощью ультратермостата устанавливают нужную температуру, в ячейку опускают мешалку и проверяют ее работу. Перед самонисса выводят на нуль с помощью ручки потенциометра рН 340, включают электронный дефлети самонисса (диаграмма), проверя-

ют стабильность работы прибора (перо самописца не должно отклоняться от нуля). Отбирают 8 дисков картофеля и все одновременно опускают в ячейку. Через 10 мин опыт прекращают, вынимают электроды и мешалку, останавливают движение ленты самописца, тщательно промывают ячейку водой, отмывают также электроды и мешалку.

Электропроводность раствора измеряют по величине отклонения пера самописца от нуля и выражают в относительных единицах. Для линейных участков диаграммы рассчитывают скорость выхода электролитов в относительных единицах в минуту. Опыт можно проводить в двух вариантах.

Вариант 1. В ячейке устанавливают температуру 20°, определяют выход электролитов в дистиллированной воде и в растворе какого-либо вещества, действие которого на выход электролитов из клетки исследуется, например 5%-ной мочевины. Поднимают температуру в ячейке до 40° и точно через 10 мин после инкубации дисков картофеля вновь определяют выход электролитов в воду. Раствор сливают в чистый стаканчик, кусочки картофеля выбрасывают, промывают ячейку, электроды и мешалку. Затем при той же температуре и в такой же последовательности определяют выход электролитов в другой исследуемый раствор. Раствор после инкубации сливают в чистый стаканчик.

Электропроводность раствора зависит не только от концентрации в нем электролитов, но и от подвижности ионов, которая, в свою очередь, зависит от температуры. Для того чтобы исключить влияние подвижности ионов, необходимо еще раз измерить электропроводность растворов, полученных при 20 и 40°, при одной и той же температуре, например 20°. Поэтому вновь устанавливают температуру 20°, наливают в ячейку воду, выводят перо самописца на нуль и затем вместо воды наливают в ячейку водный раствор электролитов, определяют его электропроводность. После этого, также установив точку отсчета, определяют электропроводность другого раствора.

Оформление работы. Сравнивают данные, полученные при разных температурах и в разных растворах, оформляют таблицу (табл. 4), делают выводы. Подробную запись задачи см. с. 13.

Таблица 4

Схема оформления результатов

Среды инкубации	Электропроводность раствора, отн. ед.	
	+20°	+40°
H ₂ O		
5% ная мочевина		

Вариант 2. Устанавливают в ячейке необходимую температуру и инкубируют кусочки картофеля 10 мин, сливают раствор в чистый стаканчик. Опыт проводят при температуре 20, 25, 30, 35, 40°. Опускают температуру в ячейке до 20°, наливают воду и устанавливают нуль, затем определяют электропроводность каждого раствора.

Оформление работы. Строят график зависимости электропроводности от температуры, делают выводы. Подробную запись задачи см. с. 13.

Опыт 3

Влияние температуры на проницаемость клеточных мембран для бетацианина

Бетацианин — пигмент столовой свеклы — относительно большая (М 564), хорошо растворимая в воде молекула, находящаяся в клеточном соке. Чтобы попасть во внешнюю среду, молекула бетацианина должна пройти через тонопласт, основной цитоплазматический матрикс и плазмалемму. Диффузия бетацианина из вакуоли в среду может проходить достаточно быстро при действии различных факторов или агентов, вызывающих изменение

проницаемости мембран. Измеряя оптическую плотность инкубационной среды через определенный промежуток времени, можно оценить степень воздействия на проницаемость мембран. Этот простой и быстрый метод используется обычно в прикладных исследованиях при изучении действия какого-либо вещества или фактора на биологические объекты.

Цель работы: определить действие температуры на проницаемость мембран для бетацианина по выходу его в различные инкубационные среды.

Объект исследования: корень столовой свеклы (*Beta vulgaris*).

Ход работы. Из корня столовой свеклы сверлом вырезают столбики ткани диаметром 5 мм, с помощью лезвия и линейки разрезают их на миллиметровые кусочки. Стараясь выбирать одинаковые по цвету, отсчитывают 60 дисков, которые в течение 15—20 мин промывают водопроводной водой для удаления остатков клеток. Как и в опыте 2, для этого используют воронку Бюхнера.

В 3 пробирки наливают по 10 мл воды, в следующие 3 пробирки — по 10 мл 0,5 М сахарозы. В каждую пробирку помещают по 10 дисков свеклы, 2 пробирки (одна с водой, другая с сахарозой) оставляют при комнатной температуре, 2 другие ставят в водяную баню с температурой $+35^{\circ}$, замечают время, 2 оставшиеся пробирки (с водой и сахарозой) помещают в водяную баню при $+45^{\circ}$, также отмечают время.

В течение 1 ч через каждые 10—15 мин в пробирках измеряют выход бетацианина в раствор. Для этого из опытной пробирки пипеткой отливают раствор в чистую пробирку и после измерения оптической плотности выливают раствор в ту же самую опытную пробирку, стараясь не терять жидкость. Измерение плотности проводят на ФЭКе с зеленым светофильтром, кюветы 0,5 см или СФ-4А при 535 нм.

Оформление работы. Строят график зависимости оптической плотности раствора от времени и делают выводы. Подробную запись задачи см. с. 13.

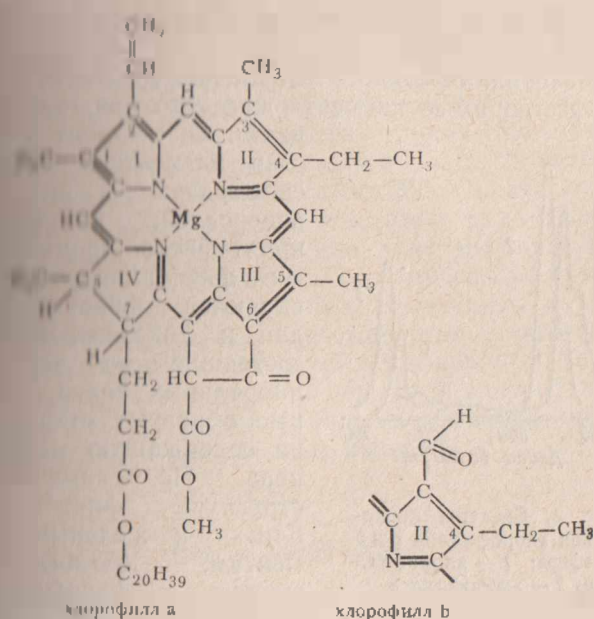
в возбужденное состояние достаточно энергии квантов видимой области спектра. Все пигменты фотосинтезирующих организмов обычно подразделяются на три группы: хлорофиллы и фикобилипротеиды — пигменты тетрапиррольной природы, а также каротиноиды.

У всех эукариотных растений пигменты локализованы в хлоропластах — в органоидах клетки, которые являются центрами превращения солнечной энергии. У прокариотных водорослей и фотосинтезирующих бактерий хлоропластов нет. Пигменты, принимающие участие в фотосинтезе, у них локализованы в мембранных структурах — тилакоидных ламеллах.

Хлорофиллы. Все фотосинтезирующие организмы содержат эти зеленые пигменты. По своей природе хлорофиллы являются Mg-порфиринами. Центральным атомом, связывающим четыре пиррольных кольца (I—IV), служит Mg. В результате образуется большое порфириновое кольцо с сопряженными по кругу двойными связями. Чередующиеся одинарные и двойные связи включают множество делокализованных π -электронов, которые принимают участие в поглощении света. Кроме того, в структуре хлорофилла имеется одно циклопентановое кольцо (V), которое включает высокоактивную в химическом отношении кетогруппу, которая участвует в образовании ассоциатов молекул хлорофилла и комплексов пигмента с молекулами воды.

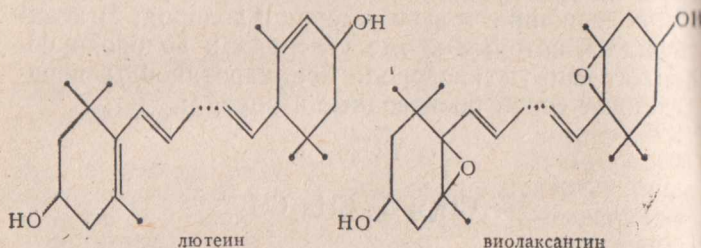
Длинная углеводородная цепь (остаток фитила), присоединенная к порфириновой части молекулы хлорофилла обладает липофильными свойствами. Фитильный остаток служит своего рода неполярным якорем, с помощью которого молекулы хлорофилла взаимодействуют с липидами и гидрофобными белками. Все это имеет значение для создания определенной пространственной ориентации молекул хлорофилла и поддержания структуры хлоропластов.

В настоящее время известно около 10 пигментов, входящих в группу хлорофиллов и отличающихся друг от друга некоторыми структурными



поглощениями. Наиболее распространены среди них хлорофиллы *a*, *b* и бактериохлорофилл. Хлорофилл *a* входит в состав пигментного аппарата всех фототрофов, кроме фотосинтезирующих бактерий, содержащих бактериохлорофиллы. Хлорофилл *b*, который находится в хлоропластах высших растений и в зеленых водорослях, отличается от хлорофилла *a* тем, что вместо $-\text{CH}_3$ у 3-го углеродного атома (в II кольце) имеется $-\text{CONH}_2$ группа.

Порфириновое кольцо хлорофилла поглощает красные и сине-фиолетовые лучи, пропуская значительную часть зеленых (рис. 4). Этим объясняется зеленый цвет хлорофилла. Именно молекулы хлорофилла *a* (у растений) и бактериохлорофилла *a* (у фотосинтезирующих бактерий) являются теми пигментами, которые непосредственно входят в реакционный центр фотосинтеза и принимают участие в преобразовании световой энергии. Остальные хлорофиллы служат «антеннами». Они поглощают



няется их желто-красная окраска. Основными каротиноидами пластид высших растений и зеленых водорослей являются β -каротин и ксантофиллы лютеин, виолаксантин и неоксантин. Эти четыре пигмента составляют $\sim 98\%$ от общего количества каротиноидов зеленых листьев. Большое разнообразие каротиноидных пигментов характерно для сине-зеленых водорослей, которые являются первыми фотосинтезирующими организмами, перешедшими от фоторедукции к фотосинтезу с выделением кислорода. Состав каротиноидов сине-зеленых водорослей заметно отличается от пигментного состава высших растений. Из каротиноидных пигментов у них преобладают β -каротин, эхиноенон и миксоксантофилл. Два последних не обнаружены у других представителей растительного мира. Многообразие каротиноидов у сине-зеленых водорослей связано с их филогенетическим происхождением, со способностью к существованию при очень разнообразных, порою экстремальных условиях внешней среды, с их чрезвычайной эврибионтностью.

Роль каротиноидов при фотосинтезе полностью не раскрыта. Доказано, что каротиноиды играют роль вспомогательных пигментов, которые передают энергию поглощенных квантов хлорофиллу или хлорофиллу. Благодаря этому более полно используется та часть видимого спектра, которая не поглощается хлорофилл. Во-вторых, существенное значение в реакциях фотосинтеза имеет защитная функция каротиноидов, которые, поглощая избыток больших энергий, выполняют роль экранов, предохраняющих хлорофилл и другие биологически активные соединения клетки от фотодеструкции. В-третьих, возможно, что каротиноиды принимают участие в процессах выделения кислорода растениями на свету. Было высказано предположение (Сажиников, 1965), что световыиндуцированное превращение зеаксантина в виолаксантина (так называемый виолаксантиновый цикл) могут играть роль в выделении O_2 при фотосинтезе. Механизм этого процесса в настоящее время не выяснен.

Из вышеизложенного видно, что наличие различных пигментов обеспечивает поглощение растениями солнечного света в широком спектральном диапазоне, эффективную миграцию и локализацию энергии возбуждения на активных центрах. Набор и содержание пигментов в растениях зависит от систематического положения фототрофов, от их филогенетического состояния и условий существования. В процессе эволюции растения разных местобитаний вырабатывали свой характерный набор пигментов, позволяющих им при различных условиях существования наиболее эффективно использовать доступный свет.

Интенсивность и спектральный состав солнечного света, доступные для растений разных экологических групп, различаются. Травянистые растения в лиственных и хвойных лесах довольствуются светом, который проникает сквозь кроны деревьев и кустарников. На долю тропических трав, растущих под тенью раскидистых деревьев и лиан, проникает едва лишь десятая часть полного дневного света. Даже в посевах одной культуры на

долю нижних ярусов листьев приходится на долю меньше световой энергии, чем на долю верхних. При прохождении через толщу листьев уменьшается интенсивность света, увеличивается доля рассеянного света, инфракрасной и коротковолновой радиации. С экологической точки зрения теневыносливого покрова в лесу относятся к числу теневыносливых растений. Они лучше растут в затененных местах и часто не встречаются на открытых местах леса. К тенелюбивым и теневыносливым относятся многие комнатные растения (аспидистра, папоротники, плющ, аспарагус), которые на своих естественных местах обитания растут в условиях довольно слабого освещения. Эти растения приспособлены к меньшей интенсивности света и плохо переносят прямые солнечные лучи.

Приспособленность растений к определенному световому режиму отражается в их строении и аппарате. Хлоропласты в листьях теневыносливых растений крупные и богаты хлорофиллом. По сравнению со светолюбивыми теневыносливые растения содержат больше хлорофилла на единицу площади. Их листья имеют насыщенно зеленую окраску. В связи с этим теневыносливые растения очень эффективно поглощают доступный им свет. Кроме того, в «теневых» растениях увеличивается содержание хлорофилла *b*, сильно поглощающего коротковолновые лучи. В результате этого соотношение $chl\ a/chl\ b$ уменьшается. Если у светолюбивых растений соотношение $chl\ a/chl\ b$ в среднем составляет $\sim 3,5-3,9$, то у теневыносливых растений оно примерно 2,5. Теневые растения содержат также относительно много каротиноидов. Хотя эти изменения в соотношении отдельных пигментов у теневыносливых растений не дают видимых цветовых эффектов в окраске листьев, их можно рассматривать как явление «хроматической адаптации» к условиям существования растений в определенном световом типе.

Растения гор привыкли к мощному потоку ультрафиолетовых лучей. Альпийские растения крайне светолюбивы и имеют высокое соотношение $chl\ a/chl\ b$ ($\sim 5,5$). Клеточный сок многих аль-

Получая активный ультра-
фиолет, они предохраняют фотосинтети-
ческий аппарат растений от перегрева и фотоокис-

лительности пигментного аппарата к ин-
тенсивному составу света осо-
бенно выражена у полных фототрофов. Сол-
нечный свет проходит через слой воды, толщиной
несколько метров, становится менее интенсивным
и глубководные водоросли, подоб-
ные наземным растениям, характеризуются высо-
ким содержанием пигментов. У бурых и красных
водорослей, которые обитают в глубокой воде,
где почти нет малых красных лучей и где пре-
обладает зелено-зеленый свет, в пигментном ап-
парате, кроме хлорофилла, содержатся фуко-
ксантин и каротиноиды. Эти пигмен-
ты поглощают лучи той спектральной
области, которые пропускаются толстыми слоями

воды. Для водорослей характерны хрома-
тические изменения, вызванные фенотипическими
факторами (фенотипическая адаптация). Пере-
мены в пигментном аппарате водорослей на-
блюдаются, что изменяется их окраска,
происходящая в зависимости от условий
жизни: температуры, освещения, среды.
Поверхностные водоросли, растущие на поверх-
ности, часто имеют зеленую окраску,
глубководные водоросли зеленеют в красном свете,
желтеют в зеленом, желтеют — в сине-зеленом
свете. Изменение окраски водорослей в этом
связано с перераспределением соотно-
шения пигментов фотосинтетического аппарата,
преимущественно хлорофилла *a* и фикобилинпро-

теинов. Пигментный комплекс фототро-
фов представляет собой сложную и лабильную си-
стему, которая четко реагирует на изменение ус-
ловий среды и приспосабливается к ним в
своей последовательно закрепленной про-

долю нижних ярусов листьев приходится меньше световой энергии, чем на долю верхних. При прохождении через толщу листьев уменьшается интенсивность света, увеличивается доля рассеянного света, инфракрасной и коротковолновой радиации. С экологической точки зрения подстильный покров в лесу относится к числу теневыносливых растений. Они лучше растут в тенистых местах и часто не встречаются на открытых местах леса. К тенелюбивым и теневыносливым относятся многие комнатные растения (асpidистра, фикус, плющ, аспарагус), которые на своих естественных местах обитания растут в условиях довольно слабого освещения. Эти растения приспособлены к меньшей интенсивности света и плохо растут под прямыми солнечными лучами.

Приспособленность растений к определенному световому режиму отражается в их пигментном аппарате. Хлоропласты в листьях теневыносливых растений крупные и богаты хлорофиллом. По сравнению со светолюбивыми теневыносливые растения содержат больше хлорофилла на единицу площади. Их листья имеют насыщенную зеленую окраску. В связи с этим теневыносливые растения более эффективно поглощают доступный им свет. В то же время, в «теневых» растениях увеличивается содержание хлорофилла *b*, сильно поглощающего в ближней инфракрасной области спектра инфракрасные лучи. В результате этого соотношение $chl\ a/chl\ b$ уменьшается. Если у светолюбивых растений соотношение $chl\ a/chl\ b$ в среднем составляет $\sim 3,5-3,9$, то у теневыносливых растений оно примерно 2,5. Теневые растения содержат также относительно много каротиноидов. Хотя эти пигменты в соотношении отдельных пигментов у теневыносливых растений не дают видимых цветовых сдвигов в окраске листьев, их можно рассматривать как явление «хроматической адаптации» к условиям существования растений в определенном световом типе.

Растения гор привыкли к мощному воздействию ультрафиолетовых лучей. Альпийские растения крайне светолюбивы и имеют высокое соотношение $chl\ a/chl\ b$ ($\sim 5,5$). Клеточный сок многих альпийских растений имеет розоватую окраску, что связано с наличием в нем антоцианов.

Постоянный активный ультра-
фиолетовый свет, они предохраняют фотосинтези-
рующие растения от перегрева и фотоокис-

лительности. Пигментный аппарат к ин-
тенсивности спектральному составу света осо-
бенно приспособлен у водных фототрофов. Сол-
нечный свет, проходя через слой воды, толщиной
несколько метров, становится менее интенсивным
и сдвигается в длинноволновую область спектра.
Глубоководные водоросли, подоб-
ные растениям, характеризуются высо-
ким содержанием пигментов. У бурых и красных
водорослей обитает в глубокой воде,
где проникает мало красных лучей и где пре-
обладает синевато-зеленый свет, в пигментном ап-
парате в хлорофилле содержатся фуко-
ксантин и каротиноиды. Эти пигмен-
ты поглощают лучи той спектральной
области, которые пропускаются толстыми слоями

воды. Для водорослей характерны хрома-
тические изменения, вызванные фенотипическими
факторами (фенотипическая адаптация). Пере-
мены в пигментном аппарате водорослей на-
пряжены, что изменяется их окраска.
Окраска водорослей в зависимости от условий
среды температуры, освещения, среды
обитания. Красные водоросли, растущие на поверх-
ности, часто имеют зеленую окраску,
зеленые водоросли зеленеют в красном свете,
синие и желтые — в синем-зеленом.
Изменение окраски водорослей в этом
связано с перераспределением соотно-
шения пигментов фотосинтетического аппарата,
преимущественно хлорофилла *a* и фикобилинпро-

теинов. Пигментный комплекс фототро-
фов представляет собой сложную и лабильную си-
стему, которая активно реагирует на изменение ус-
ловий среды и приспосабливается к ним в
процессе своей наследственно закрепленной про-

сосом. Отсасывают жидкость при помощи насоса. После этого в ступку приливают еще немного ацетона, растирают, снова вливают на фильтр и отсасывают. Эту операцию повторяют еще несколько раз, пока раствор, стекающий из фильтра, не будет абсолютно бесцветным.

Вытяжку переливают в мерную колбу на 25 мл, колбу Бунзена споласкивают несколько раз небольшими порциями ацетона и доводят чистым ацетоном объем вытяжки в мерной колбе до метки. *Работа количественная, нельзя терять ни одной капли!* Полученная ацетоновая вытяжка содержит сумму зеленых и желтых пигментов.

Концентрацию хлорофилла *a* и *b* определяют на спектрофотометре. Для этого часть полученного экстракта наливают в кювету спектрофотометра. Вторую кювету, заполненную чистым растворителем (80%-ный ацетон), используют как контрольную. Кюветы помещают в кюветную камеру спектрофотометра и определяют оптическую плотность (*D*) вытяжки при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофилла *a* и *b* в 80%-ном ацетоне. Для хлорофилла *a* в 80%-ном ацетоне максимум поглощения в красной области спектра наблюдается при $\lambda=665$ нм, для хлорофилла *b* — при $\lambda=649$ нм. Каротиноиды определяют при $\lambda=440,5$ нм. Концентрацию хлорофилла *a* и *b* в вытяжке рассчитывают по формуле Вернона:

$$\begin{aligned}C_a &= 11,63 \cdot D_{665} - 2,39 \cdot D_{649}, \\C_b &= 20,11 \cdot D_{649} - 5,18 \cdot D_{665},\end{aligned}$$

где C_a , C_b — концентрация хлорофилла *a* и *b* в мг/л.

Для определения концентрации каротиноидов (мг/л) в суммарной вытяжке пигментов может быть использована формула Веттштейна:

$$C_{\text{кар}} = 4,695 \cdot D_{440,5} - 0,268 (C_{a+b}),$$

где C_{a+b} — суммарное содержание хлорофиллов *a* и *b* в растворе (мг/л).

Установив концентрацию пигментов в вытяжке, определяют их содержание в исследуемом материале с учетом объема вытяжки и навески пробы:

$$A = \frac{V \cdot C}{P \cdot 1000},$$

где C — концентрация пигментов в мг/л; V — объем вытяжки в мл (25 мл); P — навеска растительного материала в г (0,1—0,2 г); A — содержание пигмента в растительном материале в мг/г сырой массы.

Оформление работы см. с. 13.

Задача 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХЛОРОФИЛЛА

Опыт 1

Флуоресценция хлорофилла

Флуоресценция — явление свечения веществ при поглощении ими света. Переход возбужденной молекулы пигмента в основное исходное состояние сопровождается излучением поглощенной энергии в виде света флуоресценции. Излучаемый свет имеет большую длину волны, чем поглощаемый. Для хлорофилла характерна красная флуоресценция.

Ход работы. Вытяжку пигментов помещают на черном фоне у окна или освещают сине-фиолетовым светом в области коротковолнового максимума хлорофилла. Вишнево-красный цвет вытяжки и отраженном свете свидетельствует о способности хлорофилла флуоресцировать, что является признаком фотохимической активности вещества.

Явление флуоресценции можно наблюдать и на живых растениях. Удобными объектами для этих целей являются водоросли, водяной мох *Fontinalis*, *Elodea densa* и другие растения. Растительный объект помещают на предметное стекло микроскопа и освещают его сине-фиолетовыми лучами. Для этого между осветителем и зеркалом микроскопа помещают синее стекло. Под влиянием этого облучения содержащие хлорофилл пластиды начинают светиться красным светом.

Опыт 2

Спектр поглощения вытяжки пигментов

Для пигментов зеленых листьев характерно избирательное поглощение отдельных лучей спектра. Чтобы определить, какие лучи поглощает хлорофилл, используют спектроскоп. Он состоит из коллиматорной трубы, имеющей на одном конце узкую щель, на другом — линзу; призмы; зрительной трубы с линзой на одном конце и окуляром, через который ведется наблюдение, — на другом. В некоторых спектроскопах имеется еще труба, в которой помещена специальная шкала для измерения длин волн лучей.

Свет от источника излучения, проходя через щель коллиматора, попадает на линзу, а потом на призму. Призмой свет разлагается на пучки лучей различных цветов. В фокальной плоскости второй линзы получается ряд параллельных, различно окрашенных изображений щели, которые рассматриваются через окуляр зрительной трубы. Помещая на пути света, дающего сплошной спектр, раствор окрашенного вещества, обнаруживаем на фоне спектра темные полосы или отдельные линии, соответствующие участкам света, поглощенным раствором.

Ход работы. До начала работы со спектроскопом устанавливают источник света и регулируют ширину щели на коллиматорной трубе. Щель должна быть не очень широкой, но и не очень узкой. В первом случае спектр получается яркий, но размытый; во втором — он мало освещен. При работе со спектроскопом, где имеется шкала для измерения длин волн лучей, изменением положения зеркала добиваются, чтобы шкала накладывалась на спектр, а деления и цифры отчетливо были видны через зрительную трубу. Вдвиганием и выдвиганием окуляра достигают ясного изображения спектра и проектирующегося на нем изображения шкалы.

Установив спектроскоп, приступают к определению спектра поглощения пигментов. Для этого перед щелью спектроскопа помещают пробирку

(лучше с плоскопараллельными стенками) с раст-
вором пигментов. Пробирку укрепляют в лапке
штатива. Зарисовывают спектр и отмечают поло-
жение в нем темных полос, соответствующих участ-
кам спектра, которые поглощаются данным раст-
вором.

Опыт 3

Разделение пигментов по Краусу

Метод основан на различной растворимости
пигментов в спирте и бензине. Сродство пигментов
к полярным (спирт, ацетон) и неполярным (бен-
зин) растворителям определяется степенью их по-
лярности. Ксантофиллы, содержащие две или бо-
лее полярных групп, хорошо растворимы в спирте,
и то время как каротин отличается более высоким
сродством к бензину. Фитольный остаток в моле-
куле хлорофилла представляет ее гидрофобную
часть и обуславливает возможность взаимодейст-
вия молекулы пигмента с бензином. Удаление фи-
тола при омылении хлорофилла увеличивает срод-
ство пигмента к полярным растворителям.

Ход работы. В пробирку наливают 2—3 мл
спиртовой вытяжки пигментов, прибавляют при-
мерно полуторный объем бензина и несколько ка-
пель воды, для того чтобы спирт не смешивался
с бензином. Пробирку закрывают и несколько раз
сильно встряхивают, а затем дают 2—3 мин по-
стоять. Происходит разделение слоев: верхний зе-
леный слой (бензиновый) содержит оба зеленых
пигмента и каротин, а нижний желтый слой (спир-
товой) — ксантофиллы. Определяют спектр погло-
щения ксантофилла. Показателем чистоты отде-
ления ксантофилла от зеленых пигментов является
отсутствие поглощения в красной области спектра.

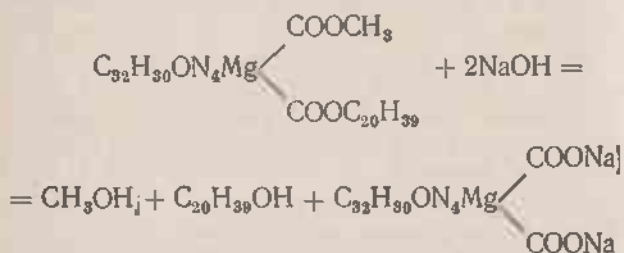
Опыт 4

Омыление хлорофилла и отделение каротина

Ход работы. В пробирку с 2—3 мл вытяжки
пигментов прибавляют несколько капель 20%-ного
спиртового раствора щелочи. Наливают 1—1,5 мл
бензина и две капли дистиллированной воды.
Сильно встряхивают, а затем дают отстояться.

Нижний, спиртовой, слой содержит соль хлорофиллиновой кислоты (продукт омыления хлорофилла) и ксантофилл, верхний, бензиновый слой, — каротин. Определяют спектр поглощения каротина.

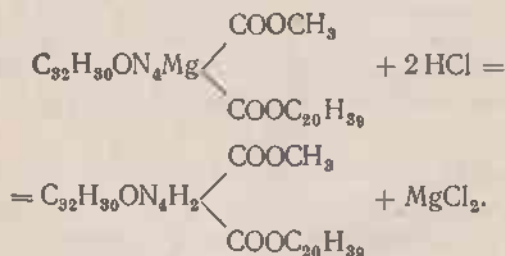
Можно произвести омыление и после разделения слоев по Краусу. Прибавляют в ту же пробирку кусочек едкого калия, встряхивают и наблюдают перемещение хлорофилла из верхней фазы (бензин) в нижнюю (спирт). Реакция хлорофилла со щелочью идет следующим образом:



Опыт 5

Получение феофитина и восстановление металлоорганической связи

Ход работы. В пробирку наливают 2—3 мл спиртовой вытяжки пигментов и добавляют 1—2 капли 10%-ной HCl. При взбалтывании вытяжка становится бурой вследствие образования производного хлорофилла — феофитина (в хлорофилле атом магния замещается водородом). Реакция идет по следующему уравнению:



К побуревшей вытяжке прибавляют несколько кристалликов уксуснокислого цинка или меди,

растения нагревают на водяной бане и наблюдают появление зеленой окраски благодаря восстановлению металлоорганической связи.

Задача 3

СРАВНЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА ПИГМЕНТОВ ЭУКАРИОТНЫХ И ПРОКАРИОТНЫХ РАСТЕНИЙ

Разделение смеси пигментов на отдельные компоненты проводится с помощью хроматографии на различных носителях-адсорбентах (бумага, сахароза, силикагель, силуфол и др.). Чтобы пигменты разделялись на сорбентах, используют систему неполярных растворителей с примесью определенного количества полярного растворителя. Различные пигменты, обладая неодинаковой растворимостью в данном растворителе и разной адсорбируемостью, передвигаются по мере движения растворителя с различной скоростью и располагаются на адсорбенте в отдельных местах. Чем больше растворимость пигмента в растворителе и чем хуже он адсорбируется данным адсорбентом, тем быстрее он будет передвигаться и тем дальше будет располагаться зона этого пигмента.

Цель работы: разделить смесь пигментов с помощью хроматографии и проследить, какие сходства и различия имеются в пигментном аппарате у разных групп фототрофов.

Объект исследования: пигменты, выделенные из высших растений, зеленых и сине-зеленых водорослей¹.

Ход работы. Разделение пигментов проводят на пластинках силуфола размером 5×15 см. Силуфол — это пластинки для тонкослойной хроматографии на алюминиевой фольге. В качестве сор-

¹ Растворы пигментов готовят заранее. Пигменты извлекают из листьев высших растений или из осадка водорослей смесью спирта с ацетоном (1:3). Полученный раствор пигментов фильтруют через стеклянный фильтр, затем выпаривают растворители, а остаток пигментов растворяют в дихлорформе и хранят в холодильнике.

бента используется силикагель, связывающим веществом является крахмал. Чтобы предотвратить окисление хлорофилла во время разгонки пигментов, пластинку предварительно обрабатывают 10^{-2} М раствором аскорбиновой кислоты.

На пластинку силуфола с помощью капилляра наносится вытяжка пигментов (0,05—0,15 мл) по-

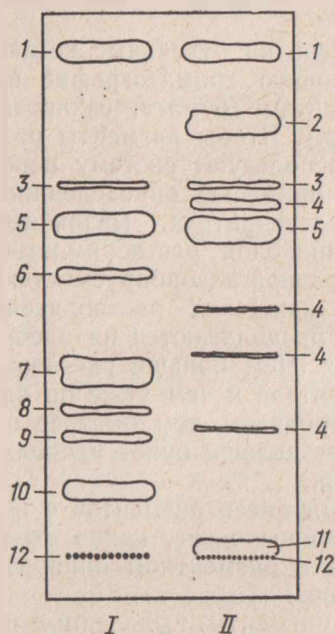


Рис. 5. Распределение отдельных зон пигментов высших растений (I) и сине-зеленых водорослей (II) при разделении на силуфоле: 1 — β -каротин, 2 — эхиноенон, 3 — феофитин, 4 — минорные ксантофиллы, 5 — хлорофилл *a*, 6 — хлорофилл *b*, 7 — лютеин + зеаксантин, 8 — антераксантин, 9 — виолаксантин, 10 — неоксантин, 11 — миксоксантофилл, 12 — старт

лосой 1,5 см на расстоянии 2 см от нижнего края пластинки. В процессе нанесения вытяжки пластинку подсушивают струей воздуха. После нанесения нужного объема вытяжки пластинку подсушивают до полного испарения растворителя и помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную смесью растворителей следующего состава: бензин, ацетон, петролейный эфир, гексан в объемном соотношении 10:10:3:10. На одну пластинку наносят вытяжку пигментов из высших растений и сине-зеленых водорослей. Разгонку проводят в сосудах с плотно закрытой крышкой, затемненных черной бумагой. После того как фронт растворителя поднимется вверх, не доходя 2 см до края пластинки, хроматограмму вынимают и высушивают в струе

Вопросы. Рассматривается, какие сходства и различия имеются в пигментном аппарате у этих двух групп организмов. Схема распределения пигментов высших растений и сине-зеленых водорослей *Anabaena variabilis* на пластинке сиулофола показана на рис. 5.

Оформление работы. Полученную хроматограмму наклеивают в тетрадь и отмечают зоны пигментов. Подробно оформление задачи см. с. 13.

Задача 4

РАЗДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ (по Д. И. Сапожникову) И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ КАРОТИНОИДОВ ЗЕЛЕНОГО ЛИСТА

Цель работы: отделить каротиноиды от хлорофиллов и определить их содержание в зеленых листьях.

Объект исследования: листья высших растений (например примулы).

Ход работы. Для решения задачи надо получить вытяжку пигментов, отделить каротин, лютеин и виолаксантин, а также определить концентрацию каротиноидов.

Получение вытяжки пигментов. Навеску листьев, равную 0,5 г, тщательно растирают в сухой фарфоровой ступке с 1—2 г безводного Na_2SO_4 и небольшим количеством CaCO_3 до сухого зеленого порошка. Измельченный растительный материал переносят на стеклянный фильтр № 3 и настаивают в течение 5 мин с 3—5 мл растворителя (смесь этилового спирта и ацетона в отношении 3:1). Небольшими порциями растворителя из растительного порошка на фильтре вымывают все пигменты в пробирку, вставленную в колбу Бунзена. Для окончательной экстракции пигментов порошок промывают порцией этилового эфира и общий объем экстракта в пробирке доводят растворителем до 10 мл. Экстракт содержит сумму зеленых и желтых пигментов.

Отделение каротина, лютеина и виолаксантина.

На два листа хроматографической бумаги (ленинградская быстрая) размером 16×16 см на расстоянии 2 см от нижнего края полосой 12 см наносят по 1 мл полученной вытяжки пигментов. В процессе нанесения бумагу подсушивают струей воздуха. После нанесения вытяжки бумагу хорошо подсушивают до полного испарения растворителя, свертывают в цилиндр (соединяя верхние края бу-

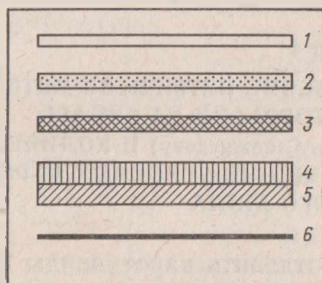


Рис. 6. Распределение пигментов на бумажной хроматограмме: 1 — каротин, 2 — лютеин, 3 — виолаксантин, 4 — хлорофилл *a*, 5 — хлорофилл *b*, 6 — старт

маги скрепкой) и помещают в хроматографическую камеру для разгонки.

В камеру предварительно (за 15 мин) наливают 30 мл бензол-петролейный эфир (в объемном соотношении 2:1). Уровень растворителя должен быть ниже нанесенной полосы пигментов. Камеру плотно закрывают крышкой и затемняют черной бумагой. Через 20—30 мин, когда фронт растворителя поднимется на 12 см и будет видно четкое разделение пигментов, хроматограмму вынимают и подсушивают. Отдельные зоны пигментов располагаются в следующем порядке (рис. 6).

Определение концентрации каротиноидов. Окрашенные полосы, соответствующие каротину и ксантофиллам (лютеин+виолаксантин), вырезают с двух хроматограмм, зоны одноименных пигмен-

Его соединяют, измельчают и помещают в два химические стакана (в один — зоны каротина, в другой — зоны лютеина и виолаксантина вместе). Для лучшей элюции пигментов измельченную бумагу в стакане обрабатывают этиловым эфиром (1 мл) и пигменты затем элюируют смесью спирт — ацетон (1:3). Растворитель прибавляют небольшими порциями, настаивают 3 мин и фильтруют в мерную пробирку, повторяя экстракцию до полного вымачивания пигментов. Объем элюата доводят до 10 мл.

Оптическую плотность растворов каротина и ксантофиллов измеряют на фотоэлектроколориметре с синим светофильтром. Концентрацию пигментов определяют по калибровочной кривой и рассчитывают содержание пигментов в 1 г сырой массы ткани. Данные опытов помещают в таблицу (табл. 5).

Таблица 5

Результаты количественного определения каротиноидов

Исходный материал, г	Объем суммарной вытяжки пигментов, мл	Нанесено на хроматограмму, мл	Сырая масса ткани, соответствующая объему вытяжки, нанесенной на 2 хроматограммы	Объем элюата, мл	Значение оптической плотности на ФЭКе	Концентрация пигмента в элюате, мг/л	Содержание пигмента	
							в объеме элюата	в 1 г сырой массы ткани

Задача 5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА

Для характеристики интенсивности фотосинтеза могут быть использованы разные показатели: интенсивность газообмена, учет накопления ассимилятов в растениях, энергетическая эффектив-

ность фотосинтеза, активность отдельных звеньев фотосинтеза и др. Наиболее распространенными методами оценки суммарной интенсивности фотосинтеза являются газометрические, основанные на учете количества поглощенной углекислоты или выделенного кислорода: определение интенсивности фотосинтеза с помощью инфракрасных газоанализаторов, манометрический метод Варбурга, радиоуглеродный, катарометрический и электрохимические методы, а также ряд других. Выбор того или иного метода зависит от цели работы и наличия той или иной лабораторной техники. Ниже более подробно описан манометрический метод, который в настоящее время широко применяют для определения интенсивности фотосинтеза.

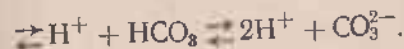
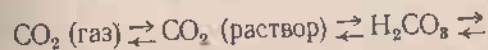
Манометрический метод, разработанный немецким ученым Варбургом, нашел широкое применение при изучении процессов, протекающих с выделением или поглощением газов (дыхание, фотосинтез, определение активности некоторых ферментов). Принцип метода заключается в определении количества выделенного или поглощенного объектом газа по изменению давления в замкнутом пространстве при постоянном объеме и температуре. Более подробно манометрический метод описан в разделе «Дыхание». Ниже приводятся лишь рекомендации, которые необходимо соблюдать при изучении интенсивности фотосинтеза.

Известно, что в фотосинтезе происходит поглощение CO_2 и выделение O_2 . Используя манометрию для оценки интенсивности фотосинтеза, необходимо создать такие условия, при которых давление одного газа во время опыта остается постоянным. Обычно фотосинтез учитывается по выделению O_2 , а концентрация CO_2 в воздушной фазе поддерживается постоянной благодаря применению различных буферных смесей. Наиболее широко применяются карбонатно-бикарбонатные буферные растворы Варбурга, состоящие из Na_2CO_3 и NaHCO_3 создающие определенные концентрации CO_2 в растворе и в воздушной фазе (табл. 6). Равновесие CO_2 между раствором и газовой фазой устанавливается по схеме:

Таблица 6

Концентрация CO_2 , поддерживаемая буферными смесями Варбурга при 25°

Концентрация, моль/л	pH смеси	Концентрация CO_2 в буферной смеси, моль/л	Концентрация CO_2 в воздушной фазе		
			моль/л	мг/л	%
0,085	0,015	10,8	$0,53 \cdot 10^{-6}$	$0,64 \cdot 10^{-6}$	0,03 0,0016
0,080	0,020	10,7	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	0,05 0,0030
0,075	0,025	10,5	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$2,0 \cdot 10^{-6}$	0,09 0,0050
0,070	0,030	10,4	$2,6 \cdot 10^{-6}$	$3,1 \cdot 10^{-6}$	0,13 0,0077
0,060	0,040	10,2	$5,3 \cdot 10^{-6}$	$6,4 \cdot 10^{-6}$	0,28 0,0158
0,050	0,050	10,1	$9,8 \cdot 10^{-6}$	$11,8 \cdot 10^{-6}$	0,52 0,0292
0,035	0,065	9,8	$23 \cdot 10^{-6}$	$27,8 \cdot 10^{-6}$	1,20 0,0685
0,025	0,075	9,6	$43 \cdot 10^{-6}$	$52 \cdot 10^{-6}$	2,30 0,1280
0,015	0,085	9,4	$91 \cdot 10^{-6}$	$119 \cdot 10^{-6}$	4,85 0,2720
0,010	0,090	9,2	$150 \cdot 10^{-6}$	$180 \cdot 10^{-6}$	7,90 0,4470
0,005	0,095	8,8	$330 \cdot 10^{-6}$	$400 \cdot 10^{-6}$	17,60 0,9850



Кроме вышеуказанных применяются еще так называемые CO_2 -буферы, состоящие в основном из соединений типа диэтаноламина. Они способны поддерживать постоянную концентрацию CO_2 в пределах от 1 до 5%.

Для определения фотосинтеза наземных растений необходимо выбрать буферную смесь, при которой поглощение CO_2 из воздушной фазы уравнивается ее поступлением из раствора. Для этого определяют фотосинтез опытного объекта в такой системе буферов и выбирают буферный раствор, обеспечивающий максимальное значение фотосинтеза. Предварительно проводят также выбор оптимальной площади листа.

Цель работы: определить интенсивность фотосинтеза растений разных опытных вариантов.

Объект исследования: листья наземных растений или суспензия водорослей.

Ход работы. В зависимости от конструкции и объема сосудов наливают туда определенный объем (5—10 мл) выбранной буферной смеси. Височки или небольшие кусочки листьев помещают на сетке или специальных пластинках над буфером. Водоросли можно погружать прямо в буферный раствор. Одновременно ставят термобарометры и сосудики для определения интенсивности дыхания. В термобарометры наливают тот же объем буферного раствора, что и в опытные сосудики. Для определения интенсивности дыхания сосудики с буферным раствором и растительным материалом закрывают от освещения черными чехлами.

Манометры с сосудиками помещают в нагретую до определенной температуры ванну (обычно 25°), включают качание и термостатируют с открытыми кранами в течение 30 мин без освещения для выравнивания температуры и насыщения воздушной фазы сосудика углекислотой. Затем включают свет и качают манометры с открытыми кранами еще 10 мин для достижения стационарного состояния фотосинтеза. После этого уровень жидкости в правом колене доводят до нулевой точки, закрывают кран и отмечают исходное положение манометрической жидкости в левом открытом колене. Отсчеты делают через 10-минутные интервалы в течение 30—60 мин, причем перед каждым отсчетом уровень жидкости в правом колене манометра устанавливают на исходной точке, а данные берут по левой шкале.

Интенсивность фотосинтеза выражается количеством кислорода (в мл или мг), выделенного растительным объектом на единицу массы (1 г) или площади (1 дм²) за единицу времени (1 ч). Расчеты и форма записи приведены в разделе «Дыхание» (с. 78). Считая фотосинтетический коэффициент $O_2/CO_2=1$, можно понять, что количество выделенного в опыте O_2 равно количеству поглощенной CO_2 . Зная количество миллилитров поглощенной в опыте углекислоты, можно перевести их в единицы массы (масса 1 л CO_2 составляет 1,9768 г).

Изменения в газовом составе, которые наблюдаются при освещении растений, характеризуют максимальную интенсивность ассимиляции. Для расчета фотосинтеза к этим значениям следует прибавить количество CO_2 , выделенного за это время в процессе дыхания.

Оформление работы. Результаты представляют в таблице. Подробно оформление задачи см. с. 13.

Задача 6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ХЛОРОПЛАСТОВ

Первичные фотохимические реакции осуществляются с участием возбужденных молекул хлорофилла и сопряжены с потоком электронов от водного донора электронов к соединениям с более высоким восстановительным потенциалом. Таким образом, энергия квантов используется для подъема электронов «вверх» против термодинамического потенциала. Энергия электронов используется в цепи последовательных окислительно-восстановительных реакций, в результате которых образуются восстановленные соединения (АТФ, НАДФ-Н). Эти соединения являются первыми стабильными «консерваторами» световой энергии.

Многочисленные экспериментальные данные, полученные в последнее время, позволили построить схемы первичных фотохимических реакций фотосинтеза. Наиболее признанная схема фотохимических реакций высших растений и водорослей (Z-схема) приведена на рис. 7. Она включает две последовательно протекающие фотохимические реакции, которые осуществляются за счет световой энергии, поглощаемой двумя разными фотосистемами: ФС-I — длинноволновой, возбуждаемой дальним красным светом, с хлорофиллом P_{700} в реакционном центре, и ФС-II — коротковолновой, возбуждаемой светом с длиной волны 680 нм. Две фотосистемы осуществляют различные функции. С функционированием ФС-I сопряжены реакции циклического фотофосфорилирования и создания

мощного восстановителя, в то время как ФС-II связана с реакциями фотоокисления воды. Продукты, образующиеся при возбуждении ФС-II, используются в реакциях, сопряженных с ФС-I. Взаимодействие двух фотосистем осуществляется через

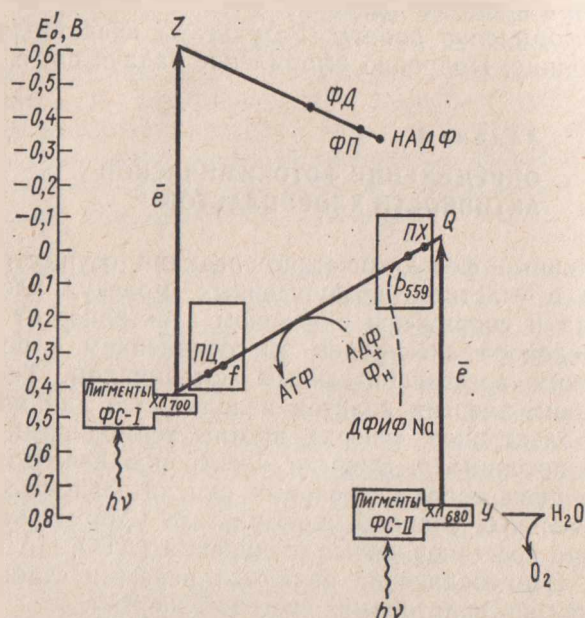


Рис. 7. Схема фотохимических реакций хлоропластов при фотосинтезе: ФД — ферредоксин; b_{559} , f — цитохромы; ПХ — пластохинон; ПЦ — пластоцианин; ФП (ФД-НАДФ-редуктаза) ДХФИФNa — дихлорфенолиндифенолNa, Y, Q, Z — неидентифицированные переносчики

промежуточные компоненты электронтранспортной цепи.

В фотореакции I электрон, удаленный от возбужденной светом молекулы хлорофилла, приводит к восстановлению ферредоксина и образованию НАДФ·Н. Положительно заряженная молекула хлорофилла воспринимает электрон от близлежащих доноров, первым из которых, по-видимому, является цитохром f . Цитохром f акцептирует

электронов от другого переносчика, который, в свою очередь, восстанавливается за счет электрона следующего переносчика и т. д. Свет, поглощаемый фотосистемой I, поднимает потенциал электрона от уровня цитохрома f ($E^I_0 = 0,37$ В) до уровня ферредоксина ($E^I_0 = -0,43$ В), который затем восстанавливает НАДФ.

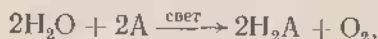
В фотореакции II электрон, удаленный от фотосенсибилизированной молекулы хлорофилла, воспринимается акцептором пластохиноном А (или соединением Q) и восстанавливает его. Молекула хлорофилла возвращается в исходное положение, воспринимая электрон от воды (OH^-). Окисление воды приводит к выделению молекулярного кислорода. Энергетический потенциал электрона повышается от уровня воды ($E^I_0 = +0,81$ В) до уровня пластохинона А ($E^I_0 = +0,01$ В) или близкого к нему по потенциалу соединения Q. Затем через ряд темновых окислительно-восстановительных реакций электрон переносится к цитохрому f ($E^I_0 = -0,37$ В). На этом участке электронтранспортной цепи происходит «спуск электронов вниз» (электроны движутся по градиенту окислительно-восстановительного потенциала). За счет энергии, выделяющейся на этом пути переноса, образуются молекулы АТФ.

Таким образом, в обеих фотореакциях происходит запасание энергии, а на участке цепи от пластохинона до цитохрома f — освобождение ее. Образовавшиеся молекулы НАДФ·Н и АТФ, в которых световая энергия преобразована и «запасена» в виде химической энергии, участвуют в последующих темновых реакциях восстановления CO_2 .

В настоящее время доказано, что изолированные хлоропласты являются полноценными фотосинтетическими структурами и способны осуществлять все этапы фотосинтеза. Световые фотохимические реакции происходят в пигментсодержащих мембранных структурах пластид, фиксация CO_2 и темновые ферментативные реакции протекают в основном в строме хлоропластов, где сосредоточены и соответствующие ферментные системы.

Одним из показателей фотохимической актив-

ности хлоропластов является реакция Хилла. Она представляет собой комплекс начальных стадий фотосинтеза, связанных с фотоокислением воды, в которых мобилизованные из воды при участии ФС-II электроны направляются на восстановление введенных в реакционную смесь акцепторов электронов. Фотовосстановление акцепторов сопровождается выделением O_2



где А — акцептор e .

Эта реакция была открыта в 1937 г. англичанином Хиллом и названа по его имени. Хилл обнаружил, что изолированные хлоропласты способны при освещении восстанавливать железо ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$), одновременно выделяя кислород. В дальнейшем было показано, что изолированные хлоропласты могут восстанавливать на свету не только железо, но и ряд других соединений: окислительно-восстановительные индикаторы, бензохинон, а также естественный акцептор электронов — НАДФ. Таким образом, реакция Хилла, в которой хлоропласты проводят разложение воды и восстанавливают какой-либо другой окислитель, добавленный извне, представляет собой наиболее простую модель первичных фотохимических стадий фотосинтеза.

В отношении спектров действия, чувствительности к специфическим ингибиторам и различным физическим и химическим факторам, реакция Хилла весьма сходна с процессами фотосинтеза в целом. Поэтому реакцию Хилла используют в качестве физиологической характеристики состояния фотосинтетической системы растений.

В соответствии с особенностями механизма фотосинтетической ассимиляции CO_2 все высшие растения делятся на две группы. К первой группе относятся растения, у которых ассимиляция CO_2 при фотосинтезе происходит в цикле Кальвина и первым стабильным соединением является трехуглеродное соединение — фосфоглицериновая кислота. Это — C_3 -путь. Ко второй группе относятся

растения, которые первоначально фиксируют CO_2 в четырехуглеродные аспарагиновую или яблочную кислоты, а затем эту же углекислоту вновь усваивают, но уже через цикл Кальвина. Это — C_4 -путь, или цикл Хэтча—Слэка. Акцептором CO_2 в цикле Хэтча—Слэка служит фосфоенолпировиноградная кислота (ФЕП). Включение CO_2 осуществляется в реакции β -карбоксилирования ФЕП с помощью фермента ФЕП-карбоксилазы. Впервые этот путь фиксации углерода был обнаружен в 1965 г. австралийскими учеными Хэтчем и Слэком у некоторых тропических злаков. К C_4 -растениям относятся растения, сформировавшиеся в сходных экологических условиях аридных тропических областей. Типичными представителями этой группы растений являются сахарный тростник, просо, сорго, кукуруза. Схема, отражающая основные пути C_4 -метаболизма, приведена на рис. 8.

В чем заключается физиологический смысл цикла Хэтча — Слэка?

Основной фактор, лимитирующий скорость фотосинтеза, — низкая концентрация CO_2 в воздухе (0,03%) и ее медленная диффузия в клетки и хлоропласты растений. C_4 -растения по экологическому происхождению являются обитателями теплых и сухих районов. В таких условиях растворимость CO_2 значительно снижается. Поэтому карбоксилирование может отставать от световых реакций фотосинтеза и становится «узким местом», лимитирующим фотосинтез в целом. Однако скорость фотосинтеза C_4 -растений не снижается благодаря тому, что связывание CO_2 с ФЕП катализируется ферментом ФЕП-карбоксилазой, который из-за большого сродства к CO_2 работает даже при очень низких концентрациях CO_2 .

Следовательно, основная функция C_4 -пути — концентрирование CO_2 в клетках мезофилла, чтобы фотосинтез не подавлялся из-за нехватки углекислого газа. Поэтому цикл Хэтча—Слэка можно рассматривать как своего рода «углеродную помпу», приставку к циклу Кальвина, обеспечивающую эффективную работу фотосинтетического аппарата. C_4 -растения лучше остальных видов использу-

ют скудные ресурсы CO_2 . Для них характерна высокая скорость ассимиляции углерода, поэтому многие C_4 -растения представляют собой высокоурожайные культуры.

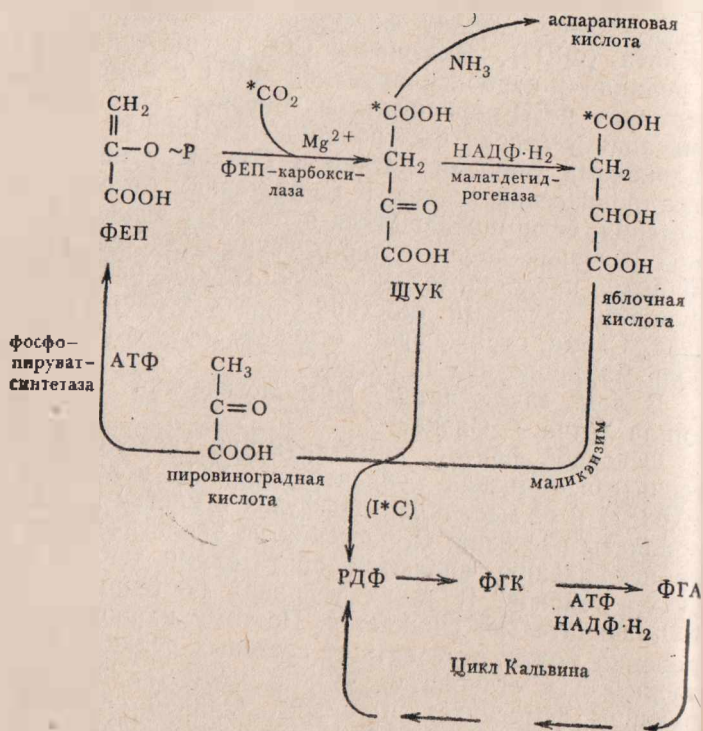


Рис. 8. Цикл Хэтча — Слэка

Важнейшей чертой растений с C_4 -путем ассимиляции углерода является особенность анатомического строения их листьев и организации фотосинтетического аппарата. Густая сеть мелких проводящих пучков окружена клетками паренхимной обкладки и кольцами мезофилла. Наличие клеток обкладки — генетически закрепленный признак C_4 -растений.

У некоторых представителей C_4 -растений, на-

у кукурузы, ярко выражена структурная и функциональная специализация хлоропластов в эпидермисе обкладки и мезофилла. Хлоропласты в клетках мезофилла компактные, с большим количеством гран. В них функционируют как I, так и II фотосистема. Гранальные хлоропласты мезофилла с высокой скоростью осуществляют реакцию Хилла и все другие фотохимические реакции. Хлоропласты обкладки крупные, для них характерно наличие ламелл и отсутствие гран. Из-за отсутствия ФС-II активность реакции Хилла и нециклического фотофосфорилирования в хлоропластах обкладки незначительна. Лишь на некоторых этапах онтогенеза и при высокой интенсивности света наблюдается незначительная активизация ФС-II. Это связано с появлением в агранулярных хлоропластах обкладки псевдогран (спаренных тилакоидов, рудиментальных гран).

Цель работы: определить активность реакции Хилла в хлоропластах, выделенных из мезофилла и обкладки сосудистых пучков. В качестве электроакценторной системы использовать 2,6-дихлорфенолндофенолNa (ДФИФNa).

Объект исследования: кукуруза.

Ход работы. Для решения задачи необходимо выделить хлоропласты, определить оптическую плотность суспензии хлоропластов, а затем скорость реакции Хилла.

Выделение хлоропластов. Выделение двух типов хлоропластов из листьев кукурузы основано на различной устойчивости клеток обкладки и мезофилла к механическому разрушению. Нежная ткань мезофилла разрушается легко, и хлоропласты выходят в среду выделения. Для разрушения клеток обкладки требуется более жесткое и многократное растирание тканей.

Навеску листьев (5—7 г) размельчают ножницами и растирают в предварительно охлажденной фарфоровой ступке с 10-кратным количеством (по отношению к массе) среды выделения (среда А), также предварительно охлажденной. Для лучшего растирания среду добавляют небольшими порциями. В состав среды А входят следующие компо-

ненты: 0,05 М *трис*-HCl буфер, pH 7,0; 0,4 М сахароза; 0,01 М NaCl; 0,003 М цистенин; 0,4 мг/мл альбумин.

Полученный после растирания гомогенат отжимают через полотно в фарфоровую чашку и переносят в центрифужную пробирку. Остаток, в состав которого входят в основном проводящие пучки, используют для выделения хлоропластов из клеток обкладок проводящих пучков. Для этого проводящие пучки переносятся в ступку, небольшими порциями добавляются 20 мл среды выделения, и интенсивно растирают ткань. Полученный гомогенат отжимают через полотно в чашку, остаток опять переносят в ступку, и процедуру повторяют еще 2 раза. Получается ~60 мл суспензии, которую переливают в отдельную центрифужную пробирку.

Первое центрифугирование проводят при 300 (1500 об/мин на центрифуге ЦЛС-3) в течение 3 мин. Осадок, содержащий обрывки тканей, ядер, разрушенные клеточные стенки и т. д., отбрасывают, а надосадочную жидкость переливают в другой центрифужный стакан.

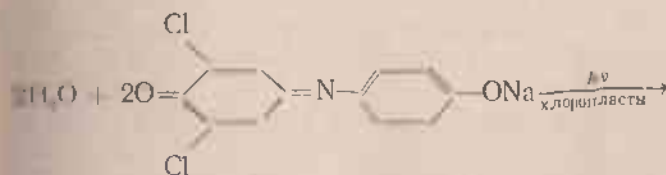
Для осаждения хлоропластов суспензию центрифугируют в течение 10 мин при 1500 g (3500 об/мин на центрифуге ЦЛС-3). Надосадочную жидкость сливают, а полученный осадок чистых хлоропластов суспендируют со средой Б в маленьком гомогенизаторе до получения однородной смеси. Среда Б состоит из следующих компонентов: 0,05 М *трис*-HCl буфер, pH 7,0; 0,4 М сахароза; 0,01 М NaCl.

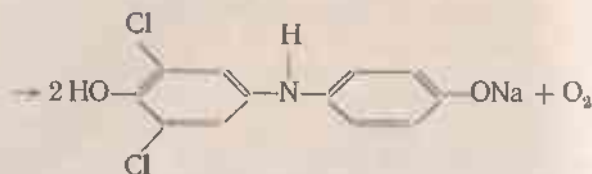
Для этого на осадок хлоропластов в центрифужной пробирке добавляют несколько раз по 2—3 мл среды Б, осадок перемешивают стеклянной палочкой и переносят в гомогенизатор. Гомогенизируют до получения однородной смеси, а затем переносят в мерный цилиндр. Центрифужную пробирку и гомогенизатор несколько раз ополаскивают средой Б для удаления оставшихся хлоропластов. Конечный объем суспензии хлоропластов мезофилла доводят средой Б до 50 мл, хлоропластов обкладок сосудистых пучков — до 15 мл. Получен-

ные суспензии хлоропластов хранят в банке со льдом, защищенной от света черной бумагой.

Определение оптической плотности суспензии хлоропластов на ФЭКе. Максимальная скорость реакции Хилла наблюдается при содержании 20—30 мкг хлорофилла в реакционной смеси. Поэтому из полученных хлоропластов готовят суспензию, 1 мл которой содержит 10 мкг хлорофилла. Для этого определяют оптическую плотность суспензии на ФЭКе с красным светофильтром и продолжают прибавлять среду Б к суспензии до тех пор, пока *D* последней не будет 0,260. Это соответствует концентрации хлорофилла 10 мкг/мл. В качестве нулевого раствора используют среду Б. Полученные хлоропласты используют для определения их фотовосстановительной активности.

Определение активности реакции Хилла. Вначале определяют активность реакции Хилла хлоропластов мезофилла. Для этого в 4 пробирки наливают по 3 мл суспензии хлоропластов (30 мкг хлорофилла) и по 1 мл раствора 2,6 ДФИФNa 10^{-4} М. Немедленно после добавления ДФИФNa пробирки с реакционной средой помещают в черные стаканчики, чтобы защитить их от воздействия света. На ФЭКе с красным светофильтром определяют исходные оптические плотности суспензий в темноте, и они служат темновым контролем, а две другие освещают лампой накаливания в течение 5 мин. Окислительно-восстановительный индикатор 2,6-ДФИФNa в окисленном состоянии имеет синюю окраску, а при восстановлении превращается в бесцветное лейкосоединение. Оптическая плотность раствора при этом уменьшается. Реакция идет по следующей схеме:





Немедленно после освещения определяют D суспензии в опытных (свет) и контрольных (темнота) пробирках. Рассчитывают изменение D пробы за время опыта. Вносят поправку на темновое восстановление краски. Активность реакции выражается величиной изменения оптической плотности при освещении суспензии за 1 ч в расчете на 1 мг хлорофилла. Точно такую же процедуру повторяют с хлоропластами обкладок.

Схема записи приведена в табл. 7.

Таблица 7

Результаты определения активности реакции Хилла хлоропластов мезофилла и обкладки листьев кукурузы

Варианты опыта	Оптическая плотность растворов (D)		Изменение оптической плотности (ΔD)		Изменение оптической плотности (ΔD)	
	до опыта	после опыта	за время опыта	с поправкой на темновое восстановление ($\Delta D_{\text{свет}} - \Delta D_{\text{тем}}$)	за 1 ч	за 1 мг хлорофилла
Свет						
Темнота						

Оформление работы. Результаты обобщают в таблице. Подробно оформление задачи см. с. 13.

Задача 7

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Опыты с изолированными хлоропластами показали, что при фотосинтезе энергия квантов света, поглощаемая хлорофиллом, переходит в энергию

химических связей молекул АТФ. Этот процесс называется фотосинтетическим фосфорилированием, в отличие от окислительного фосфорилирования — энергетического. Фотофосфорилирование впервые открыто в 1954 г. на бесклеточных системах: Френкелем — на бактериальных хроматофорах и Арноном — на хлоропластах шпината.

Согласно теории электронного потока Арнона возбуждаемый светом ток электронов в хлоропластах сопряжен с образованием АТФ. Свободная энергия, необходимая для синтеза АТФ, освобождается в определенных участках электронтранспортной цепи, где происходит перенос электрона по градиенту термодинамического потенциала. При наличии сопрягающих механизмов эта свободная энергия может быть зафиксирована в микроэнергетических связях АТФ. В настоящее время известно два типа фотофосфорилирования: циклическое и нециклическое. Циклическое фотофосфорилирование сопряжено с циклическим потоком электронов, при котором удаленный из фотовозбужденной молекулы хлорофилла электрон возвращается к ней по «замкнутой» системе переносчиков и кофакторов (рис. 9).

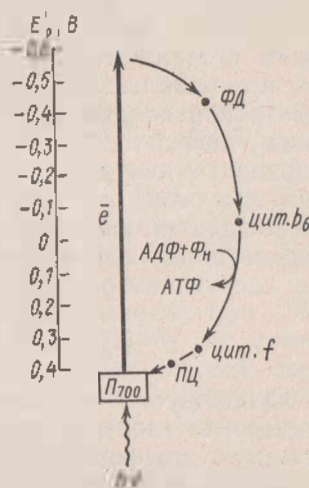
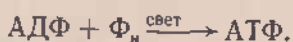


Рис. 9. Схема циклического фотофосфорилирования: ФД — ферредоксин, ПЦ — пластоцианин

В реакциях циклического фотофосфорилирования участвует только ФС-I. Под действием света электроны возбужденной молекулы хлорофилла (P_{700}) принимаются акцептором (химическая природа точно не установлена) с потенциалом $-0,6$ В. От акцептора электроны переходят к железосодержащему белку ферредоксину, который при этом

восстанавливается, а от него — к цитохрому b_6 и затем к цитохрому f . На последнем этапе растратив энергию, полученную при переходе в возбужденное состояние, электроны возвращаются на свои орбитали в молекулах хлорофилла a . Цикл замкнулся. Окисленная форма пигмента восстанавливается и при возбуждении снова может служить источником для циклического процесса.

Во время описанного процесса обладающие высоким потенциалом электроны движутся «вниз» и их потенциалы постоянно снижаются. Перенос электронов сопряжен с синтезом АТФ. Таким образом, энергия света, поглощенная пигментом реакционного центра, фиксируется в виде АТФ. Процесс циклического фотофосфорилирования не сопровождается выделением O_2 или синтезом восстановленных кофакторов и может быть представлен следующим образом:



Существует несколько путей циклического транспорта электронов, сопряженных с фотосинтетическим фосфорилированием. Они различаются по включению разных кофакторов и энергетической эффективности. Различные пути циклического транспорта электронов обеспечивают наиболее эффективную работу электронтранспортной цепи при изменении условий существования растений.

В экспериментальных условиях для образования АТФ изолированными хлоропластами необходим свет как источник энергии, основные компоненты фосфорилирующей системы — АДФ, Φ_n , Mg^{2+} и кофакторы, каждый из которых служит медиатором переноса электронов. К кофакторам циклического фотофосфорилирования относятся ферредоксин (ФД), феназинметасульфат (ФМС), флавиномононуклеотид (ФМН), витамины K_1 , K_3 .

Цель работы: определить активность циклического фотофосфорилирования в хлоропластах высших растений в зависимости от условий выращивания и онтогенеза растений. В качестве кофактора использовать ФМС.

Объект исследования: проростки гороха, пшеницы и других растений.

Ход работы. Определение фотосинтетического фосфорилирования растений включает 4 этапа: выделение хлоропластов; проведение фосфорилирования; определение фосфора в реакционной смеси; определение содержания хлорофилла в суспензии хлоропластов.

Выделение хлоропластов. Навеску листьев (4—5 г) размельчают ножницами, растирают в предварительно охлажденной фарфоровой ступке с 10-кратным (по массе) количеством среды выделения, в состав которой входят следующие компоненты: 0,05 М трис-НС буфер, рН 7,8; 0,4 М сахароза; 0,01 М NaCl. Для лучшего растирания среду добавляют *небольшими порциями*. После растирания гомогенат отжимают через полотно в фарфоровую чашку и переносят в центрифужную пробирку.

Первое центрифугирование проводят при 150 g (1000 об/мин на центрифуге ЦЛС-3) в течение 1 мин. Осадок, содержащий обрывки тканей, ядра, разрушенные клеточные стенки и т. д., отбрасывают, а надосадочную жидкость переливают в другую центрифужную пробирку. Для осаждения хлоропластов суспензию центрифугируют в течение 7 мин при 1500 g (3500 об/мин на центрифуге ЦЛС-3). Надосадочную жидкость сливают, а полученный осадок хлоропластов суспендируют в маленьком гомогенизаторе с 7 мл среды выделения. Полученную суспензию хлоропластов помещают в банку со льдом, защищенную от света черной бумагой.

Проведение фотофосфорилирования. Для проведения фотофосфорилирования готовят реакционную среду, состав которой приведен в табл. 8.

Растворы для реакционной смеси, кроме АДФ и ФМС, готовят заранее на бидистиллированной воде и хранят в холодильнике. АДФ и ФМС готовят непосредственно перед опытом, и тогда же все компоненты реакционной среды сливают вместе.

Реакционную среду готовят сразу на 4 колбочки (2 опытные на свету и 2 контрольные в темноте

для одного биологического варианта), взяв каждого компонента реакционной смеси в пятикратном объеме (табл. 8).

Таблица 8

*Состав реакционной среды для циклического
фотофосфорилирования*

Компоненты	Количество в колбочке, мкмоль	Количество раствора в колбочке, мл	Пятикратный объем компонента, мл
трис- HCl буфер, pH 7,8	45	0,9	4,5
NaCl	60	0,1	0,5
$\text{MgCl} \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	10	0,1	0,5
АДФ, pH 7,8	10	0,1	0,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10	0,1	0,5
ФМС	0,1	0,1	0,5
H_2O (бидистил.)	—	0,6	3,0
Общий объем		2,0	10,0

В каждую колбочку наливают по 2 мл реакционной смеси и по 1 мл суспензии хлоропластов. В контрольные колбочки сразу добавляют 1 мл 10%-ной ТХУ (трихлоруксусная кислота) и 1 мл CH_3COONa (1 М). Опытные колбочки освещают 5 мин (схема установки показана на рис. 10). Нужно следить, чтобы температура воды в ванне не превышала 20° . Для регулирования ее можно использовать лед. После освещения в каждую колбочку быстро добавляют по 1 мл ТХУ и 1 мл CH_3COONa . Содержимое колбочек фильтруют через беззольные фильтры в пробирки и в фильтрате определяют содержание неорганического фосфора методом Лоури.

Определение неорганического фосфора в реакционной смеси по методу Лоури. К 0,5 мл фильтрата добавляют 1,5 мл бидистиллированной воды. Затем в пробирку прибавляют 2 мл CH_3COONa (1 М); 4 мл ацетатного буфера, pH 4,0; 1 мл 1%-ной аскорбиновой кислоты, приготовленной на 0,001 М $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Через 10 мин добавляют 1 мл 1%-ного $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, приготовленного на

0,05N H_2SO_4 . Через 10 мин плотность раствора фосфомолибденовой сини измеряют на ФЭКе в кювете 0,5 см с красным светофильтром.

Концентрацию фосфора в растворе определяют по калибровочной кривой. Показателем фосфорилирующей активности хлоропластов служит убыль неорганического фосфора за время инкубации. Фосфорилирующую активность изолированных хлоропластов выражают в микромолях фосфора за 1 ч в расчете на 1 мг хлорофилла.

Определение хлорофилла в суспензии хлоропластов. Для расчета фосфорилирующей активности хлоропластов на 1 мг хлорофилла необходимо определить содержание хлорофилла в 1 мл суспензии. С этой целью к 1 мл суспензии хлоропластов добавляют 8,0 мл 100%-ного ацетона. Раствор фильтруют через стеклянный фильтр № 2 или 3. Затем объем фильтрата доводят 80%-ным ацетоном до 10 мл и измеряют оптическую плотность раствора на СФе при 652 нм (контроль — ацетон). Содержание хлорофилла в миллиграммах в 1 мл исходной суспензии можно рассчитать, умножая оптическую плотность (D_{652}) на коэффициент

$$K = \frac{10}{34,5 \cdot 1,0} = 0,290.$$

Схема расчетов приведена в табл. 9.

Оформление работы. Результаты обобщают в таблице. Подробно оформление задачи см. с. 13.

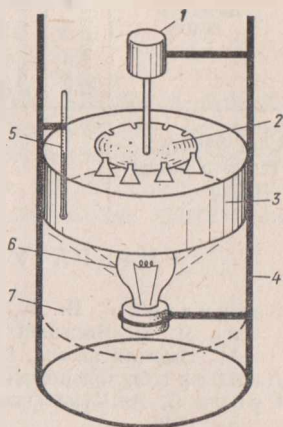


Рис. 10. Общий вид установки для определения фотосинтетического фосфорилирования: 1 — моторчик, 2 — вращающийся диск с колбочками, 3 — кристаллизатор с водой, 4 — штатив, 5 — термометр, 6 — лампа накаливания на 500 Вт, 7 — защитный кожух для лампы

Таблица 9

Результаты определения активности фотофосфорилирования

Варианты опыта	Оптическая плотность на ФЭКе	Концентрация фосфора, мкг/мл	Концентрация фосфора (контрольный опыт), мкг/мл	Содержание фосфора, мкг			Микромоль фосфора за 1 ч на 1 мг хлорофилла
				с учетом разведения	за 1 ч	за 1 ч на 1 мг хлорофилла	
Свет (опыт)							
Темнота (контроль)							

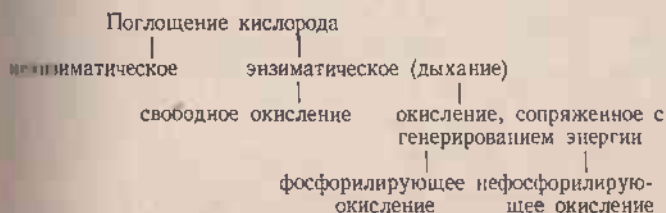
ЛИТЕРАТУРА

- Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина Л. М. Большой практикум по физиологии растений. М., Высшая школа, 1975.
- Либберт Э. Физиология растений. М., Мир, 1976.
- Рубин Б. А. Курс физиологии растений. М., Высшая школа, 1976.
- Рубин Б. А., Гавриленко В. Ф. Физиология и биохимия фотосинтеза. М., Изд-во Моск. ун-та, 1977.
- Тарчевский И. А. Основы фотосинтеза. М., Высшая школа, 1977.
- Сапожников Д. И. Об участии ксантофиллов в переносе кислорода при фотосинтезе. — В кн.: Биохимия и биофизика фотосинтеза. М., Наука, 1965.
- Семикватова О. А., Чулановская М. В. Манометрические методы изучения дыхания и фотосинтеза растений. М.—Л., Наука, 1965.

Раздел III

ДЫХАНИЕ

Ряд веществ, входящих в состав организма, может окисляться самопроизвольно, без участия ферментов, т. е. происходит неэнзиматическое окисление. Сущность дыхания составляет поглощение кислорода, катализируемое энзиматическими системами (см. схему).



Дыхание является одной из важных сторон общего метаболизма веществ и связанных с ним превращений энергии в живых организмах. Оно (дыхание) представляет собой совокупность многозвенных окислительно-восстановительных процессов, в ходе которых сложное органическое соединение преобразуется в более простые метаболиты. Электроны и водород дыхательного субстрата совершают многозвенный путь. Окислительные этапы этого пути катализируются окислительно-восстановительными ферментами (см. задачу на с. 91). Конечный акцептор электронов окисляемых продуктов (также и водорода) — кислород.

Свободным окислением называют окислительно-восстановительные процессы, идущие без генерирования энергии в АТФ (трансмембранный потенциал не возникает). В ходе процессов свободного окисления образуется ряд важных для клетки ме-

таболитов, у теплокровных организмов большое значение имеет выделение тепловой энергии, поддерживающей температуру тела. Роль свободного окисления для растений еще мало изучена.

Фосфорилирующее окисление. Реакции в цепи окислительно-восстановительных превращений субстрата могут быть сопряжены с процессом запасания выделяющейся при этом энергии в форме фосфатных связей АТФ. Сопряженность с фосфорилированием удалось показать лишь для небольшого количества окислительных реакций метаболизма. В ходе работы митохондриальной дыхательной цепи происходит образование трансмембранного потенциала, которое предшествует синтезу АТФ. Энергия трансмембранного потенциала может уже непосредственно быть использована, например на перенос ионов через мембраны против градиента в процессах поглощения и передвижения ионов минеральных веществ. Естественно, в данном случае, несмотря на то что процессы окисления сопряжены с накоплением энергии, синтеза АТФ происходить не будет. Такое окисление можно называть *нефосфорилирующим*.

Физиологическая значимость дыхания многообразна. В результате фотосинтеза энергия света, преобразованная в химическую форму достаточно стабильных соединений, откладывается в запас. Для того чтобы энергия этих соединений, обладающих высоким энергетическим потенциалом, могла использоваться, она должна быть вновь преобразована в лабильную форму, которая легко утилизируется. Такой универсальной формой является энергия связей АТФ. Аккумуляция энергии в доступной для использования форме (АТФ) — важнейшая функция биологического окисления, но это далеко не единственная функция дыхания.

В ходе окисления образуется восстановительный потенциал, например НАД·Н или НАДФ·Н, который используется в ряде восстановительных синтезов.

При окислительном преобразовании сложных и относительно инертных молекул появляются более простые и лабильные метаболиты, являющиеся

«инертным» материалом в разнообразных син-
тезах. Так, в процессе дыхания создаются как
энергетическая, так и материальная базы клетки,
необходимые для обеспечения жизненных функций
организма.

Одной из известных функций дыхания является
детоксикация некоторых ядов, попадающих в ор-
ганизм извне или образующихся в нем, происходя-
щая путем их окислительной деструкции. Дыхание
приводит в движение метаболизм не только опос-
редованно через образование богатых энергией
соединений, но и прямым путем, так как необра-
тимые окислительно-восстановительные процессы
приводят в движение цепь равновесных реакций,
получая им поступательное значение.

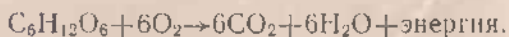
Изучая химизм процессов гликолиза, цикла
Кребса, гексозомонофосфатного пути и других ды-
хательных циклов, необходимо представить себе
физиологическое значение отдельных этапов окис-
ления, так же как и значение существующего
многообразия этих путей.

Задача I

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ КИСЛОРОДА РАЗНЫМИ РАСТЕНИЯМИ

Дыхание — важнейшее звено метаболизма, от ко-
торого зависят многие жизненные функции орга-
низма. Естественно, в тех клетках, органах и ор-
ганизмах, где наиболее активно протекают раз-
личные жизненные функции, велика потребность
в энергии, в простых метаболитах, используемых
в пластическом обмене и др., интенсивность дыха-
ния особенно велика. Так, в более молодых ор-
ганизмах дыхание активнее и продуктивнее, чем в
старых. Чем выше напряженность различных жиз-
ненных функций, тем как правило, выше и интен-
сивность дыхания.

Одним из внешних проявлений дыхания являет-
ся поглощение кислорода и выделение углекислого
газа. Суммарная формула дыхательного газообме-
на относительно проста:



Посмотрев на нее, легко себе представить, что измерение интенсивности, или скорости, дыхания можно проводить, измеряя скорость поглощения кислорода (или выделения CO_2). Осуществлять это можно различными методами: манометрическим, полярографическим, химическим методом Винклера (в водной среде) и другими. Мы остановимся на первых двух методах.

Цель работы: познакомиться с различием интенсивности процесса в органах и тканях разных объектов.

Объект исследования: проростки гороха и пшеницы (листья или корни).

Ход работы. Навеску растительного материала (400—500 мг) помещают в реакционные сосудики газометрического аппарата Варбурга. Мелкие листья можно использовать целиком, из крупных сверлом вырезают диски или режут их на части. При работе с корешками отрезки корней помещают в питательный раствор. Во внутренний стаканчик сосудика наливают 0,3 мл КОН и вставляют «КОН-бумажку». Сосудики шлифуют к соответствующим манометрам и помещают в термостатическую ванну. После термостатирования измеряют поглощение кислорода.

Оформление работы. Запись результатов работы на газометрическом аппарате Варбурга удобно вести так, как указано в табл. 11. В заключение следует выписать конечные результаты работы (сводка результатов) и дать вывод, сделанный на основании полученных результатов. При оформлении каждой задачи должны быть записаны результаты каждого этапа работы, затем конечная сводка результатов и выводы. Подробно оформление задачи см. с. 13.

Метод работы на газометрическом аппарате Варбурга

Метод основан на определении изменения газового давления, обусловленного выделением или поглощением какого-либо газа в системе. Опреде-

Опыт проводится в условиях постоянного объема и температуры. Сохранение постоянства объема возможно при проведении измерений газового давления в замкнутом пространстве, которое ограничено манометрическим сосудиком и частью манометра.

Постоянство объема системы достигается тем, что перед началом опыта и каждым отсчетом манометрической жидкости в соединенном с сосудиком колене манометра (правом) всегда приводится к нулевому положению, выбранному за ноль. Об изменении давления газа в системе судят по уровню манометрической жидкости в левом колене.

Количество поглощенного или выделенного газа (x) рассчитывается по формуле:

$$x = HK,$$

где H — отмечаемое по манометру изменение давления газа в мм манометрической жидкости (с поправкой на показание термобарометров); K — константа сосудика (коэффициент, позволяющий рассчитывать объем газа).

Константа сосудика K (мкл/мм) отражает количество поглощенного или выделенного газа в мкл, которое вызывает изменение газового давления в данном сосудике, равное 1 мм манометрической жидкости. Константу сосудика вычисляют по следующей формуле:

$$K = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_l \alpha}{P_0},$$

где V_g — объем газового пространства сосудика, включая и часть манометра до нулевой точки; V_l — объем жидкости в сосудике; T — температура опыта в градусах абсолютной шкалы; α — растворимость газа в 1 мл жидкости при парциальном давлении газа в 1 ат и температуре T ; P_0 — стандартное давление (760 мм рт. ст., или 1013 Па), выраженное в мм манометрической жидкости — 10 000;

$$P_0 = \frac{760 \cdot 13,6}{\text{удельная масса манометрической жидкости}} = \frac{760 \cdot 13,6}{1,033} = 10\,000.$$

Пример расчета К. Условия опыта: определяем объем кислорода. Навеска — 0,4 г, объем щелочи — 0,3 мл, объем сосуда 23,43 мл, температура опыта — 25°C ($T = 298$).

V_l — объем жидкости, внесенной в сосудик — 2 мл;

α — растворимость кислорода в воде при 25°C — 0,028;

V_g — рабочий объем сосуда $23,43 - (2 + 0,4 + 0,3) = 20,73$ мл.

Выражаем объем в микролитрах и подставляем значения в формулу константы сосуда:

$$K = \frac{20730 \cdot \frac{273}{298} + 2000 \cdot 0,028}{10\,000} = 1,955 \text{ мкл/мм.}$$

Формы и размеры сосудинок могут быть разными, чаще всего у них один боковой отросток (рис. 11, слева), который позволяет вводить во время опыта в реакционную смесь какой-либо реагент. В дно сосуда впаивают стаканчик, в который при исследовании поглощения кислорода наливают раствор щелочи, поглощающий выделяющийся CO_2 . В каждый стаканчик наливают по 0,3—0,5 мл 20%-ного раствора КОН. Чтобы увеличивать поверхность соприкосновения щелочи с воздухом, в стаканчик помещают кусочек фильтровальной бумаги, сложенный гармошкой. Размер «КОН-бумажки» (квадрат со стороной примерно 2 см) должен быть таким, чтобы она, вставленная в стаканчик, выступала из него на 3—5 мм. После увлажнения бумажки щелочь на дне стаканчика должна еще остаться.

Манометр имеет U-образную форму, обе его ветки внизу сходятся в один отросток, который вставляется в резиновый резервуар с манометрической жидкостью (рис. 11, справа). Специальным

ингтовым зажимом, позволяющим сжимать резиновый резервуар, можно ввести в манометр большее или меньшее количество жидкости. Обе ветви манометра имеют шкалу делений с отсчетом снизу вверх. Середина шкалы (деление 15 или 150) чаще всего принимается за нулевое. Левая ветвь манометра открыта, правая имеет изогнутое колено со шлифом, на который припаяны сосульки. Над боковым отверстием имеется кран, который во время опыта закрывают. В рабочем состоянии манометры укреплены на специальных стойках, имеющих крепления для установки манометров на термостатической ванне.

Измерение давления в замкнутом пространстве проводят при постоянной температуре, которую поддерживают с помощью термостатической ванны, заполненной водой. Во время опыта сосудики погружены в воду. На дне ванны имеются два нагревателя: один мощный, поднимающий температуру до близкой к опытной, другой нагреватель лишь поддерживает температуру постоянной. Второй нагреватель включен в сеть через пускорегулирующее устройство и контактный термометр, которые обеспечивают автоматическое включение и выключение нагревателя. В ванне есть чувствительный термометр и мешалка, обеспечивающая хорошее перемешивание воды и, следовательно, одинаковую температуру во всех частях

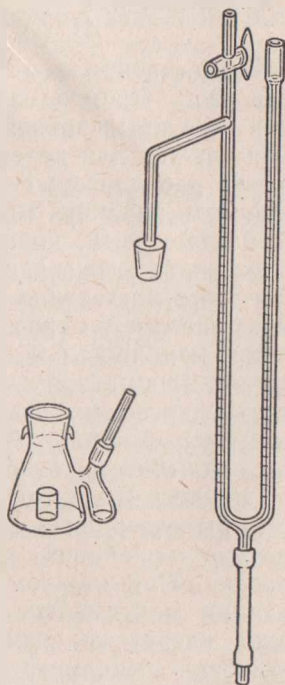


Рис. 11. Реакционный сосудик с манометром к газометрическому аппарату

ванны. Обычно стойка, на которой крепятся манометры, соединена с качающим или движущим механизмом, обеспечивающим перемешивание жидкости в сосудах.

Конструкция прибора для газовых микроанализов АГ-1 и работа с ним

Термостатическая ванна цилиндрическая, объемом 40 л. Прибор снабжен двумя двигателями, один — с крыльчаткой — расположен сверху ванны и служит для перемешивания воды (мешалка), другой расположен снизу и приводит в движение механизм качания манометров. Прибор оснащен 16 манометрами, конструкция прибора позволяет приближать к экспериментатору любой манометр. Для этого достаточно нажать на ручку фиксатора, находящегося у основания ванны, и повернуть цилиндр, приближая к себе нужный манометр. Качание манометров осуществляется с помощью электродвигателя, вращение которого передается на кулисный механизм, преобразующий вращательное движение в возвратно-поступательное колебание кулисы относительно диска. При этом все манометры совершают 100 колебаний в минуту. Амплитуда колебаний может меняться с помощью поводка. При нижнем положении поводка размах качания максимален. По мере продвижения поводка вверх колебания уменьшаются до полной остановки манометров. Указанная регулировка размаха выполняется продвижением планок штатива вдоль оси качания. Фиксация штатива обеспечивается пружинной-защелкой. Описанное устройство позволяет производить индивидуальное включение и выключение любого манометра со ступенчатой регулировкой на ходу. *При работе прибор должен быть обязательно заземлен. На пульте управления 4 тумблера-выключателя, 2 кнопки, 2 сигнальные лампы и 2 патрона для предохранителей.*

Порядок включения:

1. Включить вилку прибора в сеть.
2. Включить тумблер «мешалка» и сразу же нажать на кнопку КН-1 (на пульте слева).

3. Включить тумблеры «нагрев» и «подогрев».

4. При температуре на $0,5-1,0^{\circ}$ ниже требуемой выключить тумблер «нагрев», иначе вода перегреется и охладить ее будет трудно.

5. Отрегулировать контактный термометр, когда температура в термостате по показаниям контактного термометра приблизится к заданной. Для этого медленно вращать магнитную головку контактного термометра против часовой стрелки до тех пор, пока не погаснет контрольная лампочка «подогрев», и закрепить винтами магнитную головку контактного термометра.

6. Для включения качания манометров, включить тумблер «привод» и сразу же нажать кнопку КН-2 (на пульте справа).

При выключении прибора сначала выключают тумблеры, затем прибор отключают от сети.

Ход работы. Составляют схему опыта, согласно которой размещают сосудики и заполняют их. Определение проводят в двух- трехкратной повторности. Следовательно, в 2—3 сосудика помещают навески опытного варианта (с ингибитором), в такое же количество сосудиков помещают навески контрольного варианта и 2—3 сосудика используют в качестве термобарометров (о термобарометрах см. ниже). Навески помещают в основное пространство сосудика. Во внутренний стаканчик наливают 0,3—0,5 мл 20%-ного раствора КОН и вставляют «КОН-бумажку». При отсутствии центрального стаканчика КОН наливают в боковой отросток. Шлифы пробок сосудиков и манометров смазывают специальной смазкой, боковые отростки сосудика закрывают пробкой (шлифы хорошо притирают).

Сосудики надевают на заранее смазанные вакуумной смазкой шлифы манометров и также тщательно притирают (хорошо притертые шлифы прозрачны). На отростки сосудиков и манометров надевают резиновые кольца, поддерживающие сосудики. Манометры с сосудиками ставят в термостатическую ванну. *Краны манометров должны быть открыты!* Включают систему качания.

Измерение газового давления начинают только

через 20—30 мин. После уравнивания температуры сосуда и ванны необходимо остановить качание, установить уровень манометрической жидкости и в правом колене на деление 15 (150), отметить положение мениска в левом колене манометра. В некоторых манометрах (по разным причинам) деления в правом и левом колене не всегда совпадают. Затем закрывают краны манометров и снова включают качание. Показания снимают через 20 мин 2—3 раза. Для этого отключают качание, уровень жидкости в правом колене с помощью винта на резервуаре с манометрической жидкостью доводят до деления 15 (150) и отмечают положение мениска в левом колене. Учитывая исходное (нулевое) показание манометров, определяют величину смещения уровня манометрической жидкости за время опыта. Умножив полученное значение на константу сосуда, получают количество поглощенного кислорода в обычных единицах. Вводят соответствующую поправку на показания термобарометров. Ниже приведена схема записи результатов и последовательности расчетов (табл. 11).

После окончания опыта *открывают краны манометров* и только после этого снимают манометры с ванны и ставят их на специальные подставки. Если снять манометры не открыв кран, то из-за быстрого понижения температуры манометрическая жидкость может быть переброшена в сосуд и тогда снова придется промывать и перезаряжать манометр.

Сосудики снимают с манометров. Ваткой вытирают смазку со шлифов манометров, а затем и со шлифов сосудиков. Более тщательно можно убрать смазку ваткой, смоченной толуолом. Работу с толуолом проводят под тягой. Сосудики моют мыльным раствором или хромовой смесью. Хромовая смесь может испортить шлифы, поэтому заливать сосудики ею следует так, чтобы она не касалась шлифов. После хромовой смеси сосудики тщательно промывают водопроводной, а затем дистиллированной водой. Сушат сосудики в перевернутом виде.

Термобарометры. Параллельно с сосудиками, в которых проводят измерение, ставят также несколько сосудиков в качестве термобарометров, по которым контролируют возможные колебания температуры и внешнего давления. Эти сосудики осматривают пустыми (иногда в них наливают только жидкость). Поправку на термобарометры вводят следующим образом: если уровень жидкости в опытном колене термобарометра поднялся, то либо возросло внешнее давление, либо повысилась температура ванны. В этом случае для опытных сосудиков, в которых происходит падение давления газа, отмечаемое по манометру, уменьшение давления меньше действительного на величину изменения давления газа в термобарометре. Отсюда следует, что к наблюдавшемуся здесь падению давления необходимо прибавить показания термобарометров. Если же уровень манометрической жидкости в опытном сосудике повышается, то в этом случае из наблюдавшегося показания опытного сосудика следует вычесть показания термобарометра. Так, если показание термобарометра имеет знак, противоположный показанию опытному сосудика, то показание термобарометра следует прибавить к показанию опытного сосудика, если же имеет тот же знак, то показание термобарометра следует вычесть из показания опытного сосудика. Следовательно, берется арифметическая разность между показаниями опытного сосудика и термобарометра.

Приведем пример расчета (табл. 10).

Таблица 10

Показания		
Опыт	Термобарометр	С поправкой на термобарометр
-2,0	-0,2	-1,8
-2,0	+0,2	-2,2
+1,0	-0,2	+1,2
+1,0	+0,2	+0,8

Задача 2

МНОГООБРАЗИЕ ПУТЕЙ ОКИСЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОГО СУБСТРАТА

Пути окисления дыхательного субстрата многообразны. Окислению подвергаются соединения, относящиеся к разнообразным классам. Рассмотрим пути окисления глюкозы. Окислению может подвергаться нефосфорилированная глюкоза. Катализирует его фермент глюкооксидаса. Этот путь хорошо изучен у микроорганизмов. Окисление монофосфата глюкозы (глюкозо-6-фосфата) является первым этапом гексозомонофосфатного пути окисления (апотомический путь). Широко распространен путь окисления глюкозы, первым этапом которого является гликолиз. Для этого пути характерно двукратное фосфорилирование при подготовке субстрата к окислению. Иногда этот путь называют дихотомическим, так как в основе его лежит разрыв дважды фосфорилированной гексозы на две части.

Различные альтернативные пути окисления можно отметить для ряда метаболитов и на промежуточных этапах окисления. Физиологическое значение множества путей окисления огромно, так как каждая альтернативная цепь окислительных реакций приводит к образованию свойственных только этой цепи метаболитов. Многообразие метаболитов обеспечивает выполнение большого числа жизненно важных клеточных функций. Например, на промежуточных этапах гексозомонофосфатного пути окисления образуются пентозы, необходимые для синтеза нуклеиновых кислот, компонентов адениновой системы и других важных соединений; эритрозо-4-фосфат участвует в синтезе шикимовой кислоты — предшественника ароматических аминокислот, фенолов и ростовых веществ.

На полностью окисленную молекулу глюкозо-6-фосфата (6 циклов) восстанавливается 12 молекул НАДФ, выделяется 6 молекул CO_2 и 1 молекула фосфорной кислоты, при этом используется 7 молекул H_2O . Восстановленный НАДФ (НАДФ·Н)

в себе большой запас энергии, реализуемой различными способами, одним из которых является использование НАДФ·Н в восстановительных процессах, например в синтезе белков и жирных кислот. Не отрицается возможность переноса электронов НАДФ·Н по дыхательной цепи митохондрий.

В результате гликолитического превращения глюкозы синтезируется 2 моля АТФ, образуется пируват, который может участвовать в синтезе жиров и углеводов, а также такой центроболит, как пировиноградная кислота. Дальнейшее превращение последней весьма многообразно. При окислительном декарбоксилировании пирувата в митохондриях образуется ацетил-КоА, подвергающийся окислению в цикле Кребса. В ходе этого цикла мобилизуется большое количество электронов, транспортируемых по электронтранспортной цепи (ЭТЦ) дыхания. Так, на молекулу пирувата мобилизуется 10 электронов. Транспорт электронов по ЭТЦ дыхания сопряжен с синтезом АТФ (2—4 молекулы АТФ на пару электронов). Метаболиты цикла Кребса являются компонентами многих важных синтетических процессов в клетке, например гистокислоты, аминирываясь, дают аминокислоты, необходимые для синтеза белка. Ацетил-КоА нужен для синтеза жирных кислот. Органические кислоты используются в синтезе углеводов.

Соотношение путей окисления не постоянно в каждом организме, органе, ткани, клетке в зависимости от целого ряда факторов. В регуляции этого соотношения могут участвовать такие центроболиты, как НАД и НАДФ; НАД·Н и НАДФ·Н; АТФ и АДФ. В тканях корня моркови, например, по данным Риса и Биверса, почти половина глюкозы окисляется по гексозомонофосфатному пути и половина — через гликолиз и цикл Кребса. При старении тканей, а также неблагоприятных условиях это соотношение изменяется нередко в сторону повышения роли гексозомонофосфатного пути, что можно проследить, используя метод меченых атомов. Применяют глюкозу с меченым углеродом в положении C_1 или C_6 и затем исследуют соот-

ношение углеродов C_1 и C_6 в выделенном при дыхании углекислом газе. CO_2 , выделяемый при гексозомонофосфатном пути окисления, содержит углерод C_1 . Во втором случае содержание C_1 и C_6 примерно равно.

Косвенно о соотношении данных путей окисления можно судить по ингибирующему дыханию действию NaF . В конце гликолитического цикла гидратацию 2-фосфоглицерата с образованием фосфоэнолпирувата катализирует фермент энولاза. Для действия этого фермента необходимо присутствие двухвалентных катионов Mg^{2+} и Mn^{2+} , с которыми фермент образует комплекс, прежде чем присоединит к себе субстрат. Фермент ингибируется фторидом (NaF), особенно в присутствии фосфата. Ингибирующее действие оказывает Mg^{2+} -фторофосфатный комплекс. Подавление дыхания под действием NaF выражают в процентах от необходимого поглощения O_2 , что отражает долю участия окисления, идущего через гликолиз. Гексозомонофосфатное окисление фторид не ингибирует.

Полученные результаты дают лишь примерное представление соотношений путей окисления, так как ингибирование не бывает абсолютно полным и ингибитор не всегда действует строго специфично. Однако ингибиторный анализ широко используется для решения разнообразных задач при исследовании дыхательного метаболизма.

Цель работы: определение соотношения двух путей окисления и его изменений в связи с возрастом и факторами внешней среды.

Объект исследования. Эту работу можно проводить с любыми тканями растений, например с корнями проростков гороха разного возраста.

Ход работы. Навески ткани 400—500 мг инфильтрируют раствором 0,02—0,05 NaF , приготовленным на буферном растворе (можно фосфатном) с рН 4,5. Параллельно контрольные навески инфильтрируют буферным раствором с рН 4,5 (см. метод инфильтрации на с. 90). В некоторых случаях, например при работе с молодыми корешками, определяют поглощение O_2 непосредственно в растворе ингибитора, без его инфильтрации. Для этого

2004/05/20 10:00 AM

Дата	
Название и цель работы	
Объект исследования	
Температура	
Время начала опыта	
Навеска	

№ сосуда	Варианты и названия сосуда	Нулевое показание манометра	Отсчет		$H = \text{разница опыта}$ ного и нулевого показаний	$H - c$ поправкой на термобаромет- ры	$x = HK$	x — за время опыта	x — за время меж- ду отсчетами	Поглощение O_2 в мл за 1 ч на 1 г св. массы	Данные для расчета константы сосуда			Константа со-су- дника K
			Время от- счета	Показание манометра							α	V	$x V$	

навеску помещают в сосудик Варбурга и заливают опытные варианты раствором NaF (2 мл), контрольные — буферным раствором (2 мл). Определения поглощения O_2 проводят в 2—3-кратной повторности, как описано в предыдущей задаче.

Оформление работы дано в табл. 11. Рассчитывают среднее значение для каждого варианта. Дыхание в опытном варианте, т. е. при инфильтрации ингибитором, выражают в процентах от дыхания в контроле. Окончательный результат выражают в процентах подавления (табл. 12).

Таблица 12

Схема записи результатов опыта

Вариант	Поглощение кислорода, мкл/г сырой массы/ч	Результаты подавления, % от контрольного
Ингибитор Буферный раствор		

Метод вакуум-инфильтрации. Навески растительного материала (400—500 мг), состоящие из кубиков ткани со сторонами 4—5 мм, заворачивают в марлю, кладут в стаканчик, заливают раствором ингибитора. Сверху помещают грузик, например литую стеклянную пробку. Грузик необходим для того, чтобы навеска не всплывала на поверхность раствора при инфильтрации. Хорошо стаканчики прикрыть воронкой без длинного носика, что препятствует разбрызгиванию раствора. Для контроля также берут навески в другой стаканчик, заливают их соответствующим буферным раствором, и далее всю процедуру проводят аналогично.

Стаканчики помещают в вакуум-эксикатор, хорошо притирают крышку, подсоединяют эксикатор к электрическому вакуумному масляному насосу и откачивают воздух в течение 20—30 мин, пока из раствора не перестанут выделяться пузырьки. Далее закрывают кран эксикатора и только тогда отсоединяют эксикатор от насоса. Затем медленно

открывают кран, воздух входит в эксикатор. В результате увеличения давления воздуха над раствором, раствор входит в межклеточники ткани, способствуя проникновению ингибитора. Кусочки принимают, дают им слегка обсохнуть и помещают в трубки газометрического аппарата Варбурга.

Задача 3

ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ ДЫХАНИЯ

Дыхание — сложный многозвенный комплекс окислительно-восстановительных процессов, в результате которых водород окисляемого дыхательного субстрата восстанавливает кислород с образованием H_2O или H_2O_2 . Кислород при этом играет роль акцептора электронов. Вода образуется при переносе 4 электронов:



перекись водорода при переносе $2\bar{e}$:

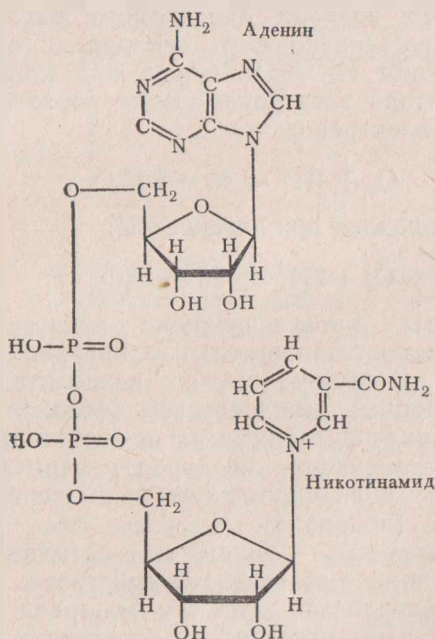


Ферменты, катализирующие непосредственно окислительно-восстановительные превращения дыхательного субстрата, можно разделить на следующие группы: дегидрогеназы (ферменты, активирующие водород), оксидазы и оксигеназы (ферменты, активирующие кислород), ферменты, выполняющие роль промежуточных переносчиков электронов (водорода).

Дегидрогеназы — ферменты, катализирующие дегидрирование дыхательного субстрата. Они активируют определенные атомы водорода субстрата, придавая им способность переходить с субстрата на соответствующий акцептор с более высоким редокс-потенциалом. Акцептором водорода и электронов может быть кислород или какое-то соединение, участвующее в цепи переноса электронов и водорода. Дегидрогеназы, у которых акцептором электронов является кислород, называют перокси-дегидрогеназами, нередко их по праву

называют оксидазами, так как они выполняют окислительные функции, передавая водород и электроны на кислород. Акцептором водорода и электронов от анаэробных дегидрогеназ служат промежуточные переносчики водорода.

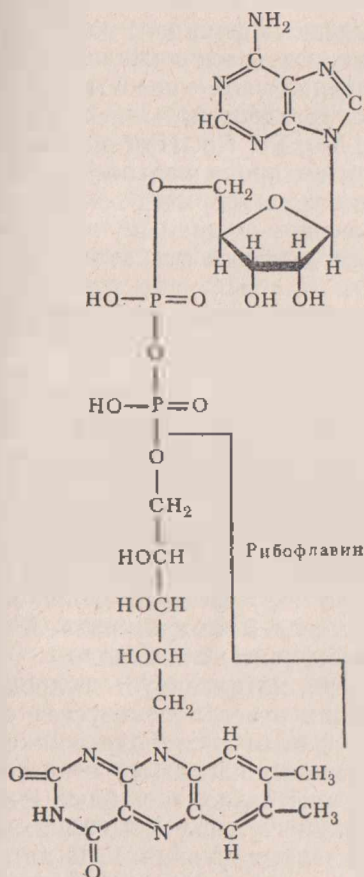
По своей химической природе дегидрогеназы бывают пиридиновыми и флавиновыми. В своем составе они имеют белковую часть — апофермент и кофермент. Коферментами пиридиновых дегидрогеназ может быть НАД (никотинамидадениндинуклеотид) или НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат).



Никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺)

К НАДзависимым дегидрогеназам относятся, например, лактатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, малатдегидрогеназа; к НАДФзависимым — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа и другие.

Флавиновые дегидрогеназы в составе коферментов содержат производные рибофлавина (витамина В₂). Два, обычно отмеченные звездочками, атома азота — ключевые атомы в каталитической функции. К ним присоединяются 2 Н⁺, в результате чего кофермент восстанавливается.



Флавинаденидинуклеотид (ФАД)

Коферментами флавиновых ферментов могут быть или ФМН (флавинмононуклеотид), или ФАД

(флавинаденидинуклеотид). Среди флавиновых дегидрогеназ встречаются анаэробные и аэробные ферменты. К первой группе относятся сукцинат-дегидрогеназа и ряд флавиновых ферментов промежуточного переноса e и водорода, например, редуктаза цитохрома c , хинонредуктаза и глутатионредуктаза. Многие флавиновые ферменты осуществляют оксидазные функции, например, глюкозооксидаза, оксидазы L -аминокислот, ксантиноксидаза, оксидаза гликолевой кислоты и липооксидаза. Флавиновые дегидрогеназы нередко содержат металлы — Co , Mo , Fe , Cu . При окислении кофермента два атома водорода переносятся от молекулы восстановленного кофермента на молекулу акцептора. По имеющимся данным, эти атомы водорода могут присоединяться или отрываться от него по одному.

Необходимо познакомиться с отдельными дегидрогеназами и краткой их характеристикой по учебнику.

Ферменты, катализирующие перенос электронов на кислород, называются *оксидазами*. Их называют также терминальными, поскольку катализируемый ими процесс представляет конечный этап окисления — передачу электронов и водорода на кислород с образованием H_2O или H_2O_2 .

Небольшая доля потребляемого при дыхании кислорода (менее 1%) внедряется непосредственно в молекулу окисляемого субстрата. Катализируют эти реакции ферменты *оксигеназы*.

Монооксигеназа катализирует гидроксилирование субстрата, для этого используется один атом кислорода, второй атом кислорода должен принять водород и электроны, например, от восстановленного НАД. Следовательно, подобные ферменты — ферменты смешанного типа (выполняющие оксигеназные и оксидазные функции). К ним же относятся o -дифенолоксидаза и пероксидаза, которые наряду с оксидазными выполняют и гидроксилирующие функции. Дноксигеназы катализируют внедрение в молекулу субстрата двух атомов O_2 с разрывом ароматического кольца.

Среди оксидаз большое место занимают ферменты, содержащие железо в составе протетической группы (Fe-протеиды) и медь (Cu-протеиды).

В группе *железопротеидов* основное место занимают гемопротеиды. Варбург показал, что железо в железопорфириновом комплексе (гемине) этих ферментов претерпевает обратимые окислительно-восстановительные превращения. Атом металла в гемопротеидах может присоединять или отдавать электрон, соединяться с молекулярным кислородом с дальнейшей диссоциацией этого комплекса, соединяться с H_2O_2 с последующей перестройкой образовавшегося соединения, приводящей к выделению кислорода и др. Поэтому некоторые гемопротеиды, например, гемоглобин, каталаза, пероксидаза, цитохромоксидаза и цитохромы в цепи переноса электронов, могут осуществлять различные функции.

В растительном мире терминальные ферменты, содержащие Cu, играют важную роль. К *медьпротеидам* относятся полифенолоксидазы, или фенолазы (или фенолоксидазы), и аскорбиноксидаза.

С характеристикой перечисленных выше ферментов также необходимо познакомиться подробнее по учебнику.

Хорошей иллюстрацией ферментов промежуточного переноса электронов (водорода) является митохондриальная дыхательная цепь (рис. 13). Так, дегидрогеназы мобилизуют электроны и водород субстрата. От восстановленного кофермента НАД электроны (и водород) переносятся на флавопротеиновый компонент цепи в комплексе, с которым функционирует негеминное железо. Далее в переносе электронов участвуют коэнзим Q, цепь цитохромов b , c , c_1 , a , a_3 . Конечные цитохромы $a + a_3$ выполняют оксидазные функции и называются цитохромоксидазой. Следует еще раз отметить, что перенос e происходит по электрохимическому градиенту от компонентов с более низким окислительно-восстановительным потенциалом к компонентам с более высоким потенциалом. На рис. 12

представлены альтернативные дыхательные цепи, в которых можно видеть и другие ферменты промежуточного переноса электронов и водорода.

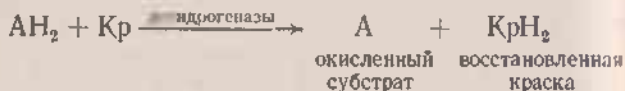
Цель задачи: проследить за активностью отдельных ферментов в разных растениях, органах растений и за изменением активности под влиянием различных факторов.

Опыт 1

Определение общей дегидрогеназной активности (по Тунбергу)

Активность дегидрогеназ можно определить с помощью красок, например метиленовой соли, тиопина, 2,6-дихлорфенолиндофенола, соли тетразолия, которые в окисленном и восстановленном состоянии разного цвета. Так, первые три краски бесцветны в восстановленном состоянии (лейкоформы) и окрашены в окисленном. Для тетразолиевых красок, наоборот, бесцветны окисленные формы и окрашены восстановленные.

Перечисленные краски могут акцептировать водород субстрата с помощью как анаэробных, так и аэробных дегидрогеназ. Восстановление краски происходит по следующей схеме:



Цель работы и объекты исследования: сравнить дегидрогеназную активность тронувшегося в рост зародыша и семядолей гороха, старых и молодых участков корня проростков гороха, дрожжей живых и убитых кипячением.

Ход работы. Из проросших семян гороха, предварительно очищенных от оболочек, извлекают зародыши (корешок не должен быть длиннее 0,5 см). Навески по 200—300 мг зародышей и семядолей

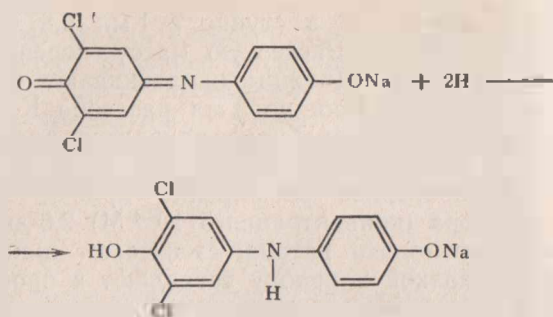
тщательно растирают в ступке с 1 мл 0,87%-ного раствора K_2HPO_4 . Растертую массу переносят в пробку Тунберга. Дважды ополаскивают ступку, каждый раз приливая по 1 мл раствора K_2HPO_4 . Таким образом, в пробирке находится растертая навеска в 3 мл раствора K_2HPO_4 .

В шарообразное расширение пробки вносят 1 мл раствора (концентрация $5 \cdot 10^{-4}$ М) 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, смазывают шлиф вакуумной смазкой и пробку вставляют в пробирку, прищипывая с небольшой амплитудой из стороны в сторону. Пришлифованные поверхности должны быть прозрачными. Из трубок откачивают воздух до остаточного давления 10—12 мм. На электрическом масляном насосе это достигается за 2—3 мин. Поворотом пробки трубку закрывают прежде, чем отсоединяют ее от насоса. Затем трубки Тунберга помещают в термостатическую ванну с температурой 37°. После 15-минутного термостатирования краску из головки пробки приливают к содержимому пробирки и засекают время. Трубка продолжает находиться в ванне. Время от момента введения краски до полного обесцвечивания ее в результате деятельности дегидрогеназ характеризует их активность. Результаты выражают в относительных единицах A и рассчитывают по формуле

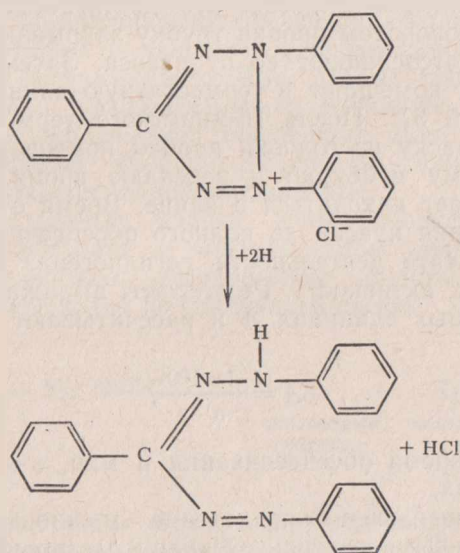
$$A = \frac{1 \cdot 100}{n \cdot g},$$

где n — время обесцвечивания в мин, g — навеска в граммах.

Сравнительное определение можно провести и так. 1—2 г растительной ткани растирают с 5 мл 0,87%-ного раствора K_2HPO_4 и переносят в пробирку. После термостатирования прибавляют 1—1,5 мл раствора краски и перемешивают. Чтобы прекратить доступ кислорода, поверхность жидкости в пробирке заливают вазелиновым или другим жидким маслом. Об активности дегидрогеназ судят по скорости обесцвечивания краски. Ниже показано восстановление 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия и тетразолия хлористого.



Восстановление
2,6-дихлорфенолидофенолята натрия



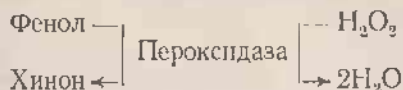
Восстановление тетразолия хлористого

Опыт 2

Сравнение активности пероксидазы корней и листьев разных растений

Пероксидаза — фермент, катализирующий окисление фенолов, ароматических аминов и других соединений с помощью перекиси водорода или ор-

радикальных перекисей. Простетическая группа фермента является железопорфирином.



Цель работы и объекты исследования: сравнить активность пероксидазы молодых и старых листьев или различных по возрасту участков корня.

Ход работы. Навески (100—200 мг) тканей корней и листьев растирают в ступке с небольшим количеством ацетатного буфера (рН 5,4). Растертую массу количественно переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки буферным раствором. Дают постоять 10—15 мин. Затем раствор центрифугируют при 3,5—4 тыс. об/мин, сливают надосадочную жидкость в колбочку и определяют активность фермента на ФЭКе. (Вместо центрифугирования можно фильтровать растворы через бумажный фильтр.) Об активности пероксидазы судят по времени образования синей окраски до заданной заранее оптической плотности.

Определение на ФЭКе. В две кюветы толщиной 2 см наливают 2 мл вытяжки, 2 мл 1/15 М фосфатного буферного раствора, рН 6,7, 2 мл раствора глицериновой смолы, 0,05%-ный раствор готовится на 90%-ном спирте (хранить не больше 3 дней). Ставят кюветы в кюветодержатели прибора, одну слева (контроль), другую справа (опыт) и с помощью оптических клиньев уравнивают оба световых потока, при этом стрелка на гальванометре встает в нулевое положение. Уравнивают световые потоки сначала при чувствительности 1, затем 2 (наиболее высокой), при которой и ведется определение. Правый отсчетный барабан ставят на деление 0,250 (шкала оптической плотности), в этом случае, естественно, стрелка гальванометра смещается в сторону. В левую контрольную кювету наливают 2 мл воды, в правую опытную доливают 2 мл 0,1—0,3%-ной H_2O_2 пипеткой с широким носиком. Сильная струя перемешивает содержимое кюветы. Одновременно с первой каплей включают секундомер. В опытной кювете раствор синест,

стрелка гальванометра передвигается к нулевому положению. Отмечают время от начала приливания H_2O_2 до достижения раствором заданной оптической плотности, когда стрелка гальванометра достигает нулевого положения. Проводят три определения и берут среднее значение. Активности фермента A рассчитывают по следующей формуле

$$A = \frac{E \cdot \alpha \cdot \beta \cdot \gamma}{t \cdot d}$$

где E — экстинкция = 0,250; d — толщина слоя жидкости в см (толщина кюветы); t — время в с; α , β , γ — факторы разведения; α — отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки в мл, к массе навески в г; β — степень дополнительного разведения вытяжки после центрифугирования (если это требовалось); γ — степень постоянного разведения вытяжки в кювете (в наших условиях 4). В конечном итоге результат отражает изменение оптической плотности раствора за единицу времени в расчете на 1 г сырой массы.

Для определения активности фермента данным методом в качестве субстрата пероксидазы можно использовать также гваякол и пирогаллол, определение проводят с синим светофильтром. Ход определения тот же, что и с гваяковой смолой. Концентрация гваякола — 0,183 г в 50 мл раствора, пирогаллола — 0,189 г в 50 мл раствора. Буферный раствор — фосфатный 1/15 М, рН 6,7. Перекись водорода — 0,1%-ный раствор. Навеска растительного материала — 50—100 мг в 50 мл раствора.

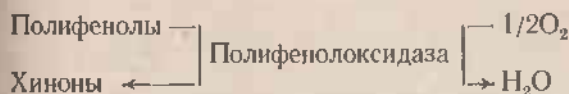
Опыт 3

Сравнение активности полифенолоксидазы в корнях и листьях растений

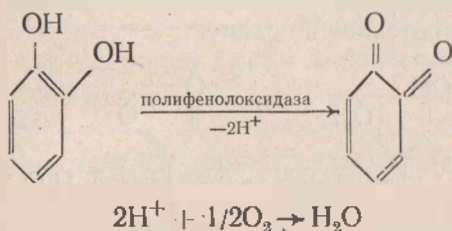
В активной группе полифенолоксидазы содержится медь. Полифенолоксидаза окисляет фенолы с образованием хинонов, в результате чего мобилизованный водород фенолов соединяется с кислородом с образованием H_2O . В живой клетке хиноны вновь восстанавливаются до фенолов хинон-

редуктазами. В конечном итоге система «полифенолы — хиноны» служит важным завершающим звеном дыхательного цикла переноса водорода до кислорода воздуха.

Названия полифенолоксидаз отражают окисляемые ими субстраты: лакказа, тирозиназа, монофенолоксидаза (МФО), орто-дифенолоксидаза (о-ДФО) и пара-дифенолоксидаза (п-ДФО).



Примером может служить реакция окисления пирокатехина



Цель работы: сравнить активность полифенолоксидазы листьев и корней, листьев разного возраста.

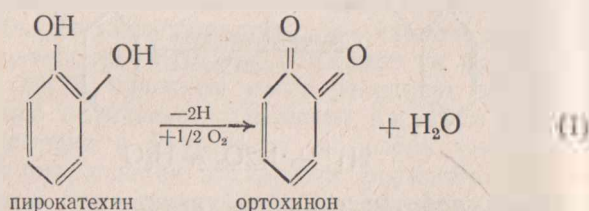
Объекты исследования: двухнедельные проростки гороха, люпина, фасоли, подсолнечника, а также клубни картофеля, у которого можно сравнить ткани кожуры и мякоти.

Ход определения. Навеску растительного материала (500—1000 мг) растирают в фосфатном буферном растворе pH 7—7,4, переносят в мерную колбу на 25 мл и смесь доливают буфером до метки. Техника определения на ФЭКе та же, что и определения активности пероксидазы. В две кюветы толщиной 2 см вносят 2 мл вытяжки, 2 мл воды или буферного раствора, 2 мл 0,01—0,02% -ного раствора парафенилендиамина¹ (готовят на

¹ Вместо парафенилендиамина можно брать диметилпарафенилендиамин, но его растворяют в воде. При использовании этого реактива ведут определения со спектофилтром № 6 (оранжевый).

0,01 н. щавелевой кислоте). Обе кюветы ставят в ФЭК. Уравниваются световые потоки. Стрелка гальванометра стоит на нуле.

Ставят отсчетный правый барабан на 0,250 (оптическая плотность). Определение проводят при желто-зеленом светофилтре № 5. В левую, контрольную, кювету вносят 2 мл воды, в правую, опытную, приливают 2 мл 1%-ного раствора пирокатехина (готовят перед определением). Отмечают по секундомеру время от начала приливания пирокатехина до момента, когда стрелка гальванометра достигнет нулевого положения (т. е. раствор достигнет заранее заданной оптической плотности — 0,250). Активность фермента рассчитывают по той же формуле, что и активность пероксидазы. Реакция протекает по схеме.



Задача 4

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПУТИ ТЕРМИНАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ

Терминальным (или конечным) окислением называют последнее звено, которым заканчиваются многочисленные альтернативные окислительные

нии (рис. 12). На этом этапе электроны и водород дыхательного субстрата акцептируются кислородом с образованием H_2O или H_2O_2 .

Реакции терминального окисления катализируются разнообразными по химической природе и механизму действия оксидазами. Такая многочисленная и гетерогенная в функциональном отношении система энзиматических механизмов растений

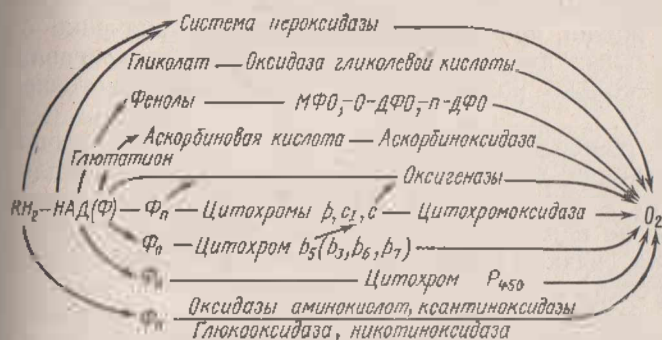


Рис. 12. Альтернативные пути терминального окисления: RH_2 — субстрат окисления, МФО — монофенолоксидаза, о-ДФО — орто-дифенолоксидаза, п-ДФО — пара-дифенолоксидаза, Фп — флавопротеид, НАД(Ф) — НАД и НАДФ

дает возможность мобилизовать электроны от многих субстратов.

Функциональная значимость отдельных окислительных дыхательных цепей изучена недостаточно. Однако не вызывает сомнений, что многообразие альтернативных окислительных цепей в различных клеточных органоидах имеет огромный биологический смысл. Дыхание растений происходит в большом диапазоне температур, концентрации кислорода, в отличие от теплокровных организмов с постоянной температурой тела и кровеносной системой, транспортирующей кислород в каждую клетку. Чувствительность отдельных ферментов к меняющимся условиям различна. Множественность ферментных систем позволяет компенсировать функции одной системы другими. Например, при

недостатке кислорода или низких температурах увеличивается доля участия пероксидазной системы, уменьшается полифенолоксидазная, а в случае недостатка железа падает активность железосодержащих ферментов и увеличивается медьсодержащих. Таких примеров много.

При функционировании отдельных дыхательных цепей образуются различные промежуточные продукты, которые могут быть использованы в многочисленных синтезах в клетке, что также важно в жизни организма. Рассматривая значение отдельных путей окисления, не трудно представить, насколько роль дыхания может быть многозначной.

Наиболее хорошо изучена фосфорилирующая функция биологического окисления, осуществляемая в митохондриях. Она является очень важной, но не единственной функцией дыхания. Эта функция связана с потоком электронов от окисляемого субстрата по электронтранспортной цепи дыхания, с которым сопряжен синтез АТФ. Терминальным ферментом ЭТЦ митохондрий является цитохромоксидаза.

На схеме представлены наиболее известные для растений альтернативные пути терминального окисления (рис. 13). Рассмотрим ферментные системы, ответственные за оксидазные (терминальные) этапы. Так, среди оксидаз мы уже отмечали цитохромоксидазу — терминальный компонент ЭТЦ митохондрий. Цитохромоксидаза представляет собой комплекс цитохромов a и a_3 с редокс-потенциалами $+0,29$ и $+0,55$ соответственно. Как все цитохромы, цитохромоксидаза является железопорфириновым соединением. Этот фермент содержит в своей молекуле и медь. Такие соединения, как цианиды, азиды, CO , образуют комплексы с тяжелыми металлами и тем самым блокируют железо активного центра этого фермента, что ингибирует его каталитическую активность. Близкую химическую природу имеет фермент пероксидаза, активный центр которой, как и у цитохромоксидазы содержит геминное железо и подавляется теми же ингибиторами. Медьсодержащие оксидазы —

ферменты, в активном центре которых содержится медь. К ним относятся аскорбинатоксидаза и фенолазы (МФО, *о*-ДФО, *п*-ДФО), которые также ингибируются азидами, цианидами и СО. Кроме того, медь активных центров этих ферментов может блокироваться ингибиторами, взаимодействующими только с медьпротеидами. Например, к ним относится диэтилдитиокарбамат натрия.

Поглощение кислорода, устойчивое к действию таких классических ингибиторов, как KCN, NaN_3 , СО, нередко называют остаточным, или резистентным, дыханием. Оно осуществляется флавопротеиновыми оксидазами, среди которых можно назвать глюкооксидазу, липооксидазу, ксантинооксидазу, оксидазы L-аминокислот, гликолатоксидазу и другие. Их активная группа представлена производными рибофлавина (витамина В₂) отсюда название — флавиновые ферменты, коферментами которых являются ФМН или ФАД. Флавопротеиновые ферменты ингибируются атебрином (хиннином) и акрихином.

Таким образом, использование различных ингибиторов при исследовании дыхательного поглощения кислорода позволяет вычленить ту или иную группу ферментов, что дает возможность представить их долю участия в дыхательном процессе. Сочетание подобного ингибиторного анализа дыхания с определением активности отдельных ферментов как терминального, так и промежуточных этапов окисления позволяет более полно судить о многообразии окислительных путей.

Цель работы: изучить многообразие окислительных путей.

Объекты исследования: разные растения, например, корешки гороха, пшеницы и других растений.

Ход работы. Берут 6 навесок по 400 мг растительной ткани. Половину навесок инфильтрируют 0,005 М раствором азидата натрия (NaN_3), приготовленным на буферном растворе, рН 4,5, вторую половину — инфильтрируют для контроля буферным раствором. Каждую навеску, подготовленную таким образом, помещают в реакционные сосудики

аппарата Варбурга и определяют поглощение кислорода. Метод инфильтрации и метод определения кислорода, поглощаемого растительной тканью, мы уже рассматривали в задачах 1 и 2. При работе с молодыми корешками можно обойтись без инфильтрации и определять поглощение кислорода растительной тканью, находящейся непосредственно в растворе ингибитора (2 мл) в реакционном сосудике.

Оформление работы. Конечные результаты должны отражать интенсивность поглощения кислорода обоими вариантами и долю подавляемого ингибитором поглощения кислорода, выраженную в %. Схему записей результатов можно взять из задачи № 1, 2 этого раздела.

Задача 5

ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕПЕНИ СОПРЯЖЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ ОКИСЛЕНИЯ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Функцией фосфорилирующего окисления является аккумуляция энергии окисления в форме фосфатных связей АТФ. Этот процесс называется окислительным фосфорилированием. Различают два типа окислительного фосфорилирования — субстратное фосфорилирование и фосфорилирование в цепи дыхательных ферментов (мембранное). Синтез АТФ в процессе окислительного фосфорилирования сосредоточен, главным образом, в специализированных органоидах клетки — митохондриях и сопряжен с последовательными окислительно-восстановительными превращениями в электронтранспортной цепи дыхания митохондрий. Ниже представлена ЭТЦ дыхания (рис. 13), компоненты которой располагаются в ней в соответствии с окислительно-восстановительными потенциалами каждой пары системы.

На схеме ЭТЦ пункты фосфорилирования в дыхательной цепи отмечены (см. схему). Так, при окислении α -кетоглутаровой кислоты в митохондриях происходит так называемое «субстратное фос-

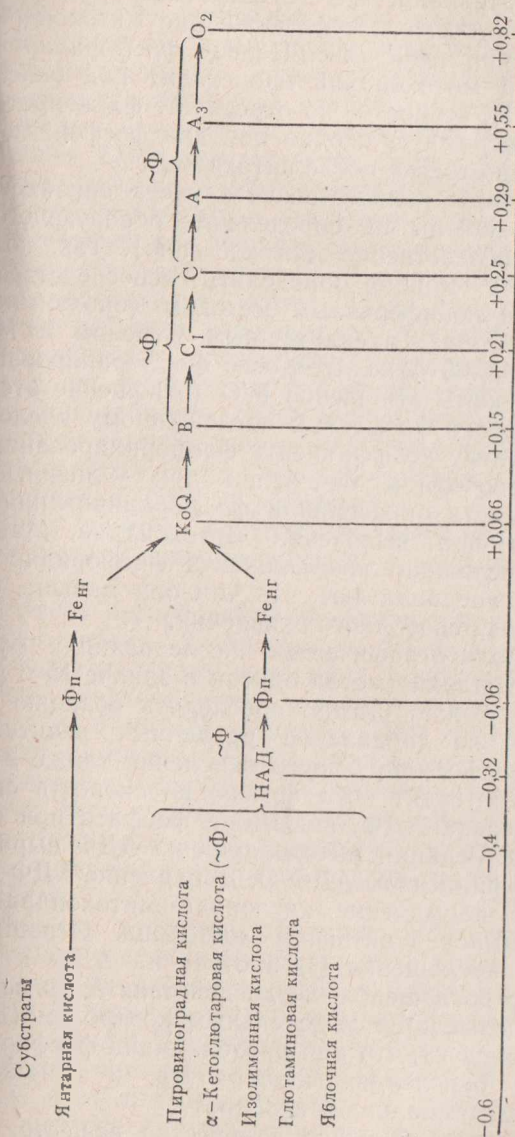


Рис. 13. Митохондриальная электронтранспортная цепь (ЭТЦ)

форилирование». Необходимо вспомнить из предыдущего материала, что «субстратное фосфорилирование» осуществляется также вне митохондрий, например при гликолизе. Первое фосфорилирование в ЭТЦ митохондрий происходит при окислении НАД·Н, второе — на отрезке от флавопротена до цитохрома c_1 и одно или два фосфорилирования — на отрезке после цитохрома c .

Все методы количественного учета накопления энергии основаны на определении образующегося АТФ (непосредственно или косвенно). Так, количество АТФ можно определить непосредственно люциферин-люциферазным методом (биолюминесцентный метод), предложенным Стрелом и Мак Элроем. Мерой окислительного фосфорилирования может служить отношение Р/О (отношение этерифицированного фосфата к поглощенному кислороду). По этому коэффициенту фосфорилирования и судят о свободном окислении при условии, что сопряженность окисления и фосфорилирования не нарушена при выделении митохондрий. Максимальная величина коэффициента фосфорилирования 3—4, предполагают, что чем она меньше, тем больше доля свободного окисления.

При полярографических исследованиях функций митохондрий (метод описан в задаче № 6 раздела III) можно быстро проследить реакцию митохондрий на добавление различных реактивов. О доле фосфорилирующего окисления также в какой-то мере судят по действию на скорость окисления добавок АДФ, акцептора фосфата при синтезе АТФ. Реакция митохондрий на АДФ выражается коэффициентом АДФ/О. Добавление АДФ стимулирует поглощение кислорода митохондриями, находящимися в активном состоянии. Отношение скорости поглощения O_2 в ответ на АДФ к скорости его поглощения, когда действие АДФ закончилось, называется дыхательным контролем (ДК). Отсюда следует, что при преобладании фосфорилирующего окисления величина ДК и отношения АДФ/О максимальна и наоборот.

Существует большое количество веществ, разобщающих окисление и фосфорилирование. Меха-

ними их действия могут быть различны. Одним из таких разобщителей является 2,4-динитрофенол (ДНФ). ДНФ — протонофор, так назвал В. П. Скурячев вещества, повышающие протонную проводимость мембран. На этом свойстве разобщителей (все они протонофоры) основан механизм разобщения дыхания и фосфорилирования. В результате действия ДНФ прекращается синтез АТФ, акцептор же фосфата АДФ накапливается. Увеличение проводимости мембран для протонов под действием разобщителей увеличивает скорость дыхания и выделение тепловой энергии. Естественно, чем активнее происходит синтез АТФ, тем в большей степени действие разобщителя приведет к увеличению скорости поглощения кислорода. Следовательно, по степени активации поглощения кислорода при действии ДНФ можно косвенно судить о степени сопряженности окисления и фосфорилирования. Разумеется, что на субстратное фосфорилирование ДНФ не действует.

Цель работы: получить представление о доле фосфорилирующего окисления у изучаемого объекта.

Объект исследования: корешки гороха.

Ход работы. Концентрация ДНФ для каждого рода растительного материала подбирается эмпирически заранее. Она колеблется в пределах от $5 \cdot 10^{-4}$ до $5 \cdot 10^{-6}$ М. Раствор ДНФ готовят на буферном растворе, рН 6,0. Разобщитель вводят в межклетники методом вакуум-инfiltrации (см. задачу № 2 раздела III). В некоторых случаях, например с молодыми корешками, можно работать со взвесью кусочков растительной ткани в растворе ДНФ.

Навеску растительной ткани (400—500 мг) помещают в сосудики Варбурга, в которые затем наливают 2 мл раствора ДНФ, в контрольные сосудики к навеске наливают соответствующий буферный раствор. Продолжение работы на приборе Варбурга описано на с. 82 в задаче № 1 раздела III. Результаты выражают в микролитрах O_2 , поглощенного 1 г свежей массы за 1 ч. Далее рассчитывают активацию поглощения кислорода ДНФ

в процентах от контроля. Делают вывод о степени сопряженности окисления и фосфорилирования.

Работу можно проводить на полярографической установке для определения концентрации кислорода так, как описано в задаче 6 раздела III. Суспензию выделенных в определенных условиях митохондрий, находящихся в буферном растворе в присутствии фосфата, помещают в ячейку и регистрируют уменьшение концентрации O_2 . Добавляют АДФ и определяют дыхательный контроль, который является мерой степени сопряжения дыхания и фосфорилирования (численно равен коэффициенту P/O). Увеличение скорости поглощения O_2 под действием ДНФ также можно наблюдать этим методом.

Задача 6

АДАПТИРОВАННОЕ К ТЕМНОТЕ И ПОСЛЕСВЕТОВОЕ ДЫХАНИЕ СИНЕ-ЗЕЛеной ВОДОРОСЛИ *ANABAENA VARIABILIS*

Исследуемая сине-зеленая водоросль *Anabaena variabilis* является облигатным фототрофом. Все жизненные процессы этой водоросли так или иначе связаны с использованием света. Светозависимые реакции происходят на мембранах сферопластов. Осуществление фотосинтетических реакций сопровождается выделением кислорода в среду. Однако в отсутствии света сине-зеленые водоросли поглощают кислород. Физиологическая сущность процессов, связанных с поглощением кислорода у сине-зеленых водорослей, изучена еще недостаточно. Процессы, связанные с поглощением кислорода, происходят на тех же мембранах, что и светозависимые процессы. Таких специализированных органелл, непосредственно выполняющих дыхательные функции, как митохондрии высших растений или животных, у них нет. Вероятно, процессы поглощения кислорода и светозависимые процессы у сине-зеленых водорослей взаимосвязаны более тесно, чем у высших растений.

Темновое или адаптированное к темноте поглощение кислорода у изучаемой водоросли происхо-

дит со сравнительно низкой скоростью. Освещение приводит к стимуляции поглощения кислорода в послесветовой период. В кинетике этого эндогенного процесса можно отметить две фазы. Первая фаза — более активное поглощение кислорода после освещения с быстрым спадом в первые минуты после освещения и вторая фаза — более медленное поглощение кислорода, скорость которого очень медленно уменьшается, но все же остается более высокой по сравнению со скоростью адаптированного к темноте поглощения кислорода. Экспериментально показано, что подобная стимуляция поглощения кислорода не зависит от изменения его концентрации во время опыта в результате фотосинтетических реакций.

Две кинетические фазы кривой, отражающей послесветовое поглощение кислорода, говорят о разнокачественности процессов, протекающих в разные периоды после освещения. Так, второй, более медленный, период поглощения кислорода имеет более самостоятельное независимое от света значение по сравнению с первым, коротким, послесветовым периодом. Возможно, что в первый период окисляются продукты, восстановленные во время фотосинтетических реакций (например, НАДФ-Н, пластохион). Эти соединения в отсутствие света окисляются с большей скоростью, чем субстраты при адаптированном к темноте поглощении кислорода (например, полисахариды).

Отсюда можно предположить, что послесветовое дыхание и дыхание, адаптированное к темноте, качественно различны. Роль темнового и послесветового дыхания, вероятно, также различна.

Выполнение этой работы проводится на полярографической установке. Метод полярографического анализа был предложен чешским ученым Гейровским в 1922 г. Суть электрохимических процессов, лежащих в основе полярографического метода, объясняется простым примером. Металлическая пластинка опущена в раствор соли того же металла. На границе металл — раствор образуется двойной электрический слой. Ионы металла под действием полярных молекул воды начинают пере-

ходить в раствор, а на поверхности металла остаются нескомпенсированными электроны. Возникает что-то вроде конденсатора, одна обкладка которого состоит из отрицательных, а другая — из положительных зарядов в растворе, удерживаемых взаимным электростатическим притяжением (рис. 14).

Так на границе металл — раствор создается электрическое поле. Разные металлы ведут себя по-разному в зависимости от их электрохимической подвижности. Это поле характеризуется равновесным электродным потенциалом металла и является мерой его электрохимической активности.

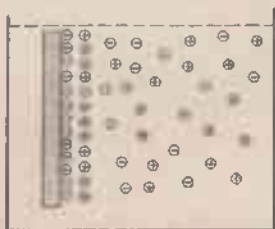
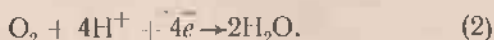
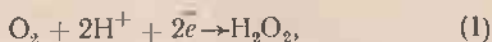


Рис. 14. Схема электрохимических процессов при помещении пластинки металла в раствор соли этого же металла

Если к металлу подвести отрицательный заряд, то положительные ионы начинают осаждаться на металле активнее, происходит катодное восстановление. Если подвести положительный заряд, то активнее будет происходить анодное растворение. При обычном электролизе оба эти процесса происходят одновременно.

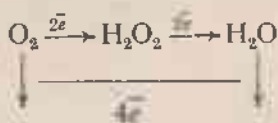
Полярографический анализ заключается в проведении реакции электролиза в электрохимической ячейке и основан на интерпретации зависимости между силой тока, характеризующей скорость электрохимического процесса, и потенциалом электрода или приложенным напряжением. Данный метод может быть использован при условии, что содержащееся в растворе вещество (или ион) способно электрохимически восстанавливаться или окисляться на поверхности электрода.

При электрохимическом (катодном) восстановлении кислорода принципиально возможно осуществление двух суммарных реакций, одна из которых протекает с присоединением двух, другая — четырех электронов:



При работе с твердыми катодами (в нашем случае катод платиновый) происходит реакция с присоединением 4 электронов (2).

Процесс синтеза воды может осуществляться двумя путями: либо непосредственно, либо через промежуточное образование перекиси водорода.



На платиновом электроде процесс может протекать по двум параллельным реакциям, ведущим к образованию одного и того же продукта. Электродные реакции протекают в несколько стадий. Можно выделить три последовательные стадии: подвод реагирующих частиц из объема раствора к поверхности электрода (I), собственно электрохимическое превращение вещества А в вещество В (II), отвод продуктов реакции в объеме раствора (III). Закономерности I и III стадии являются диффузионными и характеризуют транспорт электроактивных частиц в растворе. II стадия — кинетическая и связана с химическим превращением. Кинетика процесса в целом определяется наиболее медленной из последовательных стадий. В нашем случае исследуемый процесс имеет диффузионный характер.

Основная особенность электрохимических процессов — зависимость их скорости от потенциала электрода. Полярографический анализ базируется на измерении силы тока, проходящего через ячейку в зависимости от напряжения. Так, если в ячейку с раствором, содержащим исследуемое вещество (в нашем случае кислород), поместить электрод, на электрод подавать напряжение и измерять при этом силу тока, а результаты отразить графически, где на оси абсцисс отложить разность потен-

сигналов, создаваемую на электродах, на оси ординат — соответствующую силу тока, то получится кривая, называемая вольтамперной кривой (В-А-кривая), или полярографической волной (рис. 15).

По характеру кривой можно судить о качестве исследуемого вещества и его концентрации. Крутой взлет кривой свидетельствует о появлении в цепи тока в тот момент, когда кислород начинает восстанавливаться на катоде. До этого на участке α потенциал электрода был недостаточным для осуществления реакции с заметной скоростью. При смещении потенциала в отрицательную сторону начинается электролиз, скорость которого быстро растет по сравнению со скоростью смещения потенциала (участок β).

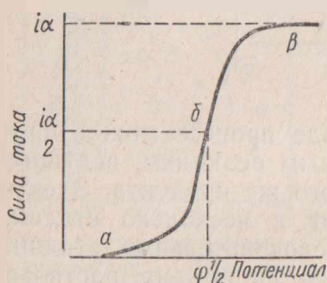


Рис. 15. Полярографическая волна

В этой области вследствие прохождения тока начинается восстановление кислорода, находящегося вблизи поверхности электрода. Поверхностная концентрация становится меньше объемной, в результате чего возникает диффузионный процесс, направленный в сторону выравнивания возникшей разности концентраций и обеспечивающий подачу исследуемого вещества к поверхности электрода.

Скорость диффузионного процесса, выраженная в электрических единицах, пропорциональна градиенту концентраций вблизи поверхности электрода:

$$i = nFD_A \frac{C_A^0 - C_A^s}{\delta_A}, \quad (\text{закон Фика})$$

где n — число электронов, принимающих участие в процессе, F — постоянная Фарадея, D_A — коэффициент диффузии частиц A , δ_A — толщина диффузионного слоя, в котором изменяется концент-

рация реагирующих веществ, C_A^s — концентрация вещества A у поверхности электрода, C_A^0 — концентрация веществ в глубине раствора.

По мере сдвига потенциала в отрицательную сторону поверхностная концентрация падает, что приводит к увеличению плотности тока. После достижения поверхностной концентрации $C_A^s = 0$ скорость процесса становится максимальной и перестает зависеть от потенциала электрода из-за невозможности дальнейшего увеличения градиента концентрации (участок ν).

Величина $i_d = nFD_A \frac{C_A^0}{\delta_A}$ называется плотностью предельного тока диффузии. Пропорциональная зависимость между предельным током диффузии по определяемому веществу и концентрацией последнего в объеме раствора и является основой количественного полярографического анализа. Потенциал рабочего электрода определяется термодинамической формулой Нернста:

$$\Phi = \Phi_0 + \frac{RT}{nF} \lg \frac{C_A}{C} = \Phi_0 + \frac{0,059}{n} \lg \frac{C_A^s}{C^s}.$$

где Φ_0 — стандартный потенциал системы, R — молярная газовая постоянная, T — абсолютная температура, C_A^s и C^s — поверхностные концентрации вещества A и B . Потенциал полуволны равен

$$\Phi_{1/2} = \Phi_0 + \frac{RT}{nF} \lg \frac{D_A \delta_A}{D_B \delta_B} = \text{const},$$

где D_A и D_B — коэффициенты диффузии веществ A и B .

При серийных анализах нет необходимости каждый раз снимать полные полярограммы. Достаточно ограничиться измерением силы тока при потенциале, примерно соответствующем середине площадки предельного тока диффузии (величина полуволны). В нашем случае эта величина равна 0,65—0,70 В. Однако экспериментатор должен быть уверен, что измеряемая величина действительно соответствует предельному диффузионному

току в растворе данного состава и на данном электроде. Для этого необходимо предварительно добиться получения воспроизводимых полярограмм. Такая полярограмма и представлена на рис. 15.

Анализ надо проводить в строго воспроизводимых условиях перемешивания раствора. Электроды из благородных металлов следует активизировать попеременной анодно-катодной поляризацией перед каждой серией измерения.

Описание полярографической установки для определения концентрации кислорода

Реакция происходит в ячейке, объем которой примерно 3 мл. Электрод вставляется в ячейку сверху, сбоку в ней есть отверстие, через которое во время опыта можно вводить тот или иной реагент. Блок ячейки имеет систему для протекания вокруг реакционной камеры воды с постоянной температурой. Вода подается из ультратермостата.

Катодом (—) является платиновая проволока, оканчивающаяся диском. Анодом (+) служит серебряная пластинка. Электрод имеет корпус из плексигласа с отверстием в нижней части, которое затянуто полиэтиленовой пленкой. Внутренняя часть электрода заполнена раствором боратного буфера в KCl следующего состава (г на 250 мл): 0,05 М Na_2CO_3 (б/в) — 1,33 или 0,05 М $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$ — 2,33; 0,05 М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ — 4,77; 0,1 М KCl (х.ч.) — 1,87.

Схема установки представлена на рис. 16.

В установке в качестве усилителя используется рН-метр ЛПУ-01. Регистрация результатов осуществляется самописцем (система КСП-4 или ЭПП-09). Источником постоянного тока для электрода является батарея (1,5 В). В схему включены два сопротивления: 15 кОм и 500 Ом (первый — ручка чувствительности, второй — установка напряжения). Ток, подаваемый на электрод, измеряется вторым рН-метром ЛПУ-01. Так, ЛПУ-01 слева показывает ток, идущий с ячейки на самописец, справа — подаваемое на электрод напряжение. Обозначения на плате управления установкой: Я — ячейка, В — ЛПУ, Б — батарея

(тумблер включения батарей, сверху). Ручка на-
пряжения сверху; ручка чувствительности, позво-
ляющая уменьшить или увеличить сигнал с ячей-
ки, снизу (при этом меняется величина отклоне-
ния стрелки самописца, т. е. ширина записи на

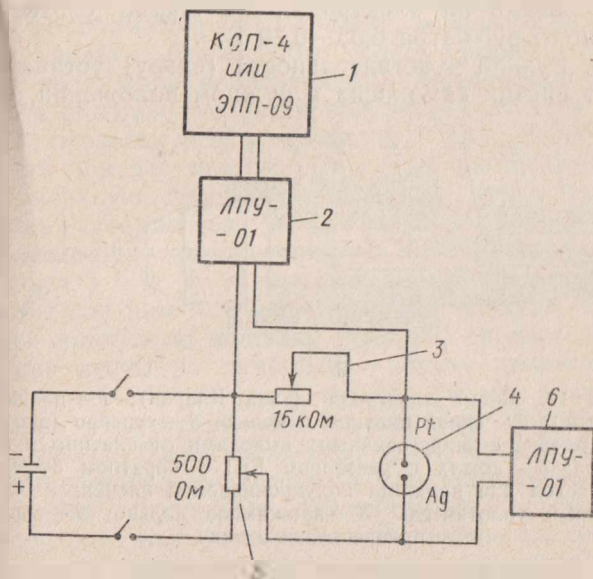


Рис. 16. Схема полярографической установки для определения кислорода: 1 — самописец; 2 — прибор, измеряющий концентрацию O_2 ; 3 — регулятор чувствительности; 4 — электрод; 5 — регулятор напряжения; 6 — прибор, контролирующий напряжение на электроде

ленте). В установку входит магнитная мешалка для перемешивания содержимого ячейки. Для освещения ячейки служит диапроектор. Между ним и ячейкой помещается плоский сосуд с водой для поглощения тепловых лучей.

Порядок включения установки:

1. Включаются в сеть вилки приборов: самописца, двух рН-метров, ультратермостата, магнитной мешалки и осветителя.

2. Включаются тумблеры на приборах: само-

писце, двух рН-метрах, ультратермостате (ручки прибора и тумблер мотора).

3. В ячейку наливают буферный раствор, вставляют электрод.

4. Ручкой напряжения (сверху) устанавливают напряжение на электродах на шкале соответствующего рН-метра 0,65—0,70 В.

5. Ручкой чувствительности (снизу) устанавливают писчик самописца в нужном положении, уси-

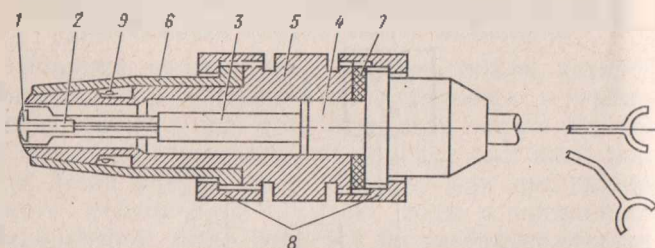


Рис. 17. Схема электрода (типа Кларка): 1 — платина (катод); 2 — сплав платины с медью; 3 — серебро (анод); 4 — пробка с запрессованными выводами от платины и серебра; 5 — кожух с раствором KCl в боратном буфере; 6 — чехол для прижима полупроницаемой пленки; 7 — резиновый уплотнитель; 8 — прижимное кольцо; 9 — место прикрепления пленки

ливая или ослабляя тем самым сигнал с электрода.

Чтобы вставить электроды в ячейку (схема электрода дана на рис. 17) без воздушных пузырей, приходится наливать раствор в ячейку доверху с образованием верхнего мениска. К поверхности жидкости осторожно подводят электрод и также осторожно вставляют его в ячейку до упора. Перед началом работы электрод необходимо стабилизировать в течение получаса. Содержимое ячейки перемешивается магнитной мешалкой, на корпусе которой закреплена ячейка.

Цель работы и объект исследования: изучить адаптированное к темноте и послесветовое дыхание синне-зеленой водоросли *Anabaena variabilis*.

Ход работы. Суспензию водорослей 8—10-дневной культуры центрифугируют в течение 10 мин при 4000 об/мин. Затем водоросли промывают бу-

ферным раствором, для чего осадок в центрифужных пробирках взбалтывают с буферным раствором рН 6,8 и снова центрифугируют. Осадок переносят в мерный цилиндр буферным раствором. Объем суспензии доводят до 25 мл.

Берут 2 мл суспензии и разводят в 3 раза, затем колориметрируют на ФЭКе, используя зеленый светофильтр. После этого объем суспензии доводят до нужной концентрации. Оптическая плотность опытной суспензии водорослей должна быть 1,00 (куветы ФЭКа толщиной 1 см). Опыт проводят при 30°, поэтому буферный раствор и приготовленную суспензию помещают перед определением в термостат.

Подготовленную суспензию помещают в ячейку (около 3 мл). В ячейку вставляют электрод так, чтобы под ним не было пузырьков воздуха. Включают магнитную мешалку (тумблер справа) и движение ленты на самописце. Лента движется со скоростью 240 мм/ч. В течение 20 мин проводят запись адаптированного к темноте поглощения кислорода. Затем включают свет. Продолжительность световой экспозиции 5 мин. Самописец регистрирует увеличение концентрации O_2 , которое происходит при фотосинтезе. В течение следующих 5 мин записывают послесветовое поглощение O_2 и снова включают свет на 5 мин. После второй световой экспозиции запись поглощения O_2 проводят более длительное время (не менее 30 мин).

Сравнивают скорость адаптированного к темноте поглощения кислорода со скоростью после первого и второго освещения. После второго освещения измеряют поглощение O_2 сразу после освещения, через 10 мин и через 20—30 мин. Скорость поглощения O_2 выражают в мкМ O_2 за 1 мин. Рассчитывают также скорость выделения O_2 при фотосинтезе.

Калибровка прибора (катода). Линеинность ответа полярографической установки на линеинное изменение концентрации O_2 в ячейке устанавливается с помощью суспензии дрожжей, так как они дышат с постоянной скоростью и поглощают весь кислород из опытной смеси.

1 г свежих дрожжей суспензируют в 12 мл водопроводной воды и центрифугируют при 1000 г в течение 5 мин. К осадку приливают 1 мл 1%-ной глюкозы, приготовленной на 0,15 М растворе KCl, затем 0,2 мл суспензии шприцем вводят в ячейку, в которую предварительно налит 1%-ный раствор глюкозы в 0,15 М KCl. Предварительно электрод стабилизирован с этим раствором (писчик самодисца поставлен на максимальное значение шкалы). Калибровку проводят при той же чувствительности прибора, что и эксперимент. Определение проводят при скорости движения ленты самодисца 240 мм/ч или 4 мм/мин.

Приведем пример расчета данных калибрования катода. В среде 250 мкМ O_2 . Дрожжи поглощают весь кислород. Амплитуда дыхания дрожжей — 93 деления на ленте, следовательно, цена одного деления $250 : 93 = 2,68$ мкМ O_2 . Калибрование время от времени повторяют.

ЛИТЕРАТУРА

- Гусев М. В., Гохлернер Г. Б. Свободный кислород и эволюция клетки. М., Изд-во Моск. ун-та, 1980, с. 35—54, 158—169.
- Гусев М. В., Никитина К. А., Корженевская Т. Г. Адаптированное к темноте поглощение кислорода облигатно фототрофными сине-зелеными водорослями. — Микробиология, 1971, т. 40, № 9, с. 956—961.
- Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина Л. М. Большой практикум по физиологии растений. М., Высшая школа, 1975, с. 51—63.
- Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., Мир, 1966, с. 280—298.
- Дженкинс М. Потенциометрические, электрометрические и полярографические методы. — В кн.: Методы практической биохимии / Под ред. Уильямс Б., Уилсон К. М., Мир, 1978, гл. 7, с. 214—244.
- Ленинджер А. Биохимия. М., Мир, 1976, гл. XIII—XVIII, с. 311—487.
- Либберт Э. Физиология растений. М., Мир, 1976.
- Методы современной биохимии. М., Наука, 1975, с. 52—57.
- Рубин Б. А. Курс физиологии растений. М., Высшая школа, 1976, с. 188—295.
- Рубин Б. А., Хандобина Л. М. Действие фтористого натрия на дыхание здоровой и зараженной фомозом моркови. — Докл. АН СССР, 1957, т. 116, № 2, с. 227—229.

- Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М., Наука, 1973, с. 12—25.
- Семихатова О. А., Чулановская М. В. Манометрические методы изучения дыхания и фотосинтеза растений. М.; Л., Наука, 1965.
- Семихатова О. А. Методы оценки энергетической эффективности дыхания растений. Л., Наука, 1967, с. 19—46.
- Уилсон К. Манометрические методы.— В кн.: Методы практической биохимии / Под ред. Уильямс Б., Уилсон К. М., Мир, 1978, гл. 8, с. 245—259.
- Умбрайт В. В., Буррис Р. Х., Штауффер Д. Ф. Манометрические методы изучения тканевого обмена. М., ИЛ, 1961.

Раздел IV

МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ (поглощение веществ)

Неорганические питательные вещества, необходимые для нормального развития растений, подразделяют на макро- и микроэлементы в зависимости от количественной потребности. К первым принадлежат С, О, Н, N, S, P, K, Ca, Mg, а также Na, Si, Cl. Содержание их в растении довольно велико — от 0,1 до нескольких процентов от сухой массы растений. При концентрации до 200—300 мг/л в наружном растворе они не оказывают вредного действия на растение. Микроэлементы — это В, Mn, Cu, Zn, Mo, Co, V и др. Их содержание в растении составляет сотые, тысячные и десятитысячные доли процента от сухой массы растения. Большинство элементов этой группы при концентрации выше 0,1—0,5 мг/л угнетают рост растения. Железо занимает промежуточное место между микро- и макроэлементами. Его оптимальная концентрация в наружном растворе — 5—10 мг/л.

Поглощение перечисленных элементов, за исключением С, Н и O_2 , у высших наземных растений происходит через корни из почвы или питательного раствора. Водные, а также низшие растения поглощают питательные вещества из окружающей среды всей своей поверхностью. В почвенном растворе ионы либо находятся в свободном состоянии, либо связаны с почвенными коллоидами. Поглощаются элементы минерального питания чаще всего в ионной форме.

В соответствии с современными представлениями процесс поглощения ионов растением можно разделить на две фазы: I — проникновение ионов в «свободное пространство» корня, II — передви-

жение их в протопласты клеток тканей корня. «Свободное пространство» включает клеточные стенки и межклеточное пространство паренхимы коры корня. Оно локализовано вне протопластов клеток и составляет 4—6% объема корня. Ионы могут поступать в «свободное пространство» и выделяться обратно путем свободной диффузии и ионного обмена.

«Свободное пространство» представляет собой систему каналов и пор, стенки которых имеют отрицательный заряд (например, за счет карбоксильных групп пектиновых веществ) и могут адсорбционно связывать катионы. Поэтому концентрация катионов и анионов в центре каналов и около их стенок различна. В центральной части пор концентрация катионов и анионов равна их концентрации в наружном растворе. Отсюда ионы могут быть выделены в воду путем диффузии. Около стенок пор концентрация катионов увеличивается, а анионов — уменьшается, и ионы могут быть выделены только в солевой раствор путем обмена. По «свободному пространству» корня ионы передвигаются пассивно апопластным путем (рис. 18), т. е. по взаимосвязанной системе всех клеточных стенок и межклетников. Такое передвижение ионов возможно только до эндодермы корня, так как субериновые участки клеток этой ткани (пояски Каспари) плотно соприкасаются с цитоплазматической мембраной и создают преграду апопластному транспорту. Поступление ионов в «свободное пространство» считается первым, подготовительным, этапом поглощения.

Второй этап поглощения — проникновение ионов в цитоплазму клеток корневых тканей. На этом этапе ионы должны пройти через полупроницаемые мембраны, и прежде всего плазмалемму. Транспорт ионов может происходить в соответствии с электрохимическим градиентом этого иона. В этом случае говорят о пассивном транспорте без затраты дополнительной энергии. При движении иона против градиента электрохимического потенциала осуществляется активный, потребляющий энергию и, следовательно, зависящий

от фотосинтеза и дыхания процесс. По современным представлениям он идет при участии веществ-переносчиков (рис. 19). Специфическим характером переносчиков объясняют избирательную способность растений при поглощении питательных элементов из среды.

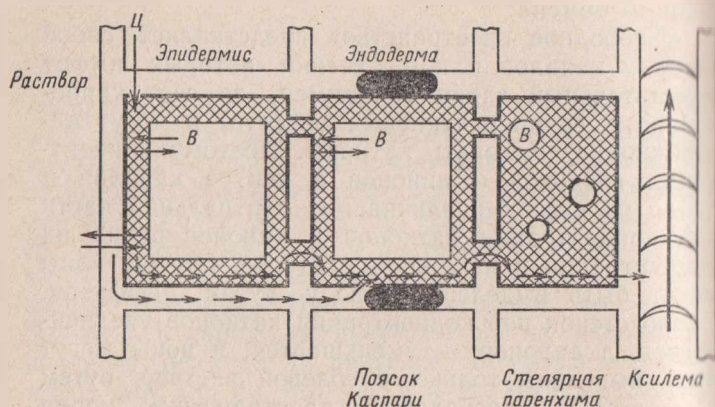


Рис. 18. Упрощенная схема строения корня (поперечный срез) (по Кларксону, 1978): Ц — цитоплазма, В — вакуоль

Корень — не только орган поглощения ионов, но и их ассимиляции, в нем происходит синтез органических соединений. Ряд элементов, в первую очередь N, P, S, попадая в ткани корня, претерпевают сложный цикл метаболитических превращений. Поэтому поглощение ионов из среды зависит и от процессов, определяющих проникновение их через мембранные структуры клетки, и от общего метаболизма в корне и растении в целом. Отсюда поглощение во многом зависит от условий выращивания растений — освещения, температуры, pH питательного раствора, снабжения корневой системы кислородом, от количества и соотношения ионов в питательном растворе.

Зависимость скорости поглощения от света. Свет влияет на поглощение косвенным путем. Образовавшиеся на свету в процессе фотосинтеза

углеводы являются субстратом дыхания-фосфорилирования, очень важного для поглощения и использования энергии, и как поставщика пластических веществ, необходимых для ассимиляции питательных веществ (например N). Кроме того, в процессе фотосинтеза образуются сильные восстановители, которые могут участвовать в восстановлении ионов NO_3^- и SO_4^{2-} . На поверхности

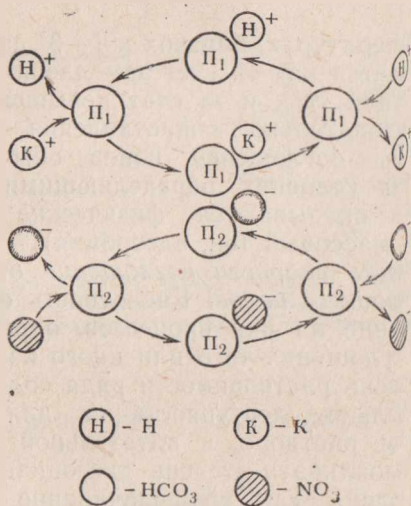


Рис. 19. Схема переноса ионов через мембрану при участии переносчиков

руется транспирационный ток в сосудах стебля, что также сказывается на поглощении питательных элементов.

Зависимость скорости поглощения от температуры. Характер зависимости поглощения от температуры при $0-2^\circ$, в интервале от 5 до 40° имеет существенные различия. С повышением температуры от 5 до 40° скорость поглощения увеличивается до максимальной. Дальнейшее повышение температуры приводит к снижению поглощения солей. Это связано, по-видимому, с кати-

ващей ферментных систем, принимающих участие в поглощении и ассимиляции ионов. Кроме того, при высоких температурах (супероптимальных) обнаруживается повышенная проницаемость мембран, что способствует усилению пассивной утечки солей. В интервале температур от 5 до 40° Q_{10} для поглощения ряда ионов (K, Ca, NH_4^+ и др.) равен 2—3. Это свидетельствует об определяющей роли метаболических реакций в развитии скорости процесса поглощения в данных температурных условиях.

При температурах, близких к 1—3°, поглощение солей снижается как за счет замедления биохимических реакций, так и за счет повышения вязкости, а следовательно, сопротивления клеточных мембран. Q_{10} поглощения ионов обычно равно 1—2. В этих условиях определяющими скорость поглощения оказываются физические процессы (диффузия, массовый ток, адсорбция).

Зависимость скорости поглощения от концентрации водородных ионов. Кислотность среды оказывает влияние на ряд процессов, определяющих величину поглощения того или иного иона. От нее зависит степень растворимости ряда солей в почве и, следовательно, доступность их для растения. В почвенном растворе, в питательной смеси pH может обуславливать степень диссоциации многоосновных солей. Так, подщелачивание среды от 5,5—6,0 и выше приводит к видоизменению преобладающей формы фосфатов от одновалентной (H_2PO_4^-) к двухвалентной (HPO_4^{2-}) и к трехвалентной (PO_4^{3-}). В значительном количестве поглощаются только одновалентные ионы.

Увеличение концентрации водородных ионов (снижение pH) приводит обычно к снижению поглощения катионов, в том числе NH_4^+ , вероятно, вследствие конкуренции между одинаково заряженными ионами за возможность вступать в реакцию с переносчиками. В зависимости от pH среды могут меняться и поглотительные свойства самого растения. Например, высокая кислотность среды увеличивает проницаемость мембранных структур клеток.

Зависимость скорости поглощения ионов от их концентрации в среде. Скорость поглощения растением ионов из раствора зависит от концентрации данного иона так же, как и скорость ферментативной реакции — от концентрации субстрата; зависимость подчиняется уравнению Михаэлиса —

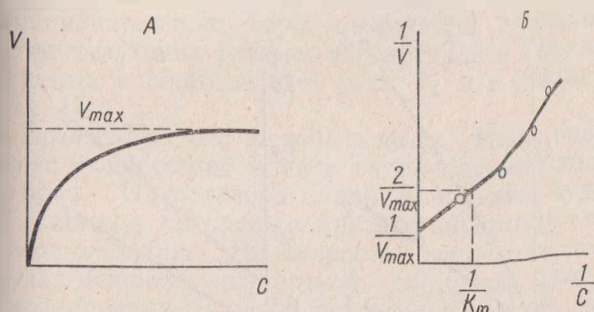


Рис. 20. Соотношение между внешней концентрацией растворенного вещества и скоростью его поглощения для случая активного переноса. Обозначения в тексте

Ментон и может быть представлена следующим образом:

$$v = \frac{V \cdot C}{K_m + C}.$$

где v — скорость поглощения иона при определенной его концентрации (C), V — максимально возможная скорость поглощения при концентрации иона, стремящейся к бесконечности, K_m — константа скорости процесса. Графическое выражение этой зависимости является гиперболой (рис. 20, А).

Если по осям отложить величины, обратные v и C , кривая принимает линейную форму (рис. 20, Б). При этом прямая линия имеет наклон, равный K_m/V , и отсекает от оси ординат отрезок, равный $1/V$. Такая зависимость скорости поглощения от концентрации иона в растворе под-

тверждает возможность поглощения при участии переносчика.

В присутствии другого иона с зарядом того же знака наблюдается снижение скорости поглощения данного иона, подобное снижению скорости ферментативной реакции, которое наблюдается, когда

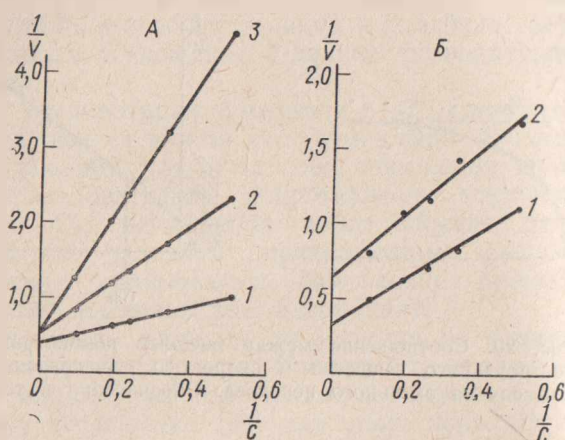


Рис. 21, А. Поглощение рубидия в отсутствие (1) и в присутствии (2 и 3) ионов калия; Б. Поглощение рубидия в отсутствие (1) и присутствии (2) лития (концентрация лития 25 ммоль/л) (по Сатклиффу, 1964); V — скорость поглощения рубидия, $\text{мкмоль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$; C — концентрация рубидия в растворе, мМ ; (А) 2 и 3 — концентрация калия соответственно 10 и 25 ммоль/л; V и C — так же, как на рис. 20

в среде присутствует ингибитор. Так же как и в случае ферментативной реакции, подавление поглощения иона при добавлении других ионов может носить конкурентный, неконкурентный и смешанный характер. На рис. 21, А представлен вариант конкурентного ингибирования поглощения ионов рубидия калием. Характерным является неизменное значение $1/V$. Рис. 21, Б иллюстрирует случай неконкурентного подавления поглощения рубидия ионами лития. В разных диапазонах кон-

концентраций соли зависимость скорости поглощения иона от наличия других ионов имеет некоторые принципиальные отличия. При низких концентрациях иона (до $5 \cdot 10^{-4}$ М соли) поглощение мало зависит от наличия в растворе другого иона. Когда концентрация иона выше (более 10^{-2} М соли), при поглощении проявляется большее сродство с другими ионами. На этом основании предполагают функционирование двух механизмов поглощения, соответствующих разным переносчиками и локализованных в плазмалемме (мех. I) и в тонопласте (мех. II).

Взаимодействие между ионами. Ионное окружение существенно влияет на поглощение какого-то иона. Из раствора одной соли катион будет поглощаться быстрее в присутствии легко поглощаемого аниона. На скорость поглощения иона влияет величина гидратной оболочки. Поэтому одновалентные ионы поглощаются быстрее, чем двух- или трехвалентные. Но, кроме этого, важную роль играют специфические особенности, свойственные самой поглощающей системе. Калий, например, из щелочных катионов поглощается лучше всего, хотя диаметр гидратированных ионов рубидия и цезия меньше. Если в среде присутствуют два или больше ионов, то могут наблюдаться явления либо антагонизма, либо синергизма ионов. Часто химически близкие ионы мешают один другому при поглощении, различные же ионы не конкурируют между собой. Такие анионы, как нитраты, сульфаты, фосфаты, оказывают стимулирующее действие на поглощение других ионов, по-видимому, вследствие активации процессов обмена.

Щелочные катионы в большей или меньшей степени конкурируют друг с другом при поглощении растением и с увеличением концентрации одного уменьшается поглощение другого катиона.

Взаимоотношения ионов при поглощении (конкурентные и неконкурентные) могут быть определены по анализу зависимости скорости поглощения от концентрации иона в среде. Для этого определяют зависимость скорости поглощения иона от его концентрации в присутствии какого-то

другого иона и без него. Строят графики зависимости обратных величин скорости поглощения (ось ординат) и концентрации (ось абсцисс) в разных условиях. При конкурентном поглощении прямые пересекутся в одной точке на оси ординат. При неконкурентном поглощении прямые будут почти параллельны. Рис. 22, А, Б иллюстрирует конкурентные отношения калия и рубидия и неконкурентные — рубидия и лития.

Задача 1

ПОГЛОЩЕНИЕ АММОНИЯ РАСТЕНИЯМИ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КИСЛОТНОСТИ СРЕДЫ

Поглощение растением аммония можно проследить по изменению концентрации аммонийного азота в питательном растворе после экспозиции в нем растений. Для этого готовят питательную смесь определенного состава, помещают туда на какое-то время растения. Определяют концентрацию аммонийного азота до и после экспозиции. Рассчитывают изменение концентрации за 1 ч на 1 г сухой массы корней.

Цель работы: изучить влияние концентрации водородных ионов на поглощение иона аммония.

Объект исследования: для работы используют растения кукурузы 10—20-дневного возраста, выращенные на видоизмененной смеси Кнопа, разбавленной в 10 раз, и выдержанные в течение суток до опыта на водопроводной воде. Во время выращивания поддерживают оптимальный для данного растения рН среды. Питательная смесь для выращивания растений имеет следующий состав (г/л): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ — 0,100; KH_2PO_4 — 0,025; MgSO_4 — 0,012; NH_4NO_3 — 0,010; KCl — 0,017.

Ход работы. Для изучения поглощения NH_4 готовят питательную смесь того же состава, что и для выращивания растений, но концентрацию увеличивают вдвое. Для приготовления этой питательной смеси используют готовые исходные ра-

створы нужных солей в более высокой концентрации:

соль	концентрация исходного раствора (готовый), г/л	добавить на 500 мл
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	100	1 мл
KH_2PO_4	25,0	"
MgSO_4	12,5	"
NH_4NO_3	10,0	"
KCl	17,0	"

В цилиндр наливают 200—300 мл водопроводной воды, прибавляют туда по 1 мл каждого исходного раствора соли. Объем раствора доводят водой до 500 мл, переливают в колбу и перемешивают. Готовую питательную смесь разливают поровну в два стакана. Пользуясь рН-метром измеряют рН смеси и доводят его в одном стакане до 7,0, а в другом — до 5,0. Для этого помещают стаканы на магнитную мешалку, опускают в раствор электроды рН-метра, включают прибор и, добавляя в стакан по каплям кислоту или щелочь, доводят рН до нужного значения.

В 4 стаканчика на 100 мл наливают по 50 мл приготовленной питательной смеси — в два из них раствор с рН 5, в два других — раствор с рН 7,0. Растения соединяют в пучки по 3—7 штук, промывают 2—3 раза в дистиллированной воде, остатки воды удаляют фильтровальной бумагой. Корни опускают в приготовленные растворы так, чтобы семена не попадали в раствор. Стаканчики с растениями взвешивают, затем ставят на свет и подсоединяют к системе продувания раствора воздухом. Экспозиция 30 или 60 мин. За это время растения могут поглощать и испарять воду. Объем питательного раствора меняется. По окончании экспозиции стаканчики с растениями взвешивают снова, массу доводят до первоначальной, добавляя в питательный раствор по каплям воду. Растения вынимают из раствора, корни отрезают, сушат фильтровальной бумагой и взвешивают.

В растворах, на которых проводилась экспозиция растений, и в исходном питательном растворе определяют концентрацию аммонийного азота методом Любошинского (подробно смотри ниже). Определение ведут в колбах на 25 мл. И вначале рассчитывают, сколько миллилитров питательной смеси надо взять на объем 25 мл, чтобы конечная концентрация аммонийного азота там была в пределах 0,02—0,4 мкг/мл. Исходя из того что концентрация NH_4NO_3 в питательной смеси — 20 мг/дл, рассчитывают соответствующую концентрацию N в аммонийной форме и разбавление, которое надо сделать, чтобы получить нужную концентрацию N. Далее рассчитанный объем питательной смеси из опытных стаканов переносят в мерные колбы на 25 мл, добавляют нужные реактивы в строго определенной (см. метод) последовательности, объем раствора доводят дистиллированной водой до метки и проводят колориметрирование. Пользуясь калибровочной кривой, находят концентрацию аммонийного азота в мерной колбе, учитывая разведение, рассчитывают концентрацию его в питательной смеси и количество в 50 мл ее. По разности между исходным и конечным содержанием аммонийного азота в 50 мл питательной смеси находят величину поглощения его растением. Рассчитывают поглощение на 1 г сырой массы корней в 1 ч. Сравнивают поглощение аммония при pH 5,0 и pH 7,0. Объясняют причину различий в поглощении аммония в разных условиях кислотности среды.

Оформление работы. Результаты работы записывают в виде таблицы (табл. 13).

Подробнее об оформлении задачи см. с. 13.

Определение аммония методом Любошинского и Зальта

При взаимодействии аммония, фенола и гипохлорита натрия получают производные индофенола, окрашенные в синий цвет. Добавление в качестве катализатора нитропрусида натрия обеспечивает быстрое протекание реакции при комнатной температуре. Интенсивность синего окра-

Таблица 13

Вариант	Масса корней	Оптическая плотность раствора, D	Концентрация аммонийного азота в мерной колбе	Разбавление	Концентрация аммонийного азота в питательной смеси	Содержание аммонийного азота в 50 мл питательной смеси	Поглощение аммонийного азота, мкг/р.ч

шивания пропорциональна количеству аммонийного азота в пределах 0,02—0,4 мкг/мл.

Ход работы. В мерные колбы на 25 мл приливают такое количество испытуемого раствора, чтобы примерная концентрация азота в нем была в пределах от 0,02—0,4 мкг/мл. В каждую колбу прибавляют в указанной последовательности следующие растворы: фенолят натрия C_6H_5ONa — 2,5 мл; фосфатную буферную смесь (рН 12) — 2,5 мл; 0,05%-ный раствор нитропруссиды натрия $Na_2[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$ — 0,5 мл (готовят перед употреблением из 1%-ного раствора); гипохлорит натрия (4% по хлору) — 0,5 мл.

Колбы взбалтывают, доливают водой до метки и ставят в темноту на 30 мин. За это время интенсивность окраски достигает максимума и сохраняется в течение нескольких часов. Через 30 мин измеряют оптическую плотность растворов на ФЭКе с красным светофильтром. По калибровочной кривой определяют, какой концентрации аммонийного азота соответствует данная оптическая плотность. Учитывая разведение, рассчитывают концентрацию N в исходном растворе.

рН-метр («рН-121»)

«рН-121» предназначен для измерения активности ионов водорода (рН). Он состоит из преобразователя (называемого в дальнейшем «прибор») и подставки. На лицевой панели прибора располагаются ручки переменных резисторов «Калиб-

ровка», «рН», «Крутизна», «НН» и ручка «Температура раствора», а также 4 кнопки выбора рода работы: «рН», «+mV», «-mV», «0, t», 5 кнопок выбора диапазона измерения: «НН», «—1÷14», «—1÷4», «4÷9», «9÷14». Резисторы «Калибровка», «Крутизна», «рН» служат для настройки прибора на данную электродную систему.

Подставка предназначена для установки сосудов с контролируемым раствором и для крепления электродов, автоматического термокомпенсатора (или термометра).

Порядок работы на рН-метре:

1. Нажать кнопку «0, t».
2. Нажать кнопку «—1÷14».
3. Включить прибор в сеть 220 В.
4. Прогреть прибор не менее 30 мин.
5. Нажать кнопку соответствующего диапазона измерения.

6. Нажать кнопку «рН».

7. Электроды перед погружением в контрольный раствор необходимо тщательно промывать дистиллированной водой, остатки воды с электродов удалить фильтровальной бумагой.

8. При замене контролируемого раствора и по окончании измерения должна быть нажата кнопка «0, t».

9. Отсчет по шкале показывающего прибора следует производить после того, как показания примут установившееся значение. Обычно время установления показаний не превышает 3 мин.

10. Отсчет показаний при измерении рН.

При работе на одном из узких диапазонов (—1÷4; 4÷9; 9÷14) отсчет показаний необходимо производить по верхней шкале показывающего прибора, руководствуясь оцифровкой, соответствующей выбранному диапазону измерения и определяемой положением кнопок выбора диапазона. При нажатии кнопки «—1÷14» отсчет показаний необходимо производить по нижней шкале прибора.

11. По окончании работы с прибором электроды для измерений должны оставаться погруженными в воду.

Задача 2

ПОГЛОЩЕНИЕ ИОНОВ КАЛИЯ КУЛЬТУРОЙ *ANABAENA VARIABILIS*

Интенсивность поглощения калия водорослями характеризуют по изменению концентрации иона в наружном растворе за определенное время. Для этого определяют концентрацию данного иона в исходном питательном растворе и после экспозиции в нем водорослей в течение заданного времени.

Для определения концентрации иона применяется потенциометрический метод с использованием ионселективного электрода. Измеряют электродвижущую силу (ЭДС) гальванического элемента, состоящего из двух электродов — вспомогательного, с постоянным потенциалом, и индикаторного (ионселективного), потенциал которого зависит от активности иона в растворе. ЭДС гальванического элемента определяется разностью потенциалов обоих электродов. Активность (a), или эффективная концентрация иона в растворе, связана с концентрацией (C) через коэффициент активности (f):

$$C = \frac{a}{f}.$$

В нашей установке в качестве электрода сравнения используется хлорсеребряный электрод (ЭВЛ-1МЗ). Он состоит из стеклянного корпуса с впаянной асбестовой нитью, соединенной через раствор AgCl с серебряной нитью. Корпус электрода заполнен насыщенным раствором KCl . Потенциал вспомогательного электрода известен и принимается неизменным при изменении состава изучаемого раствора. Индикаторный электрод чувствителен к иону калия. Электрод представляет собой трубку из определенного типа стекла, заканчивающуюся шариком, внутри которого и находится буферный раствор и помещен электрод с устойчивым потенциалом, играющий роль проводника тока. Качество стекла определяет избирательность электрода к иону калия. Электрод та-

кого типа способен изменять свой потенциал при увеличении или уменьшении активной концентрации данного иона в растворе.

Электродная система для определения калия с ионселективным и хлорсеребряным электродами составляет гальванический элемент и может быть представлена следующей схемой (для случая системы без переноса):

Стеклоанный ионселективный электрод			Вспомогательный хлорсеребряный электрод		
Внутренний вспомогательный электрод	Внутренний раствор постоянного состава	Стекло	Исследуемый раствор	KCl насыщенный раствор	AgCl Ag
φ_1	φ_2	φ_3	φ_4	φ_5	

Все разности потенциалов на границах фаз, кроме φ_3 , — постоянные величины. Величина φ_1 зависит от активной концентрации иона калия в среде. Зависимость ЭДС (E) элемента от активности (a) определенного иона в растворе выражается уравнением Нернста:

$$E = E_0 + \frac{2,3 RT}{F} \lg a,$$

где E_0 — стандартное значение ЭДС элемента ($E = E_0$ при $a = 1$); R — молярная газовая постоянная; T — температура (K°); F — постоянная Фарадея.

Из уравнения следует, что при изменении активной концентрации одновалентного иона в 10 раз ЭДС элемента должна меняться на 59,14 мВ. Реальная же величина изменения ЭДС в этом случае для каждого электрода отличается от теоретической. Поэтому все электроды калибруют, т. е. измеряют ЭДС в серии стандартных растворов с известной активностью, строят график зависимости ЭДС от $-\lg a$ и рассчитывают угловой коэффициент (S) калибровочной кривой по формуле

$$S = \frac{\Delta E}{\Delta \lg a}$$

Зная S данного электрода, можно, измерив ЭДС исследуемого раствора, определить активность иона в данном растворе. Использование для калибровки электродов растворов, по составу и ионной силе близких к исследуемому, дает возможность рассчитать концентрацию иона. Значение ЭДС в исследуемом и стандартном растворах можно записать следующим образом:

$$E_{\text{иссл}} = E_0 + S \lg a_{\text{иссл}}$$

$$E_{\text{станд}} = E_0 + S \lg a_{\text{станд}}$$

Разность потенциалов между исследуемым и стандартным растворами равна

$$\Delta E = E_{\text{иссл}} - E_{\text{станд}}$$

$$\Delta E/S = \lg \frac{a_{\text{иссл}}}{a_{\text{станд}}} = \lg \frac{C_{\text{иссл}} \cdot f_{\text{иссл}}}{C_{\text{станд}} \cdot f_{\text{станд}}}$$

Полагая, что $f_{\text{иссл}} = f_{\text{станд}}$ и потенцируя уравнение, получим:

$$C_{\text{иссл}} = C_{\text{станд}} \cdot 10^{\Delta E/S}$$

Если регистрация проводится в единицах pK ($pK = -\lg a_K$), расчет концентраций производится иначе.

По стандартным растворам калибруют шкалу самописца, рассчитывают, какому изменению pK соответствует 1 см показаний шкалы самописца. Находят pK исследуемого раствора, рассчитывают концентрацию калия.

Схема установки для определения поглощения калия культурой водорослей
(рис. 22)

Установка включает термостатированную камеру (1) для водорослей с магнитной мешалкой (2), термостат и-1 (3), рН-метр-262 (4) с электродами вспомогательным ЭВЛ-1 мз и измерительным ЭСЛ-51-07. рН-метр включен в работу в режиме чувствительности на 1 ед. рН. Для регистрации

изменения величины pK служит электронный самопишущий потенциометр КСП-4 (5) (шкала 10 мВ, время пробега шкалы — 1 с). Потенциометр подключен к рН-метру через компенсирующее

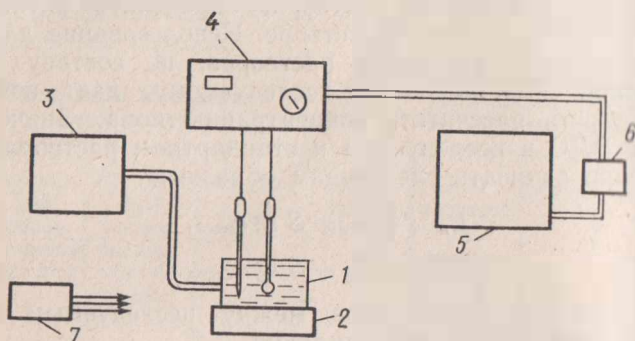


Рис. 22. Схема установки для определения поглощения калия водорослями. Обозначения в тексте

щее (ступенчато и плавно) устройство (рис. 23, 6, рис. 23).

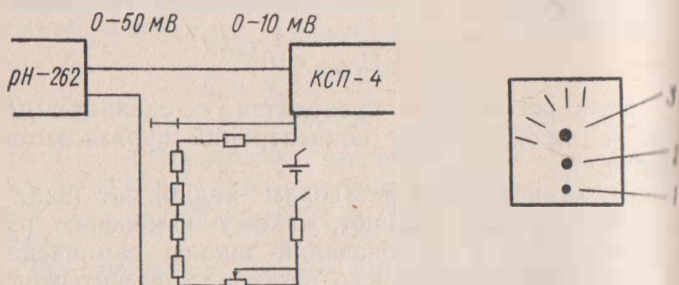


Рис. 23. Схема компенсирующего устройства: 1 — включение компенсации, 2 — плавная компенсация в пределах одной шкалы, 3 — переключение шкал

Компенсирующее устройство служит для того, чтобы перо самописца могло быть установлено в любой начальной точке его шкалы (независимо от показаний рН-метра).

В качестве источника света используется фотопроектор «Связь» (рис. 23, 7).

Цель работы: изучить динамику поглощения К водорослями.

Объект исследования: для задачи используют 4—10-дневную культуру водорослей *Anabaena variabilis*, выращенную на минеральной среде.

Ход работы. Изучение поглощения К культурой водорослей проводят на фосфатной буферной смеси ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{KOH}$) 0,008 М, рН 7,0. Для приготовления буферной смеси в колбу на 200 мл берут 5 мл 0,2 М KH_2PO_4 и 3 мл 0,2 М KOH . Раствор доводят дистиллированной водой до метки. Концентрация К равна $8 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Калибровка электрода. Для калибровки электрода регистрируют показания потенциометра, отмечая уровень записи на ленте самописца, при трех разбавлениях буферного раствора, используемого для поглощения К. С этой целью включают термостат и устанавливают температуру в камере 30°. В камеру приливают 8 мл буферного раствора, помещают в раствор электроды так, чтобы шарик измерительного электрода был полностью погружен в него и электроды не касались стенок камеры; включают рН-метр и самописец. Выбирают наиболее удобный режим работы самописца, используя компенсирующее устройство, которое включают тумблером (1). В зависимости от показания рН-метра переключателем (3) устанавливают перо самописца в начале шкалы. Если необходимо, используют плавную компенсацию (2). После того как устанавливается постоянный уровень записи на ленте самописца, добавляют к буферному раствору 1 мл дистиллированной воды. Регистрируют вновь установившееся показание потенциометра. Еще раз добавляют 1 мл H_2O и снова регистрируют показание самописца. Рассчитывают концентрацию К при первом (8 мл буферного раствора и 1 мл H_2O) и втором (8 мл буферного раствора и 2 мл H_2O) разбавлении. Находят pK для этих концентраций. Определяют, какому изменению pK соответствует 1 мм шкалы самописца.

Регистрация поглощения К водорослями. Определяют оптическую плотность культуры на ФЭКе

с зеленым светофильтром в вольтах на 0,1 см. Используя калибровочную кривую для данной водорослей, рассчитывают концентрацию клеток в культуре, используемой для задачи, и количество клеток в 100 мл этой культуры.

100 мл суспензии водорослей центрифугируют 5 мин при 2000 об/мин. Осадок водорослей ресуспензируют в дистиллированной воде, сливают в один центрифужный стакан и центрифугируют еще раз в том же режиме. К осадку водорослей приливают 3 мл дистиллированной воды. Рассчитывают концентрацию клеток в этой суспензии.

В камеру наливают 8 мл буферного раствора, на дно ее кладут магнитик и включают магнитную мешалку. В буферный раствор опускают электроды, включают освещение и самописец.

После того как устанавливается постоянный уровень записи, в камеру приливают 1 мл суспензии водорослей. Регистрируют изменение концентрации калия в среде в течение 20—30 мин. Зная, какой величине рК соответствует 1 см шкалы самописца (данные калировки), рассчитывают изменения рК (ΔpK) за каждую минуту после прибавления водорослей и рК в каждый данный момент. По величине рК находят концентрацию К.

Поглощение калия культурой водорослей характеризуют по уменьшению концентрации иона в растворе в ед. времени на 1 млрд клеток.

Оформление работы. Строят график зависимости поглощения от времени. Подробно о порядке записи задачи см. с. 13.

Варианты задач по поглощению К культурой водорослей

Поглощение калия культурами разного возраста. Для выполнения этой задачи берут 4—5-дневную и 20—25-дневную культуру. Измеряют оптическую плотность. Более густую суспензию водорослей разбавляют так, чтобы культуры разного возраста имели одинаковую оптическую плотность. Для работы используют по 100 мл каждой культуры. Далее проводят опыт так, как описано вы-

не, последовательно, т. е. сначала для одной культуры, затем для другой.

Влияние освещения на поглощение К водорослями. Проводят работу в соответствии с описанием в двух вариантах: I — в темноте, II — при освещении.

Поглощение К в зависимости от концентрации иона в среде. Для данной задачи используют молодую 4—7-дневную культуру *Anabaena variabilis*. Физную концентрацию К создают соответствующим разбавлением буферной смеси.

ЛИТЕРАТУРА

- Виславская С. С., Трубецкова О. М. Практикум по физиологии растений. М., Изд-во Моск. ун-та, 1964.
- Валхмистров Д. Б., Мазель Ю. Я. Поглощение и передвижение солей в клетках корня.— В кн.: Итоги науки и техники. Сер. физиол. раст., т. I. М., ВИНТИ, 1973, с. 164—212.
- Кларксон Д. Транспорт ионов и структура растительной клетки. М., Мир, 1978.
- Либберт Э. Физиология растений. М., Мир, 1976, с. 264—271; 280—287.
- Методы биохимического анализа растений / Под ред. В. В. Полевого, Г. Б. Максимова. Л., Изд-во Ленингр. ун-та, 1978.
- Нобель П. Физиология растительной клетки. М., Мир, 1973, с. 91—132.
- Рубин Б. А. Курс физиологии растений. М., Высшая школа, 1976, с. 324—392.
- Сатклифф Дж. Ф. Поглощение минеральных солей растением. М., Мир, 1964.

Раздел V

ВОДНЫЙ РЕЖИМ РАСТЕНИЙ

Вода составляет большую часть массы живых организмов: в среднем от 70 до 90% сырой массы. Биополимеры, в том числе и белки, могут нормально функционировать лишь в водной среде. Поэтому некоторые исследователи считают, что многие физиологические явления обусловлены особенностями не только растворенных веществ, но в равной мере и растворителя — воды.

Роль воды в жизни растений проявляется во всех аспектах их жизнедеятельности. Вода является и средой, и непосредственным участником большинства биохимических реакций. Вода служит компонентом структуры протоплазмы. Нормальная обеспеченность клеток водой необходима для поддержания их оболочек в упругом состоянии, в состоянии тургора. (Тургорным давлением называется гидростатическое давление содержимого клетки на оболочку). Благодаря тургорному состоянию поддерживается форма органов растений со слабо развитой механической тканью и осуществляется их расположение в пространстве. С изменениями тургорного давления связаны некоторые движения частей растений. Поскольку вода является хорошим растворителем, она способна переносить по растению как минеральные вещества, так и органические соединения. Питательные вещества поглощаются из почвы в растворенном виде. Испарение воды (транспирация) служит основным средством терморегуляции у растений, так как удельная теплота испарения воды очень велика.

Значение воды для живых организмов, в частности для растений, обусловлено ее уникальными свойствами, которые подробно рассматриваются

в специальной литературе. Укажем лишь на основные особенности воды, имеющие значение для биологических объектов (по Н. А. Гусеву, 1974). Теплоемкость, теплопроводность, теплота плавления и испарения, наиболее высокие среди жидкостей (кроме NH_3), уменьшают пределы температурных колебаний, способствуют сохранению постоянства температуры организма, дают термостатирующий эффект в точке замерзания.

Высокое поверхностное натяжение способствует передвижению воды по капиллярам. Способность растворять большинство веществ важна для почвенного питания растений и передвижения веществ по растению; немалую роль для дыхания и фотосинтеза играет растворимость в воде газов, в первую очередь O_2 и CO_2 .

Свойства воды определяются ее высокой структурированностью. Молекулы воды, представляющие собой диполи, соединяются между собой водородными связями, образуя ажурную квазикристаллическую структуру с тетраэдрической координацией соседних молекул. Это отличает воду от других жидкостей, в том числе и ассоциированных. Не все молекулы воды входят в состав кристаллической структуры, существуют и более подвижные молекулы, не имеющие Н-связей или имеющие малое количество их. Сложная структура воды обуславливает ее взаимодействие с электролитами и неэлектролитами, в том числе и биополимерами, делает воду структурным ингредиентом цитоплазмы, способствует переносу протонов и электронов, таким образом, во многом влияет на ход физиолого-биохимических процессов в растении.

Принято считать, что вода в клетке может быть в двух состояниях: свободная и связанная. Под связыванием подразумевается возникновение взаимодействий между молекулами воды и неводного компонента, ведущих к снижению подвижности молекул воды, отчего изменяются и другие ее свойства. Конечно, существование действительно свободной воды, сохранившей все свойства чистой воды, в биологической системе маловероятно, поэто-

му понятие категории свободной воды довольно условно. Правильнее деление воды на фракции, различающиеся по подвижности и другим свойствам. Эти фракции связаны с определенными прочностью с различными соединениями, поэтому для их извлечения требуются факторы разной водоотнимающей силы.

Методом ЯМР и другими современными методами установлено, что на более подвижную фракцию приходится 85—90% общего количества воды. Сюда относятся *резервная вода*, заполняющая вакуоли и компартменты клетки, служащие резервуарами растворов (эта вода обычно осмотически связана с сахарами, органическими кислотами и другими растворенными в ней веществами), и *интерстициальная вода*, выполняющая транспортные функции в межклетниках и сосудах растения. Эти формы воды условно относят к категории свободной воды; она активно участвует в физиологических процессах.

Фракция малоподвижной воды составляет 10—15% всей воды клетки. Это вода *конституционная* химически связанная, и *гидратационная*, образующая оболочки вокруг ионов и молекул растворенных в воде веществ. Коллоидносвязанная гидратационная вода, окружающая коллоидные частицы белков и других полимеров, необходима для нормального функционирования клетки и ее устойчивости при попадании в неблагоприятные условия. Гидратационная вода представляет особый интерес для биологов, поскольку она непосредственно взаимодействует с биополимерами и по принципу обратной связи влияет на их свойства.

Задача 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ВОДЫ В РАСТЕНИИ МЕТОДОМ ПОТЕРИ ВОДЫ

Для биохимической активности протоплазмы важно не просто количество воды, а ее термодинамическое состояние. Достаточно хорошо характери-

зует состояние воды в растении *активность воды*. Под активностью понимают способность вещества участвовать в химических реакциях, фазовых переходах, механических перемещениях и т. п., следовательно, активность показывает эффективную (реальную) концентрацию вещества, в частности воды, в системе. За меру активности воды принимается относительное давление водяного пара, с которым система в данных условиях находится в равновесии:

$$a = \frac{p}{P_0},$$

где a — активность, p — давление пара над системой, P_0 — давление насыщенного пара над чистой водой при тех же условиях.

Активность чистой воды $a_0 = 1$. В живой клетке подвижность воды снижена вследствие межмолекулярных взаимодействий, гидратации, иммобилизации воды в микрокапиллярах между макромолекулами и внутри них, а также осмотического давления. Поэтому затруднено перемещение молекул, замерзание и испарение; связанная вода менее интенсивно участвует в химических реакциях, т. е. обладает меньшей активностью. Положительно влияет на активность повышение температуры и давления. Активность воды, выраженную в процентах, называют гидратурой:

$$a \cdot 100 = \frac{p}{P_0} \cdot 100.$$

Гидратура, как и активность, уменьшается в растворе по мере повышения концентрации осмотически активных веществ, а в воздухе — с понижением степени насыщения водяными парами.

Определение относительной активности воды методом потери воды основано на том, что растение (или отдельные его части) будет терять воду, если его поместить в гипертонический раствор или в камеру с сухим воздухом. Определение потери воды в камере с сухим воздухом имеет то преимущество, что вода отнимается в парообразном состоянии, как и в естественных условиях.

Испарение воды идет усиленно, так как давление водяного пара в межклетниках листа или другого органа растения значительно выше, чем в сухом воздухе. Потеря воды вызывает снижение массы растения. Поступившая в воздух парообразная вода поглощается гигроскопическим веществом, например безводным CaCl_2 или H_2SO_4 .

Количество воды, потерянной растением, зависит от водоотнимающей силы гигроскопического вещества и от активности воды в растении, обусловленной подвижностью ее молекул. Если водоотнимающая сила постоянна (что достигается регулярной заменой гигроскопического вещества), то количество испарившейся воды будет зависеть лишь от активности воды в объекте. На количество воды, теряемой растением, влияют строение ткани листа и протоплазмы клеток, свойства плазмалеммы, интенсивность обмена веществ, которая во многом зависит от внешних условий. Поэтому температуру и освещенность, при которых проводится опыт, следует соблюдать по возможности постоянными.

Цель работы: знакомство с простым методом определения относительной активности воды в растении или его частях, например в листьях разного возраста с одного растения или листьях одного возраста с растений одного вида, находящихся в разных условиях водоснабжения или питания.

Объект исследования: листья примулы, герани, традесканции и других растений.

Ход работы. Срезать с растений по 3 листа для каждого варианта, пронумеровать их, взвесить на торсионных весах и поместить в эксикатор с хлористым кальцием. Одновременно с растительными пробами поставить в эксикатор кювету из фольги площадью 4 см^2 , в которую налить $0,8\text{—}1$ мл дистиллированной воды, чтобы дно кюветы было полностью покрыто водой. Перед помещением в эксикатор кювету с водой тоже нужно взвесить. Через 2 ч повторно взвесить листья и кюветы с водой. Рассчитать количество испарившейся воды.

Определить площадь использованных листьев весовым методом. Обвести контур листа на бума-

ге на копировальном столике, вырезать полученную фигуру, взвесить ее и найти площадь путем составления пропорции с массой квадрата известной площади (например 100 см²), вырезанного из той же бумаги.

Рассчитать скорость потери воды листом и испарения чистой воды с единицы площади. Относительную активность воды листа рассчитать по формуле:

$$a = \frac{v}{v_0},$$

где v — скорость потери воды растением, v_0 — скорость испарения чистой воды.

Оформление работы. Результаты представляют в виде таблицы (табл. 14). Подробно оформление задачи см. с. 13.

Таблица 14

Схема записи результатов

Вариант	Масса, мг		Потеря воды, мг	Площадь, см ²	Скорость потери воды, мг/см ² ·ч	Относительная активность воды
	исходная	через 2 ч				

Задача 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДНОГО ПОТЕНЦИАЛА РАСТЕНИЯ ПСИХОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Важным термодинамическим показателем состояния воды в системе, в частности в растении, органе растения или клетке, является *водный потенциал* (ψ). Водный потенциал показывает способность воды в системе совершать работу по сравнению с той, которую произвела бы при прочих равных условиях чистая вода, имеющая активность, равную 1. Иначе его можно определить как работу, необходимую для того, чтобы поднять потенциал

связанной воды до потенциала чистой, т. е. свободной воды.

Термин «водный потенциал» не вполне точен, правильнее, но менее употребителен термин «*разность потенциалов воды*», поскольку он определяется разностью между химическими потенциалами воды в системе и чистой воды:

$$\psi = \frac{\mu_w - \mu_w^0}{v_w},$$

где $\mu_w - \mu_w^0$ — разность химических потенциалов системы и чистой воды, v_w — парциальный мольный объем воды.

Водный потенциал имеет размерность энергия/объем, дж/м³, что эквивалентно н/м², т. е. давлению, поэтому его выражают в паскалях (Па) или других единицах давления (1 ат = 101,325 кПа). Химический потенциал воды связан с активностью: $\mu = RT \ln a$. Активность воды в растворе всегда меньше единицы, поэтому $\ln a_w < 0$. Следовательно, потенциал воды в растении, почве и атмосфере меньше 0. Потенциал чистой воды или системы, находящейся в равновесии с чистой водой, равен 0. Положителен потенциал воды, подвергнутой действию давления, по сравнению с потенциалом воды при стандартных условиях. Поэтому водный потенциал может быть положителен при гуттации или плаче растений (см. ниже).

Различие значений водного потенциала в разных точках (ψ_1 и ψ_2) означает, что между этими точками вода не находится в состоянии равновесия и будет стремиться в точку с более низким значением ψ . Суммарный водный потенциал почвы или органа растения определяется уравнением:

$$\psi_s = \psi_m + \psi_p + \psi_s$$

где ψ_m — матричный потенциал, обусловленный микроструктурой; ψ_p — осмотический потенциал раствора; ψ_s — потенциал давления (тургорный потенциал). Суммарный водный потенциал является наиболее удобным показателем для экологических исследований, где необходима характеристи-

ка состояния воды во всех частях системы почва — растение — атмосфера.

Чем ниже водный потенциал системы, тем с большей силой она поглощает воду. Поэтому водный потенциал, взятый с отрицательным знаком, обозначают термином «сосущая сила» (S). В настоящее время этот термин употребляется все реже, так как он мало соответствует показателю, имеющему размерность давления. Различие сосущей силы в двух точках также указывает на возможность передвижения воды между ними; в этом случае вода стремится в точку с большим значением сосущей силы.

Предлагаемый метод основан на измерении разности температур сухого и увлажненного температурного датчика в среде с определенной упругостью пара (относительной влажностью). Чем меньше упругость пара, тем выше скорость испарения воды с поверхности датчика, т. е. значительнее его охлаждение. Если поместить испытуемый образец (например часть растения) в закрытую камеру, то через определенный интервал времени в камере устанавливается равновесная упругость водяного пара, зависящая от активности воды и водного потенциала растительной ткани. Упругость пара бывает в этом случае ниже упругости насыщенного пара:

$$\psi = \frac{RT}{V} \ln \frac{p}{p_0},$$

где ψ — давление влаги в системе (водный потенциал); V — мольный объем жидкости (воды) в системе; p — упругость водяного пара, находящегося в равновесии с образцом; p_0 — упругость насыщенного водяного пара.

Для биологов и почвоведов представляет интерес интервал давлений от 0 до -5000 кПа, охватывающий область доступной для растений влаги. В этом диапазоне относительная упругость пара изменяется от 100 до 96%. Зависимость между давлением влаги и дефицитом относительной упругости пара $\left(1 - \frac{p}{p_0}\right)$ в интервале $p = 90-100\%$

близка к прямолинейной, поэтому и охлаждение увлажненного датчика будет пропорционально потенциалу исследуемого образца.

В качестве температурного датчика можно использовать терморезистор, сопротивление которого

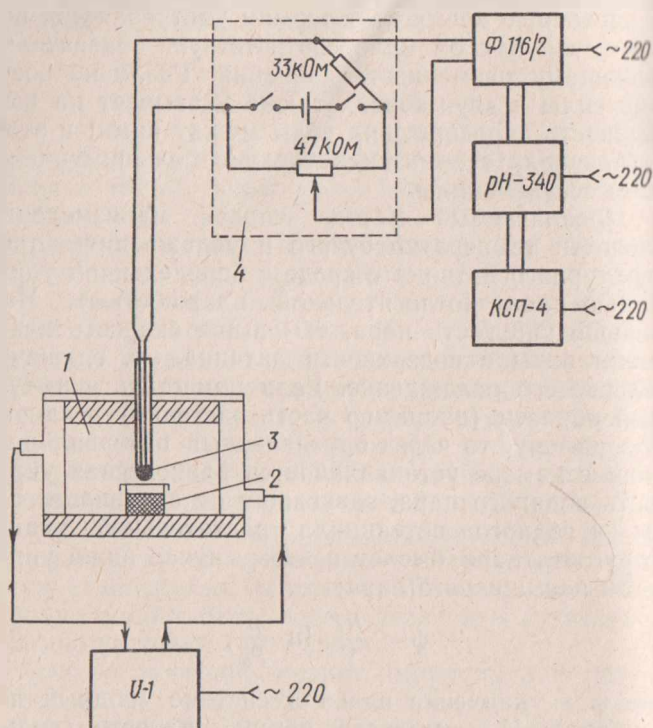


Рис. 24. Блок-схема установки для определения водного потенциала растений психрометрическим методом. Обозначения в тексте

и, следовательно, сила тока в цепи изменяется при изменении температуры. В интересующем нас интервале давлений изменение силы тока практически пропорционально величине водного потенциала. Схема установки для определения водного потенциала приведена на рис. 24.

В камере (1) поддерживается постоянная тем-

пература с помощью ультратермостата U1 или какого-то другого. В крышку камеры вставлен терморезистор МТ-6 (3), закрепленный на стержне таким образом, что он может перемещаться вверх и вниз и погружаться в капсулу с водой (2). Капсула до момента определения герметически закрыта фольгой или калькой, чтобы исключить испарение. Выдвижная решетка отделяет в камере отсек для помещения исследуемого материала. Терморезистор является плечом моста сопротивления (4), в который входит также балансирующее сопротивление, позволяющее плавно изменять силу тока. В диагональ моста включен измерительный прибор — фотокомпенсационный милливольт-микроамперметр Ф 116/2. Он предназначен: для балансировки моста; для измерения тока разбаланса моста, вызванного изменением величины сопротивления термистора вследствие его охлаждения при испарении воды с его поверхности; для выдачи сигнала на потенциометр рН=340, служащий усилителем, с последующей регистрацией сигнала на электронном самопишущем потенциометре КСП-4.

Приборы отрегулированы таким образом, что максимальное изменение силы тока соответствует охлаждению терморезистора на 2°. Это было установлено погружением датчика в воду с одновременным измерением температуры воды точным термометром.

Цель работы: знакомство с психрометрическим методом определения водного потенциала растения и сравнение водных потенциалов листьев растений, находящихся в разных условиях водоснабжения, разных органов одного растения и др.

Объект исследования: листья и другие органы различных растений.

Ход работы. Включают ультратермостат. Наливают в капсулу дистиллированной воды приблизительно до 3/4 ее высоты, закрывают ее фольгой, закручивают крышку и вставляют капсулу в камеру. Вдвигают в пазы камеры решетку и заполняют отсек исследуемым материалом. Закрывают камеру крышкой.

Включают приборы. Наступление стабильности температуры в камере определяется по постоянству величины тока разбаланса на шкале Ф 116/2 и по отсутствию отклонений пера самописца от вертикальной прямой линии. Температура стабилизируется уже через 10—15 мин, но измерение следует начинать не ранее, чем через 20—25 мин, т. е. после установления равновесной упругости водяного пара в камере.

Приблизительно через 10 мин включают тумблер самописца «запись» для проверки стабильности температуры. Регулировка исходной, нулевой, величины тока разбаланса производится посредством изменения величины переменного сопротивления. Нулевое положение пера самописца (деление шкалы 1) устанавливается рукояткой рН-метра «температура раствора».

Через 20 мин после закрывания камеры опустить стержень с датчиком настолько, чтобы он прорвал фольгу и погрузился в капсулу с водой, затем снова поднять его. Испарение воды с поверхности датчика вызывает изменение тока разбаланса, регистрируемое отклонением стрелки прибора Ф 116/2 и пера самописца. В некоторых случаях отклонению стрелки предшествует кратковременный отброс ее в противоположную сторону, который не следует принимать во внимание. Вероятно, это вызывается явлениями смачивания.

После того как изменение силы тока достигнет максимальной величины и начнет уменьшаться, следует отключить запись, после чего сменить исследуемый образец и повторить определение. Проводить не менее двух определений для каждого варианта.

Чтобы установить, какому значению водного потенциала исследуемого материала соответствует наблюдаемое изменение силы тока, производится калибровка установки. Для этого в камеру помещают жгуты из фильтровальной бумаги, смоченные раствором сахарозы. Концентрация растворов сахарозы от 0,5 до 2 М, что соответствует величинам осмотического потенциала от —1420 до —6080 кПа.

По графику, полученному на основании калибровки, найти значение водного потенциала образца.

Оформление работы. Результаты представляют в виде таблицы (табл. 15). Подробно оформление задачи см. с. 13.

Таблица 15

Схема записи результатов

Вариант	Отклонение в делениях шкалы самописца	Водный потенциал, кПа
1.		
2.		

Задача 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОГЛОЩЕНИЯ ВОДЫ РАСТЕНИЕМ ПОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Водообмен растений складывается из неразрывно связанных процессов: поглощения воды, ее передвижения и распределения, а также испарения воды (транспирация). Эти процессы находятся между собой в подвижном равновесии. Они обеспечивают постоянное передвижение воды в системе почва — растение — атмосфера, обусловленное выравниванием активности воды и водного потенциала в этой системе.

Надземная часть растения находится обычно в воздушной среде (за исключением водных растений). В воздухе существует дефицит упругости водяного пара, поэтому его водный потенциал низок, т. е. высока сосущая сила. При относительной влажности воздуха 99% его сосущая сила составляет 1360 кПа, при 90% повышается уже до 14 200 кПа, а при 50% — до 91 000 кПа. Сосущая сила тканей растения значительно ниже, от 100—1500 кПа (у травянистых растений) до 3000 кПа (у деревьев). Перепад сосущей силы ведет к по-

стоянной отдаче воды растением в воздух в виде водяного пара (процессу транспирации). Из-за частичной потери воды поверхностными клетками растения ее активность снижается и возрастает сосущая сила этих клеток, за счет чего они могут отнимать воду у более глубоко лежащих клеток, те у следующих и т. д.

Предполагают, что вода передвигается главным образом по капиллярам клеточных стенок, т. е. путем наименьшего сопротивления. Передвижение воды идет осмотическим путем, вследствие уменьшения набухания коллоидов и повышения осмотического давления. Таким образом водный дефицит распространяется от клетки к клетке с поверхности растения до его сосудистой системы.

Присасывающее (повышающее сосущую силу) действие транспирации вызывает разрежение в сосудах, вследствие чего от корней к листьям по сосудам поступает вода. Но присасывающей силы транспирации недостаточно, чтобы поднять воду на всю длину капиллярного столба в сосудистой системе, достигающей у деревьев десятков метров. Считают, что в поддержании транспирационного тока важно участие силы сцепления молекул воды между собой (когезии), действующей при условии отсутствия пузырьков газа. Большое значение имеет и сила сцепления воды со стенками сосудов (адгезия). Действие этих сил приводит к тому, что вода в просветах сосудов движется непрерывным потоком. Скорость транспирационного тока составляет от 1—5 м/ч у большинства деревьев до 10—60 м/ч у ряда травянистых растений и до 100—150 м/ч у лиан.

Наряду с присасывающим действием транспирации, именуемым *верхним концевым двигателем водного тока*, в поглощении и передвижении воды в растении участвует также *нижний концевой двигатель*, или *корневое давление*. В отличие от «пассивного» поглощения воды, вызванного ее потерей в ходе транспирации, корневое давление обусловлено «активным» поглощением, связанным с затратой энергии. Если при интенсивной транспирации отставание поглощения воды от ее расходования

вызывает усиление натяжения водных нитей в сосудах, ведущее к созданию в них отрицательного гидростатического давления, то при ослаблении или отсутствии транспирации давление в сосудах становится избыточным. Это обусловлено существованием корневого давления, действие которого наглядно проявляется в случае снижения транспирации.

Так, при насыщении атмосферы водяными парами наблюдается *гуттация* — выделение капельной жидкостью воды через гидатоды (водные железы). Если срезать надземную часть растения, на пенёчке выделяется жидкость. Это явление называют *плачем растений*, а вытекающую из сосудов жидкость (водный раствор ряда органических и неорганических веществ) — *пасоккой*. Величина корневого давления, скорость плача и состава пасоки варьируют в зависимости от вида растения, его возраста, времени года и времени суток. Гуттация и плач растений наблюдаются лишь при условии нормальной работы корневой системы: они тормозятся в отсутствие O_2 или при воздействии на корень ингибиторов дыхания, разобщителей дыхания и окислительного фосфорилирования. Это показывает, что корневое давление обусловлено именно «активным» поглощением воды, связанным с метаболическими процессами в клетках корня, идущими за счет высвобождения энергии при аэробном дыхании.

Предполагают, что поглощение воды корнем и ее передвижение по клеткам коры до центрального цилиндра осуществляется, как и передвижение воды в мезофилле листа, осмотическим путем по градиенту водного потенциала. Нерешенным остается вопрос о том, какие именно процессы создают градиент сосущей силы, обуславливающий односторонний ток воды. Существует гипотеза о полярности клеток и коровой паренхимы, т. е. о локальных различиях проницаемости и метаболических процессов в противоположных участках цитоплазмы этих клеток.

В коровой паренхиме вода движется главным образом по капилярам клеточных стенок; в цент-

ральный цилиндр она проходит через цитоплазму проникущих клеток эндодермы. В сосуды ксилемы вода поступает вследствие высокой сосущей силы их содержимого. Осмотический потенциал и, следовательно, сосущая сила сока ксилемы создается за счет активного транспорта ионов живыми клетками паренхимы в сосуды. Активный транспорт требует затрат метаболической энергии, поэтому корневое давление и зависит от интенсивности дыхания. При интенсивной транспирации, как уже указывалось, высокая сосущая сила в сосудах поддерживается за счет присасывающего действия транспирации. Доля «активного» поглощения в общем поглощении воды различна у разных растений и варьирует в зависимости от времени года и условий произрастания.

Корень растения извлекает воду из почвы до тех пор, пока существует градиент активности воды между корнем и почвой, т. е. пока сосущая сила клеток эпидермиса, контактирующих с почвенными частицами, хотя бы незначительно превышает сосущую силу почвы. Для этого клетки корней травянистых растений развивают сосущую силу до 1500 кПа, лесных деревьев — до 3000 кПа, растения засушливых местностей — до 6000 кПа. В клетку эпидермиса вода поступает осмотическим путем в вакуоль или по капиллярам клеточной стенки и далее, как уже говорилось, передвигается из клетки в клетку по градиенту сосущей силы. Сложность извлечения воды из почвы заключается в том, что корням необходимо преодолеть сопротивление сил, связывающих почвенную влагу, так как ее удерживают почвенные частицы. Уже при незначительном снижении содержания воды в почве ее сосущая сила резко возрастает, все меньше отличаясь от сосущей силы корней, что снижает интенсивность поступления воды в растение.

Различают статически и динамически доступную растению воду. *Статически доступная вода* — это весь запас почвенной влаги, удерживаемой силами, меньшими, чем сосущая сила корней. *Динамически доступная вода* — та вода, которую ра-

стение реально поглощает в единицу времени. Недоступна для растений *грунтовая* вода, так как ее уровни корни обычно не достигают. Вода почвы может удерживаться почвенными коллоидами, капиллярными силами (в порах между частицами почвы) и осмотически (ионами). Гидратационная вода коллоидов для растений недоступна. Осмотическое связывание воды ионами обычно очень незначительно, за исключением засоленных почв. Доступна для растений *капиллярная* вода, которую и извлекают корневые волоски из почвенных пор. Сила, с которой вода связана в почве капиллярно и адсорбционно, определяет *матричный*, или *капиллярный водный потенциал* почвы.

Корневая система растения постоянно находится в поисках воды, она «следует за водой» путем нарастания и увеличения активной поверхности корней, осваивая все новые участки почвы после того, как в старых истощился запас доступной влаги. Возможность растения поглощать воду зависит не только от свойств почвы, ее влагопроводности, но и от соотношения величин водного потенциала в почве и растении, от температуры почвы и особенностей самой корневой системы.

Для определения поглощения растением воды за небольшие промежутки времени используют приборы, называемые *потометрами* («измерителями всасывания»). Потометр состоит из цилиндрического сосуда, в который помещается корневая система (или обрезанный стебель) растения, и расположенной горизонтально барометрической капиллярной трубки (рис. 25). Можно использовать также U-образную трубку в качестве резервуара для корней: в одно колено ее вставляют растение, в другое — капиллярную трубку. При

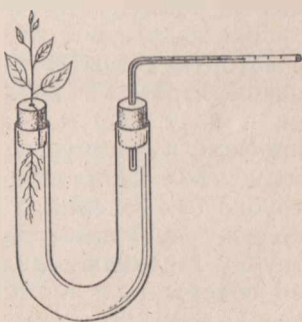


Рис. 25. Потометр в собранном виде

малейшем изменении объема воды в сосуде конец водной нити в капилляре будет смещаться.

Цель работы: знакомство с методом определения скорости поглощения воды; определение доли активного поглощения воды растением от общего поглощения воды.

Объект исследования: проростки тыквы, кукурузы, фасоли, бобов или растения традесканции, лантаны и др., выращенные в водной культуре.

Ход работы. Потометр доверху заполняют водой (прокипяченной и охлажденной или отстоявшейся не менее 8 ч). Одно колено U-образной трубки закрывают каучуковой пробкой с разрезом, в которую вставляется стебель растения таким образом, чтобы вся корневая система была погружена в воду. Другое колено прибора закрывают пробкой, в которую вставлена изогнутая под прямым углом капиллярная трубка с делениями (если трубка без делений, к ней резинками прикрепляют полоску миллиметровой бумаги). Капиллярную трубку заполняют жидкостью. В приборе не должно содержаться ни пузырька воздуха. Все щели необходимо замазать вакуумной замазкой. Для поддержания постоянной температуры прибор следует поместить в сосуд с ватой или в ультратермостат.

Отмечают исходное положение мениска в трубке, затем смещение за 3—5 мин; определение проводят 3—4 раза. Скорость поглощения воды корневой системой высчитывают по числу делений, на которое перемещается мениск в капилляре за единицу времени. Можно определять изменение скорости поглощения воды, изменяя интенсивность транспирации подземной части (при варьировании температуры, освещенности, движения воздуха и т. д.). Кроме того, целесообразно сравнить скорость поглощения воды из смеси Кнопа со скоростью поглощения чистой воды. Она будет иной, так как уже незначительная концентрация осмотически активных веществ существенно влияет на поступление воды в растение, замедляя его (см. выше). Для этого берут 0,05 н. смесь Кнопа. Поместив потометр в сосуд со льдом, наблюдают влия-

ние пониженной температуры в зоне корней на скорость поглощения воды. Подкисление или подщелачивание жидкости в приборе дает возможность проследить за влиянием рН на скорость поглощения воды растением.

После определения поглощения воды целым растением срезать надземную часть растения. Провести определение поглощения воды изолированной корневой системой, которое будет идти теперь с меньшей скоростью, так как определяется лишь активным поглощением воды корнями. Рассчитать долю активного поглощения воды в процентах от общего поглощения.

Оформление работы. Результаты представляют в виде таблицы (табл. 16). Подробно оформление задачи см. с. 13.

Таблица 16

Схема записи результатов

Состояние растения	Среда		Положение мениска			Средняя скорость смещения, делений в мин	Активное поглощение воды, % от общего поглощения
	вода	раствор Кнопа	исходное	через			
				3 мин	6 мин	9 мин	
Транспирирующее							
После срезания надземных органов							

Задача 4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ТРАНСПИРАЦИИ И ТРАНСПИРИРУЮЩЕЙ ПОВЕРХНОСТИ ЛИСТА

Процесс испарения воды надземными органами растений в атмосферу называется *транспирацией*. Вода может испаряться с кутикулированной поверхности эпидермиса (*кутикулярная транспирация*), с опробковевших поверхностей (*перидермальная транспирация*) и из устьиц (*устьичная*

транспирация). Наибольшую часть воды выделяет лист, который является основным транспирирующим органом растения. Вода испаряется с поверхности устьиц мезофилла листа в межклетники и оттуда улетучивается через устьичные щели в атмосферу.

Основной тип устьичного аппарата — это щель, окаймленная двумя видоизмененными эпидермальными клетками бобовидной формы, так называемыми замыкающими клетками. У разных видов растений устьица различаются по форме, количеству, строению и величине, что определяет максимальную транспирационную способность растения. Располагаются устьица у большинства растений на нижней стороне листа. Хотя суммарная площадь устьичных отверстий редко превышает 2% поверхности листа, но относительная транспирация листа составляет более 50% вследствие закономерности испарения с малых поверхностей. *Относительная транспирация* — интенсивность транспирации с единицы листовой поверхности, отнесенная к интенсивности испарения с равной по величине свободной водной поверхности. Интенсивность транспирации — количество воды, испарившейся с единицы поверхности листа за единицу времени.

Мы уже говорили, что транспирация, будучи, как и испарение, диффузионным процессом, определяется градиентом водного потенциала в системе растение — воздух. Поэтому все факторы, влияющие на этот градиент, влияют и на общую (устьичную и кутикулярную) транспирацию в той же мере, в какой и на процесс испарения воды. Транспирация как физический процесс зависит от дефицита насыщения воздуха водяными парами, температуры, освещенности, ветра (движения воздуха), а также величины и формы испаряющей поверхности, определяемой особенностями строения растения.

Строгая зависимость транспирации от этих факторов сохраняется лишь при условии постоянства площади устьичных отверстий, поскольку растение способно регулировать отдачу воды путем изменения степени открытости устьиц. Благодаря

особенности строения замыкающих клеток они могут изменять ширину устьичной щели от максимальной до минимальной (полного закрывания). Открывание и закрывание устьиц основано на изменении тургорного давления в замыкающих клетках, вызванном изменением осмотического давления в этих клетках. При повышении тургорного давления устьица открываются, при понижении — закрываются. Считается, что основной причиной движения устьичных клеток служат изменения концентрации CO_2 в замыкающих клетках устьиц и в межклетниках. Существуют несколько гипотез о возможных механизмах изменения осмотического давления в замыкающих клетках в связи с накоплением или расходом CO_2 , но ни одна из них до сих пор не получила полного признания. Наряду с устьичной регуляцией транспирации существует также внеустьичная, основанная на изменении водоудерживающей способности клеток вследствие изменения активности воды в клетках или проницаемости клеточных мембран.

Процесс транспирации способствует постоянному водному току по растению, с водой поглощаются из почвы и передвигаются по растению различные неорганические и органические вещества. Транспирация является основным средством терморегуляции растений, позволяющим им в самые жаркие дни предохранять листья от перегрева, несмотря на значительное поглощение солнечной энергии. Это очень важно для сохранения строения и функционирования биокolloидов.

Поскольку через устьица осуществляется не только испарение воды, но и диффузия кислорода и углекислого газа, транспирация связана с процессами дыхания и фотосинтеза. Особенно сильно сказывается состояние устьиц на ходе воздушного питания растений. По определению О. Штоккера, главная проблема газообмена состоит в лавировании между голодом и жаждой. Чтобы получать CO_2 , растение вынуждено отдавать воду; если оно удерживает воду, сокращается поступление углекислого газа. Растению приходится постоянно «ба-

лансировать», находя компромиссное решение в данных условиях.

Для определения эффективности использования воды растением введены следующие показатели: *транспирационный коэффициент* — количество воды, израсходованной растением или растительным сообществом на построение единицы массы сухого вещества; *продуктивность транспирации* — количество сухого вещества, образованного растением при расходе 1000 г воды. В среднем для большинства сельскохозяйственных растений продуктивность транспирации составляет около 3 г.

В настоящее время в эколого-физиологических исследованиях уделяют большое внимание изменениям интенсивности транспирации в зависимости от внешних условий. «Амплитуду» интенсивности транспирации растения в ответ на внешнее воздействие рассматривают как признак, характеризующий подвижность или устойчивость водного режима растения, т. е. его способность адаптироваться к изменениям условий среды. По интенсивности транспирации не всегда выявляются четкие различия между экологическими группами растений, скорее можно говорить о тенденции гигрофитов к меньшей интенсивности транспирации, по сравнению с мезофитами, учитывая при этом условия среды.

У разных растений в различных соотношениях находятся процессы поступления и расходования воды, разность которых определяет *водный баланс* растения. *Коэффициентом водного баланса* называется отношение количества потерянной воды к количеству поглощенной воды за определенное время. В случае согласования поглощения, передвижения и потери воды водный баланс будет уравновешенным. Как правило, водный баланс постоянно колеблется. Поддержание баланса между поступлением и расходом воды на определенном уровне достигается путем регулирования как поглощения, так и испарения ее.

Цель работы: сравнение интенсивности транспирации разновозрастных листьев одного растения или разновозрастных листьев растений, находящихся

ся в разных условиях водоснабжения или при раз-
личном освещении, температуре, движении возду-
ха, а также изучение строения и вычисление пло-
щади устьичного аппарата у разных растений.

Опыт 1

Определение интенсивности транспирации при помощи транспиromетров

Количество водяного пара, испаряемого расте-
нием, можно определить при помощи транспиро-
метров (рис. 26). Транспирометр Евтушенко—

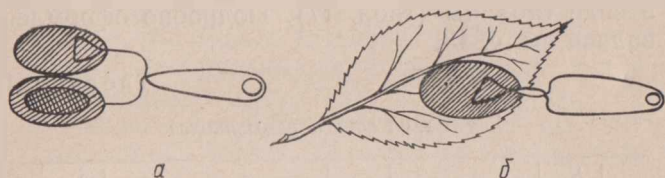


Рис. 26. Транспирометр в раскрытом виде (а) и закреп-
ленный на листе (б)

Шпота состоит из двух обоем с хлоркобальтовой бумагой, скрепленных пружинящим зажимом. Хлоркобальтовая бумага — это фильтровальная бумага, пропитанная 30%-ным раствором CoCl_2 и затем высушенная. Сухая бумага имеет синюю окраску; при увлажнении CoCl_2 образует кристаллогидрат, и цвет бумаги изменяется на розовый. Масса бумаги при этом увеличивается за счет поглощения воды. Между опытами транспирометры хранят в эксикаторе с гигроскопическим веществом, чтобы бумага оставалась в сухом состоянии. Метод можно использовать в полевых условиях.

Объект исследования: растения примулы, гор-
тензии, ландшаны, традесканции.

Ход работы. Вынимают транспирометр из экс-
катора и взвешивают его на торзионных весах. За-
крепляют его на листовой пластинке так, чтобы
одна обойма была плотно прижата бумагой к верх-
ней стороне листа, а вторая — к нижней. Отме-

чают время начала опыта. На одно растение ставят не менее трех транспирометров.

Когда бумага с какой-либо стороны листа начнет розоветь, транспирометр снимают с листа и снова взвешивают. Отмечают время окончания опыта и рассчитывают длительность экспозиции. Увеличение массы транспирометра указывает на количество поглощенного бумагой водяного пара. Определяют площадь отверстия в обойме, т. е. бумаги, поглотившей воду (учитывать поверхность двух обойм!). Рассчитывают интенсивность транспирации в $\text{г/дм}^2 \cdot \text{ч}$ или в $\text{мг/см}^2 \cdot \text{ч}$.

Оформление работы. Результаты представляют в виде таблицы (табл. 17). Подробно оформление задачи см. с. 13.

Таблица 17

Схема записи результатов

Объект	№ транспирометра	Масса транспирометра		Привес	Время опыта			Площадь бумаги	Интенсивность транспирации
		исходная	конечная		начало	конец	длительность		

Опыт 2

Определение числа устьиц и поверхности устьичных щелей на единицу площади листа

Объект исследования: листья традесканции, зебрины, сеткрезии, плюща, аспидистры, кливии и других растений разных экологических групп.

Ход работы. Срезают с нижней поверхности листа эпидермис, помещают срез в каплю воды и рассматривают под микроскопом при увеличении объектива $40\times$. Если эпидермис снимается плохо (у аспидистры, кукурузы и пр.), можно получить отпечатки эпидермиса методом Полаччи. Для этого на нижнюю поверхность листа наносят палочкой тонкий мазок коллодия. Быстро застывая,

коллодий образует пленку, на которой отпечатывается поверхность эпидермиса с устьицами. Кусочки пленки помещают в каплю воды и рассматривают под микроскопом.

Подсчитать число устьиц в 5 полях зрения при большом увеличении и рассчитать среднее число устьиц. Найти открытые устьица и измерить окулярным микрометром длину и ширину устьичной щели для 5 устьиц. При помощи объективного микрометра определяют при большом увеличении диаметр поля зрения и цену деления окулярного микрометра. Рассчитывают площадь поля зрения, площадь одной устьичной щели и общую испаряющую поверхность всех устьиц в поле зрения. Учтя, что форма устьичной щели ближе к ромбу, чем к прямоугольнику, нужно ввести при расчете коэффициент 0,7.

Используя полученные данные, рассчитывают количество устьиц на единицу площади листа и площадь устьичных щелей в процентах от площади листа. Определения проводят для двух растений; желательно сравнить строение и относительную поверхность устьиц у растений разных экологических групп.

Оформление работы. Результаты представляют в виде таблицы (табл. 18). Подробно оформление работы см. с. 13.

Таблица 18

Схема записи результатов

Размеры устьичной щели				Площадь щели, мм ²	Площадь поля зрения, мм ²	Число устьиц		Площадь устьичных щелей на 1 мм ² поверхности листа	
длина		ширина				на поле зрения	на 1 мм ² листа	мм ²	%
делений микрометра	мм	делений микрометра	мм						

ЛИТЕРАТУРА

- Баславская С. С. и др. Малый практикум по физиологии растений. М., Изд-во Моск. ун-та, 1973.
- Дусев Н. А. Состояние воды в растении. М., Наука, 1974, с. 3—10.
- Лархер В. Экология растений. М., Мир, 1977, с. 209—215, 219—227, 229—241.
- Линдберт Э. Физиология растений. М., Мир, 1976, с. 271—280, 285—292, 534—537.
- Рубин Б. А. Курс физиологии растений. М., Высшая школа, 1976, с. 296—323.
- Судницын И. И. Движение почвенной влаги и водопотребление растений. М., Изд-во Моск. ун-та, 1979, с. 36—40.
- Сулейманов И. Г. Методика определения потери воды растением.— В кн.: Роль компонентов протоплазмы в водообмене растений. Изд-во Казан. гос. ун-та, 1972, с. 61—65.
- Физиология растений (методические указания) / Под ред. С. С. Андреевко. М., Изд-во Моск. ун-та, 1978, с. 99—107.
- Шпота А. А. К методике определения транспирации полевым транспириометром. Изд-во Киргиз. гос. ун-та, 1962.

Раздел VI

РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ

Процессы роста и развития растений относятся к числу важнейших проявлений их жизнедеятельности. Явления роста и развития не однозначны, они представляют собой две взаимосвязанные стороны единого процесса жизни.

Рассматривать рост как простое увеличение массы и размеров организма ошибочно. В таком определении не отражены сложные процессы обмена веществ, новообразования элементов структуры клеток, органов, организма, влияющих на увеличение массы и размеров. В настоящее время существует общепринятое понятие роста. *Рост* — это процесс новообразования элементов структуры, сопровождающийся увеличением количественных и качественных показателей, обусловленных доминированием процесса синтеза над распадом. *Развитие* — качественные изменения обмена веществ, приводящие к новым формам роста. Процессы роста и развития неразрывно связаны между собой.

Наиболее общей закономерностью роста, присущей всем живым организмам, является его ритмичность. Согласно представлению о «большом периоде роста», отдельный орган или его участок сначала растут медленно, затем их рост ускоряется, достигает максимальной величины, после чего постепенно замедляется. Обширный экспериментальный материал свидетельствует о том, что ритм роста зависит от внутренних причин, от характера обмена веществ, хотя может изменяться и под влиянием внешних факторов.

Рассматривая рост отдельных клеток, определяющий увеличение размера и массы органа, необ-

ходимо различать три фазы (или три этапа) роста: эмбриональную, растяжения и дифференцировки. Эти этапы роста различаются по направленности процессов обмена веществ, по скорости увеличения объема клеток, по их готовности к выполнению специфических функций в организме.

В целом растению четко регулируются последовательность и закономерности протекания тех или иных процессов. В первую очередь направление, а также характер роста и развития растений зависят, конечно, от потенциальных возможностей организма, заложенных в их геноме. Однако реализация этих возможностей обусловлена рядом факторов, регулирующее действие которых может проявляться по-разному: во-первых, — через управление синтезом ферментов (транскрипция, трансляция, работа рибосомного аппарата), во-вторых, — через регуляцию активности ферментов (в основном за счет аллостерического действия), в-третьих, — изменяя свойства цитоплазматических мембран. Строгая кооперация деятельности всех органов целого растения достигается наличием различных систем регулирования, к которым относятся и фитогормоны.

По определению Д. А. Сабина, к фитогормонам относятся вещества, обладающие способностью в небольших количествах вызывать физиологические процессы, протекающие на основе физических и химических изменений; являющиеся продуктами обмена веществ организма; действующие в иных частях организма, помимо тех, где они вырабатываются.

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что фитогормоны влияют на все стороны метаболизма растений, однако для нормальной жизнедеятельности последних необходимо кооперативное действие всех фитогормонов в определенных концентрациях.

Многочисленные проявления роста растений нельзя рассматривать в отрыве от их соответствия определенному периоду индивидуального развития, или жизненного цикла растения. В зависимости от выбранных критериев онтогенез растения мож-

по расчленить на вегетативный и репродуктивный периоды, на возрастные периоды, фенологические фазы, этапы органогенеза и т. д. Переход растений из одного качественного состояния в другое характеризуется не только изменением формы, но в первую очередь коренными изменениями характера обмена веществ. Регулирующее действие внешних воздействий проявляется в задержке или же ускорении прохождения отдельных этапов развития. Природа рецепторов, воспринимающих сигнал внешней среды, и механизм ответных реакций привлекают внимание физиологов на протяжении многих десятилетий. Установлена важная роль фитохромной системы растений в фотопериодической реакции и целом ряде метаболических процессов.

Задача I

ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ РОСТА РАСТЕНИЙ

Динамика ростового процесса. Если отложить на графике логарифм размера растения как функцию времени, то рост растения (его органа, ткани) будет выражен в виде сигмоидной или S-образной кривой роста (рис. 27). Общий характер кривых роста был установлен в конце прошлого века Ю. Саксом, что фактически явилось одним из наиболее крупных обобщений, имеющих общебиологическое значение. В связи с универсальностью S-образной кривой роста было закономерно стремление многих исследователей выразить процесс роста в математических формулах. Был предложен ряд формул (Робертсоном, Блекманом, Гексли и др.), которыми более или менее удачно описываются отдельные участки кривой роста.

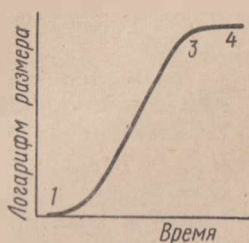


Рис. 27. Сигмоидная кривая роста: 1 — лаг-период, 2 — логарифмическая фаза, 3 — замедленный рост, 4 — стационарное состояние

ходимо различать три фазы (или три этапа) роста: эмбриональную, растяжения и дифференцировки. Эти этапы роста различаются по направленности процессов обмена веществ, по скорости увеличения объема клеток, по их готовности к выполнению специфических функций в организме.

В целом растении четко регулируются последовательность и закономерности протекания тех или иных процессов. В первую очередь направлены, а также характер роста и развития растений зависят, конечно, от потенциальных возможностей организма, заложенных в их геноме. Однако реализация этих возможностей обусловлена рядом факторов, регулирующее действие которых может различаться по-разному: во-первых, — через управление синтезом ферментов (транскрипция, трансляция, работа рибосомного аппарата), во-вторых, — через регуляцию активности ферментов (в основном за счет аллостерического действия), в-третьих, — изменяя свойства цитоплазматических мембран. Строгая кооперация деятельности всех органов целого растения достигается наличием различных систем регулирования, к которым относятся и фитогормоны.

По определению Д. А. Сабинина, к фитогормонам относятся вещества, обладающие способностью в небольших количествах вызывать физиологические процессы, протекающие на основе физических и химических изменений; являющиеся продуктами обмена веществ организма; действующие в иных частях организма, помимо тех, где они вырабатываются.

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что фитогормоны влияют на все стороны метаболизма растений, однако нормальной жизнедеятельности последних необходимо кооперативное действие всех фитогормонов в определенных концентрациях.

Многочисленные проявления роста растений нельзя рассматривать в отрыве от их соответствия определенному периоду индивидуального развития, или жизненного цикла растения. В зависимости от выбранных критериев онтогенез растения мож-

у них происходит еще в июле, хотя по погодным условиям этот месяц наиболее благоприятен для роста. По его мнению, причина ритмичности ростовых процессов состоит в несоответствии скоростей синтеза жизненно важных веществ во время роста, в частности она зависит от уровня нуклеиновых кислот в меристеме точек роста.

Наличие длительных периодов отсутствия видимого роста привело физиологов к выводу о существовании состояния покоя побегов многолетних и семян однолетних растений. Такая приостановка роста у растений средней полосы северного полушария совпадает с наступлением осенне-зимнего периода. Во время покоя происходят значительные биохимические и структурные изменения в точках роста, обеспечивающие дальнейший интенсивный рост.

Цель работы: исследовать динамику роста древесного растения (тополя).

Объект исследования: одно- или двухлетний побег древесного растения (тополя).

Ход работы. При исследовании динамики ростового процесса строят график зависимости увеличения длины стебля от номера узла (почки). На полученной кривой роста отмечают ее основные элементы. Для демонстрации ритмичности роста необходимо построить график изменения длины междоузлий от нижнего конца побега к верхнему. Измерения длины стебля от основания до определенного узла или величины междоузлия производят линейкой или миллиметровой бумагой. При измерении стебля важно не упустить из внимания сближенные узлы с неразвившимися почками у основания и на верхушке побега.

Оформление работы. Результаты измерений оформить в виде графика и сделать выводы. Подробную запись задачи см. с. 13.

Задача 2

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РОСТОВЫХ ВЕЩЕСТВ НА РОСТ КОЛЕОПТИЛЕЙ ЗЛАКОВ

В формировании растения участвуют тонкие механизмы регуляции и координации деятельности различных органов и клеток организма. Для осуществления координации в растениях могут использоваться два типа механизмов: системы химических «посыльных», направляющих активность клеток и, таким образом, вынуждающих их выполнять те или иные необходимые функции, и системы физических полей. К первому типу относятся растительные гормоны, ко второму — электрические и метаболические градиенты давления и газообмена. Продуктом деятельности всех этих систем является сложный растительный организм.

Химические вещества, которые могут участвовать в управлении ростом, называются регуляторами роста. Физиологи растений различают четыре типа таких регуляторов: ауксины, гиббереллины, цитокинины и ингибиторы. Рассмотрим физиологическую роль одной группы этих веществ — ауксинов.

Открытию ауксинов способствовали опыты, цель которых была в изучении одного из корреляционных эффектов, а именно — фототропизма. Ч. Дарвин нашел (1897 г.), что фототропическая реакция coleoptily злака зависит от верхушки coleoptily, в котором, как обнаружил Вент (1928 г.), имеется некоторое вещество, регулирующее рост, — ауксин. Кенль и др. (1934) показал, что ауксин является β -индолилуксусной кислотой (β -ИУК, или просто ИУК). Число химических веществ, обладающих способностью стимулировать рост по типу ИУК, весьма велико. Это соединения группы индола, нафтильные производные, феноксисоединения и бензоаты. Однако корреляционный эффект, подобный эффекту ауксина, вызывается значительно меньшим числом веществ, так как очень немногие синтетические регуляторы ро-

ста способны к поляризованному передвижению по растительным тканям.

Первыми надежными биометодами определения ауксинов, применяемыми и в наши дни, являются изучение реакции изгиба (при односторонней обработке) или исследование действия на прямой рост (при погружении в раствор регулятора роста) колеоптилей. В настоящее время тест на вытягивание в длину в сочетании с методом хроматографии на бумаге позволяет изучать природу и локализацию эндогенных ауксинов.

Увеличение концентрации ауксина выше некоторой оптимальной приводит к обратному эффекту — резкому замедлению роста. Ауксины играют существенную роль в различных корреляционных эффектах, например тропизмах. С ними же связано и явление апикального доминирования, опадения листьев, дифференцировка органов и тканей.

В высших растениях ауксин обычно образуется в меристемах и растущих тканях. Классическим примером может служить синтез этого гормона в верхушке колеоптиля злаков. Ауксин обладает способностью полярно передвигаться по многим растительным тканям, и в силу этого он оказывает физиологическое влияние на зоны, расположенные на значительном расстоянии от мест его образования. Растения часто получают ауксин от своих паразитов или от симбионтов, например, образование клубеньков на корнях бобовых происходит под действием ауксина, синтезируемого клубеньковой бактерией.

После того как под действием гормона завершится соответствующая реакция, организм должен быть в состоянии так или иначе избавиться от него. ИУК, например, может или войти в состав разного рода комплексов, или быть связана в определенных участках цитоплазмы, или, наконец, быть разрушена ферментативно. ИУК образует комплексы трех типов: с пептидами (индолилацилтиласпартат в корнях гороха), с сахарами (образуя гликозиды с арабинозой и глюкозой в растениях кукурузы), с ортофенолами (например с хлор-

геновой кислотой). Связывание ИУК с цитоплазматическими структурами идет, по-видимому, путем ее адсорбции на поверхности цитоплазматических белков.

Ферментный препарат, полученный из растений и способный катализировать окислительный распад ИУК, получил название оксидазы ИУК, хотя единого представления о его природе и механизме действия выработано не было. Одни авторы считают, что фермент содержит железо и, возможно, представляет собой пероксидазу, другие — что это медьсодержащий фермент. В результате тщательного исследования оксидазы ИУК из гороха было показано, что она связана с кофакторами двух типов — ионами марганца и фенольными соединениями. Марганец участвует в основной окислительной ступени (ионы марганца могут непосредственно окислять ИУК с образованием CO_2), а фенольные соединения играют роль переносчиков электронов при реокислении Mn^{+2} .

Продукты окисления ауксина разнообразны. В процессе разложения ауксина образуется ряд промежуточных продуктов, что затрудняет их идентификацию.

Не только образование гормона роста, но и его разложение, перевод в неактивную форму путем связывания, — это рычаги тонкого механизма регуляции роста и развития растения.

Специфические свойства колеоптилей злаков как объектов для изучения влияния ростовых веществ. При изучении ростовых процессов принципиальное методическое значение имеет выбор объекта. Для этой цели с успехом могут быть использованы колеоптили проростков злаков, где фазы роста клеток четко разграничены во времени. Продолжительность одной и той же фазы роста клеток у колеоптилей различных злаков различна. У пшеницы деление клеток в колеоптилях продолжается 48 ч, у овса — 54 ч, у кукурузы — 72 ч. Неодинакова продолжительность и фазы «чистого» растяжения, которая зависит от условий выращивания и сортовых особенностей культуры. После прорыва колеоптиля настоящим листом происходит

прекращение роста в длину и увеличение массы coleoptily.

Известно, что из семян злаков в coleoptиль переходит предшественник гормона роста, который перемещается в верхушку coleoptily, и там происходит превращение предшественника в деятельный ростовой гормон (ауксин). Затем этот гормон роста распространяется вниз по coleoptилью. Если отделенный от семени coleoptиль декапитировать, то клетки, находящиеся в фазе растяжения, не в состоянии сами синтезировать ростовые вещества. Поэтому изолированные участки coleoptily, клетки которого находятся в одной фазе роста — растяжения, являются хорошим объектом для изучения влияния экзогенных гормонов роста.

Цель работы: изучить влияния ростовых веществ (растительных и синтетических) на рост в длину coleoptилей злаков по методу Бояркина.

Объект исследования: coleoptили пшеницы, выращенной в темноте.

Ход работы. Отбирают coleoptили определенного возраста, клетки которых прекратили деление и перешли в фазу «чистого» растяжения (длиной не более 2,5—3,0 см). 5—7 coleoptилей зажимают между указательным и большим пальцами левой руки, оставив свободными верхние концы, и, отступив 4 мм от кончика, с помощью линейки и бритвы нарезают отрезки длиной 5 мм. При помощи тупой стеклянной палочки (или капилляра) выталкивают из отрезков первичный лист на половину его длины, а затем вытаскивают руками. Полученные таким образом полые цилиндрики нанизывают по 10 штук на стеклянные капилляры (длиной 9—10 см), а затем измеряют общую длину 10 сдвинутых вместе отрезков coleoptилей на каждом капилляре. Чтобы избежать подсыхания растительного материала, капилляры с отрезками coleoptилей хранят в дистиллированной воде. Затем с помощью пинцета в длинные узкие стеклянные кюветы («лодочки») помещают по два капилляра в каждую. Для отличия капилляров друг от друга на их концы надевают маленькие пла-

геновой кислотой). Связывание ИУК с цитоплазматическими структурами идет, по-видимому, путем ее адсорбции на поверхности цитоплазматических белков.

Ферментный препарат, полученный из растений и способный катализировать окислительный распад ИУК, получил название оксидазы ИУК, хотя единого представления о его природе и механизме действия выработано не было. Одни авторы считают, что фермент содержит железо и, возможно, представляет собой пероксидазу, другие — что это медьсодержащий фермент. В результате тщательного исследования оксидазы ИУК из гороха было показано, что она связана с кофакторами двух типов — ионами марганца и фенольными соединениями. Марганец участвует в основной окислительной ступени (ионы марганца могут непосредственно окислять ИУК с образованием CO_2), а фенольные соединения играют роль переносчиков электронов при реокислении Mn^{+2} .

Продукты окисления ауксина разнообразны. В процессе разложения ауксина образуется ряд промежуточных продуктов, что затрудняет их идентификацию.

Не только образование гормона роста, но и его разложение, перевод в неактивную форму путем связывания, — это рычаги тонкого механизма регуляции роста и развития растения.

Специфические свойства колеоптилей злаков как объектов для изучения влияния ростовых веществ. При изучении ростовых процессов принципиальное методическое значение имеет выбор объекта. Для этой цели с успехом могут быть использованы колеоптили проростков злаков, где фазы роста клеток четко разграничены во времени. Продолжительность одной и той же фазы роста клеток у колеоптилей различных злаков различна. У пшеницы деление клеток в колеоптилях продолжается 48 ч, у овса — 54 ч, у кукурузы — 72 ч. Неодинакова продолжительность и фазы «чистого» растяжения, которая зависит от условий выращивания и сортовых особенностей культуры. После прорыва колеоптиля настоящим листом происходит

прекращение роста в длину и увеличение массы coleoptilya.

Известно, что из семян злаков в coleoptilya переходит предшественник гормона роста, который перемещается в верхушку coleoptilya, и там происходит превращение предшественника в деятельный ростовой гормон (ауксин). Затем этот гормон роста распространяется вниз по coleoptilyu. Если отделенный от семени coleoptilya декапитуировать, то клетки, находящиеся в фазе растяжения, не в состоянии сами синтезировать ростовые вещества. Поэтому изолированные участки coleoptilya, клетки которого находятся в одной фазе роста — растяжения, являются хорошим объектом для изучения влияния экзогенных гормонов роста.

Цель работы: изучить влияния ростовых веществ (растительных и синтетических) на рост в длину coleoptilyей злаков по методу Бояркина.

Объект исследования: coleoptilya пшеницы, выращенной в темноте.

Ход работы. Отбирают coleoptilya определенного возраста, клетки которых прекратили деление и перешли в фазу «чистого» растяжения (длиной не более 2,5--3,0 см). 5—7 coleoptilyей зажимают между указательным и большим пальцами левой руки, оставив свободными верхние концы, и, отступив 4 мм от кончика, с помощью линейки и бритвы нарезают отрезки длиной 5 мм. При помощи тупой стеклянной палочки (или капилляра) выталкивают из отрезков первичный лист на половину его длины, а затем вытаскивают руками. Полученные таким образом полые цилиндрики нанизывают по 10 штук на стеклянные капилляры (длиной 9—10 см), а затем измеряют общую длину 10 сдвинутых вместе отрезков coleoptilyей на каждом капилляре. Чтобы избежать подсыхания растительного материала, капилляры с отрезками coleoptilyей хранят в дистиллированной воде. Затем с помощью пинцета в длинные узкие стеклянные кюветы («лодочки») помещают по два капилляра в каждую. Для отличия капилляров друг от друга на их концы надевают маленькие пла-

стилиновые шарики разного цвета. В лодочки предварительно наливают растворы фитогормонов нужной концентрации.

Данные растворы готовят на фосфатно-цитратном буфере рН 5,0 с 1%-ной сахарозой. Лодочки с плавающими в них капиллярами помещают в термостат при 25—28°. Через каждый час в течение 3 ч промеряют длину 10 отрезков колеоптилей (прямо на капилляре), предварительно их сдвинув.

Таблица 19

Влияние растактивирующих веществ на рост в фазе растяжения

Вариант опыта	№ лодочек	Длина 10 колеоптилей, мм	Прирост в длину 10 колеоптилей, мм	Прирост, % от контроля

Оформление работы. Результаты заносят в таблицу (табл. 19) и представляют в виде одного из двух графиков: 1 — увеличение общей длины отрезков колеоптилей в ходе эксперимента (динамика роста); 2 — величина прироста отрезков колеоптилей за определенные интервалы времени (ритмичность роста).

Схема опыта

- | | |
|---|--|
| <p>I вариант — 1) контроль
2) ИУК, 10^{-3} М
3) ИУК, 10^{-4} М
4) ИУК, 10^{-7} М</p> | <p>II вариант — 1) контроль
2) ИУК, 10^{-5} М
3) Кинетин, 10^{-6} М
4) ИУК, 10^{-6} М</p> |
| <p>III вариант — 1) контроль
2) НУК, 10^{-3} М
3) НУК, 10^{-5} М
4) НУК, 10^{-7} М</p> | |

(контроль — фосфатно-цитратный буфер. НУК — нафтилуксусная кислота).

Задача 3

ВЛИЯНИЕ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ВЫЖИВАНИЕ СИНЕ-ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ *ANABAENA VARIABILIS*

Индивидуальное развитие растений — процесс многоплановый и взаимообусловленный, в котором старение и отмирание одних органов идет параллельно с новообразованием и развитием других. С возрастом происходят физиолого-биохимические изменения отдельных частей и всего растения в целом, приводящие в конце концов к естественной смерти организма. В неблагоприятных условиях внешней среды могут происходить необратимые нарушения метаболизма, приводящие к быстрой гибели растения. Удобной моделью для выяснения некоторых закономерностей деградации растений могут служить одноклеточные организмы. Полагают, что у бактерий, дрожжей и многих растительных форм, размножающихся вегетативным путем, естественный процесс старения отсутствует, а отмирание их клеток происходит в результате действия неблагоприятных факторов внешней среды. Известно, однако, что многие микроорганизмы в течение более или менее длительного времени способны переживать действие таких факторов, сохраняя свою индивидуальность.

Процессы выживания, а также сохранения в темноте нежизнеспособных клеток *Anabaena variabilis* — облигатно фототрофной нитчатой сине-зеленой водоросли — сопровождается деструкцией их внутриклеточных компонентов. Поскольку для облигатно фототрофных сине-зеленых водорослей свет является единственным фактором, который обеспечивает их рост и развитие, только он может быть индикатором повреждений в клетках, вызванных нахождением их в темноте. Эти повреждения могут оказаться существенными или несущественными для последующей световой жизни водоросли. Опытным путем установлено, что выдерживание культуры *Anabaena variabilis* в темноте до двух недель не сказывается существенно на скоростях

синтеза веществ клеток, белка и нуклеиновых кислот. Продление периода инкубации клеток в темноте до трех недель приводит к снижению скоростей биосинтетических реакций, однако на свету происходит постепенное восстановление скорости роста и функций клетки.

Дальнейшее пребывание культуры водоросли в темноте (более месяца) приводит к таким повреждениям в клетках, которые не репарируются на свету. В клетке начинается деструкция, при сохранении постоянного числа клеток в культуре в короткие сроки происходит разрушение их внутриклеточных компонентов: белка, РНК, ДНК. Очень интенсивному процессу деградации на свету подвергаются пигменты, быстрее всего — каротиноиды, вслед за ними — хлорофилл, и еще медленнее — фикоцианин, в результате чего происходит быстрое обесцвечивание культуры через промежуточную стадию интенсивной голубой окраски клеточных суспензий. Процесс световой деструкции клеток *Anabaena variabilis* сопровождается значительным возрастанием скоростей поглощения ими O_2 . Удаление из среды O_2 перед перенесением клеток на свет защищает клетки от фотодеструкции.

Обнаружение процесса фотодеструкции клеток *Anabaena variabilis* на определенном этапе их темновой инкубации при последующем перенесении на свет, естественно, ставит вопрос о природе этого явления. На основании перечисленных ниже данных был сделан вывод о протекании процесса деструкции в результате фотоокисления пигментов. Действительно, процесс фотодеструкции происходит в полноценной питательной среде, т. е. в условиях, обеспечивающих интактным клеткам их нормальное развитие. Процесс индуцируется светом, независимо от его интенсивности. И, кроме того, в процессе фотодеструкции участвуют фотосинтетические пигменты и кислород.

Видимый свет потенциально вреден для многих клеток, включая растительные и животные, клетки эукариотных и прокариотных микроорганизмов, как фотосинтезирующих, так и нефотосинтезирующих. Причиной повреждающего действия света на

живые клетки является образование синглетного кислорода в результате переноса энергии на O_2 с возбужденной светом и находящейся в синглетном состоянии окрашенной молекулы (например хлорофилла). Синглетный кислород становится источником деструктивных процессов благодаря взаимодействию с ненасыщенными липидами, что приводит к образованию перекисей липидов и вслед за тем — свободных радикалов, вызывающих повреждения биологических мембран. Хлорофилл, сенсibilизирующий образование синглетного кислорода, в свою очередь, способен подвергаться деградации при соокислении в цепи реакций.

Итак, в нормально развивающихся на свету клетках, содержащих хлорофилл, существует опасность фотоокислительных реакций, сенсibilизируемых хлорофиллом. Каротиноиды считаются универсальным защитным механизмом от повреждающего действия фотоокисления не только у фотосинтезирующих, но и у нефотосинтезирующих организмов. Возможно, в клетках сине-зеленых водорослей защитную функцию от фотоокисления может иметь и фикоцианин.

Длительное выдерживание культуры клеток водоросли в темноте приводит к необратимым изменениям, «поломкам» в системе защиты клетки от фотоокисления, и поэтому оно становится причиной быстрой деструкции клеток при перенесении их на свет. Вероятно, что и массовое отмирание сине-зеленых водорослей в местах вызываемого ими «цветения» воды в природе может протекать по тому же механизму.

Цель работы: определить жизнеспособность клеток культуры облигатно фототрофной сине-зеленой водоросли *Anabaena variabilis*, выдержанной 1,5 мес. в темноте, и исследование механизмов, приводящих к гибели клеток при последующем перенесении их на свет.

Объект исследования: суспензия клеток сине-зеленой водоросли *Anabaena variabilis*, выращенных на свету в течение 7—10 дн. (контрольный вариант) и выращенных на свету в течение 7 дн.

синтеза веществ клеток, белка и нуклеиновых кислот. Продление периода инкубации клеток в темноте до трех недель приводит к снижению скоростей биосинтетических реакций, однако на свет происходит постепенное восстановление скорости роста и функций клетки.

Дальнейшее пребывание культуры водорослей в темноте (более месяца) приводит к таким повреждениям в клетках, которые не репарируются на свету. В клетке начинается деструкция, при хранении постоянного числа клеток в культуре в короткие сроки происходит разрушение их основных клеточных компонентов: белка, РНК, ДНК. Очень интенсивному процессу деградации на свету подвергаются пигменты, быстрее всего — каротиноиды, вслед за ними — хлорофилл, и еще медленнее — фикобилины, в результате чего происходит быстрое обесцвечивание культуры через промежуточную стадию интенсивной голубой окраски клеточных суспензий. Процесс световой деструкции клеток *Anabaena variabilis* сопровождается значительным возрастанием скоростей поглощения O_2 . Удаление из среды O_2 перед перенесением клеток на свет защищает клетки от фотодеструкции.

Обнаружение процесса фотодеструкции клеток *Anabaena variabilis* на определенном этапе их темновой инкубации при последующем перенесении на свет, естественно, ставит вопрос о природе этого явления. На основании перечисленных ниже данных был сделан вывод о протекании процесса деструкции в результате фотоокисления пигментов. Действительно, процесс фотодеструкции происходит в полноценной питательной среде, т. е. в условиях, обеспечивающих интактным клеткам их нормальное развитие. Процесс индуцируется светом, независимо от его интенсивности. И, кроме того, в процессе фотодеструкции участвуют фотосинтетические пигменты и кислород.

Видимый свет потенциально вреден для многих клеток, включая растительные и животные, как эукариотных и прокариотных микроорганизмов, как фотосинтезирующих, так и нефотосинтезирующих. Причиной повреждающего действия света на

и затем выдержанных в темноте 1,5 мес (опытный вариант).

Ход работы. Из каждой колбы (с контрольным и опытным вариантами) отбирают по 20—30 мл (это зависит от исходной плотности материала) суспензии клеток в две центрифужные пробирки. Отобранные пробы культуры центрифугируют 10 мин при 6000 об/мин на малой центрифуге и ресуспендируют в 8 мл полученного супернатанта или 0,05 М фосфатного буфера, рН 7,4. Сконцентрированную суспензию клеток контрольного и опытного вариантов разливают на две равные порции в пробирки и одну из них освещают 2,5 ч интенсивным светом. За это время производят определение количества хлорофилла, каротиноидов и фикоцианина в неосвещенных пробах. По окончании освещения клеток водоросли в них определяют содержание пигментов.

Спектрофотометрическое определение количества пигментов в суспензиях клеток

В круглые кюветы для образца вносят по 3 мл полученной сконцентрированной суспензии клеток и записывают их спектр поглощения на спектрофотометре СФ-14. Содержание пигментов в суспензиях клеток выражают в относительных единицах оптической плотности: из величины оптической плотности в области максимума поглощения ($D_{\max}$) вычитают значение оптической плотности при 750 нм (D_{750}) — величину поглощения в неспецифической области. Для хлорофилла это составляет $\Delta D_{(678-750)}$, для каротиноидов — $\Delta D_{(496-750)}$, для фикоцианина — $\Delta D_{(626-750)}$. На одном бланке записывают по два спектра (неосвещенной и освещенной проб) каждого варианта. После первой записи на бланке отмечают все условия регистрации спектра поглощения неосвещенных проб, чтобы при снятии повторных спектров (освещенных образцов) соблюдать те же условия записи.

Оформление работы. Результаты представляют

виде таблицы (табл. 20). Подробно оформление задачи см. с. 13.

Таблица 20

Изменение содержания пигментов в суспензии клеток водоросли при освещении ($\Delta D^i = D_{\text{неосв.}} - D_{\text{осв.}}$)

Вариант опыта	Хлорофилл				Каротиноиды				Фикоцианин			
	D_{478}	D_{750}	ΔD	ΔD^i	D_{498}	D_{760}	ΔD	ΔD^i	D_{628}	D_{760}	ΔD	ΔD^i
контроль												
освещенная проба												
неосвещенная проба												
пыт												
освещенная проба												
неосвещенная проба												

Задача 4

ВЛИЯНИЕ ГЕТЕРОАУКСИНА, ГИББЕРЕЛЛИНА И КИНЕТИНА НА ПРОРАСТАНИЕ И СКОРОСТЬ РОСТА ПЫЛЬЦЫ

Цель работы: определить влияние гормонов на прорастание и скорость роста пыльцы.

Объект исследования: пыльца примулы, тюльпана, нарцисса.

Ход работы. Прорастание пыльцы ведется во влажной камере при комнатной температуре или в термостате при 20—25°. Влажная камера делается таким образом: на предметное стекло кладется стеклянное (с шлифованными краями), водостокное или парафиновое кольцо диаметром 10—12 мм и высотой 5—6 мм. Нижний и верхний края кольца смазывают вазелином. Сверху кольцо накрывают покровным стеклом, на внутреннюю сторону которого наносится капля одного из опытных растворов. Пыльцу берут мягкой кисточкой из зрелого треснувшего пыльника и высевают на по-

Верхность капли, сначала на контрольном варианте, а затем с интервалом 10—15 мин на опытных. Опыт проводится по следующей схеме:

1. Контрольный 10%-ный раствор сахарозы на 1%-ном агаре.
2. Гетероауксин 3—5 мг/л на контрольном растворе.
3. Гиббереллин 1 мг/л на контрольном растворе.
4. Кинетин 1 мг/л на контрольном растворе.

Для определения размера пыльцевой трубки и абсолютного прироста пользуются окулярным микрометром. Предварительно нужно определить цену деления микрометра. Через час предметное стекло с влажной камерой помещают на столлик микроскопа. Все наблюдения проводят при небольшом увеличении микроскопа. В нескольких участках поля зрения микроскопа исследуется не менее 100 пыльцевых зерен. Определяют количество проросших зерен в процентах. Затем измеряют длину 10 средних пыльцевых трубок. Вслед за контролем такие же измерения проводят на опытных вариантах. Подсчет и измерение во всех вариантах необходимо закончить в течение часа. Через час после первого измерения вновь учитывают количество проросших пыльцевых зерен и определяют длину 10 пыльцевых трубок.

Оформление работы. Полученные результаты записывают в тетрадь по следующей форме (табл. 21). Делают заключение об эффективности изучаемых гормонов. Подробно о порядке записи задачи см. с. 13.

Таблица 21

Вариант	Количество проросших пыльцевых зерен		Длина пыльцевой трубки		Скорость роста за 1 ч, мк
	через 1 ч	через 2 ч	через 1 ч	через 2 ч	

**ОНТОГЕНЕЗ РАСТЕНИЙ. СРАВНИТЕЛЬНОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ
ОРГАНОГЕНЕЗА ЭТИОЛИРОВАННЫХ И
ЗЕЛЕННЫХ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ**

Жизненный цикл (онтогенез) высшего растения — это жизнь растения с момента возникновения оплодотворенной яйцеклетки (зиготы) или возникновения зачаточной почки, дающей начало органам вегетативного размножения, до естественной смерти растительного организма. Существует несколько способов деления жизненного цикла на периоды:

1) два основных периода — формирование вегетативных органов растения и — формирование генеративных органов;

2) фенологические фазы развития и роста, характеризующиеся четко выраженными морфологическими изменениями — фазы прорастания семян, появление всходов, роста стебля, цветения, образования и созревания плодов и семян;

3) основные возрастные периоды, характеризующиеся переходами растения от ювенильного состояния к зрелости и затем к старению и смерти;

4) стадии развития, отражающие приспособительные изменения растений к условиям существования в онтогенезе. Смена условий внешней среды, необходимых для прохождения процесса индивидуального развития растения, характеризует основные различия стадий и переход от одной стадии к другой;

5) этапы формирования органов, или этапы органогенеза растений.

Все процессы, характеризующие различные периоды онтогенеза, протекают синхронно и взаимосвязаны. В организме растений в процессе индивидуального развития наряду с превращениями веществ и энергетическим обменом идут процессы превращения форм макро- и микроструктур, процессы изменения строения органов. Морфофизиология растений — наука о закономерностях орга-

ногенеза и изменчивости различных растений, и следующая форма и функции в их единстве.

Высшие растения образуют новые органы и новые побеги в течение всей жизни. В этом состоит разное и одна из существенных особенностей растений. Образование таких органов в разные периоды жизни обеспечивается наличием молодой, недифференцированной ткани — меристемы. Рост растений происходит как путем многократного образования одних и тех же органов — метаморфический рост, так и путем образования новых по форме и функции органов. Верхушечная меристема, являющаяся началом всем органам стеблевого происхождения и корневой системе, сконцентрирована в конусах нарастания, соответственно на верхушках стеблей и веток и в корневых окончаниях. Развитие новых органов в любом возрасте растения начинается всегда с небольшой группы инициальных, молодых, клеток. Формирующиеся из этих клеток новые органы каждый раз воспроизводят в своем строении основные характерные для данного вида признаки.

При всей специфичности формы, строения и морфогенеза, определяющих видовые и родственные признаки, для всех побегов покрытосеменных растений характерна определенная последовательность органообразовательных процессов. В жизненном цикле однолетних растений, так же как и в цикле развития двулетних, многолетних травянистых и древесных растений, установлено наличие двенадцати этапов органогенеза.

На I этапе происходит образование конуса нарастания из инициальных клеток промеристемы. В цитологическом и физиологическом отношении конус нарастания представляет собой первичную образовательную ткань — меристему. На II этапе происходит дифференцировка вегетативных органов растения, на III этапе — процесс дифференциации главной оси зачаточного соцветия. На IV—VIII этапах происходит закладка, формирование и рост генеративной сферы растения. IX этап — цветение, оплодотворение и образование зиготы. X—XII этапы — формирование и рост

семян, переход питательных веществ в запасные вещества в семена.

У бобовых растений конус нарастания обладает детерминированным типом развития, т. е. в процессе онтогенеза постоянно остается «молодым», давая начало побегам второго порядка, образуя соцветия. Конус нарастания располагается в верхушечной и боковых почках. Почки находятся у основания кроющих листьев. Показателем степени развития почки является емкость почки, т. е. число листьев, заложившихся в ней.

На стебле молодого бобового растения отчетливо видны два низовых листа, отличающихся формой от всех остальных листьев: это листовая пластинка с тремя зубцами. Основные листья бобовых растений имеют сложное строение, проявляющееся уже при их закладке в конусе нарастания. Поэтому у бобов зачаточные листья имеют форму пластинки с пятью зубцами, которая как бы обворачивает с одной стороны конус нарастания.

I и II этапы органогенеза характеризуются закладкой и дифференциацией вегетативных органов. В этот период в почке обнаруживается конус нарастания с одним-двумя зачаточными листочками. На III этапе в пазухе зачаточного листочка образуются конусы нарастания осей второго порядка, имеющие форму бугорка между листочками и основным конусом нарастания. В результате последующей дифференциации конусов нарастания I порядка образуются зачаточные соцветия (IV этап), затем цветки (V этап). На последующих этапах развития происходит образование плодов и семян.

С действием света на растения связан чрезвычайно широкий круг физиологических явлений, который, наряду с фотосинтезом, входит и незаменимый от него фотоморфогенетический контроль над ростом, развитием и органогенезом, растения. Большинство растений прорастает в темноте, и лишь затем стебель выходит через слой почвы на свет. До этого момента усиленно растет стебель (у злаков удлиняется мезокотиль), а листья почти

не увеличиваются. Действие света на проросток дает сигнал к существенной перестройке роста у злаков прекращается удлинение мезокотили и начинается рост листьев и стебля. У двудольных растений под действием света устраняется гипокотили (он облегчает проростку проникновение через почву без повреждения точки роста), тормозится рост стебля и начинается рост листьев.

Анализ спектра действия показал, что наибольшей фотоморфогенетической активностью обладает синий свет, красный и дальний красный. В большинстве случаев влияние света на рост и развитие связано с фитохромом — пигментной системой, поглощающей в длинноволновой области спектра.

Если после прорастания растение не получает света, то происходит дальнейшее удлинение междоузлий, формирование и рост листьев задерживаются, в них не образуется хлорофилл. В отсутствие света задерживается закладка генеративной сферы растения, и в конце концов оно погибает. Все процессы органогенеза резко тормозятся.

Цель работы: сравнительное исследование физиологических и органогенетических характеристик бобовых растений одного возраста, выращенных на свету и в темноте.

Объект исследования: 10—15-дневные проростки бобов сорта Русские черные, выращенные на свету или в темноте.

Ход работы. У проростков определяют сырую массу, длину надземной части, длину междоузлий, а также этапы органогенеза пазушных и верхушечной почек.

Определение этапов органогенеза проводят при помощи бинокулярного микроскопа и препаровальных игл. Проростки бобов, изолированные от семени, кладут на предметное стекло и сначала отделяют первый низовой лист, затем второй низовой лист, первый настоящий лист, второй и т. д. Отделять листья следует осторожно, подрезая ткань иглой в самом основании листа, но так, чтобы не повредить пазушные почки.

Оформление работы. Все результаты измерений заносят в таблицу (табл. 22) или представляют

Таблица 22

Физиологические характеристики зеленых (этиолированных) проростков бобов (произвести измерения на 5 растениях и найти средние величины)

Объект	№ определения	Сырая масса, г	Длина надземной части, см	Количество узлов	Длина междоузлий, см				
					1	2	3	4	5

в виде диаграмм. Следует определить количество почек в пазухе каждого листа, емкость каждой почки, этап органогенеза и внести данные в таблицу (табл. 23). Зарисовать первые пять этапов органогенеза.

Таблица 23

Морфофизиологические характеристики верхушечной и боковых почек зеленых (этиолированных) проростков бобов

№ листа	Количество почек	Емкость почки	Этап органогенеза
1-й низовой			
2-й низовой			
1-й настоящий			
2-й настоящий и т. д.			
Верхушечная почка			

ЛИТЕРАТУРА

- Кефели В. И. Рост растений. М., 1973.
 Куперман Ф. М. Морфофизиология растений. М., 1976.
 Либберт Э. Физиология растений. М., Мир, 1976, с. 344—381; 404—417; 458—487.
 Рубин Б. А. Курс физиологии растений. М., Высшая школа, 1976, с. 422—522.
 Сабинин Д. А. Физиология развития растений. М., 1963, с. 6—41.

ПРИЛОЖЕНИЯ

1. Порядок работы на фотоэлектроколориметре

Фотоэлектроколориметр — ФЭК позволяет определить оптическую плотность окрашенных растворов. Прибор работает по принципу оптической компенсации двух световых потоков путем изменения размеров диафрагмы.

Порядок работы на ФЭК-М. Перед работой необходимо проверить установку прибора. Для этого винтом правого барабана устанавливают нуль по красной шкале. После прогрева прибора в течение 15 мин включают гальванометр и проверяют установку стрелки на нуль с открытой шторкой. Если стрелка отклоняется, ее подводят к нулю винтами грубой и тонкой настройки, соединенными двумя круговыми клиньями, изменяющими интенсивность одного из световых потоков.

На пути правого и левого пучков света помещают кюветы с растворителем. Открывают шторку и включают необходимый для данного определения светофильтр. Вращением круговых фотометрических клиньев устанавливают стрелку гальванометра на нуль, затем гальванометр выключают. Вместо кюветы с растворителем на пути правого луча устанавливают кювету с раствором исследуемого вещества. Включают гальванометр сначала в 1-е, затем во 2-е положение чувствительности и последовательно подводят отклонившуюся стрелку к нулю с помощью винта правого барабана, изменяющего величину щели диафрагмы. По красной шкале правого барабана отмечают значение оптической плотности, соответствующее максимальной чувствительности гальванометра. Измерение оптической плотности повторяют 3 раза, проверяя каждый раз установку прибора на нуль при пропускании лучей через кюветы с чистым растворителем.

Определение оптической плотности растворов на фотоэлектроколориметре связано с использованием различных светофильтров, пропускающих лучи довольно широкой области спектра. Выбор светофильтра обусловлен спектральными характеристиками пигмента. Свет, проходящий через систе-

фильтр, должен соответствовать интервалу длин волн, поглощаемых определенным веществом.

Порядок работы на ФЭК-56-М. Установить руль на обоих барабанах прибора. При закрытой шторке установить стрелку гальванометра на нуль ручкой «нуль» (слева). Поместить в левую кассету кювету с растворителем, а в правую, двойную, — две кюветы: в левое гнездо — кювету с рабочим раствором, в правое — кювету с растворителем. Открыть шторку и левым барабаном поставить стрелку гальванометра на нуль, уравнивать растворитель-контроль с рабочим раствором. Перевести правую кассету (ручка над правым барабаном) в положение «растворитель-растворитель» и правым барабаном установить стрелку гальванометра на нуль. Величина оптической плотности раствора отсчитывается по красной шкале правого барабана.

II. Приготовление реактивов

(Раздел «Минеральное питание», задача № 1, метод Любошинского и Зальта)

1. Фосфатная буферная смесь (рН 12). К 5,0 мл 0,1 М Na_2HPO_4 добавляют 4,32 мл 0,1 М NaOH и 0,68 мл H_2O . Для приготовления буферных растворов $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ дважды перекристаллизуют из воды и высушивают при 37° или в эксикаторе над хлористым кальцием до постоянной массы. Приготавливают раствор NaOH , лишенный Na_2CO_3 . Для этого растворяют 50 г NaOH в 50 г воды, переливают в узкий цилиндр, плотно закрывают и оставляют на несколько дней. В крепком растворе щелочи карбонаты нерастворимы. После осаждения берут сифоном (сверху) прозрачный раствор и готовят из него раствор нужной концентрации, проверяя титрованием соляной кислотой.

2. Фенолят натрия — $\text{C}_6\text{H}_5\text{ONa}$. 5 г перегнанного фенола и 2,5 г NaOH растворяют в 100 мл воды.

3. Гипохлорит натрия NaOCl (4%-ный по хлору). 100 г хлорной извести растворяют в 170 мл воды при сильном перемешивании в течение 15 мин (часть вещества остается нерастворенной). Прили-

вают раствор Na_2CO_3 (70 г в 170 мл воды) и тщательно перемешивают. Сначала смесь застывает, потом превращается в молочно-белую жидкость. Ее фильтруют при отсасывании через два слоя полотна, положенного в воронку Бюхнера, затем через стеклянный фильтр № 3. Получают прозрачный зеленоватый раствор гипохлорита натрия. Определяют концентрацию его путем титрования тиосульфатом натрия. Раствор не должен содержать кальция, что проверяется реакцией с щавелевокислым аммонием.

СОДЕРЖАНИЕ

Раздел I. Физиология растительной клетки (Потапов Н. Г., Тукеева М. И.)	4
<i>Задача 1.</i> Движение протоплазмы	7
<i>Задача 2.</i> Вязкость протоплазмы	14
<i>Задача 3.</i> Проницаемость клеточных мембран	16
<i>Задача 4.</i> Влияние изменения температуры на проницаемость клеточных мембран	24
Литература	33
Раздел II. Фотосинтез (Гавриленко В. Ф., Таймалв Э. А.)	34
<i>Задача 1.</i> Определение содержания основных пигментов фотосинтетического аппарата в листьях высших растений	44
<i>Задача 2.</i> Определение оптических и химических свойств хлорофилла	47
<i>Задача 3.</i> Сравнение качественного состава пигментов эукариотных и прокариотных растений	51
<i>Задача 4.</i> Разделение пигментов методом хроматографии на бумаге (по Д. И. Сапожникову) и количественное определение основных каротиноидов зеленого листа	53
<i>Задача 5.</i> Определение интенсивности фотосинтеза	55
<i>Задача 6.</i> Определение фотохимической активности хлоропластов	59
<i>Задача 7.</i> Определение фотосинтетического фосфорилирования	68
Литература	74
Раздел III. Дыхание (Хандобина Л. М.)	75
<i>Задача 1.</i> Исследование интенсивности поглощения кислорода разными растениями	77
<i>Задача 2.</i> Многообразие путей окисления дыхательного субстрата	86
<i>Задача 3.</i> Ферментные системы дыхания	91
<i>Задача 4.</i> Альтернативные пути терминального окисления	102
<i>Задача 5.</i> Исследование степени сопряженности процессов окисления и фосфорилирования	106
<i>Задача 6.</i> Адаптированное к темноте и послесветовое дыхание синезеленой водоросли <i>Anabaena variabilis</i>	110
Литература	120
Раздел IV. Минеральное питание (поглощение веществ) (Маркарова Е. Н.)	122
<i>Задача 1.</i> Поглощение аммония растениями в разных условиях кислотности среды	130
<i>Задача 2.</i> Поглощение ионов калия культурой <i>Anabaena variabilis</i>	135
Литература	141

Раздел V. Водный режим растений (Власова Т. А.)	142
Задача 1. Определение относительной активности воды в растении методом потери воды	144
Задача 2. Определение водного потенциала растения психометрическим методом	147
Задача 3. Определение поглощения воды растением потометрическим методом	153
Задача 4. Определение интенсивности транспирации и транспирирующей поверхности листа	159
Литература	166
Раздел VI. Рост и развитие растений (Казакова А. С.)	167
Задача 1. Основные закономерности роста растений	169
Задача 2. Изучение влияния ростовых веществ на рост coleoptилей злаков	172
Задача 3. Влияние неблагоприятных факторов внешней среды на выживание сине-зеленой водоросли <i>Anabaena variabilis</i>	177
Задача 4. Влияние гетероауксина, гиббереллина и кинетина на прорастание и скорость роста пыльцы	181
Задача 5. Онтогенез растений. Сравнительное исследование процессов органогенеза этиолированных и зеленых бобовых растений	183
Литература	187
Приложения	188

МАЛЫЙ ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Заведующая редакцией Н. М. Глазкова. Редактор Г. М. Полехова. Художественный редактор М. Ф. Евстафиева. Обложка художника Л. А. Бабаджанян. Технический редактор Т. Е. Светличная. Корректоры Л. А. Айдарбекова, С. Ф. Будаева

Тематический план 1982 г. № 159
ИБ № 1324

Сдано в набор 24.12.81 Подписано к печати 16.05.82. Л-М0091. Формат 84×108^{1/32}. Бумага тип. № 1. Гарнитура Литературная. Высокая печать Усл. печ. л. 10,08 Уч.-изд. л. 8,71 Тираж 15540 экз. Заказ 313 Цена 45 к. Изд. № 1785.

Ордена «Знак Почета» издательство Московского университета
103009, Москва, ул. Герцена, 5/7.
Типография ордена «Знак Почета» изд-ва МГУ.
Москва, Ленинские горы