

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Національний авіаційний університет

АНАТОМІЯ ТА ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

Лабораторний практикум
для студентів напрямку підготовки
6.051401 «Біотехнологія»

VIVERE!
VINCERE!
CREARE!

Київ 2016

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Національний авіаційний університет

АНАТОМІЯ ТА ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

Лабораторний практикум
для студентів напряму підготовки
6.051401 «Біотехнологія»

Київ 2016

УДК 581.1.4(076.5)
ББК Е 573я7
А 643

Укладачі : *О. М. Ковальов, С. І. Тарасюк, А. В. Дразнікова*

Рецензент *Т. І. Білик*

Затверджено методично-редакційною радою Національного авіаційного університету (протокол № 6/15 від 17.12.2015 р.).

Анатомія та фізіологія рослин : лабораторний практикум /
А 643 уклад. : О. М. Ковальов, С. І. Тарасюк, А. В. Дразнікова. – К. : НАУ,
2016. – 52 с.

Наведено методики виконання лабораторних робіт з курсу «Анатомія та фізіологія рослин» та коротке теоретичне обґрунтування кожного дослідження. Містить запитання для самоперевірки з теорії та практичної частини.
Для студентів напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія».



ВСТУП

Основною метою лабораторного практикуму «Анатомія та фізіологія рослин» є ознайомлення студентів із сучасними методами досліджень, закріплення теоретичних знань студентів та формування практичних умінь і навичок на основі застосування досягнень науки.

Практикум містить порядок виконання лабораторних робіт. Під час виконання запропонованих дослідів студенти опановують методи експериментальних досліджень, набувають уміння аналізувати отримані результати. Окремий розділ стосується правил техніки безпеки під час роботи в лабораторії. Наведено список літератури.

Структура практикуму відповідає затвердженій робочій навчальній програмі дисципліни «Анатомія та фізіологія рослин», яка складається з одного модуля та вміщує вісім лабораторних робіт.

У лабораторних роботах викладено принцип методу, вказано основні матеріали, реактиви та обладнання, розписано порядок виконання роботи, запропоновано запитання, відповіді на які потребують аналітичного мислення від виконавців та допомагають пояснити отримані результати, що має важливе значення для підготовки студентів до самостійного виконання наукових робіт.



ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

1. У лабораторії повинні бути в наявності протипожежні засоби (вогнегасник, пісок, вода), аптечка для надання першої медичної допомоги та засоби особистого захисту (гумові рукавички, захисні окуляри та ін.).

2. У лабораторії заборонено вживати їжу, палити.

3. Працювати слід у спецодязі (халатах). Під час роботи з великими об'ємами концентрованих кислот та при їх наливанні доцільно додатково використовувати захисні окуляри.

4. Після роботи з реактивами потрібно вимити руки, а після роботи з токсичними сполуками – вимити руки, почистити зуби, промити ротову порожнину, змінити одяг.

5. Під час роботи з реактивами не можна торкатися обличчя, очей та відкритих ділянок шкіри.

6. Роботи, пов'язані з виділенням газів, мають проводитись лише під витяжною шафою.

7. Заборонено пробувати реактиви на смак, вдихати леткі речовини – вони можуть бути отруйними.

8. Відбирати розчини потрібно лише піпетками, використовуючи спеціальні пристосування з гумовими грушами або дозаторами.

9. Для приготування розчинів речовини треба відбирати шпателем, кількісно переносити їх у мірні стакани чи колби. Готові реактиви повинні зберігатися в закритому посуді з етикетками, на яких позначено назву, формулу сполуки, концентрацію та дату приготування.

10. Перед проведенням досліджень необхідно ретельно вивчити методику та підготувати робоче місце, знати лабораторний посуд та обладнання (див. додаток).

11. Перед використанням приладів потрібно детально ознайомитися з інструкцією.

12. Необхідно дотримуватись правил техніки безпеки під час роботи з електроприладами та обладнанням.

13. У разі потрапляння на шкіру кислот чи лугів уражені ділянки потрібно негайно промити великою кількістю (струменем) води.

Лабораторна робота 1

БУДОВА РОСЛИННОЇ КЛІТИНИ

Мета роботи: визначити морфологічні та функціональні особливості органел рослинної клітини.

Завдання

1. Засвоїти правила роботи з мікроскопом.
2. Визначити загальну структуру рослинної клітини, а також розташування і морфологію органел.
3. Приготувати препарати для вивчення будови рослинної клітини.
4. Проаналізувати морфологічні особливості вакуолей, пластидів, клітинних включень при мікроскопуванні препаратів рослин.

Основні теоретичні відомості

Структурною та функціональною одиницею рослинного організму, як і інших живих істот, є клітина. Вперше цей термін запропонував у 1665 р. англійський учений Роберт Гук, який вивчав під мікроскопом структуру корка. Пізніше, вже у XIX ст., німецькі вчені – гістолог Т. Шванн і ботанік М. Шлейден запропонували загальну біологічну концепцію клітинної теорії, згідно з якою основною одиницею структури і функції всіх організмів є клітина.

За сучасним уявленням, *клітина* – це основна структурно-функціональна одиниця всіх живих організмів, елементарна жива система.

Для визначення живого вмісту клітин англійський учений Р. Броун увів поняття «ядро» (1831), чеський біолог Я. Пуркінє – «протоплазма» (1840), а німецький ботанік Е. Страсбургер – поняття «цитоплазма» (1882).

Цитоплазма, яка в більшості клітин заповнює весь внутрішній простір, містить ряд органел і різноманітні розчинені речовини.

Усі рослинні клітини можна розділити на дві групи: ті, що забезпечують метаболізм, та ті, які не мають метаболічної активності.

Найактивнішими є клітини паренхіми, частка яких становить майже 80 % усіх клітин рослинного організму. Кожна жива клітина насправді є самовідтворювальною системою, оточеною плазматичною мембраною (*плазмолемою*), що контролює транспортування речовин та забезпечує структурну і біохімічну відособленість клітини. Регулюючи обмін між внутрішнім і навколишнім середовищем, вона забезпечує стабільність (гомеостаз) системи.

Обладнання, прилади та матеріали: рослини: традесканція (*Tradescantia*) або рео (*Rhoeo*), стрілолист (*Sagittaria*), цинія (*Zinnia*), сансеварія (*Sanseveria*), бегонія (*Begonia*), червоний та зелений перець, цибуля біла та червона, препарат голки сосни, предметні та покривні скельця, мікроскоп, скальпель, дистильована вода.

Порядок виконання роботи

Засвоєння правил роботи з мікроскопом

1. Мікроскоп поставити на відстані 3–4 см від краю стола так, щоб окуляр знаходився проти лівого ока.
2. Об'єктив 8× перевести у робоче положення на відстань 1 см від предметного столика.
3. За допомогою гвинта підняти конденсор у крайнє верхнє положення.
4. Відкрити ірисову діафрагму (важіль переводять за годинниковою стрілкою впритул).
5. Навести дзеркало на джерело світла (природне або штучне). Одночасно лівим оком подивитися в окуляр, а дзеркало повернути в той чи інший бік до тих пір, доки не буде рівномірно та інтенсивно освітлене поле зору.
6. На предметний столик покласти мікропрепарат (постійний або тимчасовий) так, щоб досліджуваній об'єкт знаходився під об'єктивом.
7. Дивлячись збоку, за допомогою кремальєри опустити об'єктив 8× так, щоб між ним і препаратом була відстань 4–5 мм.
8. Лівим оком подивитися в окуляр і одночасно кремальєрою (її повернути на себе) підняти об'єктив 8× до положення, при якому видно чітке зображення досліджуваного об'єкта.
9. Чіткішого зображення об'єкта можна домогтися, повертаючи від себе або до себе мікрометричний гвинт (до півоберта в один бік).
10. Для дослідження об'єкта при великому збільшенні об'єктив 40× перевести в робоче положення і за допомогою мікрометричного гвинта досягти його чіткого зображення. Якщо зображення об'єкта в окулярі при об'єктиві 40× не видно, то в робоче положення необхідно перевести об'єктив 8× і повторити операції пунктів 7–9.
11. Підготовлений мікроскоп (у робочому положенні) переміщати на столі не дозволяється.

Завдання: замалювати мікроскоп відповідно до рис. 1.1, підписуючи всі його частини та характеризуючи їх функції.

Загальні закономірності будови рослинної клітини

Поява електронного мікроскопа дала змогу з'ясувати ультраструктурну організацію клітини.

Характерною ознакою структури рослинної клітини є наявність клітинної оболонки, пластид, центральної вакуолі та відсутність центріолей у процесі їх поділу. Як і всі еукаріоти, вона має також ядро з ядерцем, ендоплазматичний ретикулум, мікротільця, апарат Гольджі, рибосоми, цитоскелет – мікротрубочки та мікрфіламенти.

Крім того, у клітині є ергастичні речовини: кристали, антоціани, таніни, крохмальні зерна, жири, олії, воски, білкові тільця.

У рослинній клітині можна виділити три важливі компартменти: клітинну оболонку, протопласт, вакуоля.

Завдання: замалювати будову рослинної клітини відповідно до рис. 1.2, підписуючи всі структурні компоненти і органели та характеризуючи їх будову й функції.

Рух цитоплазми у рослинних клітинах

Усім рослинним клітинам притаманний рух цитоплазми. Однак швидкість руху в різних клітинах неоднакова і часом настільки мала, що переміщення цитоплазми можна спостерігати не в усіх клітинах. Крім того, цитоплазма безбарвна, тому її рух визначають за переміщенням органел та включень.

На швидкість руху цитоплазми впливають різноманітні фактори. Так, швидкість збільшується під дією світла, за підвищеної температури, а також у разі пошкодження сусідніх клітин. Рух цитоплазми сприяє транспорту речовин у клітині. Однак до кінця це явище не вивчене.

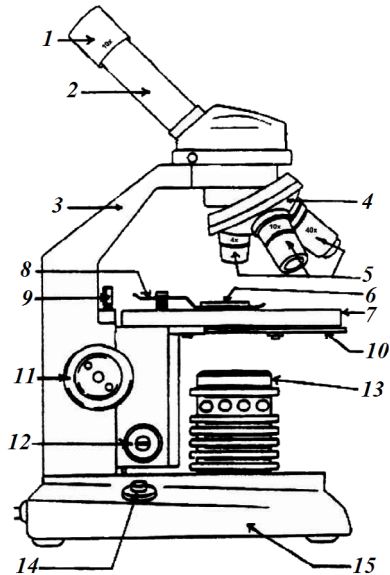


Рис. 1.1. Схема світлового мікроскопа

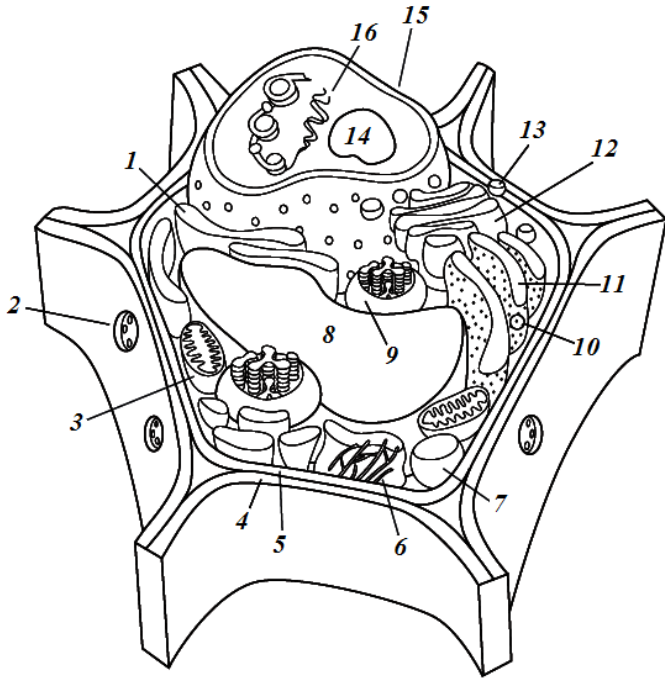


Рис. 1.2. Схема будови рослинної клітини

Завдання: зняти тичинки з квітки традесканції (*Tradescantia*) або рео (*Rhoeo*) (епідерміс цибулі може бути використаний замість тичинок квітів). Зверніть увагу на дрібні білі волоски на філаментах. Зняти пильовик і приготувати препарат філаментів за технікою «роздавлена крапля» (рис. 1.3). Дослідити волоски на філаментах за допомогою мікроскопа.



Рис. 1.3. Приготування препарату «роздавлена крапля»

На предметне скельце кладуть досліджуваний об'єкт, додають декілька крапель дистильованої води та обережно накривають покривним скельцем. Надлишок води, що виходить за межі скельця, видаляють фільтрувальним папером.

Кожна волосинка тичинки складається із сукупності клітин. Необхідно сфокусуватись на одній клітині і звернути увагу на велике *ядро*. Якщо ретельно обстежити цитоплазму, можна побачити маленькі частинки, які рухаються в *цитоплазматичному потоці*. Рух цитоплазми відбувається завдяки тим самим білкам, які відповідають за рух м'язів (*актин* і *міозин*). Рухливі частинки вкриті міозином, який рухає їх уздовж волокон актину з використанням енергії АТФ.

Пластиди

Пластиди – це клітинні органели, у яких синтезуються та запасуються органічні речовини. До пластид належать: протопласти, хлоропласти, хромопласти, лейкопласти, амілопласти.

Протопласти – це дрібні (до 1 мкм), різноманітні за формою, обмежені двома мембранами, недиференційовані пластиди, що містяться в меристемі клітин кореня, пагона і є попередниками більш диференційованих хлоропластів, хромопластів і лейкопластів.

Хлоропласти – функціонально спеціалізовані пластиди, що містять пігмент хлорофіл, завдяки якому відбувається фотосинтез. Хлоропласти вищих рослин мають форму двоопуклої лінзи (диска), яка є найбільш зручною для поглинання сонячних променів. У клітинах стовпчастої паренхіми знаходяться 30–40 хлоропластів, у губчастій – біля 20. На 1 см² поверхні листа припадає приблизно 200 см² поверхні хлоропластів.

Будова хлоропласту, вивчена за допомогою електронного мікроскопа, є досить складною. Хлоропласт оточений оболонкою, що складається з двох ліпопротеїдних мембран. Внутрішнє середовище являє собою сильно обводнений білковий матрикс, або *stroma*, яку пронизують мембрани – *ламели*. Зв'язані між собою ламели утворюють *тилакоїди*. Щільно прилягаючи одне до одного, тилакоїди формують *грані*, які можна побачити навіть під світловим мікроскопом. Пігменти, що беруть участь в уловлюванні енергії світла, вмонтовані в мембрани тилакоїдів. Саме тут відбувається перетворення світлової енергії в хімічну. Ферменти, що каталізують численні реакції темної фази фотосинтезу, а також різноманітні біосинтези, у тому числі біосинтези білку, ліпоїдів, крохмалю, знаходяться в стромі.

Завдання: приготувати препарат «роздавлена крапля» мезофілу листка цинії (*Zinnia*) та ідентифікувати дископодібні хлоропласти за допомогою світлового мікроскопа, визначити їх кількість в одній клітині.

Замалювати будову хлоропласту відповідно до рис. 1.4 та підписати його структурні компоненти.

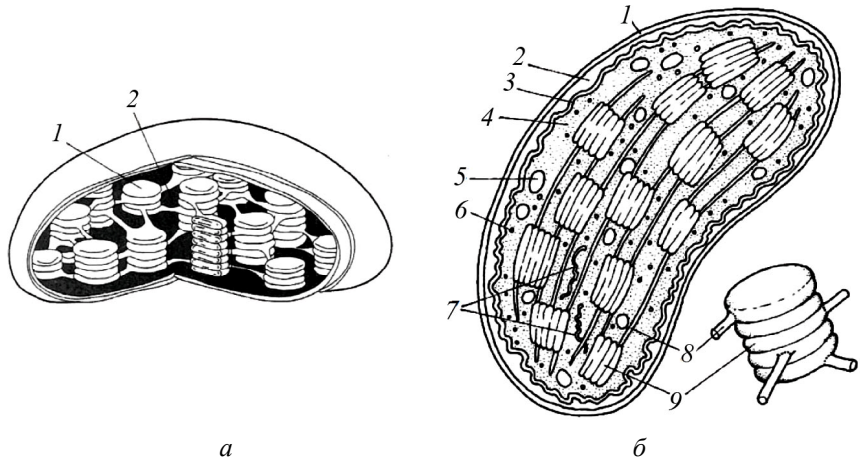


Рис. 1.4. Будова хлоропласту: *а* – загальний вигляд; *б* – поперечний розріз

Хромoplastи – нефотосинтезуючі забарвлені пластиди, які містять переважно червоні, помаранчеві й жовті пігменти. Вони, як правило, розвиваються з хлоропластів, мають приблизно такі самі розміри та форму, досить схожі й за структурою. Однак замість системи фотосинтетичних мембран у них є структури, багаті на каротиноїди – гідрофобні (жиророзчинні) пігменти.

Завдання: приготувати препарати червоного та зеленого перцю за технікою «роздавлена крапля». Ідентифікувати хромопласти та хлоропласти червоного та зеленого перцю відповідно.

Лейкопласти – це найдрібніші безбарвні пластиди неоднакової форми та з різними функціями. Лейкопласти найбільше трапляються в клітинах меристем конуса наростання кореня, клітинах бульб, кореневища, епідермі листків. Внутрішня мембрана формує подинки тилакоїди. Лейкопласти, у яких синтезується і відкладається крохмаль у незелених частинах рослин, називають *амілопластами*, рослинні олії – *олеопластами*, білки – *протеїнопластами*.

Амілопласти – це зрілі пластиди, вміст яких майже повністю складається з крохмальних зерен. Амілопласти є в запасних тканинах та органах, а саме: сім'ядолі, ендоспермі, бульбі, а також у кореневому чохлаку. Амілопласти здійснюють синтез крохмалю із сахарози, що надходить до них із фотосинтезуючих органів.

Крохмаль відкладається про запас з наступним використанням його в разі потреби, наприклад при проростанні насіння. В кореневому чохлаку функція амілопластів зовсім інша. Вона пов'язана зі сприйняттям гравітації.

Завдання: приготувати препарат «роздавлена крапля» зрілого зародка рослини стрілолиста (*Sagittaria*) та ідентифікувати крохмальні зерна за допомогою світлового мікроскопа. Кожен амілопласт містить декілька крохмальних зерен, однак, оболонка органел зазвичай не виявляється за допомогою світлового мікроскопа.

Вакуоля

Вакуоля – компартмент усередині протопласта, що заповнений водним розчином (клітинним соком) і відокремлений від цитоплазми власною мембраною – *тонопластом*.

У клітинах різних тканин рослин вакуолярний сік за хімічним складом неоднаковий. Концентрація розчинених речовин досягає 0,4–0,6 М. До його складу входять неорганічні солі (натрій, калій, кальцій, магній, хлор, залишки SO_4^{2-} , PO_4^{3-}), вуглеводи, органічні кислоти, фенольні сполуки (флаваноїди в пелюстках квітів), пігменти (антоціани), азотисті сполуки, білки, в тому числі деякі ферменти, таніни, алкалоїди. В деяких вакуолях можуть бути нерозчинні сполуки (кристали, аморфні відклади).

Вакуолі виконують опорну функцію, створюючи тургор, функцію запасання або накопичення відходів роботи цитоплазми. Осмотичні властивості клітини залежать від концентрації вакуолярного соку.

Завдання: приготувати препарат епідермісу червоної цибулі або листка традесканції (*Tradescantia*) та дослідити його під мікроскопом. Ідентифікувати червоно-фіолетові пігменти – антоціани (водорозчинні), що знаходяться у вакуолі.

Вакуолі деяких клітин здатні акумулювати фенольні сполуки, які називаються *танінами*. Ці речовини формують комплекси з білками та допомагають захищати рослини від комах та патогенів.

Розглянути під мікроскопом готовий препарат голки сосни та ідентифікувати забарвлені в червоний колір клітини, що містять таніни.

Кристали в цитозолі – це, як правило, нерозчинні солі кальцію, особливо щавлевокислий кальцій (оксалат кальцію). Він утворюється в результаті зв'язування кальцієм надлишку щавлевої кислоти, яка накопичується у вакуолях в процесі метаболізму клітини. Оксалат кальцію може відкладатися у вигляді одиночних кристалів (зовнішні луски цибулі), зростків кристалів – *друз* (листя бегонії), пучків голчастих кристалів – *рафід* (алоє) або кристалічного піску (листя помідорів, бузини). Найчастіше в рослинах трапляються друзи. Рафіди характерні тільки для однодольних. Припускають, що кристали оксалату кальцію відіграють захисну функцію, оскільки надають жорсткості рослинам, перешкоджаючи поїданню їх тваринами.

Кристалічні включення найкраще видно під мікроскопом при поляризованому світлі. Використовуючи поляризуючі фільтри, досліджують препарати сансеварії (*Sanseveria*) і бегонії (*Begonia*) та ідентифікують відповідно рафіди та друзи.

Обробка експериментальних даних

Замалювати або сфотографувати результати мікроскопічних досліджень. Підписати назви препаратів та компоненти рослинної клітини, позначивши при цьому загальне збільшення мікроскопа.

Аналіз отриманих результатів

Проаналізувати морфологічні та функціональні особливості пластидів, вакуолей та клітинних включень в еволюційному аспекті.

Запитання для самоперевірки

1. Які основні системи світлового мікроскопа? Яке їхнє призначення?
2. Як визначити збільшення мікроскопа, на якому вивчається об'єкт?
3. Що відносять до оптичної системи світлового мікроскопа?
4. Що відносять до механічної системи світлового мікроскопа?
5. Що відносять до освітлювальної системи світлового мікроскопа?
6. Для чого використовують кедрову олію під час мікроскопічних досліджень?
7. Які правила роботи зі світловим мікроскопом?
8. Чим відрізняється будова прокаріотичних клітин від еукаріотичних?
9. Які одномембранні органели є в клітинах еукаріотів?

10. Які двомембранні органели є в клітинах еукаріотів?
11. Яка будова та функції пластидів?
12. Яке значення має рух цитоплазми в рослинних клітинах?
13. Які функції виконує вакуоля в рослинних клітинах?
14. Яке значення мають кристали оксалату кальцію в клітинному соку?

Література: [1]; [3]; [4].

Лабораторна робота 2

БУДОВА КЛІТИННОЇ ОБОЛОНКИ

Мета роботи: ознайомитися з будовою, функціями та хімічним складом клітинної оболонки.

Завдання

1. Приготувати препарати деревини сосни та плода груші для визначення будови клітинної оболонки.
2. Провести якісний аналіз речовин клітинної оболонки.

Основні теоретичні відомості

У рослинній клітині можна виділити три важливі компартменти: клітинну оболонку, протопласт, вакуолю. У вищих рослин клітинна оболонка має три шари: серединна пластинка, первинна та вторинна оболонки.

У процесі поділу клітини на стадії телофази першою утворюється так звана *серединна пластинка*. Вона скріплює оболонки сусідніх дочірніх клітин і складається із клейких, драглистих пектинових речовин.

У молодих клітин наступний шар целюлозної оболонки, який відкладається протопластами сусідніх клітин з обох боків серединної пластинки, називають *первинною клітинною оболонкою*. Вона досягає товщини від 0,1 до 1 мкм та складається із целюлозних мікро- і макрофібрил, занурених у матрикс. Кожна мікрофібрила має довжину 1–5 мкм, діаметр 4–10 нм і складається з багатьох целюлозних ланцюжків, з'єднаних між собою водневими зв'язками. Мікрофібрили об'єднуються в макрофібрили і разом формують каркас клітинної оболонки, занурений у матрикс. Матрикс складається з полісахаридів – пектинів, геміцелюлоз і білка.

Під час формування *вторинної клітинної оболонки* на первинну оболонку накладається багато вторинних шарів, уміст целюлози досягає 60 %, у матриксі з'являються різні включення – *лігнін, суберин, кутин, віск* тощо. Цим досягається значна міцність і твердість вторинної оболонки, вона втрачає еластичність, а клітина – здатність до подальшого росту. Головний компонент жорсткої оболонки – лігнін, присутність якого типова для вторинних стінок клітин деревини. Лігнін скріплює целюлозні волокна й утримує їх у певному місці. Суберин у поєднанні з воском спричиняє опробковіння клітинної оболонки, що знижує її проникність. Кутин формує кутикулярний шар назовні стінки, завдяки чому вона стає майже непроникною.

Клітинна оболонка забезпечує окремим клітинам і рослині в цілому механічну міцність і опору. Вона визначає розмір, форму та стабільність рослинної клітини, захищає протоплазматичну мембрану від руйнування в разі дії гідростатичного тиску, що формується всередині клітини. Клітинна оболонка є протиінфекційним бар'єром, бере участь у поглинанні, транспортуванні та виділенні речовин.

Обладнання, прилади та матеріали: плід груші; шматочки деревини сосни (*Pinus sylvestris*), за кілька днів до заняття прокип'ячені у воді впродовж 4–6 год і залиті сумішшю однакових об'ємів гліцерину і спирту; волоски бавовнику; одно- або дворічні стебла дерева; гербарні зразки осик і хвощів, шматочки газетного та фільтрувального паперу, шматочки пробки – покривної тканини дуба пробкового, хлор-цинк-йод, флороглюцин, соляна та сірчана кислоти, сульфат аніліну, судан III, гліцерин, спиртівка, слюда, предметні та покривні скельця, мікроскоп.

Порядок виконання роботи

Будова клітинної оболонки деревини сосни та плода груші

Деревина сосни

Виготовляти препарат деревини сосни потрібно осторонь від мікроскопа, оскільки пари соляної та сірчаної кислот псують оптику. При цьому необхідно дотримуватися такої послідовності операцій: зробити тангенціальний і радіальний зрізи, покласти їх на предметне скло в краплю флороглюцину, через 5–10 с фільтрувальним папером видалити

залишки реактиву і нанести на зрізи по краплі соляної кислоти, залишити її там упродовж 10–15 с, поки не з'явиться інтенсивне червоне забарвлення, а потім кислоту зняти фільтрувальним папером.

Після цього на зрізи нанести по краплі гліцерину і накрити покривними скельцями. Для прискорення роботи можна користуватися постійними препаратами. Спочатку вивчити тангенціальний зріз. При малому збільшенні знайти тонке місце, де добре видно клітини. Деревина сосни складається переважно з прозенхімних мертвих клітин-трахеїд, що виконують провідну функцію. Стінки їх містять лігнін, що надає їм міцності. При великому збільшенні на стінці клітини знаходять облямовані пори в розрізі (вид збоку). Вторинна стінка ніби підводиться над замикаючою плівкою пори, внаслідок чого пара облямованих пор має обрис двоопуклої лінзи. Звернути увагу на те, що середня частина замикальної плівки пори потовщена. Це потовщення називають торусом. Завдяки еластичності замикальної плівки торус може притискатися до одного з отворів пори і закривати його.

Потім розглянути при великому збільшенні радіальний зріз. На ньому облямовані пори видно в плані (вид зверху) у вигляді двох концентричних кіл з діаметрами, відповідними найбільшому і найменшому діаметрам порового каналу.

Плід груші

Скальпелем відрізати тонкий шар із плода груші, покласти його на предметне скельце та додати кілька крапель флороглюцину з соляною кислотою. Накрити покривним скельцем та обережно надавити. Препарат досліджують під мікроскопом. Флороглюцин реагує з лігніном, забарвлюючи в червоний колір тільки клітини з вторинною клітинною оболонкою. Клітини, що залишились незабарвленими, мають тільки первинну клітинну оболонку (рис. 2.1).

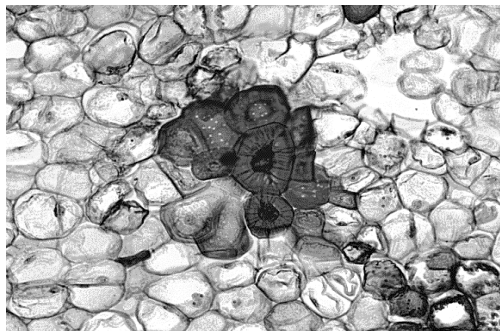


Рис. 2.1. Клітини плода груші з первинною та вторинною оболонками

Якісний аналіз речовин клітинної оболонки

1. Спочатку провести кольорову реакцію на целюлозу. Підготувати два препарати з волосків епідерми насіння бавовнику: один у краплі води, а інший у краплі хлор-цинк-йоду. Розглянути їх при великому збільшенні. Під дією реактиву целюлозна оболонка забарвлюється в синьо-фіолетовий колір. Хлор-цинк-йод – реактив для визначення целюлози (клітковини).

2. Потім підготувати препарат поперечного зрізу стебла деревної рослини у краплі води. При малому збільшенні знайти тонке місце на зрізі і розглянути його при великому збільшенні.

3. Переконавшись, що стінки всіх клітин мають однаковий сіруватий відтінок. Після цього зняти покривне скло, видалити фільтрувальним папером воду і нанести на препарат флороглюцин із соляною кислотою, дотримуючись при цьому послідовності операцій і необхідних заходів, зазначених у попередній темі. У результаті реакції оболонки клітин, що містять багато лігніну, тобто сильно здерев'янілі, набувають вишнево-червоного забарвлення, слабо здерев'янілі – рожевого, а нездерев'янілі – не змінюють колір. Цим же реактивом можна подіяти на волоски насіння бавовнику. Колір оболонки клітини не зміниться. Отже, флороглюцин з концентрованою соляною кислотою є реактивом на лігнін.

Інший реактив на лігнін – розчин сульфату аніліна, під дією якого здерев'янілі стінки стають лимонно-жовтими.

4. Капнувши реактивами хлор-цинк-йодом і флороглюцином із соляною кислотою на шматочки фільтрувального і газетного паперу, зробити висновок про їхній хімічний склад.

На внутрішній поверхні стінок клітин покривної тканини пробки відкладається суберин, унаслідок чого відбувається опробковіння. Для визначення наявності в клітинах суберина підготувати препарати пробки в краплі води і краплі барвника судан III. При великому збільшенні видно, що опробковіння стінки клітин забарвлюється суданом III в оранжево-червоний колір.

5. Ознайомитися з мінералізацією клітинної стінки на листках і стеблах гербарійних або живих зразків осок і хвощів. Стінки зовнішніх клітин цих рослин інкрустовані сполуками кремнію.

Це можна встановити, провівши пальцями по їх листках і стеблах, відчувши при цьому, що мінералізовані стінки клітин набули ріжучих властивостей.

6. Виявити сполуки кремнію в стінках клітин, виготовивши сподограми. Для цього зняти епідерму зі стебла хвоща, покласти її на шматочок слюди і прожарити на спиртівці.

Органічні речовини вигорять, залишається лише кремінний скелет стінок клітин. Розглянути його під мікроскопом.

Обробка експериментальних даних

Замалювати або сфотографувати результати мікроскопічного дослідження. Підписати назви препаратів або досліджувані компоненти клітинної оболонки, позначивши при цьому загальне збільшення мікроскопа та використані барвники.

Аналіз отриманих результатів

Проаналізувати роль ускладнення будови клітинної оболонки та хімічного складу рослинних клітин в еволюційному аспекті та визначити вплив інших організмів на функції клітинної оболонки.

Запитання для самоперевірки

1. У чому відмінність клітинної оболонки від мембрани цитоплазми?
2. Як за структурою і хімічним складом розрізняють первинну і вторинну оболонки клітини?
3. Яка відмінність між поняттями «пора» та «перфорація»?
4. У чому відмінність простих пор від окаймованих?
5. Які зміни можуть відбуватися в хімічному складі целюлозної клітинної оболонки і як це позначається на її фізичних властивостях?
6. Яке значення лігнізації оболонок клітин в еволюції рослин?
7. За допомогою яких реактивів і барвників можна виявити речовини, що входять до складу оболонки клітини?
8. Чому при обробкуванні оболонок вміст клітин відмирає?

Література: [1]; [3]; [5].

Лабораторна робота 3

ЯВИЩЕ ПЛАЗМОЛІЗУ ТА ДЕПЛАЗМОЛІЗУ В РОСЛИННИХ КЛІТИНАХ

Мета роботи: в результаті особистих спостережень визначити умови проходження плазмолізу та деплазмолізу в рослинних клітинах.

Завдання

1. Приготувати препарати епідерми червоної цибулі.
2. Спостерігати явище плазмолізу та деплазмолізу в рослинних клітинах.

Основні теоретичні відомості

Плазмоліз – це відокремлення пристінного шару цитоплазми від твердої оболонки рослинної клітини (рис. 3.1).

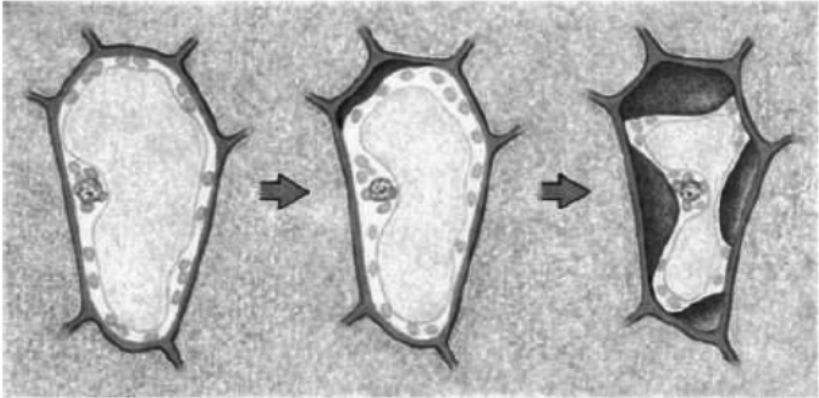


Рис. 3.1. Явище плазмолізу

Плазмоліз спостерігається лише у живих клітинах унаслідок стискання протопласта під впливом гіпертонічного щодо клітинного соку плазмолітика. За повільного плазмолізу клітини тривалий час залишаються живими. За наявності доступної для клітини води вони легко відновлюють стан тургору. Тривалий плазмоліз зумовлює загибель клітин. Явище плазмолізу використовують для визначення осмотичного потенціалу, в'язкості цитоплазми, проникності клітинних мембран тощо.

Процес плазмолізу є оборотним. Якщо плазмолізовану клітину перенести в чисту воду або слабкоконцентрований розчин, вода знову надходить в клітину, в результаті чого відбуватиметься *деплазмоліз*.

Обладнання, прилади та матеріали: червона цибуля, скальпель, препарувальні голки, предметне скло, покривні скельця, мікроскопи, скляні палички, хімічні стакани, фільтрувальний папір, 1 М розчини плазмолітиків (сахарози, NaCl), дистильована вода.

Порядок виконання роботи

Явище плазмолізу рекомендується спостерігати в клітинах рослин із забарвленим соком, тому що сама цитоплазма безбарвна.

Для лабораторних занять можна використати епідерму червоної цибулі, червоної капусти, традесканції, листки елодеї та валіснерії.

1. Для спостереження явищ плазмолізу та деплазмолізу з розрізаної червоної цибулі відокремити луски і пінцетом відділити шматочок тонкої зовнішньої плівки (епідерми, розміром 0,5x0,5 см). Помістити його в краплину води на предметне скельце.

2. Помістити предметне скло з досліджуванним об'єктом під мікроскоп. Знайти недеформовані клітини з найінтенсивнішим червоно-фіолетовим забарвленням.

3. З одного боку фільтрувальним папером відтягнути воду від препарату. З протилежного – нанести піпеткою краплину 1 М розчину сахарози або NaCl (рис. 3.2). Упродовж 1–4 хв під дією плазмолітика внутрішньоклітинна вода виходитиме з клітин.

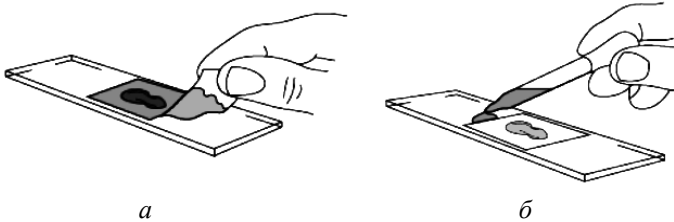


Рис. 3.2. Нанесення плазмолітика на препарат: *a* – відтягування води фільтрувальним папером; *б* – нанесення піпеткою 1 М розчину сахарози або NaCl

4. Спостерігати, як протопласт починає відставати від оболонки в кутках клітини. Відокремлення посилюється, і протопласт набуває овальної конфігурації посередині клітини.

5. Піпеткою біля покривного скла нанести кілька крапель води і фільтрувальним папером 3–4 рази обережно протягнути воду через препарат для того, щоб під покривним склом створити розчин з меншою концентрацією розчинених речовин, ніж має клітинний сік.

6. Коли клітина насичується водою (в результаті заміни розчину плазмолітика) її вакуоля розтягується і протопласт поступово заповнює весь об'єм клітини – відбувається деплазмоліз.

Обробка експериментальних даних

Замалювати або сфотографувати всі стадії плазмолізу та деплазмолізу клітин червоної цибулі, вказуючи загальне збільшення мікроскопа.

Аналіз отриманих результатів

Проаналізувати вплив різних плазмолітиків на стан рослинних клітин. Визначити, за яких умов відбувається плазмоліз або деплазмоліз рослинних клітин у природі.

Запитання для самоперевірки

1. Що таке плазмоліз та деплазмоліз? Яке їх фізіологічне, екологічне та еволюційне значення для рослин?
2. Що відбувається з рослинними клітинами, коли вони контактують із розчинами з високою концентрацією солей?
3. Що відбувається з рослинними клітинами, коли вони контактують із дистильованою водою?
4. Чому при деплазмолізі не руйнується зовнішня оболонка рослинної клітини?
5. Чому лише живі рослинні клітини володіють здатністю плазмолізувати?
6. Що відбудеться з рослинами, якщо їх поливати добривами з високим умістом розчинних солей азоту та фосфору?
7. Як явище плазмолізу використовують у біотехнології?

Література: [1]; [2]; [5].

Лабораторна робота 4

ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ТРАНСPIРАЦІЇ

Мета роботи: визначити кількість води, яка випаровується з одиниці площі листової поверхні за одиницю часу за різних умов навколишнього середовища.

Завдання

1. Зібрати потометри та змоделювати різні умови навколишнього середовища (вологість, вітер, освітленість).
2. Виміряти об'єм води, що випаровується з поверхні листків за різних умов упродовж 30 хв.
3. Визначити площу поверхні листків ваговим методом.
4. Визначити інтенсивність транспірації рослини за різних умов.
5. Визначити вологість листя деревних рослин з різних за антропогенним навантаженням районів міста.

Визначення інтенсивності транспірації за допомогою потометра

Основні теоретичні відомості

Інтенсивність транспірації – кількість води, що випарувалася з одиниці площі листової поверхні за одиницю часу. Величина її залежить від зовнішніх факторів, часу доби і коливається в межах 1–250 мл/м²/год.

Основний метод визначення інтенсивності транспірації – ваговий, заснований на обліку втрати води при випаровуванні. Цим методом можна вивчати транспірацію цілої рослини або окремих її частин. Робота з інтактними рослинами складна, тому частіше користуються зрізаними пагонами або листям.

Потометр – це прилад, що застосовується для визначення інтенсивності транспірації та поглинання води рослиною. Він складається з таких частин: штатив, трубка, заповнена водою, градуйована піпетка та ущільнення для герметичного закріплення рослини у трубці (рис. 4.1).

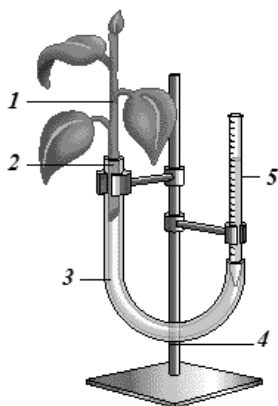


Рис. 4.1. Потометр:
1 – рослина; 2 – ущільнення;
3 – трубка, заповнена водою;
4 – штатив; 5 – градуйована
піпетка

Обладнання, прилади та матеріали: технічні ваги, піпетки, трубки, штативи, ножиці, годинник, вентилятор, кристалізатор, марля, настільна лампа, пластилін, дослідні рослини.

Порядок виконання роботи

1. Зібрати чотири потометри відповідно до рис. 4.1 та закріпити листки у трубках потометрів, позначивши початковий рівень води у піпетках.

2. Змодельовати різні умови навколишнього середовища (рис. 4.2): «контроль або кімнатні умови» – залишити листок у потометрі без створення додаткових умов; «висока вологість» – змочити марлю

водою та обережно огорнути нею листок; «вітер» – увімкнути вентилятор та спрямувати потік повітря на листок; «яскраве світло» – спрямувати на листок штучне джерело світла (у випадку використання лампи накаливання необхідно встановити між листком та лампою скляну ємність із водою для поглинання тепла). Витримати рослини у зазначених умовах упродовж 30 хв.

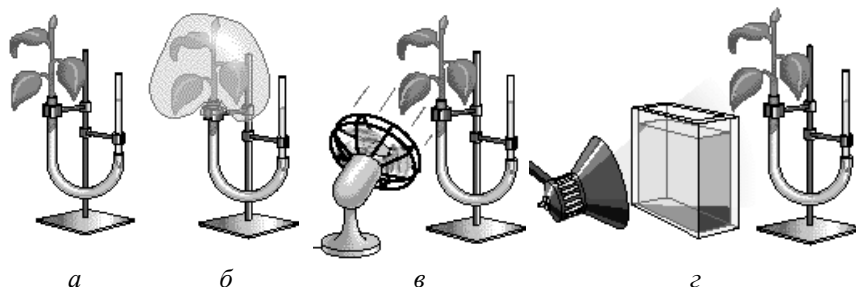


Рис. 4.2. Моделювання різних умов навколишнього середовища:
a – кімнатні умови; *б* – висока вологість; *в* – вітер; *г* – яскраве світло

3. Після завершення досліду позначити кінцевий рівень води у піпетках та визначити втрату води за 30 хв експозиції рослин у різних умовах (рис. 4.3).

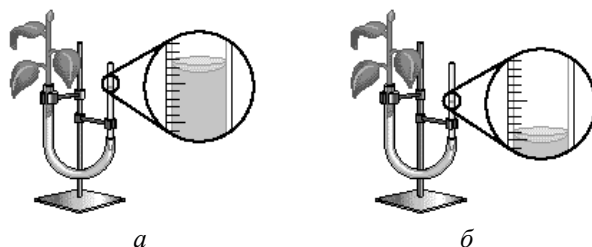


Рис. 4.3. Визначення об'єму транспірованої рослиною води:
a – на початку досліду; *б* – після 30 хв експозиції
у відповідних умовах

4. Вийняти листки з потометрів та визначити їх площу. Для цього визначити масу листків без черенків. Далі вирізати з листка квадрат розміром 5×5 см та визначити його масу. Знаючи масу 25 см^2 листка, за пропорцією знайти площу всього листка.

Оброблення експериментальних даних

Результати роботи занести до табл. 4.1 та вирахувати інтенсивність транспірації.

Таблиця 4.1

Інтенсивність транспірації за різних умов навколишнього середовища

Умови	Втрата води за 30 хв, мл	Площа поверхні листка, см ²	Площа поверхні листка, м ² (поділити см ² на 10 000)	Інтенсивність транспірації мл/м ² /30 хв
Кімнатні (контроль)				
Яскраве світло				
Вітер				
Висока вологість				

Аналіз отриманих результатів

Оцінити вплив різних умов навколишнього середовища на інтенсивність транспірації рослин. Пояснити механізми впливу факторів довкілля на фізіологічний стан рослин.

Визначення вологості листя як індикаційної ознаки стану повітря міст

Основні теоретичні відомості

Вологість рослин – один з інформаційних показників стану повітря і ґрунту. Відомо, що в центральній частині будь-якого міста створюються зони, так звані «острови тепла», де температура повітря може бути на декілька градусів (до 8 °С) вищою, ніж на відкритій місцевості, через гарячі викиди промислових підприємств, ТЕЦ, порушення циркуляції повітря в зонах висотних забудов. Тепловий ефект «островів» впливає на відносну вологість повітря і знижує її. Особливо це стосується центральних вулиць міст центру і півдня України, а також промислових центрів.

Для рослин вода є основою їхнього існування, оскільки забезпечує процес фотосинтезу і функціонування рослинних систем; вона є середовищем, де відбуваються біохімічні процеси, транспортування поживних речовин із ґрунту і газообмін; завдяки транспірації здійснюється процес кругообігу води в природі.

На вулицях з високими будинками і низькою вологістю ґрунтів через стікання опадів з асфальтових покриттів створюються умови для недостатнього зволоження кореневих систем деревних рослин.

В умовах підвищених температур, потоку повітря разом з пилом від автотранспорту і низької вологості волога з коріння швидко транспірується деревами і випаровується з поверхні листя – головного органу транспірації. У зв'язку із цим листя втрачає тугість і тургор, обвисає, змінює форму через відхилення розвитку, в ньому спостерігаються зміни на мікроскопічному рівні: обезводнення клітин і плазмоліз. Тому визначення вмісту води є не тільки показником, що зумовлений кліматом, місцезростанням, природою рослини, але і є біоіндикаційною ознакою підвищення температури через парниковий ефект, автотранспорт, неграмотну міську забудову і, як наслідок, підвищену транспірацію.

Обладнання, прилади та матеріали: аналітичні ваги, сушильна шафа, поліетиленові і паперові пакети.

Порядок виконання роботи

1. Обстежити листя дерев на вулицях міста в різних районах, особливо у дерев-індикаторів (липа, каштан, клен гостролистий), оцінити візуальну зміну стану листя (утрачення тугості, в'ялість, зупинка або зміна напрямку росту в якій-небудь частині листя). Зрізати кілька листків із зазначенням місця збору й екологічних умов, покласти їх у поліетиленовий пакет.

2. У лабораторії листя перекласти у (заздалегідь зважені) паперові пакети і зважити разом з пакетом. Висушити листя до постійної маси за температури 105 °С в сушильній шафі упродовж 1,5–2 год, перенести до ексикатора з гігроскопічною речовиною (CaCl₂) для зберігання. Знову зважити листя в пакеті і результати занести в табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Вологість листя

Маса пакета із сирым листям, г	Маса сирого листя, г	Маса пакета із сухим листям, г	Маса порожнього пакета, г	Маса сухого листя, г	Маса во-логи, г	Вологість листя, %
m	$b = m - p$	d	p	$c = d - p$	$a = m - d$	$X, \%$

Обробка експериментальних даних

Розрахунок вологості листя $X\%$ виконують за формулою:

$$X = \frac{a}{b} \cdot 100\%,$$

де a – маса води листя (яка випаровується в умовах експерименту);
 b – маса сирого листя.

Аналіз отриманих результатів

Оцінити стан зразків листя різних рослин-біоіндикаторів і різних екологічних умов (автомобільні магістралі, вулиці, закриті подвір'я, позаміська територія) та описати стан довкілля в місці збирання зразків.

Запитання та завдання для самоперевірки

1. Що таке інтенсивність транспірації?
2. Від чого залежить величина інтенсивності транспірації?
3. Який показник характеризує здатність рослин регулювати транспірацію?
4. Яке призначення потометра?
5. Що зумовлює рух води на висоту 10–50 м?
6. Що таке вологість рослин? Яке значення має вода для рослин?
7. Які форми, види і типи біоіндикації вам відомі?
8. Чому дорівнює відсотковий уміст води в очереті, якщо відомо, що його листя містять 86, стебло – 80, а коріння – 72 % води, а при висушуванні надземної частини (листя і стебла) втрата маси становить – 82 %, при висушуванні стебла і коріння – 78 %?
9. З 1 га посіву капусти за вегетаційний період (три місяці) виділяється 8 млн кг води. Розрахувати швидкість транспірації капустиного поля у т/год.
10. У зразку глини прибережної зони міститься 14 % хімічно зв'язаної і 25 % гігроскопічної води (останню можна видалити висушуванням). Розрахувати вміст хімічно зв'язаної води у висушеному зразку глини.
11. При зберіганні 1500 кг цукру маса його збільшилась на 22,5 кг у результаті зволоження. Обчислити вміст води у цукрі, який спочатку містив 2 % води.
12. Технічна сіль містить домішки: 8 % води і 4 % металевого пилю. Скільки відсотків металевого пилю буде міститися в солі після сушіння?

Література: [1]; [2]; [3].

Лабораторна робота 5

ФОТОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ РОСЛИН

Мета роботи: визначити різні показники фотосинтетичної активності рослин.

Завдання

1. Визначити хімічні властивості пігментів пластидів.
2. Виявити флуоресцентне випромінювання хлорофілу.
3. Визначити інтенсивність фотосинтезу рослин.

Вивчення хімічних властивостей пігментів

Основні теоретичні відомості

Лист рослини – орган, що забезпечує необхідні умови для фотосинтезу. Функціонально фотосинтез відбувається завдяки спеціалізованим органелам – хлоропластам. Розмір хлоропластів коливається від 4 до 10 мкм. У клітині може бути від 1 до 100 і більше хлоропластів. Їхня загальна сумарна поверхня перевищує площу листків у десятки, навіть сотні разів.

На початку XIX ст. вдалося ідентифікувати зелений пігмент рослин – хлорофіл. У 1817 р. хіміки Д. Пельтьє та Д. Каванту виділили з рослин речовину, яка надає їм зеленого забарвлення, й назвали її хлорофілом.

Пігменти пластидів належать до трьох класів, а саме: *хлорофіли*, *каротиноїди* та *фікобіліни*. Нині відомо близько десяти хлорофілів, які відрізняються хімічним складом, забарвленням і поширенням серед живих організмів. Основними пігментами, без яких фотосинтез не відбувається, є хлорофіл-а для зелених рослин і бактеріохлорофіл для фототрофних бактерій.

Пігменти – це сполуки, які вибірково поглинають світло у видимій (400–700 нм) частині спектра. Непоглинені ділянки сонячного спектра відбиваються, що й зумовлює забарвлення пігменту. Зелений пігмент хлорофіл поглинає червоні та сині промені, тоді як зелені переважно відбиваються.

Методом хроматографічного аналізу хлорофіли було розділено на хлорофіл-а та хлорофіл-β.

Фотосинтетичні пігменти можна витягти з листя рослин за допомогою етилового спирту або ацетону. У витяжці будуть знаходитися зелені пігменти – хлорофіл- α і хлорофіл- β , а також жовті – каротини і ксантофіл (каротиноїди).

Обладнання, прилади та матеріали: пробірки, штативи, мікроскопи, водяна баня, піпетки 5–10 мл, етиловий спирт, бензин, 20 %-й розчин NaOH, спиртова витяжка пігментів із зелених листків.

Порядок виконання роботи

Поділ пігментів за методом Крауса засновано на різній розчинності пігментів в етиловому спирті та бензині.

У чисту пробірку відлити 2–3 мл спиртової витяжки пігментів, додати трохи більше бензину і 2–3 краплі води. Пробірку кілька разів сильно струсити і дати відстоятись упродовж 2–3 хв. При цьому відбувається поділ шарів: верхній зелений шар містить хлорофіли і каротин, нижній шар жовтий спиртовий – ксантофіл.

Омилення хлорофілу – це здатність його при реакції з лугом утворювати сіль хлорофілінової кислоти і спирти (метиловий і фітол). У пробірку з 2–3 мл спиртового розчину пігментів долити 1 мл 20 %-го розчину NaOH, збовтати. Потім пробірку прогріти на киплячій водяній бані, охолодити та додати рівний об'єм бензину, струсити і дати відстоятись.

У бензиновий шар переходять каротин і ксантофіл, у спиртовий – натрієва сіль хлорофілінової кислоти.

Обробка експериментальних даних

Замалювати забарвлення шарів рідини, вказуючи розподіл пігментів.

Флуоресценція хлорофілу

Основні теоретичні відомості

Флуоресценція – це свічення речовин під час поглинання ними світла. Вона відбувається як наслідок переходу молекул із синглетного збудженого стану до синглетного основного.

Флуоресценція – ознака фотохімічної активності хлорофілу.

За відсутності світла молекула хлорофілу перебуває в основному синглетному стані. При ньому електрони займають найнижчі енергетичні рівні. Коли молекула поглинає кванти світла, то електрон переходить на інший, більш високий енергетичний рівень. Цей рівень відповідає синглетному збудженому стану молекули хлорофілу, який є нестійким та короткочасним. Збуджена молекула хлорофілу повертається в основний синглетний стан, при цьому енергія електрона може витрачатися на фотохімічні реакції, флуоресценцію, збудження сусідніх молекул хлорофілу, виділення у вигляді тепла. Хлорофіл флуоресцює в червоній частині спектра з максимумом поглинання 670 нм.

Флуоресценція хлорофілу дуже добре спостерігається в розчинах, у листках цей процес відбувається менш інтенсивно, оскільки поглинута хлорофілом енергія витрачається на фотохімічні реакції.

Обладнання, прилади та матеріали: штатив із пробіркою, настільна лампа, шматок чорного паперу, транслюмінатор, захисні окуляри, спиртова витяжка хлорофілу.

Порядок виконання роботи

Розмістити пробірку зі спиртовою витяжкою хлорофілу:

- 1) навпроти джерела денного світла, витяжка має яскраво-зелений колір;
- 2) на тлі чорного паперу так, щоб відбиті промені були в полі зору, витяжка має криваво-червоний колір;
- 3) в ультрафіолетовому світлі транслюмінатора, використовуючи при цьому захисні окуляри, витяжка має криваво-червоний колір.

Обробка експериментальних даних

Замалювати явище флуоресценції. Якісно порівняти інтенсивність флуоресценції різних зразків рослинних пігментів.

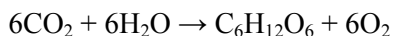
Визначення інтенсивності фотосинтезу рослин

Основні теоретичні відомості

Першим дослідником фотосинтезу вважається англійський хімік і філософ Дж. Прістлі, який у 70-х роках XVIII ст. опублікував свої спостереження «...повітря, зіпсованого горінням або подихом і очи-

шуваного» зеленими частинами рослин. Основні наукові праці французького агрохіміка Ж. Б. Буссенго присвячені вивченню кругообігу речовин у природі і метаболізму тварин і рослин. Встановлення будови хлорофілу Р. Вильштеттером, Г. Фишером і Дж. Конантом (30-і роки ХХ ст.) наблизило науку до з'ясування природи фотосинтезу. Повний синтез хлорофілу, здійснений у 1960 р. Р. Вудвордом зі співробітниками, був тріумфом пізнання природи.

Хоча фотосинтез ще не до кінця досліджено, не викликає сумнівів, що першостадійний процес – це збудження пігменту зеленого листа – хлорофілу-*a*, внаслідок поглинання світла і наступна витрата енергії активних молекул на окиснення води і відновлення CO₂. Інтенсивність фотосинтезу характеризує нарощування біомаси планети і являє собою акумуляцію речовини і енергії:



Хлорофіл – природний каталізатор процесу, являє собою складну органічну речовину класу порфіринів, гетероциклічний комплексон, що містить катіон магнію. Первинним продуктом фотосинтезу вчені вважають *D*-гліцеринову кислоту, що є джерелом усієї біомаси планети, яка перетворюється спочатку в моно-, оліго-, а потім у полісахариди. Швидкість її утворення на одиницю площі за одиницю часу характеризує *первинну продукцію* – масу живої речовини, створювану автотрофами (кг/км·рік).

Вторинну продукцію створюють гетеротрофи, вона також оцінюється масою органічної речовини на одиницю площі за одиницю часу.

Фотосинтез, що є «родоначальником» первинної продукції, опосередковано впливає і на інтенсивність розвитку вторинної продукції. Ці величини також виражають енергетичними характеристиками, тобто енергією, що утворюється в розрахунку на одиницю площі за одиницю часу (Дж/м·добу).

Методи визначення інтенсивності фотосинтезу базуються на гравіметричному аналізі збільшення рослинної біомаси за визначений період часу в процесі фіксації H₂O і CO₂ за умов денного освітлення.

Обладнання, прилади та матеріали: сушильна шафа, аналітичні ваги, ножиці, скляні бюкси, свердла для пробок, світлонепроникний папір.

Порядок виконання роботи

1. Здійснити відбір проби методом висічок. Щоб одержати якісну середню пробу і достовірні результати статистичної обробки, потрібно брати по можливості більшу кількість листя з числом висічок не менше за 100.

2. На дослідній ділянці вибрати найбільш симетричне листя рослини одного виду і відрізати половину листя. Другу половинку на черешку залишити на рослині. Аналізовану біомасу вмістити на 30 хв у воду для досягнення максимального насичення. Сутність полягає в тому, щоб маса одиниці площі листя визначалася в умовах повного насичення водою. Потім вмістити листя нижньою стороною, де краще видно жилки, нагору і, вибираючи місця, де немає жилок, гостровідточеним свердлом вирізати кружечки – зробити висічки діаметром 1 см у кількості не менш як 100. Вмістити аналізований матеріал у таровані скляні бюкси і висушити до постійної маси. Потім знайти масу одиниці площі листя M_S :

$$M_S = \frac{m}{S},$$

де m – маса висушених висічок, г; $S = 100\pi D^2/4$ (см²) – площа 100 кружечків висічок.

3. Через 4–6 год (бажано сонячного ясного дня) половинки листя, що залишилися на рослинах, зрізати і визначити масу одиниці площі M_E за аналогічною методикою:

$$M_E = \frac{m_E}{S},$$

де m_E – маса сухих висічок після експозиції.

4. Встановлене збільшення маси за одиницю часу експозиції ще не може характеризувати інтенсивність фотосинтезу, оскільки за час нарощування біомаси відбувалася витрата речовин на дихання і відтік асимілятів. Для обліку цих процесів потрібно провести «темновий контроль». Для цього відібрати проби листя тієї самої рослини після темновий витримки: відрізати половину листя, а на контрольні, що залишилися на рослині листя, натягнути ковпачок із світлонепроникного паперу. Оброблення листя повторюється, однак

фіксується не збільшення їхньої маси, а зниження; тепер слід розрахувати знижену масу M_K на одиницю площі:

$$M_k = \frac{m_k}{S},$$

де m_k – маса висушених висічок у темновому контролі.

Обробка експериментальних даних

Величину асиміляції A становитиме сума прибутку маси одиниці площі листя за час експозиції і її зменшення в контролі:

$$A = \frac{(M_E - M_K) \cdot 10^3}{S},$$

Інтенсивність фотосинтезу I (мг/см²·год) розраховують за формулою:

$$I = \frac{(M_E - M_S) - (M_S - M_K) \cdot 10^3}{t} = \frac{(M_E - M_K)}{t},$$

де t – час експозиції листів; 10^3 – коефіцієнт перерахування, мг.

Аналіз отриманих результатів

Дані аналізу і результати розрахунків занести до табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Інтенсивність фотосинтезу

m , г	S , см ²	M_S , г/см ²	m_E , г	M_E , г/см ²	m_K , г	M_K , г/см ²	A , мг/см ²	I , мг/(см ² ·год)

Запитання та завдання для самоперевірки

1. Чому створення органічної речовини рослинами називається фотосинтезом?
2. У яких органелах здійснюється фотосинтез?
3. Які анатомічні особливості листка забезпечують ефективний фотосинтез?
4. Які пігменти знаходяться в хлоропластах?
5. Яка хімічна природа хлорофілу і його роль в процесі фотосинтезу?
6. Як називаються жовті пігменти хлоропластів і яка їхня роль?
7. Як можна витягти пігменти з листка?
8. Як впливає інтенсивність світла на процес фотосинтезу?

9. Які анатомо-фізіологічні особливості листя світлолюбних і тіньовитривалих рослин?
10. Чи можна виростити нормальну рослину при штучному освітленні?
11. Які фізико-хімічні властивості пластидних пігментів?
12. Яка роль каротиноїдів у процесі фотосинтезу?
13. Що таке флуоресценція і фосфоресценція? Чим вони відрізняються одна від одної?
14. Чому в листках хлорофіл флуоресцює слабо?
15. Яке значення має флуоресценція в життєдіяльності зеленого листка?
16. Для яких пігментів рослинного організму характерне явище флуоресценції?
17. Обґрунтуйте залежність інтенсивності флуоресценції від ефективності проходження фотосинтетичних процесів.
18. Хлорофіл належить до класу гетероциклічних сполук – порфіринів, і відповідає брутто-формулі $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$. Обчисліть масову частку металу в біокатализаторі фотосинтезу. Яка енергетична роль хлорофілу в рослинах в процесі фотосинтезу?
19. Чому існування біосфери залежить від фотосинтезу?
20. Назвіть учених, які працювали над проблемою фотосинтезу.
21. Чи впливає на процеси фотосинтезу озоновий шар атмосфери?

Література: [1]; [2]; [4].

Лабораторна робота 6

ВИЗНАЧЕННЯ КІНЦЕВИХ ПРОДУКТІВ ФОТОСИНТЕЗУ

Мета роботи: експериментально встановити накопичення кінцевих продуктів фотосинтезу в різних органах рослин.

Завдання

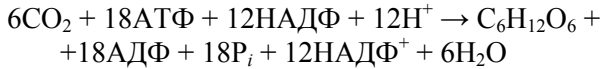
1. Перевірити можливість фіксації діоксиду вуглецю різнокольоровими рослинами.
2. Встановити наявність моно- та полісахаридів у рослинних матеріалах за допомогою якісних реакцій.

Фіксація діоксиду вуглецю

Основні теоретичні відомості

Фотосинтез відбувається в два етапи. На першому етапі за рахунок енергії сонця синтезується АТФ і відновлюється НАДФ. На другому етапі завдяки фіксації діоксиду вуглецю значна частина

цієї енергії зберігається в енергоємних вуглеводах. Моносахарид глюкоза, що містить шість атомів вуглецю, формується завдяки фіксації CO₂ за таким рівнянням:



Цей результат не досягається в один крок, а потребує багато окремих реакцій. Вуглеводи, упаковані у формі дисахариду сахарози, транспортуються до нефотосинтезуючих частин рослини, таких як: корені або плоди. Для більш тривалого збереження вуглеводів рослинами синтезується крохмаль, що складається з двох ланцюгів глюкози. Накопичується він в хлоропластах у вигляді крохмальних зерен, а потім перетворюється на сахарозу та виноситься з клітини.

Більшість світлових реакцій фотосинтезу відбувається перед темновими реакціями. У деяких різнокольорових рослин, таких як *Coleus*, частини листя не містять хлорофілу.

У цій роботі необхідно визначити, чи відбуваються в таких частинах листя рослин темнові реакції фотосинтезу, навіть без попередніх світлових реакцій.

Обладнання, прилади та матеріали: листя рослини *Coleus*, чашки Петрі, водяна баня, хімічні стакани, 70 % етанол, пінцет, розчин Люголя, дистильована вода, штучне джерело світла, олівець.

Порядок виконання роботи

1. Кожному студентові одержати кольоровий листок рослини *Coleus*.
2. Олівцем обвести контури листка та позначити зони з різним забарвленням, використовуючи штучне джерело світла або прикладаючи листок до вікна.
3. Далі листок покласти у киплячу водяну баню та витримати до знебарвлення червоної частини листка, внаслідок розчинення червоних пігментів – антоціанів, що переходять у воду.
4. Після цього обережно за допомогою пінцета листок перенести у стаканчик з нагрітим на водяній бані 70 % етанолом. Листок витримати до знебарвлення зеленої частини, внаслідок розчинення зелених пігментів – хлорофілів, що переходять у спиртовий розчин.
5. Далі листок перенести пінцетом до чашки Петрі, обережно розправити та додати декілька крапель розчину Люголю (I₂KI) і дистильо-

вано воду, щоб повністю покрити листок рідиною. Спостерігати за забарвленням крохмалю у синьо-фіолетовий колір. Для кращого виявлення результатів використати штучне джерело світла.

Обробка експериментальних даних

Результати роботи занести до табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Відношення рослинних пігментів до формування крохмалю

Пігменти	Наявність крохмалю
Без пігментів	
Хлорофіл	
Антоціани	
Каротиноїди або ксантофіли	

Аналіз отриманих результатів

Проаналізувати функціональну спеціалізацію різного забарвлення листя деяких видів рослин. Визначити роль даного явища в еволюції рослин.

Накопичення крохмалю, складних та простих цукрів

Основні теоретичні відомості

Рослини здатні зберігати молекули глюкози різними способами. З молекул глюкози можуть бути синтезовані більші молекули, такі як крохмаль (амілоза та амілопектин). Деякі рослини використовують глюкозу для синтезу таких молекул, як сахароза (з глюкози та фруктози), а інші рослини зберігають глюкозу в нативній формі простого цукру.

У цій роботі за допомогою розчину Люголю та реактиву Бенедикта необхідно визначити, у якій формі зберігається глюкоза в різних рослинах.

Обладнання, прилади та матеріали: зразки досліджуваних рослин (цибуля, картопля тощо), чашки Петрі, скальпелі, водяна баня, пробірки, піпетки, розчин Люголю, реактив Бенедикта, дистильована вода.

Порядок виконання роботи

1. Рослинні матеріали нарізати кубиками та покласти в чашку Петрі. Зверху нанести декілька крапель розчину Люголю. Спосте-

рігати за появою синьо-фіолетового забарвлення, що свідчить про наявність у рослинному матеріалі крохмалю.

2. Нові кубики рослинного матеріалу внести у підписані відповідним чином пробірки. За допомогою піпетки додати 2 мл дистильованої води та 2 мл реактиву Бенедикта.

3. Пробірки витримати на киплячій водяній бані упродовж 3–5 хв, після чого визначити зміни в забарвленні рідини у пробірках.

Обробка експериментальних даних

Реактив Бенедикта використовують для виявлення деяких цукрів (так званих «редукуючих цукрів»), таких як глюкоза. Під час проведення реакції за наявності глюкози утворюється червоний осад, а за наявності сахарози (нередукуючий цукор) – осад не утворюється.

Результати реакції з реактивом Бенедикта занести до табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Визначення цукрів за допомогою реактиву Бенедикта

Рослинний матеріал	Початковий колір	Колір після 3–5 хв	Наявність осаду
Цибуля			
Картопля			
Інше			

Аналіз отриманих результатів

Зробити висновки про наявність моно- та полісахаридів у різних рослинних матеріалах. Визначити роль даного явища в еволюції рослин.

Запитання для самоперевірки

1. Які пігменти забезпечують фіксацію діоксиду вуглецю?
2. У чому полягає адаптивна функція різнокольорового забарвлення листя деяких рослин?
3. В якій формі може зберігатися глюкоза в рослинному матеріалі?
4. Яке значення мають моно- та полісахариди у виробництві біопалива?
5. Чому крохмалевмісні коренеплоди довше зберігаються, ніж солодкі фрукти та ягоди?

Література: [1]; [2].

Лабораторна робота 7

ВИВЧЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ЗАХИСТУ ТА СТІЙКОСТІ РОСЛИН

Мета роботи: вивчити механізми захисту та стійкості рослин до несприятливих умов навколишнього середовища.

Завдання

1. Опанувати метод оцінювання стійкості рослин до впливу температури.
2. Спостерігати захисну дію цукрів на протоплазму.
3. Провести порівняльний аналіз вмісту танінів у рослинних екстрактах методом радіальної дифузії в агаровому гелі.

Вплив температури на проростання насіння

Основні теоретичні відомості

Для діагностики стійкості рослин використовують як польові, так і лабораторні методи.

У польових умовах зазвичай реєструють ростові процеси, тобто враховують висоту рослин, куцистість, формування листового апарату при дії тих чи інших несприятливих умов.

В основі лабораторних методів лежить визначення змін фізіолого-біохімічних процесів, що відбуваються в рослинах за дії різних факторів. Висока здатність рослин зберігати відносно стабільний стан за змінних умов навколишнього середовища обумовлює їх високу стійкість. Чим менше амплітуда відхилення фізіологічного процесу від норми і чим швидше він повертається до неї після якогось впливу, тим вище стійкість рослин.

Обладнання, прилади та матеріали: чашки Петрі, фільтрувальний папір, термостат, холодильник, пінцет, скальпель, лінійка, штатив із пробірками, термометр, кристалізатор, піпетки, хімічні стакани, три партії по 50 насінин (горох, пшениця, льон тощо), дистильована вода.

Порядок виконання роботи

Для досліду взяти три партії по 50 насінин (гороху, пшениці, льону або ін.). Розкласти їх у чашки Петрі на вологий фільтрувальний папір і витримати за різних температурних умов (першу чашку –

за температури 20–25 °С, другу – за температури 7–10 °С і третю – за температури 0–5 °С). Під час досліду проконтролювати, щоб фільтрувальний папір не підсихав.

Обробка експериментальних даних

Починаючи з третьої доби, щодня визначають кількість пророслого насіння, яке видаляють із чашки Петрі.

Аналіз отриманих результатів

За швидкістю проростання насіння зробити висновок щодо впливу температури на проростання. Обґрунтувати різницю в швидкості проростання насіння.

Спостереження захисної дії цукрів на протоплазму

Основні теоретичні відомості

За впливу негативних температур на рослинні тканини в міжклітинному просторі утворюється лід, який відтягує воду з клітин, зневоднює протоплазму. При певному ступені зневоднення відбувається денатурація білків, мембрани втрачають вибіркову проникність, спостерігається вихід речовин із клітин рослин. Цукри захищають структури протоплазми і зменшують вихід речовин із клітин.

Обладнання, прилади та матеріали: столовий буряк, 0,5 М розчин сахарози, 1 М розчин сахарози, лід або сніг, NaCl, дистильована вода, пробірки, ніж.

Порядок виконання роботи

Із тканин столового буряка вирізати три стовпчики завдовжки 2–3 см, ретельно обполоснути їх водою і помістити в три пробірки. У першу пробірку налити 5 мл дистильованої води, у другу – 5 мл 0,5 М розчину сахарози, у третю – 5 мл 1 М розчину сахарози. Пробірки підписати і на 20 хв занурити в охолоджувальну суміш, що складається з трьох частин льоду або снігу і однієї частини NaCl. Потім пробірки вийняти з охолоджувальної суміші і розморозити в склянці з водою за кімнатної температури.

Обробка експериментальних даних

Визначити відмінності в інтенсивності забарвлення рідин у пробірках і пояснити їх. Результати замалювати або сфотографувати.

Аналіз отриманих результатів

Зробити висновок щодо захисної дії різних концентрацій цурку на протоплазму рослинних клітин. Пояснити механізми впливу цукрів на протоплазму.

Визначення вмісту танінів в екстрактах рослин

Основні теоретичні відомості

Таніни – це вторинні метаболіти рослин фенольної природи, знайомі як терпкі, в'язучі сполуки червоного вина (потрапляють у вино зі шкірок плодів, насіння або стебел винограду), чайного листка та недозрілих плодів. В деревних рослинах таніни накопичуються в корі, бруньках та плодах, локалізуються у вакуолях та поверхневому воску клітин.

Таніни синтезуються рослинами для захисту від шкідливих організмів (мікроорганізмів, комах і хребетних трав'яних тварин). Механізм їх дії оснований на преципітації білкових молекул поверхні мікроорганізмів або ферментів комах та тварин. У промисловості таніни використовують для фарбування та дублення шкіри, а також як компоненти біопестицидів.

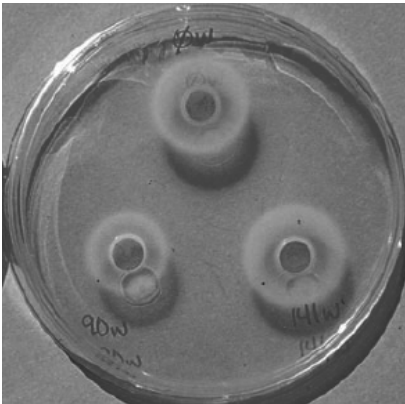


Рис. 7.1. Преципітація альбуміну в агаровому гелі

У цій лабораторній роботі проводиться кількісне визначення вмісту танінів у рослинних екстрактах, що базується на взаємодії танінів з білком альбуміном в агаровому гелі. Водноспиртові екстракти вносяться у лунки агарового гелю, що містить альбумін. При радіальній дифузії екстрактів у гелі відбувається преципітація молекул альбуміну танінами, ознакою якої є формування кільця навколо лунки (рис. 7.1).

Діаметр кілець пропорційний вмісту танінів у рослинних екстрактах. Слід зазначити, що не всі дубильні речовини зв'язуються з білками, а також не всі білкові преципітати нерозчинні. Тому цей метод використовується для кількісного визначення лише тієї групи танінів, що володіють властивістю формувати нерозчинні осадки з білковими молекулами, а отже мають високу біологічну активність.

Обладнання, прилади та матеріали: зразки висушених лікарських рослин, танін, бичачий альбумін, агар, водяна баня, плитка, автоматична мікропіпетка, чашки Петрі, ступки з товчачиками, 50 %-й етанол, дистильована вода, марля, ножиці, мірна колба об'ємом 25 мл, конічна колба об'ємом 500 мл, ваги, хімічні стаканчики, мірні циліндри об'ємом 10 мл та 25 мл, фольга, маркер для скла, спиртовий термометр.

Порядок виконання роботи

1. Приготувати рослинні екстракти.

Зважити 1 г рослинної сировини, перенести наважку у фарфорову ступку, додати 10 мл 50 % етанолу та ретельно розтерти товчачиком упродовж 10–15 хв. Потім екстракти вичавити через двохшарову марлю у хімічні стакани. Ці стакани підписати та накрити фольгою для попередження випаровування етанолу до моменту внесення екстрактів у агаровий гель.

2. Приготувати 2 %-й агаровий гель, що містить 0,1 % альбуміну.

Об'єм агарового гелю визначити за кількістю студентів, які виконують лабораторну роботу. Кожен студент має працювати з однією чашкою Петрі, яка містить 20 мл агарового гелю. Припустимо, що загальний об'єм агарового гелю має становити 200 мл. Зазвичай готують 2 %-й агаровий гель. Для цього слід зважити 4 г агару, перенести у термостійку конічну колбу, додати 175 мл дистильованої води, прокип'ятити до повного розчинення агару та охолодити на водяній бані до температури 50 °С.

Окремо готують розчин альбуміну. Для цього у мірну колбу об'ємом 25 мл внести 0,2 г бичачого альбуміну, довести об'єм до мітки та ретельно перемішати. Готовий розчин альбуміну нагріти на водяній бані до температури 50 °С та внести в охолоджений до 50 °С розчин агару. Ретельно перемішати та розлити отриману суміш по 20 мл в не-

обхідну кількість чашок Петрі. Для кращого застигання гелю рекомендовано відкриті чашки Петрі помістити під вентилятор.

Таким чином отримують 2 %-й агаровий гель, що містить 0,1 % альбуміну. Для приготування інших об'ємів гелю необхідно розрахувати відповідні кількості агару та альбуміну, що використовуються.

3. Провести реакцію преципітації.

Після повного застигання гелю в ньому вирізати потрібну кількість лунок однакового діаметра (краще це робити за допомогою кулькової ручки). Зі зворотного боку чашки Петрі навпроти лунок маркером позначити номер екстракту, що буде внесений до певної лунки. Після цього до лунок за допомогою автоматичної мікропіпетки внести екстракти рослин такого об'єму, щоб повністю заповнити лунку (зазвичай 40 мкл). Для кожного екстракту використати новий наконечник («носик») автоматичної мікропіпетки.

Маючи хімічно чистий реактив танін, можна приготувати стандартні розчини таніну відомої концентрації, внести їх в окремі лунки агарового гелю для порівняння з екстрактами рослин.

Заповнені чашки Петрі поставити на плоску поверхню та витримати за кімнатної температури впродовж 24 год.

Обробка експериментальних даних

За допомогою лінійки виміряти діаметр кілець преципітації альбуміну навколо лунок. При внесенні стандартних концентрацій таніну до лунок порівнюють кільця преципітації відомої концентрації танінів з досліджуваними екстрактами.

Аналіз отриманих результатів

Отримані дані внести до табл. 7.1 та зробити висновок про кількісний вміст танінів у рослинних екстрактах та можливості застосування біологічної активності танінів даних рослин.

Таблиця 7.1

Вміст танінів у рослинних екстрактах

№	Назва рослини	Діаметр зони преципітації, мм

Запитання для самоперевірки

1. Що лежить в основі стійкості рослин до стресу?
2. Чому як кімнатні квіти переважно використовують рослини субтропіків та тропіків?
3. У чому полягає захисна дія цукру на протоплазму?
4. Як впливає вміст вільної і зв'язаної води на морозостійкість рослин?
5. Чому саме ріст є головним показником стійкості рослин до небажаних умов?
6. Чому для екстракції танінів використовують водно-спиртовий розчин?
7. Як впливають умови росту рослин на накопичення танінів?
8. Як можна підвищити синтетичну активність рослин для отримання танінів?
9. Як таніни застосовуються у промисловості загалом та в біотехнології зокрема?

Література: [1]; [2].

Лабораторна робота 8

МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН

Мета роботи: оволодіти деякими методами біотехнології рослин.

Завдання

1. Виділити ДНК із цибулі.
2. Отримати культуру клітин вищих рослин.
3. Екстрагувати вірус тютюнової мозаїки з рослинної сировини та ідентифікувати вірус шляхом зараження листя рослини *Coleus*.

Виділення нуклеїнових кислот із цибулі

Основні теоретичні відомості

Біотехнологія рослин – це сукупність технічних прийомів для модифікації, покращення, створення та розмноження рослинних організмів, одержання з них корисних речовин.

Вирощування і маніпуляції з клітинами, тканинами і органами рослин поза організмом на штучних живильних середовищах у строго контрольованих умовах дозволяє:

– отримувати результати незалежно від клімату, сезону, ґрунтових умов;

- вивчати такі складні процеси, як: ріст, клітинна диференціація і розвиток рослинного організму, метаболізм і його регуляція у клітинах і тканинах цілої рослини;
- проводити швидке розмноження у дуже великих кількостях;
- отримувати безвірусний рослинний матеріал;
- створювати принципово нові технології для промисловості і сільського господарства;
- скоротити селекційний процес у 2–3 рази.

Виділення нуклеїнових кислот (ДНК та РНК) із клітин є першим етапом у багатьох дослідженнях у галузі біотехнології рослин. Метод, що описується в цій роботі, є універсальним та використовується в усьому світі. Спочатку досліджувана рослинна тканина механічно руйнується. Далі додається детергент, який допомагає зруйнувати клітинні та ядерні мембрани. Отримані клітинні фрагменти розділяються шляхом фільтрації. Нуклеїнові кислоти і розчинні білки залишаються у розчині. За допомогою протеолітичного ферменту видаляють білкові молекули. Потім нуклеїнові кислоти осаджують за допомогою охолодженого етанолу.

Обладнання, прилади та матеріали: ступка з товкачиком, терка, ніж, водяна баня на 60 °С, лід, термометр, хімічні стакани на 250 мл, марля, приблизно 100 г цибулі, детергент (рідина для миття посуду), NaCl, дистильована вода, фермент протеаза, крижаний 95 %-й етанол, пробірки, скляні палички, піпетка Пастера, розчин 4 % розчин NaCl.

Порядок виконання роботи

1. У хімічний стакан об'ємом 250 мл додати 3 г NaCl, 10 мл детергенту та довести загальний об'єм до 100 мл дистильованою водою.

2. Нарізати або натерти цибулю на дрібні шматочки розміром приблизно 5 мм². Перенести масу цибулі в хімічний стакан об'ємом 250 мл та додати весь об'єм приготованого розчину детергенту з NaCl.

3. Ретельно перемішати та витримати на водяній бані за температури 60 °С упродовж 15 хв. Така обробка спричиняє руйнування клітинних мембран цибулі. Детергент формує комплекси з мембранними фосфоліпідами та білками, зумовлюючи їх преципітацію. Іони натрію зв'язуються з негативно зарядженими фосфатними групами молекул ДНК. За температури 60 °С фермент ДНКаза, який в іншому випадку починає розрізати ДНК на фрагменти, частково денатурується.

4. Суміш охолодити у крижаній бані впродовж 5 хв, постійно перемішуючи. Це сповільнює руйнування нуклеїнових кислот, яке відбуватиметься за подальшої дії високої температури.

5. Суміш перенести у велику ступку та розтерти товчачиком впродовж 3–5 хв. Це додатково руйнує клітинні стінки та мембрани, спричиняючи вихід молекул нуклеїнових кислот. Суміш розтирати недовго, у протилежному випадку може відбутися руйнування ниток ДНК та РНК.

6. Суміш профільтрувати через кілька шарів марлі в інший хімічний стакан, контролюючи, щоб піна на поверхні рідини не забруднювала фільтрат, що містить розчинні білки та ДНК. Фільтрат можна зберігати в холодильнику впродовж 1–2 діб.

7. Розподілити фільтрат у пробірки відповідно до кількості студентів. До фільтрату додати протеолітичний фермент, ретельно перемішати. Фермент руйнує білки, асоційовані з молекулами нуклеїнових кислот.

8. Додати крижаний 95 %-й етанол, обережно наливаючи по стінках пробірок. Пробірки потримати 2–3 хв нерухомо. Нуклеїнові кислоти є нерозчинними в охолодженому етанолі. Мають формуватися бульбашки і, доки інші речовини в суміші будуть розчинятися, доти молекули нуклеїнових кислот будуть випадати в осад.

9. Обережно прокрутити скляну паличку між фазами спиртової суміші і детергенту, намагаючись не змішувати шари. З'явиться біла сітка фібрил ДНК та РНК, яку можна забрати з пробірки за допомогою піпетки Пастера та ресуспендувати в 4 %-му розчині NaCl. ДНК можна забарвити спеціальними барвниками, наприклад, ацетоорсеїном, та дослідити під мікроскопом. Кислотний характер ДНК та РНК може бути підтверджений за допомогою універсального індикаторного паперу.

Нуклеїнові кислоти, отримані таким чином, не будуть чистими. Основним завданням роботи є демонстрація основних принципів виділення ДНК та РНК з тканин.

Обробка експериментальних даних

Описати результат виділення нуклеїнових кислот та замалювати або сфотографувати всі шари суміші.

Аналіз отриманих результатів

Розробити схему виділення нуклеїнових кислот та визначити найбільш критичний етап. Визначити можливі помилки при виділенні генетичного матеріалу рослин.

Культура рослинних тканин

Основні теоретичні відомості

Культурою клітин, тканин і органів рослин називають вирощені окремі клітини, а також тканини і органи, на штучних поживних середовищах в асептичних умовах (*in vitro*).

Для отримання культури клітин вищих рослин достатньо в асептичних умовах взяти шматочок рослинної тканини (*експлантат*) і розмістити його на спеціальне середовище. Через деякий час відбудеться дедиференціація клітин – тобто, клітини втратять свою вихідну спеціалізацію. Клітинна маса буде швидко збільшуватися, утворюючи калюс. *Калюс* – це особливий тип тканини, що є накопиченням недиференційованих клітин. Якщо шматочки калюсу періодично пересаджувати на нове поживне середовище (пасувати), вони можуть рости необмежений час.

Найважливіша властивість ізольованої клітини рослини – здатність давати початок цілій рослині. Процес утворення диференційованих структур рослини із недиференційованих клітин отримав назву морфогенезу *in vitro*, а поява інтактною рослини з окремої клітини, протопласти, групи клітин – регенерація. В основі цієї здатності лежить унікальна властивість рослинних клітин – тотипотентність.

Тотипотентність – це здатність клітини реалізовувати генетичну інформацію, що забезпечує її диференціювання і розвиток цілого організму. В природних умовах тотипотентність у рослин реалізується при загоєнні ран. У цьому випадку на ураженій поверхні відбувається розвиток калюсу.

Використання калюсних клітин рослин у біотехнології пов'язане з їх здатністю продукувати, при культивуванні *in vitro*, біологічно активні речовини, які утворюються цілими рослинами. Це має важливе значення для медицини, парфумерії, харчової промисловості. Клітини рослин *in vitro* використовують для отримання алкалоїдів, стероїдів, глікозидів, гормонів, ефірних олій.

Обладнання, прилади та матеріали: нещодавно відростлі пагони дерева тополі (*Populus* sp.), водний розчин кінетину концентрацією 0,002 г/л (кінетин швидко розчиняється тільки у лужному середовищі), 1 М NaOH, фільтрувальний папір, чашки Петрі, парафінова стрічка, скальпель або ніж, пінцет, дистильована вода.

Порядок виконання роботи

Ця робота описує спрощену методику отримання калюсу без використання багатокомпонентних середовищ та виконується у нестерильних умовах.

1. Відрізати міжвузлові частини пагонів тополі завдовжки 1–2 см та скальпелем розрізати їх уздовж на дві частини.

2. На дно чашки Петрі внести 2–3 диски фільтрувального паперу та змочити їх розчином кінетину. Розчин кінетину потрібно готувати в гумових рукавичках, а використаний посуд промити великим об'ємом води.

3. Пагони покласти на фільтрувальний папір зрізами догори.

4. Чашки Петрі накрити кришками та заклеїти парафіною стрічкою для попередження надмірного випаровування розчину кінетину.

5. Чашки Петрі витримати у теплом, добре освітленому місці, перевіряючи їх щотижня. Калюсні тканини (рис. 8.1) формуватимуться упродовж декількох тижнів.

6. У випадку появи пліснявих грибів на поверхні фільтрувального паперу необхідно обережно видалити їх за допомогою пінцета, залишаючи неконтаміновані нижні диски фільтрувального паперу.

7. При висиханні фільтрованого паперу необхідно зволожити його дистильованою водою.

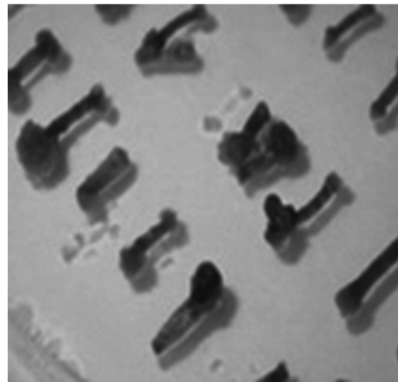


Рис. 8.1. Калюсні тканини

Обробка експериментальних даних

Результати спостережень за формуванням калюсу замалювати або сфотографувати. Визначити середній термін появи недиференційованих клітин.

Аналіз отриманих результатів

У разі отримання позитивних результатів можливим є визначення впливу освітленості та концентрації кінетину на формування калюсу, а також отримання калюсних культур інших видів рослин.

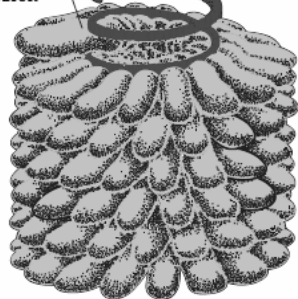
Зараження листя рослин вірусом тютюнової мозаїки

Основні теоретичні відомості

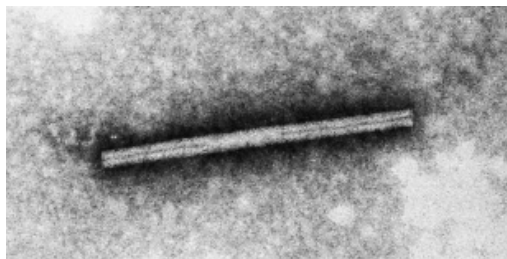
Віруси являють собою неклітинні форми життя. Російський фізіолог рослин Д. Й. Івановський першим виявив у клітинах з листків тютюну безбарвні кристалоподібні скупчення – збудники мозаїчної хвороби тютюну, які пізніше було названо вірусами. Клітинна структура вірусам не властива. Однак вони мають низку особливостей, притаманних живим організмам. Завдяки працям Д. Й. Івановського з фізіології рослин виникла нова галузь науки – вірусологія. Свою дисертацію про природу мозаїчної хвороби тютюну Д. Й. Івановський захистив (1903) у Київському університеті Святого Володимира.

У сучасних умовах вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) є найбільш вивченим, оскільки він має потенційний негативний вплив на сільське господарство завдяки широкому спектру рослин-господарів, у тому числі тютюну, томатів та картоплі, а також декоративних рослин, таких як герані, колеус і фіалки. ВТМ належить до великої групи споріднених вірусів, так званих «тобамовірусів». За своєю структурою ВТМ є паличкоподібним, безоболонковим вірусом з одноланцюговим РНК-геномом (рис. 8.2).

Капсидний білок — РНК



a



б

Рис. 8.2. Структура вірусу тютюнової мозаїки:
a – білки капсида, розташовані по спіралі, щільно зв'язані один з одним та з РНК-геномом; *б* – електронна мікрофотографія вірусу тютюнової мозаїки (х 400 000)

ВТМ є дуже стабільним, його легко виділяти з інфікованих тканин рослин, а також легко зберігати та використовувати у лабораторних дослідженнях. Стабільність ВТМ зумовлена щільно упакованими білками капсида, що роблять його стійким до умов, які руйнують більшість інших типів вірусів.

Віруси рослин не можуть самостійно пройти щільний бар'єр клітинної оболонки та отримати доступ до цитоплазми. Зараження рослин вірусами відбувається у випадках попереднього пошкодження тканин комахами (окремі віруси рослин переносяться комахами) або від ушкоджень, нанесених у результаті дії вітру, технічних засобів та інструментів. Потрапляючи до цитоплазми вірус реплікується, і знову зібрані віріони ВТМ здатні рухатися по всій рослині, заражаючи більшість її клітин. Рух віріонів до сусідніх клітин відбувається через плазмодесми, у той час як рух до листків або коріння відбувається через флоему. Зараження рослини ВТМ зупиняє ріст рослини-господаря та призводить до появи світлих та темних плям (мозаїки) на листі (рис. 8.3).

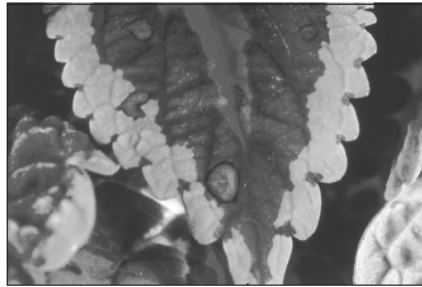


Рис. 8.3. Ознаки зараження рослини *Coleus blumei* вірусом тютюнової мозаїки

У цій роботі необхідно провести екстракцію ВТМ з висушеного листа тютюну та ідентифікувати вірус, заражуючи листя чутливої до нього рослини (колеус).

Обладнання, прилади та матеріали: висаджені в горщики рослини роду *Coleus*, тютюн, наждачний папір, марля, вата, хімічні стакани, воронки, ваги, ступки з товчачиками, мірний циліндр на 10 мл, дистильована вода.

Порядок виконання роботи

1. Два горщика з рослинами роду *Coleus* підписати: «дослід – інокуляція ВТМ» та «контроль», зазначаючи дату та прізвища виконавця досліджу.

2. Як джерело тютюну використати цигарки. Тютюн із цигарок зібрати до паперового пакета, зважити 1 г та перенести до ступки.

3. Додати 10 мл дистильованої води, ретельно розтерти товкачиком упродовж 10–15 хв.

4. Екстракт листя тютюну, що містить віріони, відфільтрувати через кілька шарів марлі в хімічний стакан.

5. За допомогою наждачного паперу пошкодити поверхню кількох листків дослідного та контрольного зразків рослини *Coleus*.

6. Ватою нанести екстракт листя тютюну на пошкоджене листя дослідної рослини, тим самим інокуючи цю рослину вірусом. На контрольну рослину вірусний інокулят не наноситься.

7. Рослини витримати за кімнатної температури так, щоб їх листя не торкалося одне одного. Віруси можуть передаватися від рослини до рослини, якщо їх листя доторкуються.

8. Провести спостереження за станом рослин кожні 2–3 дні впродовж 14 діб.

Обробка експериментальних даних

Результати спостережень занести до табл. 8.1.

Таблиця 8.1

Поява ознак ВТМ на листках рослин

День після інокуляції	Інокульована вірусом рослина	Контрольна рослина

Аналіз отриманих результатів

Порівняти стан зараженої та контрольної рослин. Визначити добу появи ознак вірусу на поверхні листя рослин.

Запитання для самоперевірки

1. Які основні етапи виділення ДНК із рослин?
2. Що таке культура рослинних тканин? Як її отримують?
3. Як застосовують калюсні культури в біотехнології?
4. Як віруси заражують рослини у природних умовах?
5. Як застосовують вірус тютюнової мозаїки в біотехнології?

Література: [1]; [6].

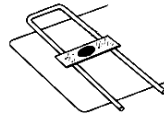
Лабораторний посуд та обладнання



Предметні
та покривні скельця



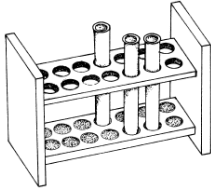
Кристалізатор



Місток



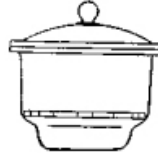
Хімічний
стакан



Пробірки
та штатив



Ваги



Ексікатор



Ступка
з товчачиком



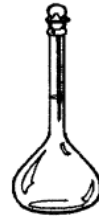
Градуйований
циліндр



Колба
Ерленмейера



Колба
з відводом



Мірна
колба



Пінцет



Часове скло



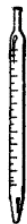
Спиртівка



Чашка Петрі



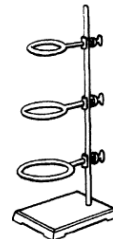
Воронка



Градуйована
піпетка



Піпетка
Мора



Штатив
з кільцями

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Мусієнко М. М.* Фізіологія рослин / М. М. Мусієнко. – К. : Либідь, 2005. – 808 с.
2. *Мусієнко М. М.* Екологія рослин / М. М. Мусієнко. – К. : Либідь, 2006. – 432 с.
3. *Стеблянко М. І.* Ботаніка. Анатомія і морфологія рослин / М. І. Стеблянко, К. Д. Гончарова, Н. Г. Закорко. – К. : Вища шк., 1995. – 384 с.
4. *Біологія* / З. М. Шелест, В. М. Войціцький, В. А. Гайченко, О. М. Байрак. – Житомир : ЖДТУ, 2002. – 592 с.
5. *Слюсарев А. О.* Біологія. Загальна біологія. Ботаніка. Зоологія. Людина та її здоров'я / А. О. Слюсарев, О. В. Самсонов, В. М. Мухін. – К. : Вища шк., 2003. – 622 с.
6. *Черевченко Т. М.* Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* / Т. М. Черевченко, А. Н. Лаврентьева, Р. В. Иванов. – К. : Наук. думка, 2008. – 559 с.

ЗМІСТ

Вступ	3
Заходи безпеки під час виконання лабораторних робіт	4
<i>Лабораторна робота 1</i>	
Будова рослинної клітини	5
<i>Лабораторна робота 2</i>	
Будова клітинної оболонки	13
<i>Лабораторна робота 3</i>	
Явище плазмолізу та деплазмолізу в рослинних клітинах	17
<i>Лабораторна робота 4</i>	
Визначення інтенсивності транспірації	20
<i>Лабораторна робота 5</i>	
Фотосинтетична активність рослин	26
<i>Лабораторна робота 6</i>	
Визначення кінцевих продуктів фотосинтезу	32
<i>Лабораторна робота 7</i>	
Вивчення механізмів захисту та стійкості рослин	36
<i>Лабораторна робота 8</i>	
Методи біотехнології рослин	41
Додаток	49
Список літератури	50

Навчальне видання

АНАТОМІЯ ТА ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

Лабораторний практикум
для студентів напряму підготовки
6.051401 «Біотехнологія»

Укладачі :

КОВАЛЬОВ Олександр Михайлович

ТАРАСЮК Сергій Іванович

ДРАЖНІКОВА Анна Вікторівна

Редактор *Є. Г. Кравченко*

Технічний редактор *А. І. Лавринович*

Коректор *О. О. Крусь*

Комп'ютерна верстка *Л. А. Шевченко, Н. В. Чорна*

Підп. до друку 28.03.2016. Формат 60x84/16. Папір офс.

Офс. друк. Ум. друк. арк. 3,02. Обл.-вид. арк. 3,25.

Тираж 100 пр. Замовлення № 34-1.

Видавець і виготівник

Національний авіаційний університет

03680, Київ-58, просп. Космонавта Комарова, 1.

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру ДК № 977 від 05.07. 2002