

**Міністерство освіти і науки України
Дніпропетровський національний університет
ім. Олеся Гончара**

**СПЕЦПРАКТИКУМ ІЗ ФІЗІОЛОГІЇ
ТА БІОХІМІЇ РОСЛИН**

2013

**Міністерство освіти і науки України
Дніпропетровський національний університет
ім. Олеся Гончара**

Кафедра фізіології та інтродукції рослин

**СПЕЦПРАКТИКУМ ІЗ ФІЗІОЛОГІЇ
ТА БІОХІМІЇ РОСЛИН**

Практичне видання

**Дніпропетровськ
РВВ ДНУ
2013**

Уміщено лабораторні роботи зі спецпрактикуму з фізіології та біохімії рослин, які відповідають навчальному плану дисципліни.

Для студентів ДНУ, які навчаються за спеціальністю «Фізіологія рослин». Можуть бути корисні для аспірантів, наукових співробітників.

Темплан 2013, поз.38

Спецпрактикум із фізіології та біохімії рослин

Практичне видання

Укладачі: канд. біол. наук, доц. А.М. Кабар
асист. Г. А. Заїко
асп. Т. Ю. Лихолат

Редактор О. В. Бец
Техредактор Л.П. Замятіна
Коректор Т. А. Белиба

Підписано до друку 15.10.13. Формат 60x84/16. Папір друкарський. Друк плоский. Ум. друк. арк. 1,9. Ум. фарбовідб. 1,9. Обл.-вид. арк. 2,2. Тираж 100 пр. Зам. №

РВВ ДНУ, просп. Гагаріна, 72, м. Дніпропетровськ, 49010.

Друкарня «Ліра», пл. Десантників, 1, м. Дніпропетровськ, 49038.

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру
серія ДП №14 від 13.07.2000 р.

Лабораторна робота 1. Визначення вмісту металів у рослинних зразках

Мета: визначити вміст важких металів у рослинних зразках.

Обладнання: атомно-абсорбційний спектрометр ААС-30, штативи, пробірки, леза, дощечка, мірні пробірки, гумові пробки.

Реактиви: концентрована азотна, сірчана або хлорна кислота.

Об'єкт дослідження: рослинні зразки.

Вступні пояснення

Біологічний кругообіг важких металів значно змінюється в часі і просторі: в межах однієї і тієї ж ґрунтово-кліматичної зони (степу) вміст важких металів у рослинах змінюється навіть за однакового типу умов. Пошкодження рослин на промислових майданчиках спричинені впливом комплексу органічних та неорганічних поллютантів. Визначити ступінь участі конкретного забруднювача в цьому процесі, спираючись на специфічні морфологічні, фізіологічні та біохімічні показники, досить складно. У зв'язку з цим результати дослідження будуть більш вірогідними та інформативними, якщо порівняти кількість накопичених рослинним організмом хімічних речовин як між собою в умовах промислового забруднення, так і з рослинами, взятими на місцезростаннях поза дією промислових викидів.

Вплив основних важких металів на рослини

Постійно присутній в тканинах рослин **кобальт** бере участь в обмінних процесах. У мікродозах кобальт є необхідним елементом для нормальної життєдіяльності багатьох рослин. Застосування кобальтових солей (сірчаноокислого кобальту) як добрив, як виявилось, сприяє прискоренню дозрівання ячменю, підвищує врожай насіння червоної конюшини, збільшує вміст жиру в насінні льону. Під впливом кобальту підвищується врожайність цукрових буряків.

Вплив **молібдену** на рослинні організми залежить від багатьох факторів. Входячи до складу ферменту нітраторедуктази (що є за своєю будовою молібдофлавопротеїном), молібден відновлює нітрати у вищих і нижчих рослинах і стимулює синтез білка в них. Тому в умовах нестачі молібдену в рослинах накопичуються нітрати, одночасно зменшується рівень азотистої розчинної і азотистої білкової фракцій. Молібден і марганець, імовірно, каталізують окремі реакції, кожна з яких впливає на концентрацію амінокислот - проміжних продуктів білкового обміну. Молібден активує реакцію, що веде від нітратів до утворення амінокислот, тоді як марганець, можливо, активує подальші фази перетворення амінокислот у білки. Молібден необхідний для синтезу вітаміну С і каротину, синтезу і переміщення вуглеводів, використання фосфору.

У рослинах в середньому міститься 0,000 05% **нікелю** на 100 г живої ваги (залежно від виду рослини, місцевості, ґрунту, клімату та ін.). Рослини в районі нікелевих родовищ можуть нагромаджувати в собі значні кількості

нікелю. При цьому спостерігаються явища ендемічного захворювання рослин, наприклад потворні форми айстр. Серед рослин існує різниця в чутливості до впливу нікелю. Токсичні рівні нікелю в листках рослин (млн⁻¹ сухої маси) такі: ячмінь – 26, види твердої деревини – 100-150, цитрусові – 55-140, бур'яни – 154. Типові симптоми пошкоджуючої токсичної дії нікелю – це: хлороз; поява жовтого забарвлення з наступним некрозом; зупинка росту коренів і появи молодих пагонів або паростків; деформація частин рослини; незвичайна плямистість; в деяких випадках – загибель всієї рослини.

Середній вміст *марганцю* в рослинах 0,001%. Марганець служить каталізатором процесів дихання рослин, бере участь у процесі фотосинтезу. Високий окисно-відновний потенціал марганцю свідчить про те, що марганець відіграє таку ж роль для рослинних клітин, як залізо – для тварин.

Марганець входить до складу або є активатором деяких ферментативних систем, регулює відношення $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$, впливаючи на окисно-відновні процеси, що відбуваються за допомогою заліза.

Марганець посилює гідролітичні процеси, в результаті чого зростає кількість амінокислот, сприяє просуванню асимілятів, що утворюються в процесі фотосинтезу, від листя до коренів та інших органів. За даними П. А. Власюка, марганець за нітратного живлення рослин реагує як відновник, тоді як за аміачного – як окисник. Завдяки цьому за допомогою марганцю можна впливати на процеси цукроутворення і синтезу білків. У разі нестачі марганцю в ґрунтах (у разі низького вмісту або за несприятливих умов для засвоєння його рослинами) виникають захворювання рослин, що характеризуються появою на листках рослин хлоротичних плям, які в подальшому переходять у вогнища некрозу (відмирання). Зазвичай при цьому відбувається затримка росту рослин і їх загибель. Надлишок марганцю, так само як і його дефіцит, несприятливо позначається на рослинах.

Мідь необхідна для життєдіяльності рослинних організмів. Майже вся мідь листків зосереджена в хлоропластах і тісно пов'язана з процесами фотосинтезу; вона бере участь у синтезі таких складних органічних сполук, як антоціан, залізопорфірини і хлорофіл; мідь стабілізує хлорофіл, захищає його від руйнування. Мідь входить як структурний компонент до складу сполук з білком (мідьпротеїду, що містить 0,3 % міді), утворюючи окиснювальний фермент поліфенолоксидазу. Цей фермент вперше був виявлений в бульбах картоплі, печерицях, а в подальшому – у складі більшості поширених рослин. Хоча цей фермент може окиснювати лише певні фенольні сполуки, присутність в рослинних тканинах поряд з оксидазою пірокатехіну або ортохінону дозволяє поліфенолоксидазі брати участь в окисненні великої кількості органічних сполук. Мідь сприяє синтезу в рослинах залізовмісних ферментів, зокрема пероксидази. Установлено позитивний вплив міді на синтез білків у рослинах і завдяки цьому – на водоутримувальну здатність рослинних тканин. Навпаки, в разі нестачі міді гідрофільність колоїдів тканин зменшується. Очевидно, що в зв'язку з цим

мідь у вигляді добрив може підвищувати посухо- та морозостійкість рослин, а також, імовірно, стійкість до бактерійних захворювань.

Залежно від виду рослин, місцевості зростання, клімату тощо вміст **цинку** в рослинах дуже варіює. Цинк є компонентом деяких ферментних систем. Він необхідний для утворення дихальних ферментів – цитохромів А і Б, цитохромоксидази (активність якої різко спадає за нестачі цинку), входить до складу ферментів алкогольдегідрози і гліцилгліциндипептидази. Цинк пов'язаний з перетворенням сполук, що містять сульфогідрильні групи, функція яких полягає в регулюванні рівня окисно-відновного потенціалу в клітинах. За нестачі цинку в вакуолях клітин нагромаджуються поліфеноли, фітостерини, лецитин як продукти неповного окиснення вуглеводів і білків; у листках виявляється більше редуруючих цукрів і фосфору і менше сахарози та крохмалю. За відсутності цинку порушується процес фосфорилування глюкози. Нестача цинку призводить до значного зменшення в рослинах ростового гормону – ауксину.

Цинк є складовим компонентом ферменту карбоангідрози. Входячи до її складу, цинк впливає на найважливішу фотохімічну реакцію «темнової» утилізації вуглекислого газу рослинами і на процес виділення CO_2 , тобто на процес дихання рослин. Рослини, що розвиваються в умовах недостатності цинку, бідні на хлорофіл, навпаки, листки, багаті на хлорофіл, містять максимальні кількості цинку. У зелених листках цинк, можливо, зв'язаний з порфіринами.

Під впливом цинку збільшується вміст вітаміну С, каротину, вуглеводів і білків в окремих видів рослин, цинк посилює ріст кореневої системи і позитивно позначається на морозостійкості, а також жаро-, посухо- і солестійкості рослин. Сполуки цинку мають велике значення для процесів плодоношення.

Стрес рослин, спричинений важкими металами (ВМ). Стійкість рослин до них. Величезна кількість експериментів довела, що важкі метали у надмірних дозах мають негативний вплив на морфологічну та анатомічну будову рослин, так само як і нестача для рослин мікроелементів. У наш час дослідники продовжують детальніше вивчати дію цих елементів на морфологію та анатомію рослинного організму. В цій сфері, наприклад, виявлено, що за вирощування сої на ґрунті, забрудненому 50 і 100 гранично допустимими концентраціями (ГДК) кадмію (Cd), кількість бульбочок на коренях рослин зменшувалась на 30,7 і 44 % відповідно, а висота стебел – на 14-20%. У 1990 – 2000-х рр. продовжували досліджувати реакцію рослин на ВМ на фізіологічному рівні. Вже в другій половині ХХ ст. вивчали поглинання, транспорт і динаміку мікроелементів у рослині. Зокрема, досліджували цитологічні та молекулярні механізми потрапляння цих елементів у клітини живих організмів. Звичайно ж, дослідники продовжують активно вивчати процеси накопичення та розподілу ВМ, особливо мікроелементів у рослинах, та фактори, які на це впливають. Так, вивчають накопичення окремих металів: марганцю, кадмію, нікелю та ін. З'являються нові відомості про транспорт металів у рослинному організмі. Давно відомо,

що особливо важливу роль в цих процесах відіграють корені рослин. Поглинання може здійснюватись і позакореневим шляхом – листками і стеблами рослин; це виявили ще в другій половині ХХ ст. і продовжують досліджувати в наш час. При цьому дуже важливо дослідити механізми гіперакумуляції рослинами ВМ. Вивчається динаміка вмісту ВМ в рослині протягом онтогенезу: в насінні, яка розвивається; паростках та органах рослин різних стадій індивідуального розвитку; пагонах, листках (зокрема, просторовий розподіл важких елементів у листку в процесі його розвитку). Особлива увага приділяється дослідженню: накопичення ВМ у врожаї сільськогосподарських рослин залежно від технологічних прийомів вирощування певних культур; міграції важких металів у системі “грунт-рослина-тварина”; впливу забруднення навколишнього середовища токсичними дозами ВМ та їх нагромадження в рослинних організмах. Інтенсивно вивчається вплив металів – забруднювачів навколишнього середовища – на мінеральне живлення рослин. Важкі метали можуть бути антагоністами або синергістами, а тому, потрапляючи в рослинний організм в надлишку, антагоністи пригнічують метаболізм один одного в рослинному організмі, а синергісти – прискорюють обмін речовин у самому рослинному організмі. Наприклад, кадмій у рослинах ячменю змінює трофічний статус заліза. Звичайно досліджуються нові аспекти впливу ВМ на метаболізм різних органічних речовин в рослинних організмах, наприклад, вивчається дія міді на обмін індол-3-ацетату і лігніну в коренях арахісу, вплив свинцю на накопичення аскорбінової, дегідроаскорбінової, дикетоглутонінової кислот у паростках соняшника, вплив іонів кадмію на вміст вільних амінокислот у рослинах кукурудзи. Вивчається дія кадмію, свинцю на вміст білків і фотосинтетичних пігментів у паростках салату (*Lepidium sativum*). Оскільки для процесів фотосинтезу необхідний пігмент хлорофіл, то актуальним питанням є дослідження впливів токсикантів на вміст і накопичення цього пігменту в зеленій частині рослини, що і вивчають останнім часом у різних конкретних диких видів і культурних сортів. Досліджують активність фотосинтезу залежно від різних ВМ, наприклад цинку як елемента мінерального живлення, вплив різних ВМ, наприклад кобальту, на пігментний склад, електрон-транспортний ланцюг фотосинтетичного апарату рослин, вплив ВМ, зокрема кадмію, на різні реакції фотосистеми II, циклу Кальвіна та інші реакції фотосинтезу. В 90-х рр. почали інтенсивно досліджувати дію важких металів на міцність хлорофіл-білково-ліпідного комплексу, який відіграє важливу роль у розвитку стійкості рослин до несприятливих умов навколишнього середовища. Найбільш важливий механізм токсичної дії ВМ на живі організми полягає в пригніченні активності багатьох ферментних систем. Це обумовлено здатністю ВМ вступати в хімічну взаємодію з сульфогідрильними (-SH) групами протеїнів живих організмів, в першу чергу ферментних, а також інших білкових структур. Зміна їх конформаційного стану призводить до блокування перебігу низки біохімічних процесів. Досліджено, наприклад, що мідьвмісна аміноксидаза впливає на вироблення пероксиду, який, у свою чергу, впливає

на закриття продохів у мишачого горошку (*Vicia faba*). Деякі ферменти рослин проявляють антиоксидантну дію в разі стресу, спричиненого важкими металами. Такими ферментами є пероксидаза, каталаза, глутатіонредуктаза, гваяколпероксидаза, супероксидна дисмутаза та ін. Виявлено, що окремі речовини, наприклад 28-гомобрасинолід, здатні в певних концентраціях підвищувати активність таких ферментів під час оксидативного стресу, тим самим підсилюючи стійкість рослин до дії токсикантів. Вивчають також впливи конкретних важких металів на активність різних ферментів, наприклад свинцю на аспартат- і аланінамінотрансферази. Цікава й важлива для дослідження проблема функціонування протонного насоса в рослин. На думку сучасних авторів, найважливіший компонент універсального двигуна практично всіх активних транспортних потоків пролягає через плазматичну мембрану рослинної клітини. Тому важливе також вивчення впливу важких металів на функціонування цих протон-транспортних насосів клітинних мембран. Крім фізіологічної дії досліджують також дію важких металів на рослини на клітинному та цитогенетичному рівні. У кінці ХХ ст. було написано багато праць, в яких викладено дослідження механізмів стійкості рослин до токсикантів, зокрема до важких металів. Доведено, що стійкість пов'язана з генетичними особливостями популяцій рослин: ще в 70-х рр. ХХ ст. було виявлено, що толерантність популяцій рослин до важких металів переважно високоспецифічна і генетично успадковується. Також досліджують механізми толерантності рослин до надлишку іонів металів на молекулярному рівні. Механізми стійкості тісно пов'язані з механізмами поглинання ВМ рослинами. Тому важливо дослідити, які ж механізми кореневого живлення використовують рослини для того, щоб запобігти поглинанню великих кількостей неорганічних елементів, зокрема ВМ. Особлива увага у вивченні токсичної дії ВМ на рослини завжди приділялась речовинам-протекторам, які здатні підвищувати стійкість рослинних організмів до цих токсикантів. Такими протекторами виявились деякі фітогормони, регулятори росту природного та синтетичного походження, саліцилова кислота, вітамінні препарати. Як відомо, з поняттям стійкості організмів до різних несприятливих факторів пов'язане також поняття стресу. В умовах, коли гомеостатичні механізми уже недостатні для підтримання життєдіяльності, а нові генозалежні пристосування ще не вироблені через повільну реалізацію (на яку клітина може витратити години і навіть дні), нативність живої системи забезпечується стресовими захисними механізмами. Деякі метали, наприклад кадмій, викликають оксидативний стрес. Рослини за тривалої дії негативних факторів здатні до них адаптуватись, тому активно вивчається питання пристосування рослин до важких металів. Такі адаптації досліджуються і в досить поширених видів рослин, і в ендеміків. Важливими для захисту рослин від забруднень важкими металами можуть виявитися методи підвищення стійкості рослин проти засолення.

У наш час поширені дослідження очистки ґрунтів методом біоремедіації, коли з метою детоксикації забруднювачів у ґрунті чи воді

використовуються мікроорганізми, рослини чи ферменти, що походять з рослин чи мікроорганізмів. Зокрема, перспективною вважається фітореMediaція – використання рослин, щоб ліквідувати, утримати чи трансформувати забруднювачі. Розробляють методи підвищення ефективності фітореMediaції забруднених ВМ ґрунтів. Зокрема, досліджують можливість використання різних порід дерев для фітореMediaції ґрунтів від Cd, Pb, Cu та Cr, а для очищення ґрунтів від надлишків міді – використання *Ammania baccifera*. Існує ще ціла низка перспективних для фітореMediaції рослин: *Salix viminalis*, *Rumex tiashanicus*, *Rumex patientia*, *Sorghum bicolor* для очистки ґрунтів від кадмію; *Zea mays* – від свинцю та ін.

Принцип методу. Визначення вмісту металів здійснюють на атомно-абсорбційному спектрометрі ААС-30 Карла Цейса (Німеччина) за методикою Хавердова, Цалева.

Значний прогрес у вивченні мікроелементів і важких металів був досягнутий після відкриття і практичної реалізації атомно-абсорбційного спектрофотометричного методу, що має цілу низку переваг: чутливість, вибірковість, висока продуктивність, досить гарна відтворюваність результатів і простота виконання аналізу. Атомно-абсорбційний аналіз був запропонований у 1955 р. і відразу ж набув значного поширення в дослідженнях. Цей метод аналізу забезпечує виявлення багатьох елементів на рівні 0,1 – 0,01 мкг/моль, що в багатьох випадках дає можливість аналізувати рослини без попереднього концентрування елементів. Метод дозволяє сьогодні визначити до 70 елементів, переважно металів: Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Cr, Ni, Pb, Cd, Hg, As, Se. Однак ним не можна визначити основні біогенні елементи – N, P, S тощо. Метод атомної абсорбції, скорочено – АА-метод, заснований на використанні здатності вільних атомів певних елементів селективно поглинати резонансне випромінювання визначеної для кожного елемента хвилі.

На рис. 1 наведено принципову схему пристрою атомно-абсорбційного спектрофотометра.

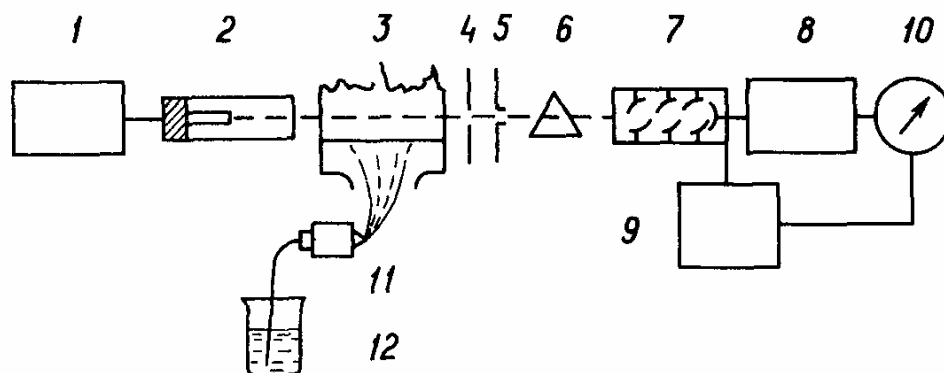


Рис. 1. Схема атомно-абсорбційного спектрофотометра:

- 1 – джерело живлення спектральної лампи з порожнистим катодом; 2 – спектральна лампа; 3 – полум'я атомізатора; 4 – модулятор; 5 – щілина монохроматора; 6 – монохроматор; 7 – фотопомножувач; 8 – блок живлення фотопомножувача; 9 – підсилювач; 10 – реєструвальний прилад; 11 – розпилювач атомізованого розчину; 12 – розчин

Джерелом випромінювання для аналізованого елемента є спеціальні лампи, розташовані у високочастотному генераторі. Лампи з порожнистим катодом можуть бути виготовлені для визначення одного чи декількох елементів. Останнім часом виробляють лампи підвищеної яскравості світіння, що збільшує чутливість методу. Ці лампи відрізняються від звичайних ламп із порожнистим катодом наявністю додаткового розряду на виході з порожнини катода, де знаходиться хмара незбуджених пар. Лампи з підвищеною яскравістю дозволяють проводити визначення за малої щільності монохроматора і за невеликих напруг на фотопомножувачі, що зменшує відношення сигнал – шум. АА-метод відрізняється від емісійного методу більш вираженою селективністю і підвищеною стабільністю показань, що мало залежить від інтенсивності полум'я і зміни його температури. Якщо імовірність накладення ліній в емісійному спектральному аналізі дорівнює 2,5 %, то в атомно-абсорбційному аналізі за тих же умов вона дорівнює 0,04 %. Чутливість прямого визначення в рослинах деяких елементів недостатня, що змушує застосовувати спеціальні прийоми концентрування металів в аналізованому розчині.

Хід роботи

Перед обробкою дослідних зразків на атомно-абсорбційному спектрофотометрі ААС-30 спочатку застосовують метод сирого озолення. У процесі озолення зразки окиснюють, нагріваючи з концентрованою азотною, сірчаною чи хлорною кислотою або з сумішшю цих кислот. Незважаючи на те що сире озолення виконують за температур, дещо нижчих, ніж за сухого озолення, все ж існує небезпека часткового випарювання Sb, As, Zn, Hg, Se, P і деяких інших елементів.

Розрізняють два способи сирого озолення: а) у відкритій посудині; б) сире озолення під тиском.

За першого способу зразок розташовують у герметичній тефлоновій посудині з кількома мілілітрами концентрованої азотної кислоти або суміші азотної та хлорної кислот. Пробу нагрівають до температури 70–105°C і термостатують за цієї ж температури протягом 1–2 год. Після охолодження розчин нагрівають до температури 70–105°C у відкритій тефлоновій склянці для видалення надлишку кислот. Із порівняння різноманітних модифікацій сухого і сирого озолення біологічних зразків, поданого в працях Вольскіса і Дорофєєва, випливає, що ці методики дають практично однакові результати за подальшого атомно-абсорбційного аналізу таких концентрацій металів, які містяться в тканинах і органах рослин. Тому, вибираючи методику, слід дотримуватися таких принципів:

- наявність необхідного посуду, обладнання і реактивів;
- можливість максимально спростити процедуру підготовки проби до аналізу;
- можливість підготувати до аналізу одночасно максимальну кількість проб;
- використання мінімального набору реактивів з метою уникнути внесення сторонніх домішок;

- уникнення (по можливості) перенесення проби в процесі підготовки до аналізу з однієї посудини в іншу.

У зв'язку з усім вищевикладеним пропонується така стандартна методика сирого озолення зразків тканин рослин. Наважку тканини масою приблизно 2 г розташовують в тефлоновій склянці на 50 мл, зважують з точністю до 0,1 г, потім висушують за температури 105°C протягом 24–28 год до постійної ваги, після чого пробу охолоджують в ексікаторі і знову зважують з точністю до 0,01 г. До склянки доливають 3–6 мл концентрованої азотної кислоти (особливо чистої). Відкрити тефлонову склянку нагрівають на плиті до 70–80°C для видалення надлишку кислоти. Якщо розчин після охолодження має темно-коричневий колір і непрозорий, необхідно додати 1 мл кислоти і повторити процедуру термостатування. Розчин випарюють до утворення маслянистого залишку. Для прискорення процесу відгону парів кислоти можна використовувати CO₂, який отримують з апарата Кіппа. Залишок проби розчиняють у кількох мілілітрах деіонізованої води, яку зливають в той же мірний посуд. Об'єм розчину доводять до 10 мл. Як мірний посуд можна використовувати мірні пробірки з притертими пробками. Для кожної конкретної тканини, яку аналізують, треба спочатку визначити мінімальний об'єм кислоти, необхідної для повного розчинення проби (але не більше 10 мл концентрованої HNO₃ для тефлонової склянки на 50 мл). *Тривале зберігання кислого розчину проби в тефлоновій склянці неприпустиме!*

Паралельно з аналізом серії проб біологічного матеріалу необхідно проводити холостий дослід, тобто той же дослід, але без аналізованої тканини. У випадку, коли наважка аналізованого матеріалу за масою менша 1 г, а об'єм розведення проби повинен бути не меншим 10 мл, концентрації металів, які містяться в мінімальних кількостях (кадмій, кобальт), можуть виявитися нижчими межі чутливості приладу. З метою підвищення чутливості методу рекомендується додати до розчину, який аналізують, кілька мілілітрів метил-ізобутилкетону (МІБК) або *n*-амілового спирту, ретельно перемішати розчин з органічним розчинником у ділильній лійці, злити після відстоювання нижню водну фазу і аналізувати її на вміст металів. Маючи органічну розчинність у слабкокислих і водних розчинах, органічні розчинники знижують як в'язкість, так і поверхневий натяг розчину і підвищують, таким чином, швидкість аспірації, збільшують концентрацію атомів у полум'ї. За попередньої обробки аналізованого розчину *n*-аміловим спиртом чутливість визначення розглядуваних 10 металів підвищується в 2–4 рази. Результати аналізу визначають за формулою

$$C = \frac{C_1 \cdot V}{P},$$

де C - концентрація елемента в наважці, мг/кг сирій ваги;
 C_1 – вміст елемента в 1 мл досліджуваного розчину;
 V – об'єм розчину, мл;
 P – маса наважки, г.

Повторність визначень металів триразова.

Зробіть висновок про вміст важких металів у рослинних зразках.

Лабораторна робота 2. Визначення проникності цитоплазми за дії температури та токсичних речовин

Мета: порівняти проникність живої та мертвої цитоплазми рослинної клітини.

Обладнання: мікроскоп, предметне й накривне скло, свердла, штативи з п'ятьма пробірками, піпетки, чашка Петрі, леза, дощечка, мірна пробірка, гумові пробки.

Реактиви: 30 %-на оцтова кислота, 50 %-й спирт, 1М KNO₃, кипляча вода.

Об'єкт дослідження: коренеплоди червоного буряку.

Вступні пояснення

Протоплазма (від грец. *πρώτος* – «перший» та *πλάσμα* – «виліплене, оформлене») – це жива речовина, вміст живої клітини, її цитоплазма та ядро. Уявлення про протоплазму виникло і утвердилось у зв'язку з розвитком клітинної теорії. Термін «протоплазма» ввів у 1839 р. Ян Пуркіне для визначення формоутворювальної речовини зародка, подібної до камбію рослин. В 1882 р. польський ботанік Е. Страсбургер виокремив у межах протоплазми 2 складники – каріоплазму і цитоплазму.

Для протоплазми всіх живих клітин характерна принципова єдність фізико-хімічних властивостей і структурно-функціональної організації. Протоплазма рослинної й тваринної клітин містить (%): води – 75-85, білка – 10-20, ліпідів – 2-3, неорганічних речовин – 1. Сухий залишок протоплазми на 96 % складається з вуглецю, кисню, водню та азоту, на 3 % – з кальцію, фосфору, калію, сірки; в невеликих кількостях в протоплазмі є йод, залізо, натрій, хлор, магній, мідь та інші елементи. Протоплазма – багатозафазна колоїдна система, в якій дисперсним середовищем є вода з розчиненими в ній неорганічними солями, а основними дисперсними фазами – білки, ліпіди, нуклеопротеїди. Протоплазма – це не тільки неоднорідне, а й високоструктуроване і компартиментизоване (розділене перегородками – мембранами – на відсіки, що виконують певні функції) середовище, якому властивий високий ступінь молекулярної організації. В структурній організації протоплазми та її функціональній активності важлива роль належить біологічним мембранам. Останні розподіляють протоплазму на окремі структури, обмежують дифузію речовин, одночасно створюють специфічну орієнтацію поліферментативних систем, на яких можуть бути локалізовані певні типи реакцій. Цитоплазма живої клітини завдяки напівпроникності утримує в клітинному соці деякі розчинені речовини. У разі пошкодження цитоплазми (температурою, хімічними агентами тощо) вона втрачає цю властивість, і речовини з клітинного соку виходять назовні через ультрамікроскопічні пори клітинної оболонки.

Хід роботи

3 коренеплодів очищеного столового буряку вирізають диски товщиною до 0,5 см і промивають під проточною водопровідною водою, поки та не залишиться прозорою. Промиті диски буряку поміщають по п'ять у кожен пробірку за схемою, наведеною в табл. 1.

Таблиця 1

Результати визначення проникності цитоплазми

Варіант досліджу	Контроль (дистильована вода) (5 мл)	Кипляча дистильована вода (5 мл)	30 %-на оцтова кислота (5 мл)	50 %-й спирт (5 мл)
Інтенсивність забарвлення розчину				

Через 30 хв після початку досліджу всі пробірки інтенсивно збовтують. Визначають інтенсивність забарвлення розчинів і ступінь пошкодження тканин такими термінами: слабе, середнє, сильне. Результати записують у таблицю. Для спостереження за станом клітин із диска буряку контрольного варіанта з найбільш інтенсивно забарвленим розчином роблять тонкі зрізи, розміщують їх на предметному склі в краплі 1 М розчину KNO_3 , накривають накривним склом і розглядають у мікроскоп.

Клітини зрізів обох варіантів зарисуйте і зробіть висновок про ступінь пошкодження цитоплазми.

Лабораторна робота 3. Визначення температурного порога коагуляції цитоплазми

Мета: визначити рівень жаростійкості рослин за температурним порогом коагуляції цитоплазми і з'ясувати причини шкідливої дії високих температур на рослинний організм.

Обладнання: хімічні склянки, пробірки, піпетки, водяна баня, термометр.

Реактиви: нейтральний червоний, 1 М цукроза.

Об'єкт дослідження: цибулина.

Вступні пояснення

Температура, за якої рослини ростуть і розвиваються найбільш інтенсивно, є оптимальна. Відхилення від неї сповільнює ріст і розвиток рослин або й згубно діє на них. Температура, нижче за яку ріст і розвиток припиняються, називається мінімальною, а та, вище за яку припиняються ті самі процеси, – максимальною.

Хід роботи

Приготувати 12 зрізів епідерми листків. Помістити по 2 зрізи в пробірки з водою. Приготувати водяні бані з температурою 48, 50, 52, 54, 56,

58⁰С. Помістити у водянй бані пробірки зі зрізами й підтримувати відповідний рівень температури. Через 10 хв зрізи перемістити на предметні стекла. Якщо клітини не забарвлені, обробити зрізи нейтральним червоним. На зрізи епідерми нанести по одній краплі 1 М цукрози. Через 15-20 хв розглянути зрізи під мікроскопом – чи спостерігається плазмоліз.

Дані занести у табл. 2, позначивши наявність або відсутність плазмолізу.

Таблиця 2

Результати визначення температурного порога коагуляції

Вид рослини	Плазмоліз за температури, ⁰ С					
	48	50	52	54	56	58

Зробіть висновок про рівень жаростійкості рослин за температурним порогом коагуляції цитоплазми і про причини шкідливої дії високих температур на рослинний організм.

Лабораторна робота 4. Визначення вмісту хлорофілу

Мета: визначити вміст хлорофілу в рослинному матеріалі.

Обладнання: мірні колби, хімічні склянки, пробірки, піпетки, лійка, паперові фільтри, бюкси, бюретка, лід, спектрофотометр СФ-46, водяна баня, термометр.

Реактиви: 96 %-й етанол, 5 %-й розчин ортофосфорної кислоти, 0,001 Н розчин 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію, 15 %-й розчин КІ, 1 %-й розчин крохмалю, 0,001 Н розчин йодату калію КІО₃, аскорбінова кислота, дистильована вода.

Об'єкт дослідження: рослинний матеріал.

Вступні пояснення

Хлорофіл – зелений пігмент рослин, за допомогою якого відбувається фотосинтез. Він розміщується в особливих клітинних структурах, що називаються хлоропластами. Хлорофіл являє собою сполуку, похідну від порфіринового комплексу магнію (рис. 2).

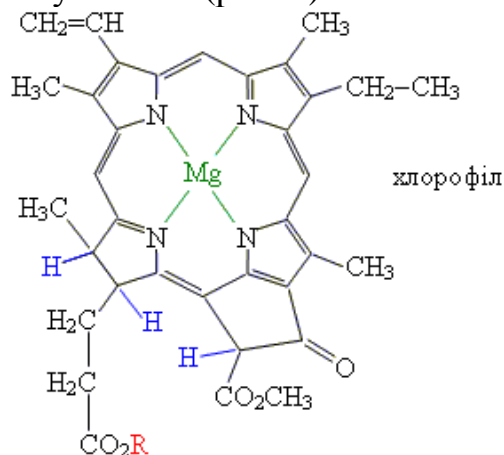


Рис.2. Будова хлорофілу

Виділяють декілька форм хлорофілу. У більшості зелених рослин, як і зелених та евгленових водоростей, містяться хлорофіли *a* і *b*. Хлорофіл *a* є універсальний майже для всіх фотосинтезуючих організмів, таких як ціанобактерії, прохлорофітні бактерії, бурі, діатомові, криптомонадні, червоні, жовто-зелені, золотаві, динофітні та евгленові водорості. Форми хлорофілу *c* (*c1*, *c2*) характерні для різноманітних водоростей (хлорофіл *c1* характерний для діатомових та динофітних водоростей, *c2* – для бурих, криптомонадних, жовто-зелених, золотавих водоростей). Хлорофіл *d* властивий ціанобактеріям та червоним водоростям, хлорофіл *f* – лише ціанобактеріям. Прохлоронові бактерії містять хлорофіли *a*, *b* та *c*. Вміст суми хлорофілів у вищих рослин, а також окремих фракцій залежить від фази розвитку рослини, ступеня росту, впливу чинників навколишнього середовища.

Хід роботи

Для визначення вмісту суми хлорофілів *a* і *b* наважку листків масою 2 г тричі екстрагують 96 %-м етанолом по 10 мл. Після фільтрації об'єм об'єднаного екстракту доводять до 30 мл і аналізують на спектрофотометрі СФ-46 за довжини хвилі 654 нм. Розрахунок загальної кількості хлорофілу здійснюють за формулою

$$C_a + C_b = 25,1 E_{654} ,$$

де $C_a + C_b$ – концентрація хлорофілів *a* та *b*;

E_{654} – оптична густина екстракту за довжини хвилі 654 нм.

Для визначення концентрації хлорофілів *a* і *b* застосовують формули

$$C_a = 13,7 E_{665} - 5,76 E_{649},$$

$$C_b = 25,8 E_{649} - 7,60 E_{665}.$$

де C_a – концентрація хлорофілу *a*;

C_b – концентрація хлорофілу *b*;

E_{665} – оптична густина екстракту за довжини хвилі 665 нм;

E_{649} – оптична густина екстракту за довжини хвилі 649 нм.

Вміст хлорофілу у тканинах визначають в міліграмах на 1 г сирі маси за формулою

$$V_{ек} C_{хл} / 1000 m_{нав} ,$$

де $V_{ек}$ – об'єм екстракту (30 мл);

$C_{хл}$ – концентрація хлорофілу (г/л);

$m_{нав}$ – маса наважки (2 г).

Зробіть висновок про загальний вміст хлорофілу та хлорофілів *a* і *b* у рослинних зразках.

Лабораторна робота 5. Визначення нітратів

Мета: засвоїти експрес-метод визначення потреби рослин в азоті.

Обладнання: предметне скло, фільтрувальний папір, скляні палички, кольорова шкала, леза.

Реактиви : 1 %-й дифеніламін в H_2SO_4 .

Об'єкт дослідження: горох, пшениця, кукурудза, кімнатні рослини.

Вступні пояснення

Азот – одна з найпоширеніших речовин у біосфері, вузькій оболонці Землі, де підтримується життя. Так, 79 % повітря, яким ми дихаємо, складається з цього елемента. Основна частина атмосферного азоту знаходиться у вільній формі, за якої два атоми азоту з'єднані разом, утворюючи молекулу азоту – N_2 . Оскільки зв'язки між двома атомами дуже міцні, живі організми не здатні безпосередньо використовувати молекулярний азот – його спочатку необхідно перевести в «зв'язаний» стан. У процесі зв'язування молекули азоту розщеплюються, даючи можливість окремим атомам азоту брати участь у хімічних реакціях з іншими атомами, наприклад киснем, і, таким чином, перешкоджаючи їм знову об'єднуватися в молекулу азоту. Зв'язок між атомами азоту й іншими атомами досить слабкий, що дозволяє живим організмам засвоювати ці елементи. Тому зв'язування азоту – надзвичайно важлива частина життєвих процесів на нашій планеті. Сполуки азоту також беруть участь у хімічних процесах, що відбуваються в атмосфері, і впливають на клімат.

Азот у формі неорганічних сполук, таких як нітрати у ґрунті, абсорбується рослинами і перетворюється на органічні сполуки у тканинах рослин. Нітрати – солі азотної кислоти, яких дуже багато в навколишньому середовищі, наприклад у ґрунті або воді. Азот поряд з фосфором і калієм становить основу живлення рослин, у тому числі й овочів. Нітрати входять до складу багатьох добрив, наприклад калійна селітра (нітрат калію), кальцієва селітра (нітрат кальцію), аміачна селітра (нітрат амонію) і под. Нітрати можуть також стати причиною виникнення раку й інших захворювань. За певних умов нітрати можуть з'єднуватися із вторинними і третинними амінами, утворюючи нітрозаміни, які є канцерогенами. Нітроти ослабляють захисні системи організму. Як наслідок, людина частіше піддається простудним захворюванням, які довго не проходять. У разі надлишку в ґрунті нітратів рослини здатні поглинати їх у великих кількостях. У цьому випадку тільки частина нітратів перетворюється в рослинний білок, інша кількість накопичується в овочах і травах у чистому вигляді, а потім надходить в організм людини в процесі вживання цих рослин у їжу.

Хід роботи

Свіжі зрізи з рослини розміщують на предметному склі з проміжками в 1-2 см. Потім на кожен зріз наносять по одній краплі 1%-го розчину дифеніламіну в сірчаній кислоті. Інтенсивність забарвлення зрізів порівнюють за кольоровою шкалою та визначають кількість балів за табл. 3.

Шкала потреби рослин в азотних добривах

Бал забезпеченості	Візуальні ознаки забарвлення зрізу	Вміст нітратів	Потреба рослини в азоті
1	Блідо-голубе, дуже швидко настає обвуглення	Низький	Гостра
2	Синє, поступово зникає	Середній	Середня
3	Темно-синє або темно-фіолетове, настає швидко, стійке	Високий	Забезпечені

Зробіть висновок про вміст нітратів у рослинних зразках та потребу рослини в азоті.

Лабораторна робота 6. Визначення фосфатів

Мета: засвоїти експрес-метод визначення потреби рослин у фосфорі.

Обладнання: предметне скло, фільтрувальний папір, скляні палички, кольорова шкала, леза.

Реактиви: $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, бензидин, насичений водний розчин CH_3COONa .

Об'єкт дослідження: горох, пшениця, кукурудза, кімнатні рослини.

Вступні пояснення

Фосфати – солі фосфатної кислоти. Оскільки фосфатна кислота є трьохосновна, від неї походять три ряди солей, наприклад:

- $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{NaOH} = \text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$;
- $\text{H}_3\text{PO}_4 + 2\text{NaOH} = \text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$;
- $\text{H}_3\text{PO}_4 + 3\text{NaOH} = \text{Na}_3\text{PO}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$.

Першу з цих солей називають дигідрофосфатом натрію, другу – гідрофосфатом натрію, а третю – нормальним (середнім) фосфатом натрію. Дигідрофосфати металів у воді розчиняються добре. Усі нормальні фосфати, за винятком фосфатів натрію, калію і амонію, у воді нерозчинні. Гідрофосфати за своєю розчинністю у воді займають проміжне місце між дигідрофосфатами і нормальними фосфатами. Але малорозчинні у воді гідрофосфати та нерозчинні нормальні фосфати легко розчиняються навіть у слабких органічних кислотах.

Фосфор також дуже потрібен рослинам. Його не можна замінити ніяким іншим елементом. Він обов'язковий компонент складних білків. Достатня кількість фосфору сприяє кращому засвоєнню азоту, калію, магнію. Фосфор прискорює утворення та досягання плодів. За його нестачі сповільнюється ріст, цвітіння, зав'язування та досягання плодів.

Хід роботи

На пляму соку, нанесеного на фільтрувальний папір і на зріз на предметному склі, наносять краплями послідовно розчини молібденово-кислого амонію, бензидину та насиченого водного розчину оцтовокислого натрію. Інтенсивність забарвлення порівнюють з кольоровою шкалою та оцінюють за табл. 4.

Таблиця 4

Шкала потреби рослин у фосфорних добривах

Бал забезпеченості	Візуальні ознаки забарвлення зрізу	Вміст фосфору	Потреба рослини у фосфорі
1	Сіро-голубе, судинні пучки темні	Низький	Гостра
2	Світло-синє, судинні пучки сині	Середній	Середня
3	Темно-синє, судинні пучки синьо-чорні	Високий	Забезпечені

Зробіть висновок про вміст фосфатів у рослинних зразках та потребу рослини у фосфорі.

Лабораторна робота 7. Визначення калію

Мета: засвоїти експрес-метод визначення потреби рослин у калії.

Обладнання: предметне скло, фільтрувальний папір, скляні палички, кольорова шкала, леза.

Реактиви: 5 %-й кобальт-нітрит натрію, HCl (3:1).

Об'єкт дослідження: горох, пшениця, кукурудза, кімнатні рослини.

Вступні пояснення

Калій не входить до складу органічних сполук, але відіграє важливу роль у процесі утворення вуглеводів, підвищує стійкість рослин до хвороб, холодостійкість, впливає на смак овочів. Особливо багато калію виносять з ґрунту коренеплоди. За його нестачі сповільнюється ріст, рослини виростають низькорослі та кволі. Зокрема, листки у рослин стають крихкими, із закрученими догори краями. Хлорозна тканина буріє і відмирає. У капусти, наприклад, краї нижніх листків світлішають, жовкнуть, буріють і відмирають. На торфових ґрунтах сильно виявляється зморшкуватість листків, головки пухкі й дрібні. У помідорів на краях листків з'являються плями бронзового відтінку, потім утворюється суцільна кайма з відмерлих тканин. У огірків листки темно-зелені, куполоподібні. Краї нижніх листків жовтіють і відмирають. Плоди помітно розширені у верхній частині. У цибулі кінці старих листків стають сірувато-жовтими, соломисто-жовтими і в'януть. У моркви листки закручуються, їх краї буріють, зелене забарвлення поступово змінюється, стає сіруватим, а потім бронзовим. У разі нестачі калію ріст рослин припиняється, вони стають карликовими, верхні бруньки відмирають, корені таких рослин короткі, товсті й ослизнені. У помідорів

верхні листки жовтіють, а нижні залишаються зеленими, рослини кволі, ростові точки відмирають. Коренева система невелика і сильно розгалужена, плоди пошкоджуються верхівковою гниллю.

Хід роботи

На предметному склі розміщують зріз тієї чи іншої рослини. Потім його придавлюють. На одержану пляму соку і на зріз наносять краплю 5 %-го розчину кобальт-нітриту натрію. Через 1-2 хв додають 1-2 краплі соляної кислоти, розведеної в співвідношенні 3:1. Через 3-5 хв порівнюють інтенсивність забарвлення осаду з кольоровою шкалою для визначення калію й оцінюють за табл. 5.

Таблиця 5

Шкала потреби рослин в калійних добривах

Бал забезпеченості	Візуальні ознаки забарвлення зрізу	Вміст калію	Потреба рослини в калії
1	Солом'яно-жовте	Низький	Гостра
2	Жовтогаряче	Середній	Середня
3	Червоно-сурикове	Високий	Забезпечені

Зробіть висновок про вміст калію у рослинних зразках та потребу рослини у калії.

Лабораторна робота 8. Вплив гідразину на ростові, анатомічні та морфологічні показники рослин

Мета: вивчити вплив розчинів гідразину на ростові, морфологічні й анатомічні показники *Leonurus cardiaca L.* залежно від їх концентрації, тривалості дії та часу аплікації препарату.

Обладнання: чашки Петрі, мірні колби, фільтрувальний папір, термометр, рН-метр, лінійка, годинник, санний мікроскоп, мікроскоп з окуляр-мікрометром (збільшення x 200).

Реактиви: розчини з різною концентрацією гідразину ($1 \cdot 10^{-5}$: $1 \cdot 10^{-4}$: $1 \cdot 10^{-3}$: $1 \cdot 10^{-2}$: $1 \cdot 10^{-1}$ %), дистильована вода, субстрат з ґрунтової суміші „Універсальна поліська" з рН 5,5-6,5 та з доданням рівної за об'ємом кількості піску, фіксатор Карнуа (96 %-й етиловий спирт – 6 частин; хлороформ – 3 частини; оцтова кислота (крижана) – 1 частина), парафін.

Об'єкт дослідження: *Leonurus cardiaca L.*

Вступні пояснення

Останнім часом умови існування рослин погіршуються у зв'язку з глобальними процесами на Землі, як природного, так і антропогенного походження. Тому зростає потреба в точній оцінці адаптивного потенціалу рослин, яка неможлива без вивчення їх стійкості до шкідливого впливу хімічних речовин, що потрапляють у навколишнє середовище в складі відходів (токсини, гербіциди, мутагени і под.) . До найбільш небезпечних для організмів токсикантів належить гідразин, який часто використовується у промисловому виробництві. Гідразин – надзвичайно небезпечна речовина

(1-й клас небезпеки). Величина його ГДК (мг/м^3) – 0,1. Продукція гідразину і його похідних безперервно зростає, що спричинило появу екологічної проблеми зберігання, транспортування і ліквідації відходів цих речовин, які мають сильну фізіологічну дію і високу токсичність. Існують дані про мутагенні і канцерогенні властивості гідразину. Доцільне є вивчення впливу токсикантів на економічно вигідні культурні рослини, оскільки саме вони проявляють меншу стійкість до несприятливих умов середовища. Тому за зміною ростових, анатомічних та морфологічних показників під впливом гідразину можна визначити фізіологічну активність його як щодо всього рослинного організму, так і стосовно окремих його якостей, наприклад вмісту біологічно активних речовин.

Хід роботи

Дослід з вивчення впливу гідразину на рослинний організм складається з двох стадій. Для проведення першої стадії готують 5 розчинів з різною концентрацією гідразину: $1 \cdot 10^{-5}$: $1 \cdot 10^{-4}$: $1 \cdot 10^{-3}$: $1 \cdot 10^{-2}$: $1 \cdot 10^{-1}$ %. Відібране насіння поміщають в чашки Петрі по 30 штук. Застосовують метод пророщування на зволоженому фільтрувальному папері. Дослід проводять в лабораторних умовах. Обробка триває протягом 48 год (2 доби): 24 год (1-ша доба), 24 год (2-га доба). Для контролю насіння замочують у воді. Визначають вплив гідразину на довжину надземної частини і довжину кореня паростків. Заміри здійснюють на 7-му добу. На другій стадії обробку насіння проводять тими самими розчинами, вона триває 12 год. Далі насіння висаджують на субстрат з ґрунтової суміші „Універсальна поліська” з рН 5,5-6,5 та з доданням рівної за об'ємом кількості піску. Дослід проводять у закритому приміщенні зі сталою температурою 23°C. Освітлення повинне бути природним, з максимальною інтенсивністю 1500 лк.

Визначають схожість у процентах, за кількістю пророслого насіння на 7-му добу. Висоту дослідної рослини вимірюють на 21-шу добу. Підраховують кількість листків у вегетативній частині пагона. Матеріал для цитологічних і анатомічних досліджень відбирають з середньої частини стебла. Площу листків визначають методом квадратів. Для фіксації відбирають матеріал з серединної частини листової пластинки на 20-й день від початку появи листка. Використовують фіксатор Карнуа: 96 %-й етиловий спирт – 6 частин; хлороформ – 3 частини; оцтова кислота (крижана) – 1 частина. Тривалість фіксації – 2 год. Зразок зневоднюють і заливають в парафін. Зрізи роблять на санному мікроскопі. Площу провідних пучків визначають на поперечних зрізах за допомогою мікроскопа з окуляр-мікрометром (збільшення $\times 200$). Ширину діапазону варіації показників підраховують, розділивши найбільший показник у певному варіанті обробки на найменший показник у цьому ж варіанті обробки. Коефіцієнт фізіологічної активності (КФА) визначають поділом середнього показника певного параметра в дослідженому варіанті на середній показник цього параметра в контролі.

Зміни довжини кореня і надземної частини паростків за дії розчинів з різною концентрацією гідразину залежно від часу обробки заносять до табл. 6-8.

Таблиця 6

Вплив гідразину на довжину надземної частини паростків *Leonurus cardiaca L.* залежно від часу обробки і концентрації

Час обробки	Довжина надземної частини, мм				
	Контроль	Концентрація гідразину, %			
		$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$
24 год (1-ша доба)					
24 год (2-га доба)					
48 год (2 доби)					

Таблиця 7

Вплив гідразину на довжину кореня паростків *Leonurus cardiaca L.* залежно від часу обробки і концентрації

Час обробки	Довжина кореня, мм				
	Контроль	Концентрація гідразину, %			
		$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$
24 год (1-ша доба)					
24 год (2-га доба)					
48 год (2 доби)					

Таблиця 8

КФА різних концентрацій гідразину стосовно довжини кореня і надземної частини паростків *Leonurus cardiaca L.* залежно від тривалості та часу обробки

Показник	Час обробки	Концентрація гідразину, %				
		$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-1}$
Довжина надземної частини, мм	24 год (1-ша доба)					
	24 год (2-га доба)					
	48 год (2 доби)					
Довжина кореня, мм	24 год (1-ша доба)					
	24 год (2-га доба)					
	48 год (2 доби)					

*Зробіть висновок про вплив розчинів різної концентрації гідразину на ростові, морфологічні й анатомічні показники *Leopurus cardiaca L.* залежно від їх концентрації, тривалості дії та часу аплікації препарату.*

Лабораторна робота 9. Визначення вмісту ТБК-активних речовин

Мета: визначити вміст ТБК-активних речовин у рослинному матеріалі.

Обладнання: мірні колби, хімічні склянки, пробірки, піпетки, фарфорова ступка, кварцовий пісок, лійка, паперові фільтри, бюкси, спектрофотометр СФ-46, центрифуга, водяна баня, термометр.

Реактиви: 10 %-й розчин трихлороцтової кислоти (ТХО), розчин тіобарбітурової кислоти (ТБК), дистильована вода.

Об'єкт дослідження: рослинний матеріал.

Вступні пояснення

За оптимальних умов процеси пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) проходять в клітині збалансовано й концентрація його продуктів підтримується на постійному низькому рівні. В умовах стресу відбувається порушення про- та антиоксидантних процесів у клітині.

Надмірному розвитку вільнорадикальних процесів перешкоджає система антиоксидантного захисту. У випадку виснаження таких захисних ресурсів можлива необоротна деструкція ліпідів, білків, мембранних структур.

Продуктами процесів ПОЛ є ТБК-активні продукти (такі, що вступають у реакцію з тіобарбітуровою кислотою), основний з яких – малоновий діальдегід (МДА). Цей біфункціональний альдегід здатний утворювати шиффові основи з аміногрупами білка, виступаючи як зшиваючий агент. В результаті утворюються нерозчинні білок-ліпідні комплекси, що мають назву пігментів зносу або ліпофусцинів. У відповідь на різні стресові впливи в клітинах рослини відбувається збільшення вмісту МДА, що пов'язане з активацією вільнорадикальних реакцій. Таким чином, вміст МДА може служити показником активності окиснювальних процесів, обумовлених кисневими радикалами. При цьому чим вища концентрація металу, тим вищі вміст ТБК-активних продуктів і активність ферментів оксидоредуктаз.

Хід роботи

В основу цього методу покладено визначення концентрації забарвленого комплексу, який утворився в результаті реакції МДА з двома молекулами ТБК у кислому середовищі за температури 99-100°C. Наважку досліджуваного матеріалу (0,5 г) подрібнюють ножицями й розтирають у фарфоровій ступці з 3 мл дистильованої води. Далі до гомогенату додають 3 мл ТХО й гомогенізують вдруге. З отриманого гомогенату відбирають у мірні пробірки з притертими пробками дві проби по 2 мл. До однієї з проб додають такий же об'єм (2 мл) ТХО, у подальшому цю пробу використовують як контроль у спектрофотометрії. До другої проби доливають 2 мл розчину ТБК. Після цього проби інкубують

протягом 30 хв на киплячій водяній бані, потім охолоджують та центрифугують 10 хв за частоти 3000 об/хв. Супернатант акуратно відбирають шприцом у пробірки та вимірюють на спектрофотометрі (або фотоелектроколориметрі) за $\lambda=532$ нм. Кількість МДА у рослинній тканині виражають у наномолях МДА на 1 г сирової маси.

Зробіть висновок про вміст ТБК-активних речовин у рослинному матеріалі.

Лабораторна робота 10. Визначення перебігу процесів пероксидного окиснення ліпідів у горосі за дії комплексу важких металів

Мета: визначити ТБК-активні продукти за оцінкою накопичення кінцевого продукту пероксидного окиснення ліпідів – МДА.

Обладнання: центрифугальні пробірки, піпетки, водяна баня, термостійкі пробірки, фарфорова ступка з кварцовим піском, спектрофотометр, кювета з довжиною оптичного шляху 1 см, центрифуга.

Реактиви: 1 ПДК- та 10 ПДК-розчини комплексу важких металів (Са, Ni); 0,1 М калійфосфатний буфер; 17 %-й розчин ТХО; 0,8 %-й розчин 2-тіобарбітурової кислоти.

Об'єкт дослідження: трьохдобові паростки гороху.

Вступні пояснення

Важкі метали стимулюють надлишкове утворення активних форм кисню, в результаті чого виникають коливальні зміни фізико-хімічних властивостей протоплазми, мембран органел, порушення метаболічних процесів, що призводить до посилення вільнорадикальних процесів.

Хід роботи

В закрутках фільтрувального паперу в дистильованій воді проводять пророщування насіння гороху протягом 3 діб. Потім закрутки поміщають у розчини важких металів. Матеріали для аналізу відбирають через 6, 24 та 48 год. Дослід здійснюють у трикратній повторності.

У фарфоровій ступці розтирають з кварцовим піском наважку рослинного матеріалу масою 1 г в 5 мл 0,1 М калійфосфатного буфера. Отриманий гомогенат центрифугують за частоти 3000 об/хв протягом 10 хв. Потім відбирають в пробірку 0,5 мл супернатанту, доливають 2,0 мл дистильованої води, 1,0 мл розчину ТХО та 1,0 мл розчину ТБК. Пробу інкубують на водяній бані 10 хв. Потім центрифугують протягом 10 хв за частоти 3000 об/хв.

Інтенсивність забарвлення вимірюють за довжини хвилі 540 нм на спектрофотометрі у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см.

Кількість МДА у рослинних тканинах гороху розраховують у наномолях МДА на 1 г сирової маси рослинної наважки за формулою

$$X = \frac{D \cdot 1000000 \cdot V \cdot A}{H \cdot \varepsilon},$$

де X – кількість МДА;

D – значення оптичної густини за $\lambda = 540$ нм;

V – об'єм реакційної суміші (4,5 мл);

A – відношення загального об'єму витяжки до об'єму проби, взятої для визначення МДА;

ε – молярний коефіцієнт екстинкції, що дорівнює 155 000 л/(см·моль);

H – маса наважки рослинного матеріалу, г.

Зробіть висновок про вплив важких металів на перебіг процесів пероксидного окиснення ліпідів.

Лабораторна робота 11. Визначення вмісту аскорбінової кислоти та глутатіону

Мета: визначити вміст аскорбінової кислоти та глутатіону в рослинному матеріалі.

Обладнання: фарфорова ступка, кварцовий пісок, лійка, мірні колби, хімічні склянки, пробірки, піпетки, паперові фільтри, бюкси, бюретка, лід, спектрофотометр СФ-48, водяна баня, термометр, секундомір, рН-метр.

Реактиви: 5 %-й розчин ортофосфорної кислоти, 0,001 Н розчин 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію, 15 %-й розчин КІ, 1 %-й розчин крохмалю, 0,001 Н розчин йодату калію KIO_3 , аскорбінова кислота, 0,4 М трис-буфер (рН = 8,9), реактив Елмана, дистильована вода.

Об'єкт дослідження: рослинний матеріал.

Вступні пояснення

Антропогенне навантаження призводить до збільшення накопичення в біосфері важких металів, що в умовах глобального потепління негативно впливають на стан довкілля. У зв'язку з цим з'ясування адаптаційних реакцій рослинних організмів, реалізованих за допомогою антиоксидантної системи, є актуальне. Сильнодійні екологічні фактори зміщують прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в бік активації пероксидного окиснення ліпідів. Рослини мають потужну систему антиоксидантного захисту, до складу якої входять аскорбінова кислота і глутатіон.

Аскорбінова кислота (АК) присутня у всіх субклітинних компартиментах рослинних клітин в концентрації, яка потрібна для підтримки системи регенерації аскорбату. АК хімічно взаємодіє з активними формами кисню, вміст яких підвищується за стресових умов, а також бере участь у відновленні інших низькомолекулярних антиоксидантів шляхом неферментативних і ферментативних реакцій. Показано, що за дії сполук важких металів та інших токсикантів, підвищеної температури, в умовах посухи тощо, а також у разі комплексної дії несприятливих чинників порушується баланс про- та антиоксидантів. Аскорбінова

кислота є інтермедіатом окисно-відновних реакцій, з рівнем інтенсивності яких пов'язана стійкість рослин до стресових чинників. Встановлені особливості антиоксидантного статусу рослинних організмів за комплексної дії стресових факторів свідчать про різну толерантність досліджуваних рослин як до дії важких металів, так і до впливу температури. Зокрема, сумісний вплив важких металів та підвищеної температури в листках паростків спричиняє потужний стрес, ослаблення якого проявляється в зниженні вмісту аскорбінової кислоти та одночасному підвищенні кількості її окиснених форм внаслідок використання аскорбату як антиоксиданту.

Рослини реагують на негативні чинники навколишнього середовища перебудовою окремих метаболічних процесів, зокрема активністю низькомолекулярної антиоксидантної системи, важливим компонентом якої є *глутатіон*, відновлена форма якого складається із залишків глутамінової кислоти, цистеїну та глікоколу. Завдяки сульфогідрильній групі глутатіон здатний до окисно-відновних перетворень. Глутатіон у рослині виконує багато функцій: захищає організм від активних кисневих сполук, відновлює та ізомеризує дисульфідні зв'язки, впливає на активність ферментів, підтримує функції мембран, є резервом цистеїну, впливає на біосинтез білка та нуклеїнових кислот, підвищує резистентність клітин рослин до дії різних хімічних і фізичних факторів зовнішнього середовища, зумовлює стійкість до катіонів важких металів. Причина зростання вмісту відновленого глутатіону – вплив несприятливих умов середовища, зокрема температури.

Хід роботи

Видалення аскорбінової кислоти та глутатіону. Рослинний матеріал (2 г свіжої сирової тканини) розтерти на льоду у фарфоровій ступці з 20 мл 5 %-го розчину ортофосфорної кислоти з додаванням кварцового піску до стану однорідної маси, яку перенести через лійку в мірну колбу на 50 мл, змиваючи ступку залишком ортофосфорної кислоти. Вміст колби довести до позначки дистильованою водою, перемішати та залишити на 5 хв. Потім збовтати колби протягом 2-3 хв й відфільтрувати матеріал через сухий складчастий фільтр до сухої колби.

Визначення вмісту аскорбінової кислоти. В три бюкси взяти по 5 мл фільтрату й титрувати з бюретки 0,001 Н розчином 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію до слабо-рожевого кольору, який не зникає протягом 1 хв.

Визначення вмісту глутатіону. В три бюкси взяти по 5 мл фільтрату, додати 3 краплі 15 %-го розчину КJ, 5 крапель 1 %-го розчину крохмалю та титрувати з бюретки 0,001 Н розчином КJО₃ до слабо-синього кольору, який не зникає протягом 1 хв.

Визначення вмісту відновленого глутатіону. Вміст відновленого глутатіону (GSH) у зразках визначити спектрофотометричним методом, як і в лабораторній роботі 6, вимірюючи оптичну густину реакційної суміші (2 мл 0,4 М трис-буфера, рН = 8,9, 1 мл небілкової фракції екстракту, 0,05 мл реактиву Елмана) за довжини хвилі 400 нм до та після інкубування за 37°C і враховуючи показники калібрувального графіка.

Визначення співвідношення об'ємів (к). Для приготування розчину аскорбінової кислоти в мірну колбу на 50 мл налити 20 мл 5 %-го розчину ортофосфорної кислоти, додати кристалик аскорбінової кислоти та довести рідину в колбі до позначки дистильованою водою. Відтитрувати 5 мл отриманого розчину в трьох повтореннях розчином 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію та розчином йодату калію, як показано вище, та визначити співвідношення об'ємів.

Вміст аскорбінової кислоти (А), глутатіону (Г) та редукуючу активність (РА) розрахувати за формулами

$$A = \frac{a \cdot k \cdot 0,088 \cdot M \cdot 100 \cdot 1000}{m \cdot n}, \text{ мкг/\%},$$

$$Г = \frac{(b - a \cdot k) \cdot 0,307 \cdot M \cdot 100 \cdot 1000}{m \cdot n}, \text{ мкг/\%},$$

$$РА = \frac{b \cdot M \cdot 100}{m \cdot n}, \text{ мл},$$

де a – кількість 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію, витраченого на титрування, мл;

b – кількість йодату калію, витраченого на титрування, мл;

k – співвідношення об'ємів: $\frac{\text{йодат} \cdot \text{калію, мл}}{2,6\text{-дихлорфеноліндофенол, мл}}$;

0,088 – кількість відновленої аскорбінової кислоти (мл), еквівалентна 1 мл 0,001 Н розчину 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію;

0,307 – кількість відновленого глутатіону (мл), еквівалентна 1 мл 0,001 Н розчину йодату калію;

n – наважка матеріалу, мг;

M – загальний об'єм екстракту, мл;

m – об'єм екстракту, взятого для титрування, мл.

Зробіть висновок про вміст аскорбінової кислоти та глутатіону в рослинному матеріалі.

Лабораторна робота 12. Визначення активності супероксиддисмутази

Мета: визначити активність супероксиддисмутази у рослинному матеріалі.

Обладнання: мірні колби, хімічні склянки, пробірки, піпетки, лійка, паперові фільтри, бюкси, спектрофотометр СФ-46, водяна баня, термометр.

Реактиви: 0,15 М фосфатний буфер (рН – 7,8), 0,160 мМ розчин феназинметасульфату (ФМС), 0,610 мМ розчин нітросинього тетразолію (НСТ), 1 мМ розчин нікотинамідаденіндинуклеотиду (NADH), льодяна оцтова кислота.

Об'єкт дослідження: рослинний матеріал.

Вступні пояснення

Вже два десятиліття велику увагу дослідників привертає відкритий Дж. Мак-Кордом й І. Фрідовичем фермент *супероксиддисмутаза* (КФ1.15.1.11),

який виконує у клітинах аеробних організмів унікальну функцію регуляції рівня супероксидних аніон-радикалів кисню O_2^- . Фермент складається з двох ідентичних субодиниць, кожна з яких має посеред ланцюга дисульфідний місток, одну сульфогідрильну групу та ацетильовану кінцеву аміногрупу. Місце, яке займає вода у ферменті, що знаходиться в активному стані, в ході каталітичного циклу може бути зайняте супероксидним радикалом, киснем або гідроксильним радикалом. Супероксиддисмутази належить важлива роль у підтриманні певного рівня радикального окиснення полієнових ацилів фосфоліпідів мембран – однієї з найважливіших умов клітинного гомеостазу. Останніми роками уявлення про біологічну роль супероксиддисмутази у клітині поширилися, поглибилися знання про механізми регуляції ферменту, з'явилися нові дані про його зв'язки з іншими біологічно активними сполуками та процесами. Роль вільних радикалів кисню у регуляції онтогенезу, а також їх участь у розвитку багатьох патологічних станів свідчать про важливість досліджень активності супероксиддисмутази як одного з показників неспецифічної резистентності організму до пошкоджуючих агентів різної етіології.

Супероксиддисмутаза – єдиний серед відомих антиоксидантних ферментів, який безпосередньо забезпечує обрив ланцюгів киснезалежних вільнорадикальних реакцій у клітинах аеробних організмів. Супероксиддисмутаза здійснює рекомбінацію радикалів кисню з утворенням пероксиду водню та триплетного кисню. Генерування радикалів супероксиду виникає за одноелектронного відновлення кисню ферментами у процесі транспорту електронів по дихальному ланцюгу мітохондрій та редокс-системі ендоплазматичного ретикулума, а також за автоокиснення різних внутрішньоклітинних компонентів: NAD(P)H, глутатіону, флавінів, цитохрому *c*, аскорбінової кислоти, адреналіну та ін. Аніон-радикал кисню може окиснюватися та відновлюватися, перетворюватися у реакційноздатний синглетний кисень та гідроксильний радикал, який є ініціатором пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Активність супероксиддисмутази пов'язана з інтенсивністю пероксидного окиснення ліпідів та залежить від накопичення інтермедіатів ПОЛ. З одного боку, накопичення токсичних пероксидних продуктів (пероксидів жирних кислот, альдегідів, кетонів та інших продуктів) призводить до пригнічення активності супероксиддисмутази та інших антиоксидантних ферментів (каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази). З іншого боку, за принципом зворотного зв'язку зниження активності супероксиддисмутази, зумовлене впливом різних факторів, може спричинити збільшення складу пероксидів ліпідів, яке не завжди повертається до вихідного рівня, незважаючи на нормалізацію рівня супероксиддисмутази та антиоксидантів.

Хід роботи

Активність супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.11) визначають за ступенем інгібування відновлення НСТ в присутності NADH та ФМС. До складу реакційної суміші входять 1,2 мл 0,15 М фосфатного буфера (рН – 7,8), 0,1 мл 0,160 мМ розчину ФМС, 0,3 мл 0,610 мМ розчину НСТ, 0,2 мл 1 мМ розчину NADH. Супернатант додають до інкубаційної суміші в кількості 0,3 мл. Реакцію

активують додаванням NADH і зупиняють через 1 хв додаванням 1 мл льодяної оцтової кислоти. Інтенсивність забарвлення вимірюють за довжини хвилі 540 нм. Активність виражають в умовних одиницях на 1 г сирої маси за хвилину.

Зробіть висновок про активність супероксиддисмутази у рослинному матеріалі.

Лабораторна робота 13. Визначення активності каталази

Мета: визначити активність каталази у рослинному матеріалі.

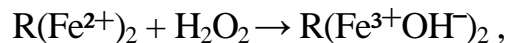
Обладнання: мірні колби, хімічні склянки, пробірки, піпетки, фарфорова ступка, кварцовий пісок, лійка, паперові фільтри, бюкси, спектрофотометр СФ-46, центрифуга, водяна баня, термометр.

Реактиви: СаСО₃, дистильована вода, 1%-й розчин пероксиду водню, 10 %-й розчин сірчаної кислоти, 0,1 Н розчин перманганату калію.

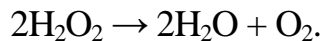
Об'єкт дослідження: рослинний матеріал.

Вступні пояснення

Каталаза належить до класу оксидоредуктаз. Вона розщеплює пероксид водню на воду та молекулярний кисень. Пероксид водню здатний однаково легко віддавати і приймати електрони, тобто бути і окиснювачем, і відновником. Тому взаємодія каталази з пероксидом водню проходить у дві стадії. На першій стадії реакції пероксид водню буде окиснювачем:



а на другій стадії – відновником:



Оскільки каталаза бере безпосередню участь в реакції, то за кількістю розкладеного за одиницю часу пероксиду можна розрахувати активність ферменту. Оптимальне значення рН для каталази лежить в межах 6,8 – 7,2. Каталаза знаходиться на одному з перших місць серед інших ферментів за каталітичною активністю, що дозволяє використовувати цей фермент як індикатор забруднень. Просторово основний фонд каталази (до 80 %) локалізований в пероксисомах, значно менший (до 15 %) – в мітохондріях і ще менший (до 7 %) – в цитозолі.

Молекулярна маса каталази різна, залежно від виділення препарату і способу його визначення вона коливається від 225 до 350 кДа. Причиною цих відмінностей може бути часткове виділення слабозв'язаних білкових субодиниць в процесі виділення ферменту. Каталаза належить до гемопротейдних ферментів, до складу яких входить залізо. При цьому атом заліза простетичної групи підлягає поперемінному окисненню і відновленню. Одна молекула рослинної каталази включає дві простетичні групи. Характер їх зв'язку з білком до кінця невідомий. Можливо, що крім ефірних чи інших зв'язків через пропіоновокислі групи є зв'язок атома заліза з атомом імідозолу, що належить до гістидинового залишку білкового ланцюга. Спектр поглинання каталази не змінюється в разі дії такого сильного відновника, як гідросульфат натрію: це свідчить про дуже сильну стабілізацію окисненого стану заліза в молекулі ферменту. Валентний

стан заліза не змінюється і в процесі розщеплення пероксиду водню даним ферментом. Каталаза інактивується синільною кислотою, сірководнем, гідроксиламіном і азидом натрію. Вона нестійка в кислому середовищі й руйнується за рівня рН, нижчого 3,0. З підвищенням температури понад 10° С зростає руйнування каталази пероксидом водню.

Хід роботи

Активність каталази визначають титриметричним методом, заснованим на урахуванні кількості пероксиду водню, розкладеного під дією ферментного препарату. Наважку 5 г свіжого рослинного матеріалу розтирають в ступці з кварцовим піском та 0,3 г CaCO₃, потім додають 20 мл води і знову ретельно розтирають до отримання однорідної маси. Після цього розтерту масу водою кількісно переносять в мірну колбу на 100 мл і доводять об'єм суспензії до мітки. Через 30-40 хв суміш фільтрують або центрифугують. Дві порції чистого фільтрату або центрифугату (по 20 мл) поміщають в колби на 100 мл. Одну з колб кип'ятять 2-3 хв для інактивації ферменту і потім охолоджують. В обидві колби доливають по 20 мл води та по 3 мл 1%-го розчину пероксиду водню. Час інкубації – від 20 до 30 хв. Після закінчення інкубації до вмісту обох колб додають по 4-5 мл 10 %-го розчину сірчаної кислоти і титрують 0,1 Н розчином перманганату калію до слабо-рожевого забарвлення, яке не зникає протягом хвилини. За різницею між контрольним та дослідним титруванням визначають кількість пероксиду водню, розкладеного за час інкубації, в розрахунку на 1 г вихідної рослинної речовини. Активність каталази виражають у мікромольх за хвилину на 1 г сирової маси.

Зробіть висновок про активність каталази у рослинному матеріалі.

Лабораторна робота 14. Визначення активності пероксидази

Мета: визначити активність пероксидази у рослинному матеріалі.

Обладнання: мірні колби, хімічні склянки, пробірки, піпетки, фарфорова ступка, кварцовий пісок, лійка, паперові фільтри, бюкси, спектрофотометр СФ-46, центрифуга, водяна баня, термометр.

Реактиви: ацетатний буфер (рН=5,4), дистильована вода, 1%-й розчин пероксиду водню, бензидин.

Об'єкт дослідження: рослинний матеріал.

Вступні пояснення

Пероксидаза належить до класу окисно-відновних ферментів, які каталізують окиснення та відновлення відповідного субстрату. Даний субстрат розглядається як донор протонів. Класичні пероксидази 1.11.1.7 – це гемопротейни, специфічні лише стосовно пероксиду водню. До складу пероксидаз входить група специфічних ензимів, серед яких слід виділити: аскорбатпероксидазу, глутатіонпероксидазу та ін. Пероксидаза каталізує окиснення багатьох органічних сполук: фенольні сполуки, цитохром *c*, нітрити, аскорбінова кислота, індоліламін, гідрохінони та їх аміни. Вивчені дотепер пероксидази складаються із незабарвленого глюкопротеїду і з'єданого з ним ферипорфірину коричнево-червоного кольору, який, виконуючи роль активного

центру, бере участь в розкладі або активації пероксиду водню, в результаті чого утворюються радикали відповідних субстратів. Простетичною групою пероксидаз хрону і японської редиски, цитохрому *c*, цитохрому P-450, хлоропероксидази є ферипротопорфірин IX (залізопротопорфірин). Вважають, що всі відомі пероксидази і їх ізоформи містять цей гем, оскільки всі вони інгібуються азидами, ціанідами й амінотриазолом. Активний центр пероксидази – протопорфірин IX заліза (Fe(III)) – знаходиться в гідрофобному оточенні, його аксіальним лігандом в положенні 5 служить азот імідазолу гістидинового залишку. Ферипротопорфірин IX утворює порфіринове кільце – високоароматичну і гідрофобну сполуку. Саме гідрофобна взаємодія порфіринового макроциклу з білком формує третинну структуру пероксидази. Водночас протопорфірин значно стабілізує білкову глобулу ферментів, що містять гем. Основна функція пероксидази – каталізувати окиснення хімічних сполук за рахунок кисню з утворенням проміжних комплексів, що мають різні спектральні характеристики. Виявлено, що пероксидазі притаманні не тільки пероксидазні, але й оксидазні властивості, що уможлиблює каталізацію окиснення цілої низки сполук за рахунок молекулярного кисню. Встановлено, що оксидазна функція ферменту проявляється у взаємодії з дигідроксифумаратом, індолілацетатом, гідро- і нафтогідрокінонами, глутатіоном та ін. Джерелом активного кисню за каталітичної дії пероксидази можуть служити як пероксид водню, так і органічні пероксиди, в тому числі пероксиди ненасичених жирних кислот і каротину. До субстрату, що окиснюється пероксидазою в присутності пероксиду водню, можна віднести більшість фенолів та фенольних кислот. Субстратна специфічність пероксидази змінюється залежно від рівня рН реакційного середовища. В нейтральному і особливо в лужному середовищі пероксидаза втрачає здатність окиснювати діаміни, але різко зростає окиснювальний каталіз фенольних сполук, особливо хлорогенової, кофейної і ферулової кислот. Пероксидаза каталізує більшість реакцій, що відбуваються в усіх тканинах, для цього ферменту розрізняють видову, органогенну, тканинну і внутрішньоклітинну специфічність розподілу ізопероксидаз. Процеси розвитку і росту рослин характеризуються зміною активності та складу ферментів, зокрема пероксидази, що бере участь в регуляції рівня ауксинів і фенольних сполук. У ході дослідження ізоферментів пероксидази бруньок, що знаходяться у стані спокою, показано можливість використання ізоферментного складу як таксономічної ознаки. В молодих клітинах кінчиків листків цибулі найбільшу активність було виявлено в ядрах. Це свідчить про можливу участь пероксидази в специфічній ядерній функції. Оскільки частина ізоензимів – лужні білки, то не виключено, що вони можуть виконувати функцію, подібну до функції гістонів. Пероксидаза – індукцибельний фермент, індукторами якого можуть бути різноманітні фізичні, хімічні і біологічні фактори. Пероксидаза, беручи участь в перших стадіях полімеризації в процесі утворення лігніну, дуже важлива для здерев'яніння, а впливаючи на концентрацію індоліл-3-оцтової кислоти, вона також впливає і на процеси росту. Обидва перетворення тісно пов'язані з розвитком, дозріванням і старінням рослинних тканин. Також пероксидаза бере участь в утворенні ауксину й етилену, відновленні нітратів, тобто в азотному

обміні, дихальних процесах. Пероксидаза має високу спорідненість до штучних субстратів, що служить доказом того, що ензим виконує захисну функцію, звільняючи клітини від чужорідного матеріалу.

Хід роботи

Активність пероксидази (КФ 1.11.1.7) визначають за методом Бояркіна, що заснований на визначенні швидкості реакції окиснення бензидину до утворення продукту окиснення синього кольору. Наважку рослинного матеріалу масою 200-500 мг розтирають у фарфоровій ступці з водою або ацетатним буфером з рН=5,4 і переносять у мірну колбу на 50 мл. Після 10 хв настоювання витяжку центрифугують за частоти 4000 об/хв. Для визначення активності в дві кювети з робочою довжиною 10 мм кожна доливають по 2 мл ферментативної витяжки або центрифугату, 2 мл буферного розчину та 2 мл бензидину. Кювети в КФК-2МП розташовують навпроти світлофільтрів. Вимірювання проводять з використанням червоного світлофільтра за довжини хвилі 590 нм. В контрольну кювету доливають 2 мл води, а в дослідну – 2 мл 0,3%-го пероксиду водню з піпетки з широким отвором. Після цього фіксують зміну оптичної густини через кожні 10 с протягом 60 с. Активність пероксидази виражають в умовних одиницях густини на 1 г сирової маси за хвилину.

Зробіть висновок про активність пероксидази у рослинному матеріалі.

Лабораторна робота 15. Екстракція сумарних ліпідів із рослинних тканин

Мета: засвоїти метод екстракції сумарних ліпідів із рослинних тканин.

Обладнання: мірні колби, хімічні склянки, пробірки, піпетки, фарфорова ступка, кварцовий пісок, ділильна лійка, паперові фільтри, бюкси, спектрофотометр СФ-46, центрифуга, водяна баня, термометр.

Реактиви: суміш хлороформ - метанол (1:2 за об'ємом), Na₂SO₄ (безводний), гексан, дистильована вода.

Об'єкт дослідження: рослинний матеріал.

Вступні пояснення

Рослинні ліпіди є унікальними структурними й функціональними компонентами мембранних систем. Найбільш поширені ліпіди – гліцероліпіди (триацилгліцероли, фосфоліпіди, гліколіпіди), а також представлені у відносно невеликій кількості, але функціонально важливі сфінголіпіди, стероли, специфічні сульфуровмісні гліко- і фосфоліпіди, хлоросульфоліпіди, бетаїнові ліпіди.

Фізіологічні функції ліпідів розглядаються у тісному зв'язку з їх фізичними та хімічними властивостями. Велика увага приділяється значенню гліколіпідів в організації фотосинтетичного апарату, при цьому показано не лише суто структурну роль ліпідів, а й функціональну (стабілізуючу), зокрема, їх значення в організації електронних потоків, участь фосфоінозитів у трансдукції зовнішніх та внутрішніх сигналів у рослинних клітинах. Доведено важливу роль

ліпідів в адаптаційних процесах. Проведені системні дослідження ліпідного складу рослин демонструють мультिवаріантну регуляторну функцію цих унікальних компонентів клітинних структур. Спричинені дією несприятливих факторів навколишнього середовища модифікації стану ліпідів призводять до зміни в'язкості мембран. Адаптивні трансформації жирнокислотного та компонентного складу гліколіпідів (і, ймовірно, інших класів ліпідів) запобігають негативним змінам, тобто відбувається гомеостаз плинності. Доведено, що трансформації гліколіпідних компонентів можуть бути важливими біохімічними тест-системами для характеристики дії індукторів стійкості.

Хід роботи

Для вилучення ліпідів з нефотосинтезуючих рослинних тканин або з фотосинтезуючих тканин, що містять ферменти, які легко дезактивуються, застосувати модифікаційний метод Блайя і Дайера, в основі якого лежить використання полярного і неполярного розчинників у суміші, що дозволяє зруйнувати ліпопротеїнові комплекси і провести повне вилучення зв'язаних ліпідів.

Наважку 0,2 г розтертої рослинної тканини залити 8 мл суміші хлороформ-метанол (1:2 за об'ємом), гомогенізувати (2 хв), після чого центрифугувати (5 хв) за швидкості 3500 об/хв. Надосадову рідину залити в ділильну лійку. В цю ж пробірку з осадом долити 9 мл суміші хлороформ-метанол-вода в співвідношенні 1:2:0,8, повторно гомогенізувати та центрифугувати. Надосадову рідину залити в ту ж ділильну лійку. Додати 8 мл суміші хлороформу, дистильованої води, струснути й залишити стояти для розділення хлороформного і водно-метанольного шарів. Нижній хлороформний шар зібрати, додати безводний Na_2SO_4 та залишити на ніч у холодильнику. Хлороформний шар профільтрувати й концентрувати в потоці азоту, після чого додати 100 мкл гексану. Розрахувати концентрацію сумарних ліпідів у дослідному зразку.

Зробіть висновок про вміст сумарних ліпідів у рослинних тканинах.

Список рекомендованої літератури

Алексеев, Ю.В. Тяжелые металлы в почвах и растениях [Текст] / Ю.В. Алексеев. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 142 с.

Должицька, А.Г. Фізіологія рослин [Текст]: навч. посіб./ А.Г. Должицька, І.І. Панчук. – Чернівці: Чернів. нац. ун-т, 2010. – 167 с.

Красільнікова, Л.О. Біохімія рослин [Текст]: навч. посіб. /Л.О. Красільнікова, О.О. Авксентьева, В.В. Жмурко. – Х.: Колорит, 2007. – 191 с.

Плешков, Б.П. Практикум по биохимии растений [Текст] / Б.П. Плешков. – М.: Колос, 1968. – 183 с.

Ogorodnic. Поживні речовини – азот, фосфор, калій та їх роль в живленні овочів [Електронний ресурс] / Ogorodnic. – Режим доступу: <http://agroazbuka.com/uk/azot-fosfor-kaliy-ovochi.html>. – Агроазбука.

Зміст

Лабораторна робота 1. Визначення вмісту металів у рослинних зразках	3
Лабораторна робота 2. Визначення проникності цитоплазми за дії температури та токсичних речовин	11
Лабораторна робота 3. Визначення температурного порога коагуляції цитоплазми	12
Лабораторна робота 4. Визначення вмісту хлорофілу	13
Лабораторна робота 5. Визначення нітратів	15
Лабораторна робота 6. Визначення фосфатів	16
Лабораторна робота 7. Визначення калію	17
Лабораторна робота 8. Вплив гідразину на ростові, анатомічні та морфологічні показники рослин	18
Лабораторна робота 9. Визначення вмісту ТБК-активних речовин	21
Лабораторна робота 10. Визначення перебігу процесів пероксидного окиснення ліпідів у горосі за дії комплексу важких металів	22
Лабораторна робота 11. Визначення вмісту аскорбінової кислоти та глутатіону	23
Лабораторна робота 12. Визначення активності супероксиддисмутази	25
Лабораторна робота 13. Визначення активності каталази	27
Лабораторна робота 14. Визначення активності пероксидази	28
Лабораторна робота 15. Екстракція сумарних ліпідів із рослинних тканин	30
Список рекомендованої літератури	31