

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
САДІВНИЦТВА

Кафедра біології

ІНТЕГРАТИВНА РЕГУЛЯЦІЯ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ФУНКЦІЙ

**Методичні рекомендації до виконання лабораторних занять
здобувачами освітнього рівня «Магістр»
спеціальності 091 – «Біологія та біохімія»**

Умань–2024 р.

Методичні вказівки підготував:

О.І. Заболотний, к. с.-г. н., доцент кафедри біології;

Розглянуті і затверджені на засіданні кафедри біології (протокол від 06.08.2024 року № 1).

Рецензенти:

кандидат с.-г. наук, доцент кафедри екології та безпеки життєдіяльності
А.В. Балабак;

кандидат с.-г. наук, доцент кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології
О.П. Сержук.

Заболотний О.І. Інтегративна регуляція фізіологічних функцій. Методичні рекомендації до виконання лабораторних занять здобувачами освітнього ступеня «Магістр» спеціальності 091 – «Біологія та біохімія». – Умань, 2024. – 12 с.

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА

Робота № 1	Одержання нуклеїнових кислот із рослинних зразків	4
Робота № 2	Вплив ендогенних фітогормонів на динаміку формування проростків рослинних зразків	5
Робота № 3	Вплив зміни інтенсивності освітлення на ростові процеси рослинних зразків	6
Робота № 4	Вплив температурних режимів на динаміку проростання насіння рослин	7
Робота № 5	Виявлення зон росту рослин за дії різних концентрацій сигнальних розчинів	8
Робота № 6	Культура рослинних тканин. Виявлення впливу розчину кінетину на формування калюсних тканин	9
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ		11

ПЕРЕДМОВА

Інтегративна регуляція фізіологічних функцій вивчає різнорівневі системи внутрішньої та зовнішньої регуляції фізіолого-біохімічних процесів рослинного організму, відкриває можливості пізнання змін, які відбуваються в рослинах за дії різнопланових чинників і ґрунтується на закономірностях життя рослин у зв'язку з умовами їх існування.

Мета навчальної дисципліни – Метою викладання навчальної дисципліни є формування компетенцій, знань, умінь для здійснення ефективної діяльності у галузі наукового пізнання закономірностей функціонування рослинного організму

Завдання – Основними завданнями вивчення дисципліни є набуття знань, умінь для самостійного вирішення сучасних наукових проблем у галузі фітофізіології.

Місце дисципліни у структурно-логічній схемі підготовки здобувачів вищої освіти. Навчальна дисципліна «Інтегративна регуляція фізіологічних функцій» є обов'язковою, і вона займає відповідне місце у структурно-логічній схемі підготовки фахівців і тісно пов'язана з іншими дисциплінами, зокрема: біологія, біотехнологія, ботаніка, фізіологія рослин, екологія та іншими дисциплінами, знаннями яких студенти повинні оволодіти.

Інтегральна компетентність – здатність розв'язувати складні задачі і проблеми в галузі біології при здійсненні професійної діяльності або у процесі навчання, що передбачає проведення досліджень та/або здійснення інновацій та характеризується невизначеністю умов і вимог.

РОБОТА № 1

ОДЕРЖАННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ ІЗ РОСЛИННИХ ЗРАЗКІВ

Матеріали і обладнання: 1) ступка з товкачиком, 2) терка, 3) ніж, 4) водяна баня на 60 °С, 5) лід, 6) термометр, 7) хімічні стакани на 250 мл, 8) марля, 9) приблизно 100 г цибулі, 10) детергент (рідина для миття посуду), 11) NaCl, 12) дистильована вода, 13) фермент протеаза, 14) крижаний 95 %-й етанол, 15) пробірки, 16) скляні палички, 17) піпетка Пастера, 18) 4 % розчин NaCl.

Основні відомості. Виділення нуклеїнових кислот (ДНК та РНК) із клітин є першим етапом у багатьох дослідженнях. 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.

Мета роботи. Оволодіти найпростішими методами отримання нуклеїнових кислот із рослинних зразків.

Хід 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 починає розрізати ДНК на фрагменти, частково денатурується.

4. Суміш охолодити у крижаний 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 товкачиком упродовж 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 охолоджену 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'являтиметься 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.

РОБОТА № 2

ВПЛИВ ЕНДОГЕННИХ ФІТОГОРМОНІВ НА ДИНАМІКУ ФОРМУВАННЯ ПРОРОСТКІВ РОСЛИННИХ ЗРАЗКІВ

Матеріали та обладнання: 1) насіння польових культур; 2) чашки Петрі; 3) фільтрувальний папір, 3) пінцет, 4) лінійка, 5) дистильована вода, 6) термостат, 7) розчини регуляторів росту рослин.

Основні відомості. Вплив регуляторів росту рослин на підвищення інтенсивності проростання насіння та посиленого росту проростків пов'язано з тим, що вони прискорюють поділ клітин, інтенсифікують процеси життєдіяльності рослинних організмів, підвищують проникність міжклітинних мембран та прискорюють в них біохімічні процеси, що призводить до посилення процесів живлення, дихання, фотосинтезу. Завдяки цим препаратам підвищується стійкість посівів до несприятливих погодних умов та до ураження їх шкідниками і хворобами. В цілому, під впливом регуляторів повніше реалізується генетичний потенціал рослин, створений природою та селекційною роботою.

Мета роботи – виявити вплив різних стимуляторів росту на швидкість проростання насіння та подальший ріст проростків.

Хід роботи. Насіння польових культур розкласти на скельця, розташовані на чашках Петрі на вологий фільтрувальний папір. У чашки Петрі залити розчини різних стимуляторів росту. Чашки Петрі зі зразками розмістити на час досліду у термостат. Під час досліду проконтролювати, щоб фільтрувальний папір не підсихав. Починаючи з третьої доби, щодня визначають кількість пророслого насіння, яке видаляють із чашки Петрі. За швидкістю проростання насіння зробити висновок щодо впливу ендогенних фітогормонів на проростання насіння та швидкість росту проростків. Обґрунтувати різницю в швидкості проростання насіння.

РОБОТА № 3

ВПЛИВ ЗМІНИ ІНТЕНСИВНОСТІ ОСВІТЛЕННЯ НА РОСТОВІ ПРОЦЕСИ РОСЛИННИХ ЗРАЗКІВ

Матеріали та обладнання: 1) чашки Петрі, 2) фільтрувальний папір, 3) темна шафа, 4) настільна лампа, 5) пінцет, 6) скальпель, 8) лінійка, 9) три партії по 50 насінин (горох, пшениця, льон тощо), 10) дистильована вода.

Основні відомості. Одне з основних умов існування всіх рослин - світло. Адже тільки на світлі в листках в результаті фотосинтезу утворюються складні органічні речовини, необхідні для росту і розвитку живого організму. Для освіти органічних речовин (цукру і крохмалю) з вуглекислого газу і води потрібна енергія, і хлоропласти отримують її у вигляді енергії сонячного променя. Вимоги до світла у рослин не однакові і залежать від походження того чи іншого виду. Африканські алое і молочаї, наприклад, звикли в пустелі до палючим променям сонця, потребують великої освітленості, а аспідістру, що росте в сутінках тропічних лісів Індокитаю, яскраве світло ні до чого.

Потреба рослин до інтенсивності освітлення змінюється в різні фази. У період цвітіння вона вище, ніж в фазу розпускання бруньок. Ростові органи менш вимогливі до світла, ніж репродуктивні (квіткові), але при хорошому освітленні ростові процеси активізуються.

Також у природі зустрічаються рослини з світлочутливими насінням - светлосхожі і темносхожі.

Мета роботи – порівняти швидкість проростання насіння за різних умов освітлення: яскраве, помірне, затемнене.

Хід 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 умов освітлення (першу чашку – під постійними променями настільної лампи, другу – за природнього освітлення і третю – за недостатніх умов освітлення). Під час досліду проконтролювати, щоб фільтрувальний папір не підсихав. Починаючи з третьої доби, щодня визначають кількість пророслого насіння, яке видаляють із чашки Петрі. За

швидкістю проростання насіння зробити висновок щодо впливу умов освітлення на проростання. Обґрунтувати різницю в швидкості проростання насіння.

РОБОТА № 4

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРНИХ РЕЖИМІВ НА ДИНАМІКУ ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ РОСЛИН

Матеріали та обладнання: 1) чашки Петрі, 2) фільтрувальний папір, 3) термостат, 4) холодильник, 5) пінцет, 6) скальпель, 8) лінійка, 9) штатив із пробірками, 10) термометр, 11) кристалізатор, 12) піпетки, хімічні стакани, 13) три партії по 50 насінин (горох, пшениця, льон тощо), 14) дистильована вода.

Основні 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.

Мета роботи – дослідити вплив різних температур на швидкість та динаміку проростання насіння польових культур.

Хід 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. Починаючи з третьої доби, щодня визначають кількість пророслого насіння, яке видаляють із чашки Петрі. За швидкістю проростання насіння зробити висновок щодо впливу температури на проростання. Обґрунтувати різницю в швидкості проростання насіння.

РОБОТА № 5

ВИЯВЛЕННЯ ЗОН РОСТУ РОСЛИН ЗА ДІЇ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ СИГНАЛЬНИХ РОЗЧИНІВ

Матеріали та обладнання: 1) проростки соняшнику висотою 2-3 см, гороху і квасолі, вирощеної в темному місці; 2) туш; 3) препарувальна голка або дерев'яна паличка; 4) лінійка; 5) проростки гороху з корінчиками, довжиною 1,5–2 см; 6) голки; 7) склянка; 8) фільтрувальний папір; 9) термостат, 10) 10% розчини сахарози, NaCl, сечовини, стимулятора росту.

Основні відомості. Для вивчення ростових процесів широко використовують метод нанесення міток на поверхню органу через певні проміжки. По мірі росту органу відстані між мітками збільшуються і можуть бути використані для характеристики інтенсивності росту різних ділянок зони росту органу. Мітки наносять тушшю. Для нанесення міток можна використати тонко загострену дерев'яну паличку, нитку або препарувальну голку, змочену в туші.

Мета роботи – виявити вплив різних розчинів різних концентрацій на ростові процеси рослин за збільшенням відстані між нанесеними мітками.

Хід роботи. Беруть насіння гороху або квасолі і пророщують у зволоженій тирсі (попередньо скляною паличкою роблять в ній заглиблення для вільного і вертикального росту кореня). Потім на невеликих (довжиною 1,5-2 см) зовсім прямих, попередньо обережно підсушених фільтрувальним папером коренях (3-4 шт) наносять мітки, починаючи від кінчика кореня. Відстань між мітками 1 мм. Мітки повинні бути тонкими і чітко вираженими. Потім проростки наколюють на голку і прикріплюють до дерев'яної пластинки корінцями вниз. В банку наливають по 1/3 об'єму води з 10% розчинами сахарози, NaCl, сечовини, стимулятора росту а стінки зсередини обгортають фільтрувальним папером. Щоб насіння не підсихало дерев'яну пластинку також обгортають фільтрувальним папером. Банки з насінням ставлять в термостат з температурою 20-25° С. Через 24 години вимірюють відстань між мітками (при збільшенні ширини самих міток, вимірюють з їх середини) і вираховують середній добовий приріст різних ділянок кореня.

Результати виражають графічно, відкладаючи на вісі абсцис номери відрізків, а на вісі ординат - прирости.

Результати досліджу за такою схемою:

№ проростка	Зони приросту, мм												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

РОБОТА № 6

КУЛЬТУРА РОСЛИННИХ ТКАНИН. ВИЯВЛЕННЯ ВПЛИВУ РОЗЧИНУ КІНЕТИНУ НА ФОРМУВАННЯ КАЛЮСНИХ ТКАНИН

Матеріали та обладнання: 1) нещодавно відрослі пагони дерева тополі (*Populus* sp.), 2) водний розчин кінетину концентрацією 0,002 г/л (кінетин швидко розчиняється тільки у лужному середовищі), 3) 1 М NaOH, 4) фільтрувальний папір, 5) чашки Петрі, 6) парафінова стрічка, 7) скальпель або ніж, 8) пінцет, 9) дистильована вода.

Основні 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, протопласту, 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.

Мета роботи – отримати калюсну тканину без використання багатокомпонентних середовищ в нестерильних умовах.

Хід роботи.

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 парафіноювою стрічкою для попередження надмірного випаровування розчину кінетину.

5. Чашки Петрі витримати у теплому, добре освітленому місці, перевіряючи їх щотижня. Калюсні тканини (рис. 1) формуватимуться упродовж декількох тижнів.

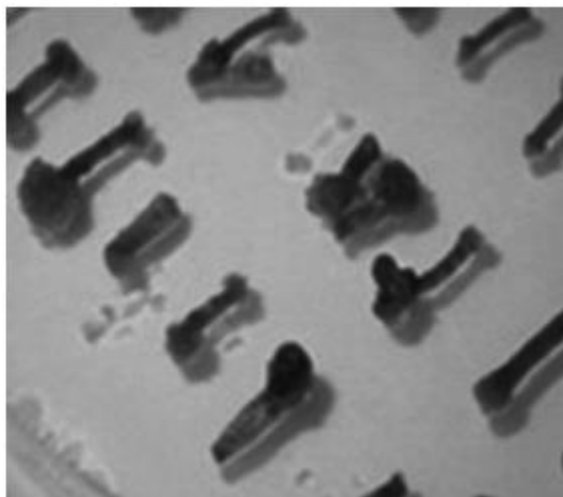


Рис. 1. Калюсні тканини

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

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

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

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ляшенко В.П. Інтегративна регуляція фізіологічних функцій. Дніпро: ДНУ ім. О. Гончара. 2018. 33 с.
2. Бессонова В. П., Яковлева-Носарь С.О. Фізіологія рослин Дніпропетровськ: «Свідлер А. Л.», 2014. 596 с.
3. Терек О.І., Пацула О.І. Ріст і розвиток рослин: навч. Посібник. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2011. – 328 с.
4. Скляр В.Г. Екологічна фізіологія рослин. Підручник. Суми: Університетська книга, 2015. 271 с. 6.

5. Гаркава К.Г., Косоголова Л.О., Карпов О.В., Ястремська Л.С. Біотехнологія. Вступ до фаху. К.: НАУ, 2012. 296 с.
6. Belava V.N., Zeleniy S.B., Panyuta O.O., Taran N.Yu., Pogribniy P.V. Expression of lectin and defensin genes in Mironovskaya 808 and Roazon wheat cultivars infected with *Pseudocercospora herpotrichoides* // ISSN 1993-6842. Biopolymers and Cell. 2010. Vol. 26. N 1.P. 45-50.
7. Панюта О.О., Шаблій В.А., Белава В.Н. Жасмонова кислота та її участь у захисних реакціях рослинного організму // Український біохімічний журнал. – 2009. – № 2. – С. 14-26. 3.
8. Письменна Ю.М., Панюта О.О., Белава В.Н., Таран Н.Ю. Лектинова активність клітинних стінок і клітинних органел проростків озимої пшениці (*Triticum aestivum*) за біотичного стресу // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. – 2014. – Вип.23 (№1129). – С. 65–72.