

Fizjologia Roślin

„D”

Przepisy do ćwiczeń



**Wydział Biologii UW
Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
Zakład Molekularnej Fizjologii Roślin Instytut Botaniki
2015**

Spis ćwiczeń i zadań

I. KIELKOWANIE NASION.....	4
1. Udział fitochromu, gibereliny i kwasu abscysynowego w regulacji kiełkowania nasion sałaty	
2. Aktywność α -amylazy oraz zawartość skrobi rozpuszczalnej podczas kiełkowania ziarniaków jęczmienia i wczesnych etapów wzrostu siewek	
3. Zamiana tłuszczów w cukry podczas kiełkowania nasion roślin oleistych	
II. ORGANOGENEZA W ROŚLINACH W WARUNKACH <i>in vitro</i>.....	10
1. Indukcja powstawania pędów i korzeni u lnu (<i>Linum usitatissimum</i> L.) w kulturach <i>in vitro</i>	
III. FOTOSYNTENZA.....	13
1. Reakcja Hilla	
2. Wydzielanie tlenu podczas fotosyntezy	
3. Fluorescencja chlorofilu <i>a</i> jako miara aktywności fotosyntetycznej liści	
IV. ODDYCHANIE.....	20
1. Pobieranie tlenu podczas oddychania	
2. Oddychanie w warunkach beztlenowych	
V. ŻYWIENIE MINERALNE.....	24
1. Wpływ pH na szybkość pobierania anionów i kationów	
2. Pobieranie jonów NH_4^+ , wpływ pH	
3. Wpływ poszczególnych pierwiastków na wzrost roślin	
4. Regulacja aktywności reduktazy azotanowej	
VI. BARWNIKI ASYMILACYJNE.....	29
1. Otrzymywanie i ilościowe oznaczanie barwników asymilacyjnych	
2. Oznaczanie zawartości poszczególnych karotenoidów	
3. Badanie właściwości chlorofilu	
VII. HORMONALNA REGULACJA WZROSTU TKANEK ROŚLINNYCH.....	33
1. Rola auksyny w wygięciach tropicznych	
2. Wpływ gibereliny na wydłużanie epikotyła karłowatego grochu	
3. Dominacja wierzchołkowa	
VIII. STARZENIE SIĘ TKANEK.....	39
1. Rola cytokinin i etylenu w starzeniu się liści	
2. Starzenie się nasion	
IX. REAKCJA ROŚLIN NA CZYNNIKI STRESOWE.....	45
1. Oznaczenie aktywności peroksydaz	
2. Oznaczanie poziomu i stanu redukcji askorbinianu	
3. Oznaczanie poziomu peroksydacji lipidów	
X. FUNKCJE SYSTEMU PRZEWODZĄCEGO.....	49
1. Transport dalekodystansowy w roślinach	
2. Przesyłanie fali potencjału pobudzenia w roślinie	

SPRAWY ORGANIZACYJNE

Ćwiczenia z Fizjologii Roślin prowadzone są przez pracowników Instytutu Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin oraz pracowników Zakładu Molekularnej Fizjologii Roślin Instytutu Botaniki. Ćwiczenia odbywają się dwa dni w tygodniu (wtorek, środa). Na ćwiczeniach studenci pracują w zespołach. Każdy zespół wykonuje wymienione wyżej ćwiczenia w kolejności zgodnej z harmonogramem zajęć dla każdej grupy.

Prowadzący ćwiczenia:

- | | |
|--|---|
| 1. Kielkowanie | dr Alicja Sobkowiak |
| 2. Organogeneza | dr hab. Bożena Szal |
| 3. Fotosynteza | prof. Elżbieta Romanowska, dr Wioleta Wasilewska |
| 4. Fluorescencja | prof. Elżbieta Romanowska |
| 5. Oddychanie | dr Tomasz Krupnik, dr Wioleta Wasilewska |
| 6. Żywienie | dr Anna Drożak, mgr Barbara Michalak |
| 7. Barwniki | dr Tomasz Krupnik, mgr Ilona Baclawska |
| 8. HRW (Horm. regul. wzrostu) | dr Jarosław Szczepanik |
| 9. Starzenie | dr Danuta Solecka |
| 10. Stres | dr hab. Bożena Szal |
| 11. FSP (Funkcje syst. przewodz.) | prof. Paweł Sowiński, dr Jarosław Szczepanik |

Do zaliczenia każdego ćwiczenia wymagane będzie wykazanie się przygotowaniem teoretycznym i praktycznym do wykonywanego ćwiczenia. Zaliczenie zajęć odbędzie się w maju, na podstawie kolokwium obejmującego wszystkie ćwiczenia.

Na ogólną ocenę z ćwiczeń złożą się:

1. wynik kolokwium,
2. ocena ogólna z pracowni (wiadomości wykazywane przez studenta w trakcie realizacji poszczególnych ćwiczeń).

Ocena ogólna z pracowni zostanie obniżona, o ile student nie zaliczył jakiegoś zadania.

Konsekwencją spóźnienia powyżej 15 min na zajęcia jest niezaliczenie tych zajęć.

Dopuszcza się możliwość niezaliczenia 1 ćwiczenia.

UWAGA!!!

WYMAGANA JEST PRACA W FARTUCHACH LABORATORYJNYCH

KIELKOWANIE NASION

Kielkowanie jest fazą w rozwoju rośliny, podczas której następuje przywrócenie aktywności metabolicznych nasienia, prowadzące do rozpoczęcia wzrostu i rozwoju siewki.

Kielkowanie nasion charakteryzujących się spoczynkiem względnym (narzuconym) rozpoczyna się po zapewnieniu odpowiednich warunków uwodnienia, dostępu powietrza i temperatury. Natomiast aktywacja metabolizmu nasion o spoczynku głębokim (wrodzonym), spowodowanym czynnikami endogennymi (takimi jak np. obecność okryw nasiennych czy niedojrzałość fizjologiczna zarodka) jest możliwa dopiero po zapewnieniu specjalnych warunków, takich jak np. odpowiednio długi okres traktowania niską temperaturą (stratyfikacja).

Kielkowanie nasion większości roślin zależy od światła. Nasiona takie nazywa się fotoblastycznymi. W zależności od reakcji na światło dzielimy nasiona na fotoblastyczne dodatnio, ujemnie lub też niewykazujące fotoblastyczności. Nasiona niewrażliwe na światło wytwarza około 4,5 % gatunków. Przykładem nasion praktycznie niewrażliwych na światło są nasiona większości roślin uprawnych w tym zbóż i roślin motylkowych, natomiast dodatnią fotowrażliwością charakteryzują się np. nasiona sałaty odm. Grand Rapids. Dla niektórych nasion, jak np. dla nasion jemioli naświetlenie jest warunkiem koniecznym ich kiełkowania. Regulacja kiełkowania przez światło odbywa się poprzez system fitochromowy. W regulacji kiełkowania uczestniczą także hormony roślinne, takie jak gibereliny, cytokininy, kwas abscysynowy, etylen.

W czasie kiełkowania wyróżnić możemy następujące fazy: pęcznienia, kataboliczną i anaboliczną. Aktywacja metabolizmu podczas kiełkowania nasienia polega na pojawianiu się w określonych tkankach i określonej kolejności pewnych aktywności enzymatycznych. Wysoką aktywnością w czasie kiełkowania charakteryzują się enzymy hydrolizujące substancje zapasowe nasion. Produkty powstające w wyniku hydrolizy substancji zapasowych mogą służyć jako substraty w innych szlakach katabolicznych lub być wykorzystywane do syntez nowych związków. Powstające cukry proste są substratami w glikolizie lub szlaku pentozofosforanowym czy cyklu Krebsa. Aminokwasy będące końcowymi produktami hydrolizy zapasowych białek służą do syntezy nowych białek w anabolicznej fazie kiełkowania. W kiełkujących nasionach roślin oleistych część acetylokoenzymu A powstającego na drodze β -oksydacji kwasów tłuszczowych przekształca się w cukry na drodze glukoneogenezy, tworząc wtórną pulę łatwo dostępnych substancji zapasowych zużywanych w anabolicznej fazie kiełkowania i początkowych etapach wzrostu

siewki. Enzymy hydrolizujące substancje zapasowe nasion są aktywowane, lub syntetyzowane *de novo*. Wykazano, że w regulacji obu tych procesów mogą uczestniczyć hormony roślinne (np. giberelina, cytokinina, kwas abscysynowy).

Celem ćwiczenia jest:

- Wykazanie udziału fitochromu, gibereliny, kwasu abscysynowego w regulacji kiełkowania fotoblastycznie dodatnich nasion sałaty odm. Grand Rapids. (*Zadanie 1*).
- Wykazanie zmian zawartości skrobi i aktywności α -amylazy podczas kiełkowania ziarniaków jęczmienia (*Zadanie 2*).
- Wykazanie zamiany tłuszczów w cukry podczas kiełkowania nasion słonecznika (*Zadanie 3*).

Zadanie 1. Udział fitochromu, gibereliny i kwasu abscysynowego w regulacji kiełkowania nasion sałaty

Materiał roślinny stanowią fotoblastycznie dodatnie nasiona sałaty odm Grand Rapids.

Przebieg doświadczenia - doświadczenie wykonać w 2 powtórzeniach biologicznych.

1. Odważoną porcję nasion namoczyć w wodzie destylowanej przez 1 godzinę w zlewce szczelnie osłoniętej folią aluminiową.
2. Szalki Petri`ego wyłożyć 2 krążkami bibuły filtracyjnej, a następnie zwilżyć 2 ml odpowiedniego roztworu; H₂O (10 szalek), GA₃ w stężeniu 5×10^{-6} M (4 szalki), ABA w stężeniu 10^{-6} M (4 szalki).
3. Po zakończonej imbibicji nasiona i szalki przenieść do ciemni biologicznej z włączonym światłem zielonym. Na każdą szalkę wyłożyć po 40 nasion, a następnie naświetlić światłem białym (2 min), czerwonym (2 min) lub daleką czerwienią (10 min) zgodnie z zamieszczonym schematem naświetlań. Szalki z nasionami nie wymagającymi naświetlania umieścić w ciemnym, szczelnym pudełku i chronić przed przypadkowym naświetleniem.

Schemat naświetlań

Podłoże	Symbol	Warunki naświetlania				
		ciemność	św. białe	czerwień	daleka czerwień	czerwień
		(C)	(B)	(R)	(FR)	(R)
H ₂ O	C	+	-	-	-	-
H ₂ O	B	-	+	-	-	-
H ₂ O	R	-	-	+	-	-
H ₂ O	FR	-	-	-	+	-
H ₂ O	R-FR-R	-	-	+	+	+
GA ₃	GA-C	+	-	-	-	-
GA ₃	GA-FR	-	-	-	+	-
ABA	ABA-C	+	-	-	-	-
ABA	ABA-R	-	-	+	-	-

Po zakończeniu naświetlania nasion wszystkie szalki umieścić w ciemnym szczelnym pudełku i pozostawić w termostacie w temperaturze 25°C na 24 godziny.

Po 24 godzinach policzyć wykiełkowane nasiona, wyniki wyrazić w % kiełkowania nasion i umieścić w tabeli:

Tabela 1. Wpływ światła na kiełkowanie (%) nasion sałaty odm. Grand Rapids

Powtórzenie	Czynnik świetlny i hormonalny								
	C	B	R	FR	R-FR-R	GA-C	ABA-C	GA-FR	ABA-R
1									
2									
średnia									

Opisać krótko doświadczenie, omówić wyniki, wyciągnąć wnioski.

Zadanie 2. Aktywność α -amylazy oraz zawartość skrobi podczas kiełkowania ziarniaków jęczmienia i wczesnych etapów wzrostu siewek

Materiał roślinny stanowią ziarniaki jęczmienia po 12 godz. i 1, 2, 4, 6, 11 dniach kiełkowania w ciemności.

Przebieg doświadczenia

Oznaczenie aktywności α -amylazy

1. 2 ziarniaki kiełkujące w ciemności przez 12 godz. i 1, 2, 4, 6, 11 dni (po uprzednim usunięciu koleoptyla i korzeni) rozetrzeć w moździerz z 1 ml 0,1 M buforu octanowego (pH 4,8) zawierającego 20 μ molu CaCl_2 . Uzyskany homogenat przenieść do probówek wirówkowych, przepłukując moździerz 2 ml buforu (łącznie należy użyć 3 ml buforu). Probówki umieścić w wirówce i odwirować przez 10 min przy 3000 g. Po wirowaniu nadsącz zlać i oznaczyć w nim aktywność α -amylazy (w 2 powtórzeniach).
2. Pobrać 100 μ l nadsącza, przenieść do probówki i dodać 1 ml roztworu skrobi. Próby inkubować 10 min w temperaturze 37°C. Reakcję enzymatyczną przerwać dodając 1 ml płynu Lugola w 0,05 M HCl. Następnie do każdej probówki dodać po 5 ml wody destylowanej i odczytać absorbancję próby przy $\lambda = 620$ nm, wobec płynu Lugola (odpowiednio rozcieńczonego) jako próby ślepej. Równolegle przygotować enzymatyczną próbę ślepą (100 μ l odpowiedniego ekstraktu + 1 ml płynu Lugola + 1 ml skrobi + 5 ml wody destylowanej) – odczytać absorbancję (wobec rozcieńczonego płynu Lugola) – czas „0”. Aktywność enzymu jest wyrażona ubytkiem skrobi. To różnica między absorbancją w czasie „0” a absorbancją mierzoną po 10 min. inkubacji. Aktywność α -amylazy wyrazić w jednostkach aktywności – Δ absorbancji/ziarniak/min.

Oznaczanie zawartości skrobi rozpuszczalnej

1. 5 ziarniaków jęczmienia kiełkujących w ciemności przez 12 godz., 1, 2, 4, 6, 11 dni (po uprzednim usunięciu koleoptyla i korzeni) rozetrzeć w moździerz z 2 ml wody destylowanej. Homogenat przenieść do probówek wirówkowych, przepłukując moździerz 3 ml wody (łączna objętość homogenatu wynosi 5 ml). Próby wymieszać i umieścić we wrzącej łaźni wodnej na 20 min. Następnie próby ochłodzić i odwirować przez 10 min przy 3000 g. Po wirowaniu zlać nadsącz i oznaczyć w nim zawartość skrobi rozpuszczalnej (w 2 powtórzeniach, wg pkt. 2).

- Pobrać 100 μ l nadsącza, przenieść do próbówki, dodać 1 ml płynu Lugola oraz 5 ml wody destylowanej. Odczytać absorbancję prób przy $\lambda = 620$ nm wobec rozcieńczonego (5 x) płynu Lugola jako próby ślepej.

Ilość skrobi odczytać z krzywej wzorcowej. Zawartość skrobi wyrazić w mg/ziarniak. Wyniki umieścić w tabeli.

Tabela 1. Zmiany aktywności α - amylazy oraz zawartości skrobi rozpuszczalnej podczas kiełkowania ziarniaków jęczmienia.

czas kiełkowania ziarniaków	Absorbancja (620 nm)		Jedn. akt α - amylazy Δ absorbancji/ ziarniak /min	Skrobia mg/ziarniak
	czas "0"	po inkubacji		
12 godz.				
1 dzień				
2 dni				
4 dni				
6 dni				
11 dni				

Opisać krótko doświadczenie, omówić wyniki, wyciągnąć wnioski.

Zadanie 3. Zamiana tłuszczów w cukry podczas kiełkowania nasion roślin oleistych

Materiał roślinny stanowią suche nasiona słonecznika oraz liścienie 10 dniowych siewek rosnących w ciemności.

Przebieg doświadczenia – doświadczenie wykonać w 2 powtórzeniach biologicznych

- Odważyć 2 x po 2,5 g liścieni 10-dniowych siewek słonecznika, wypłukać w wodzie destylowanej i umieścić w 2 probówkach zawierających 5 ml wody destylowanej. W kolejnych 2 probówkach umieścić po 0,25 g suchych zarodków słonecznika – tzn. nasion pozbawionych łupiny nasiennej. Suche zarodki także zalać 5 ml wody destylowanej. Wszystkie probówki umieścić na 10 min we wrzącej łaźni wodnej
- Po wystudzeniu próby przesączyć przez sączki karbowane. Przesącz służy do dalszych oznaczeń.
- Z każdej próby biologicznej pobrać do 2 probówek po 1 ml przesącza. Do jednej probówki dodać kilka kropli 2 M roztworu HCl i wstawić probówki do wrzącej łaźni

wodnej na 10 min. Po wystudzeniu prób zawartość probówki zobojętnić 2 M roztworem NaOH wobec papierka wskaźnikowego (HCl i NaOH dodajemy bardzo ostrożnie!). Po zobojętnieniu wyrównać wodą objętości probówek, do których dodawano HCl i probówek zawierających tylko 1 ml przesączu. Do obu probówek dodać po 0,5 ml odczynnika Fehlinga A i B (odczynnik Fehlinga A – roztwór CuSO_4 , odczynnik Fehlinga B – zasadowy roztwór winianu sodowo-potasowego). Probówki umieścić na 2 minuty we wrzącej łaźni wodnej. Porównać ilość powstałego Cu_2O w probówkach, do których wcześniej dodano HCl i probówkach zawierających tylko przesącz z nasion. Takie same reakcje przeprowadzić z wyciągiem z suchych zarodków słonecznika i porównać wyniki doświadczenia.

Opisać krótko doświadczenie, wyciągnąć wnioski.

ORGANOGENEZA W ROŚLINACH W WARUNKACH *in vitro*

Rozwój roślin jest wynikiem wzrostu i różnicowania się komórek. Procesy te zachodzą w trakcie kolejnych etapów rozwoju osobniczego (ontogenezy). Jednym z przejawów procesu różnicowania jest powstawanie organów roślinnych, czyli **organogeneza**.

Żywe komórki roślinne (niezależnie, z jakiej tkanki pochodzą), uwolnione spod wpływu rośliny macierzystej, dość łatwo podlegają odróżnicowaniu. Możliwość zmiany rozwoju komórek w innym (niż dotychczasowy) kierunku świadczy o tym, że proces różnicowania nie wiąże się ze zmianą jej podstawowej informacji genetycznej. Obserwowane w trakcie różnicowania zmiany w rozwoju są wynikiem zróżnicowanej ekspresji genów. **Komórki roślinne są zatem totipotencjalne**, tzn. każda żywa komórka zawiera pełną informację genetyczną i może podjąć rozwój w każdym kierunku.

W regulacji różnicowania komórek uczestniczą hormony produkowane przez rośliny. Świadczy o tym m.in. fakt, że wpływ rośliny macierzystej (produkującej hormony) na różnicowanie się organów można zastąpić i przyspieszyć działaniem podanego z zewnątrz (egzogenego) hormonu.

Najbardziej przekonujące dowody na udział hormonów w różnicowaniu pochodzą z doświadczeń z zastosowaniem hodowli izolowanych części roślin w warunkach sterylnych *in vitro*. Izolacja fragmentów roślin eliminuje korelacyjne oddziaływania rośliny macierzystej, które mogą być zastąpione przez odpowiednio dobrane warunki hodowli. Typ wzrostu wyizolowanego fragmentu rośliny (**eksplantatu**) i różnicowanie się organów zależą od ilościowej równowagi pomiędzy dwoma hormonami roślinnymi auksyną i cytokinina. Obecność obu tych hormonów jest niezbędna do przekształcenia zróżnicowanych tkanek eksplantatu w tkankę kalusową (odróżnicowanie). Zwiększenie w pożywce hodowlanej stosunku cytokininy do auksyny indukuje powstawanie pędów, a nadmiar auksyny względem cytokininy – tworzenie się korzeni.

Hodowla *in vitro* jest nie tylko prostym modelem doświadczalnym do badania procesów związanych z różnicowaniem się tkanek i organów, lecz jest także intensywnie wykorzystywana do celów praktycznych jak np. mikrorozmnażanie roślin.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z metodą hodowli roślin w warunkach *in vitro* oraz wykazanie na przykładzie stymulowanego hormonami powstawania organów (organogenezy), że komórki roślinne są zdolne do zmiany swojego programu różnicowania i rozwoju.

Indukcja powstawania pędów i korzeni u lnu (*Linum usitatissimum* L.)
w kulturach *in vitro*

Materiał do doświadczeń stanowią fragmenty hipokotyli lnu izolowane z 9 dniowych siewek wyhodowanych na stałym podłożu agarowym w sterylnych warunkach, przy 16 godzinnym fotoperiodzie.

Przebieg doświadczenia

1 dzień doświadczenia

Przygotowano 12 słoików przeznaczonych do hodowli *in vitro* (po 2 na każdy wariant doświadczenia). Skalpele i pęsety zostały wysterylizowane w autoklawie przez 45 min w temperaturze 121°C.

Przygotowanie pożywek do indukcji organogenezy w izolowanych hipokotyłach siewek lnu.

- W zlewce na 500 ml przygotować 300 ml pożywki Murashige i Skooga (4,43g/l). Odpowiednią naważkę pożywki rozpuścić w wodzie, a następnie dodać sacharozy – tak aby końcowe stężenie cukru w pożywce wynosiło 3%. Pożywkę rozlać po 50 ml do 6 opisanych zlewek. Do pożywki podstawowej dodać odpowiednie ilości hormonów – auksyny i/lub cytokininy, w celu uzyskania wariantów **A-F (patrz poniżej)**. Obliczyć jaką objętość każdego z hormonów należy dodać do 50 ml pożywki aby uzyskać odpowiednie stężenie końcowe.

Doprowadzić pH pożywek do wartości 5,8 (przy pomocy 0,1M KOH) i przelać po 25 ml każdej pożywki do 2 słoików dla każdego wariantu doświadczalnego (słoiki odpowiednio i wyraźnie opisać). Następnie do każdego słoika wsypać porcję agaru w takiej ilości, aby końcowe jego stężenie wynosiło 8 g/l. Słoiki zamknąć, umieścić w autoklawie i sterylizować przez ok. 25 min w temperaturze 121°C. Po wyjęciu z autoklawu pozostawić pożywkę do zestalenia pod laminarem do następnego dnia.

Uwaga ! – wyjściowe stężenie BA i 2,4 D wynosi 1mg/ml

2,4 D – kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy

BA – benzyloaminopuryna

- A – kontrola (pożywka bez hormonów)
- B – 2, 4 D (1mg/l)
- C – BA (1mg/l)
- D – 2, 4 D (1mg/l) + BA (1mg/l)
- E – 2,4 D (1mg/l) + BA (0,1mg/l)
- F – 2,4 D (0,1mg/l) + BA (1mg/l)

2 dzień doświadczenia

- **Praca pod wyciągiem laminarnym.** Z otrzymanych sterylnych hodowli delikatnie wyjąć siewki lnu. Umieścić na sterylnych szalkach Petri'ego. **Uważać aby nie uszkodzić młodych siewek!** Następnie sterylnym skalpelem wyciąć 2 cm fragmenty hipokotyli. Umieścić po 3 szt. hipokotyli (lub więcej, w zależności od ilości dostępnego materiału) w przygotowanych wcześniej słoikach zawierających pożywkę z różnymi kombinacjami hormonów roślinnych (**A, B, C, D, E, F**). Sterylną kulturę hipokotyli umieścić w komorze hodowlanej na 4 tygodnie, w temperaturze 24°C w dzień i 22°C w nocy, przy 16 godzinnym fotoperiodzie (tzn. 16 godz. światło – dzień, 8 godz. ciemność – noc)
- W trakcie 4-tygodniowej hodowli w w/w warunkach prowadzić obserwacje rozwoju fragmentów hipokotyli w poszczególnych wariantach doświadczenia. Wyniki zestawić w tabeli, zaznaczając pojawianie się tkanki kalusowej, pędów i korzeni.

Tabela 1. Wpływ hormonów na powstawanie tkanki kalusowej i odtwarzanie organów roślinnych w kulturach izolowanych fragmentów hipokotyli lnu.

stężenie hormonów w pożywce mg/l		efekt morfogenetyczny	
2,4 D	BA	kalus	pęd korzeń
0	0		
1	0		
0	1		
1	1		
0,1	1		
1	0,1		

Przedyskutować rolę **auksyn i cytokinin** w regulacji różnicowania się organów *in vitro*, oraz wpływ stężenia hormonów i wzajemnych ich proporcji na pojawianie się pędów i korzeni.

FOTOSYNTENZA

Podczas fotosyntezy roślin oraz glonów światło powoduje przepływ elektronów od H_2O do $NADP^+$ z wytworzeniem O_2 i $NADPH$. Biorą w tym udział barwniki chloroplastów, głównie chlorofile, zorganizowane w dwóch fotosystemach (PSI i PSII), które łączy łańcuch przenośników elektronów i protonów. W czasie przepływu elektronów, protony są przenoszone w poprzek błony tylakoidowej do lumen, co wytwarza gradient potencjału elektrochemicznego. Kiedy protony przemieszczają się z powrotem, poprzez kompleks syntazy ATP, powstaje ATP. Szereg związków (tzw. rozpręgaczy) niweluje ten gradient i synteza ATP nie zachodzi. Produkty reakcji świetlnych ($NADPH$ i ATP) zużywane są w reakcjach ciemniowych (do wiązania CO_2 w cyklu Calvina).

Celem ćwiczenia jest poznanie:

1. Metody badania aktywności fotochemicznej izolowanych chloroplastów.
2. Sposobu oznaczania fotosyntezy w środowisku wodnym przy pomocy elektrody tlenowej oraz wpływu CO_2 na proces fotosyntezy.

Zagadnienia wymagane w przygotowaniu teoretycznym do ćwiczenia:

1. Reakcje świetlne (transport elektronów, wytwarzanie $NADPH$ i ATP).
2. Reakcje ciemniowe (karboksylacja i oksigenacja RuBP, cykl Calvina).
3. Fotosynteza typu C_3 , C_4 , C_3-C_4 , CAM.
4. Fotooddychanie.

Zadanie 1. Reakcja Hilla

Ćwiczenie zapoznaje z metodą oznaczenia aktywności fotochemicznej izolowanych chloroplastów.

Reakcja fotochemiczna, czyli uwolnienie elektronu z centrum reakcji PSI i PSII, zachodzi wtedy, kiedy dostępny jest zarówno akceptor, jak i donor elektronu. W badaniach na izolowanych chloroplastach (lub tylakoidach), a zwłaszcza przy pomiarze aktywności PSI lub PSII, stosowane są sztuczne donory i akceptory elektronów (np.: askorbinian, benzochinon, metylviologen).

Zastosowanie żelazicyjanku jako akceptora elektronów pozwala na oznaczenie łącznej aktywności PSI i PSII, gdyż, ze względu na jego właściwości (nieprzenikalność przez błonę

tylakoidu, wysoki potencjał oksydoredukcyjny $E_{m7} = 430 \text{ mV}$), przejmuje on elektrony z obu fotosystemów (reakcja Hilla). W obecności żelazicyjanku izolowane chloroplasty wydzielają O_2 na świetle, a elektrony powstałe z rozszczepienia H_2O redukują żelazicyjanek do żelazocyjanku. Inhibitory, które hamują transport elektronów pomiędzy PSII i PSI, np. DCMU (3-(3,4-dichlorofenylo)-1,1-dimetylomocznik; nazwa handlowa: Durion – wiąże się z Q_B , tj. jednym z przonośników elektronów), hamują również wydzielanie tlenu przez chloroplasty.

Wykonanie ćwiczenia

1. Izolowanie chloroplastów.

- a) Przygotować mieszaninę do izolacji chloroplastów w następujący sposób: odważyć 13,6 g sacharozy w zlewce, dodać 50 ml buforu fosforanowego (0,05 M, pH 7,8) i 10 ml 0,1 M roztworu NaCl, i rozpuścić. Następnie, przelać do cylindra i uzupełnić wodą do objętości 100 ml. Celem wymieszania roztworu przelewać kilkakrotnie z cylindra do zlewki i pozostawić w cylindrze.
- b) Odważyć 15 – 18 g fragmentów z liści sałaty i homogenizować w 90 ml przygotowanej mieszaniny; 10 ml pozostawić. Homogenat przesączyć przez odpowiedni materiał do sączenia chloroplastów np. fizelinę, przesącz przenieść do 2 probówek wirówkowych i wirować w 5°C przez 10 min przy 3000 obr./min (ok. 2000 x g) w wirówce MPW 370.

Supernatant odrzucić, a do osadu zawierającego chloroplasty dodać niewielką ilość mieszaniny izolacyjnej (3 – 4 ml) i wymieszać bagietką. Chloroplasty zebrane z obu probówek przenieść do homogenizatora Pottera. Jednorodną zawiesinę chloroplastów przenieść do małej zlewki i umieścić w lodzie.

2. Redukcja żelazicyjanku przez chloroplasty.

Przygotować mieszaninę reakcyjną z następujących składników:

0,10 M bufor fosforanowy, pH 8,0	- 20 ml
0,03 M chlorek magnezowy ($MgCl_2$)	- 5 ml
0,25 M chlorek potasowy (KCl)	- 5 ml
0,01 M żelazicyjanek potasowy ($K_3Fe(CN)_6$)	- 5 ml

Roztwory w/w ilościach przenieść do 50 ml kolby miarowej i uzupełnić wodą. Następnie, do 16 probówek odpipetować po 3 ml tej mieszaniny.

- A) Do 10 probówek z mieszaniną reakcyjną dodać po 0,2 ml zawiesiny chloroplastów i wymieszać. Dwie probówki przenieść do ciemności, a pozostałe na światło. Po 2, 4, 6 oraz 8 lub 10 min oświetlania dodawać do kolejnych par probówek po 0,5 ml 25% kwasu trójchlorooctowego (TCA), w celu przerywania reakcji. Probówki wymieszać. Po zakończeniu oświetlania, do probówek z ciemności również dodać TCA. Zawartość poszczególnych probówek przesączyć do probówek suchych. Zmierzyć absorbancję roztworów przy długości fali 420 nm.
- B) Do 6 probówek dodać po 0,2 ml zawiesiny chloroplastów i wymieszać. Dwie probówki stanowią kontrolę, a do następnych dodać DCMU w stężeniu 2,5 μM i 10 μM , tj. po 7,5 μl i 30 μl z 1 mM roztworu DCMU (dostarczonego przez prowadzącego zajęcia). Po 8 lub 10 min oświetlania (zależnie od wyniku w doświadczeniu A) przerwać reakcję jak poprzednio (TCA) i po przesączeniu zmierzyć absorbancję.

Opracowanie wyników

Zależność absorbancji od czasu oświetlania chloroplastów, jak i stężenia DCMU, przedstawić na wykresie. Zapisać równanie reakcji redukcji żelazicyjanku. Opisać i przedyskutować wyniki. Zapisać wnioski.

Zadanie 2. Wydzielanie tlenu podczas fotosyntezy (ćwiczenie w części demonstracyjnej)

Ćwiczenie zapoznaje ze sposobem oznaczenia fotosyntezy w środowisku wodnym przy pomocy elektrody tlenowej oraz z wpływem CO_2 na natężenie wydzielania O_2 .

Podczas fotosyntezy, rośliny oraz glony, wiążą CO_2 (reakcje ciemniowe) i wydzielają O_2 (reakcje świetlne). Przebieg tych reakcji (faz fotosyntezy) jest wzajemnie powiązany (sprzężony), głównie poprzez szybkość wytwarzania oraz zużywania NADPH i ATP. W obecności CO_2 w chloroplastach, NADPH i ATP są zużywane w cyklu Calvina do redukcji 3-fosfoglicerynianu (PGA) do aldehydu 3-fosfoglicerynowego (G3P). Ciągłe odtwarzanie akceptora elektronów (NADP^+) oraz ADP warunkuje prawidłowe działanie łańcucha transportu elektronów/protonów oraz mechanizmu rozkładu H_2O . Ograniczenie dostępności CO_2 do chloroplastów powoduje spadek natężenia wydzielania tlenu, a intensywnemu wiązaniu CO_2 w fotosyntezie towarzyszy intensywne wydzielanie tlenu.

Wykonanie ćwiczenia

1. Skalibrować miernik elektrody według udzielonej instrukcji.
2. Fragment liścia (ok. 1 x 8 cm, z uszkodzoną epidermą) umieścić w termostatyzonej (25°C) kamerze. Włożyć mieszadło i umieścić kamerę na mieszadle magnetycznym.
3. Do kamery wprowadzić ok. 13 – 15 ml buforowego roztworu KH_2PO_4 w stężeniu 50 mM (pH 7.2). Włączyć mieszanie i oświetlenie. Przepłukiwać azotem technicznym przez około 10 – 15 min, celem maksymalnego obniżenia stężenia CO_2 i O_2 w roztworze i w liściu.
4. Przerwać przepłukiwanie azotem i natychmiast umieścić elektrodę w kamerze, tak aby pod czujnikiem elektrody nie było pęcherzyków gazu. Włączyć rejestrator.
5. Rejestrować na taśmie, w ciągu kilku minut, zapis stężenia O_2 . Przy braku lub minimalnej ilości CO_2 w fazie wodnej (i w komórkach liścia) O_2 nie powinien być wydzielany z większym natężeniem (pewna ilość CO_2 może pochodzić z mitochondriów).
6. Przy pomocy igły i strzykawki wprowadzić do kamery 0,1 ml 1 M roztworu NaHCO_3 . Rejestrować zmiany w stężeniu O_2 podczas okresu fotosyntezy, a po zaciemnieniu kamery – zmiany w stężeniu O_2 podczas okresu oddychania.

Opracowanie wyników

Na podstawie zarejestrowanych zapisów w zmianie stężenia O_2 na świetle (przed i po podaniu NaHCO_3) oraz w ciemności (i objętości kamery pomiarowej 10 ml) obliczyć natężenie fotosyntezy netto (P_n) oraz natężenie oddychania (DR) na jednostkę powierzchni liścia (w $\text{mg O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Podać stężenie NaHCO_3 w roztworze. Na podstawie równania Hendersona-Hasselbacha ($\text{pH} = \text{pK}_1 + \log [\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2]$) obliczyć stężenie CO_2 , przy którym zachodziło wydzielanie tlenu. Przyjąć wartość $\text{pK}_1 = 6,365$ dla temperatury 25°C. Przebieg zmian w wydzielaniu i pobieraniu O_2 przedstawić schematycznie w postaci rysunku. Opisać i przedyskutować wyniki, napisać wnioski.

Zadanie 3. Fluorescencja chlorofilu a jako miara aktywności fotosyntetycznej liści

Światło absorbowane przez cząsteczkę chlorofilu wprowadza ją w stan wzbudzenia, poprzez przeniesienie elektronu ze stanu podstawowego na orbital o wyższej energii. Chlorofil (Chl) absorbuje światło niebieskie i czerwone, przy czym kwanty światła niebieskiego (o wyższej energii niż światła czerwonego) powodują przejście elektronu na

wyższy poziom energetyczny, zwany drugim singletowym stanem wzbudzenia (S2). Stan S2 jest nietrwały i niemal natychmiast (10^{-13} s) następuje nieradiacyjny (z emisją ciepła) powrót na poziom energetyczny zwany pierwszym stanem singletowym (S1), odpowiadający energii dla kwantów światła czerwonego. Stan S1 jest na tyle trwały (10^{-8} s), że pozwala na uruchomienie fotosyntetycznego transportu elektronów. Jednak nie wszystkie elektrony z tego stanu wzbudzenia są wykorzystane do procesów fotochemicznych i część z nich powraca do stanu podstawowego, w czasie 1 ns, oddając energię w formie promieniowania świetlnego (fluorescencja) i/lub termicznego. Ponieważ powrót ten następuje z poziomu pierwszego stanu wzbudzenia, to emitowany kwant światła ma energię odpowiadającą barwie czerwonej. Emisji fluorescencji zawsze towarzyszy emisja ciepła, więc emitowany kwant ma mniejszą energię, a zatem jest o dłuższej fali niż światło absorbowane.

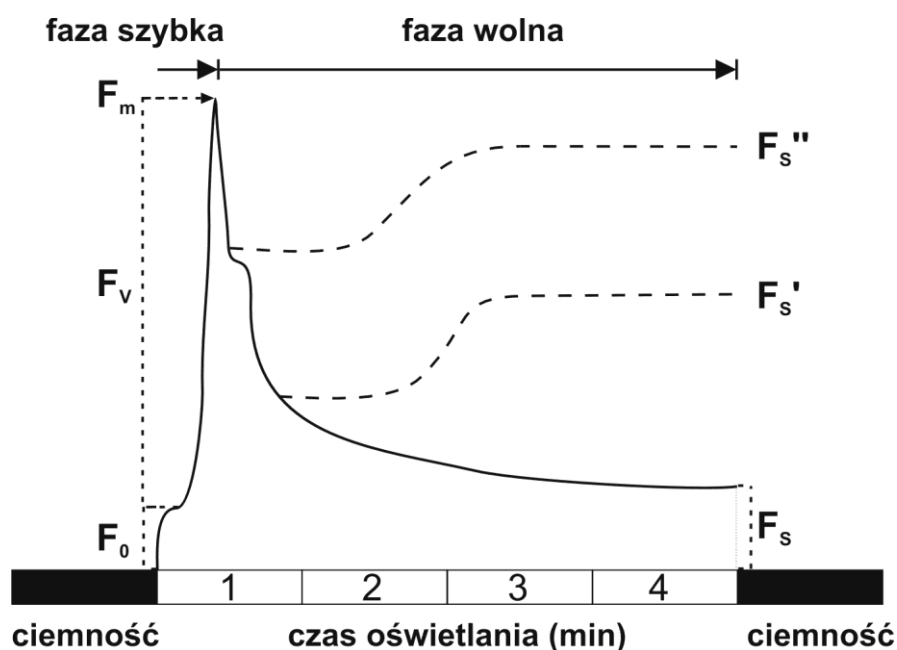
Intensywność fluorescencji zależy od ilości cząsteczek chlorofilu znajdujących się aktualnie w stanie wzbudzonym (o tzw. zamkniętych pułapkach energetycznych, niezdolne do przyjmowania elektronów). Im jest ich więcej tym intensywniejsza fluorescencja, osiągająca maksymalnie 3 – 5% pochłoniętego światła. W liściach zaadaptowanych do ciemności, pułapki energetyczne są otwarte i fluorescencja stanowi ok. 0,6% pochłoniętego światła. Fluorescencja Chl *a* odzwierciedla aktywność aparatu fotosyntetycznego i jest miarą aktywności fotosyntetycznej liścia.

Fluorescencja mierzona w temperaturze pokojowej pochodzi głównie z anten energetycznych fotoukładu II (PSII), natomiast w temperaturze ciekłego azotu (77 K, tzn. -196°C) można dokonać pomiaru fluorescencji pochodzącej z anten PSI oraz części rdzeniowej centrum reakcji PSII.

Analiza parametrów fluorescencji Chl *a* pozwala oceniać aktywność fotosyntetyczną *in vivo* co jest szczególnie przydatne w sytuacjach oddziaływania na rośliny różnorodnych stresów środowiskowych, które powodują uszkodzenia w obrębie PSII.

Pomiary fluorescencji Chl *a* rozpoczyna się od oświetlania liści zaadaptowanych (15 – 20 minut) do ciemności, światłem o takiej intensywności, aby możliwie wszystkie pułapki energetyczne były otwarte. Następuje wówczas emisja fluorescencji o słabym natężeniu zwana fluorescencją podstawową (F_0) (Rys. 1). Następnie fluorescencja narasta do momentu aż wszystkie pułapki energetyczne PSII ulegają zamknięciu i natężenie fluorescencji jest wówczas maksymalne (F_m). Różnica między fluorescencją maksymalną (F_m) a podstawową (F_0) nosi nazwę fluorescencji zmiennej (F_v). Wydajność fluorescencji

(F_v) może spadać pod wpływem stresowych czynników środowiska, uszkadzających błony tylakoidów. Czas, w którym fluorescencja osiąga połowę wartości F_m określamy jako $t_{1/2}$. Parametr ten określa wielkość systemów antenowych i ilość puli plastochinonowej, jest niższy np. u roślin przystosowanych do niskich natężeń światła (z uwagi na obecność większych anten i niższą pulę plastochinonu) w porównaniu z roślinami rosnącymi w wysokich natężeniach światła. Analiza parametrów fluorescencyjnych pozwala więc na określenie stanu fizjologicznego rośliny.



Rys. 1 Kinetyka fluorescencji chlorofilu *a*.

F_s – fluorescencja stała; F_s' i F_s'' – fluorescencja stała podczas zwiększającego się stresu.

Celem doświadczenia jest określenie, na podstawie oceny parametrów fluorescencyjnych Chl *a*, stanu aparatu fotosyntetycznego liści prosa lub kukurydzy poddanych działaniu czynników stresowych.

Wykonanie ćwiczenia

Fluorescencję chlorofilu *a* oznaczamy wykorzystując trzytygodniowe liście roślin prosa lub kukurydzy rosnących przy natężeniach światła $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Do pomiarów pobieramy środkowy, ok. 12 cm fragment trzeciego i czwartego liścia. Odcięte liście umieszczamy na 24 godziny w następujących warunkach:

1. kontrola – liście umieszczone w wodzie w temp. 25°C .

2. liście umieszczone w temperaturze 4°C.
3. liście umieszczone w temperaturze 35°C.
4. liście poddane działaniu 1 M roztworu NaCl w temp. 25°C.
5. liście poddane działaniu 5 mM roztworu $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ w temp. 25°C.

Po 24 godzinach wykonujemy pomiary. Za pomocą klamer zaciemniamy (na 15 min) środkową część badanego fragmentu liścia. Pomiaru dokonujemy przy pomocy Bio Monitora S.C.I.A.B PSM (Plant Stress Meter), Sweden. Mierzymy następujące parametry indukcji fluorescencji chlorofilu *a*:

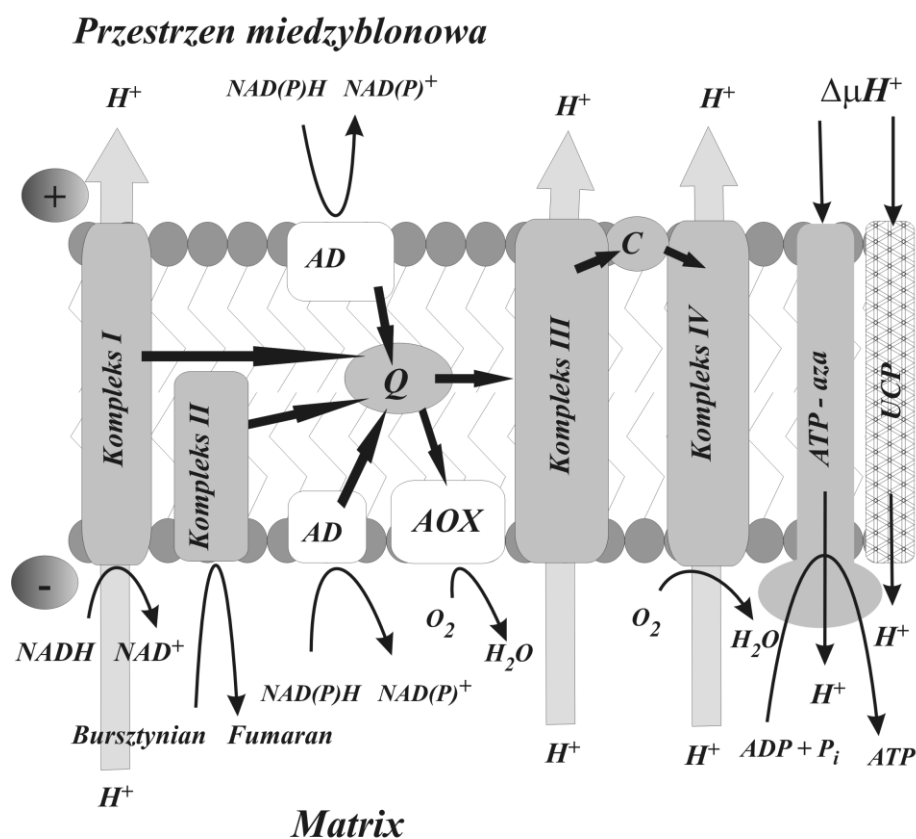
- F₀ fluorescencja podstawowa próbki adaptowanej do ciemności
- F_m fluorescencja maksymalna próbki adaptowanej do ciemności
- F_v fluorescencja zmienna ($F_m - F_0 = F_v$)
- t_{1/2} ½ czasu potrzebnego do osiągnięcia F_m
- F_v/F_m maksymalna wydajność kwantowa PSII próbki adaptowanej do ciemności

Uzyskane wyniki zestawiamy w tabeli, dyskutujemy i zapisujemy wnioski. Wyniki przedstawiające F_v/F_m ilustrujemy w postaci rysunku.

ODDYCHANIE

Oddychanie to proces utleniania związków organicznych. W oddychaniu tlenowym, gdzie czynnikiem utleniającym jest O_2 , produktami są woda, dwutlenek węgla oraz energia. Oddychanie zachodzi w mitochondriach – organellach komórkowych otoczonych podwójną błoną. Podstawowym celem oddychania zachodzącego w mitochondriach jest produkcja ATP. Powstaje ono w procesie zwanym fosforylacją oksydacyjną. Tlen redukowany jest przy użyciu elektronów pochodzących z NADH i bursztynianu. Przeniesienie elektronów na tlen następuje stopniowo, przy udziale przenośników elektronów – związków ulegających procesom utleniania i redukcji. Schematyczną budowę roślinnego łańcucha oddechowego przedstawia Rys. 1.

W skład drogi cytochromowej wchodzi cztery kompleksy białkowe oraz cytochrom c, pula ubichinonu i syntaza ATP.



Rys. 1. Budowa łańcucha oddechowego w mitochondrium roślinnym. Kolor szary – kompleksy białkowe związane z drogą cytochromową, kolor biały – alternatywne białka przenoszące elektrony; C – cytochrom c, Q – pula ubichinonu, AD – alternatywne dehydrogenazy NAD(P)H, AOX – oksydaza alternatywna, UCP – białko rozprzęgające, $\Delta\mu H^+$ – elektrochemiczny gradient protonowy; zwróć uwagę na centralną pozycję ubichinonu oraz na ładunki po obu stronach błony.

Transportowi elektronów towarzyszy przemieszczanie się protonów w poprzek błony, powstaje elektrochemiczny gradient protonowy ($\Delta\mu\text{H}^+$), warunkujący syntezę ATP. Specyficzną cechą mitochondriów roślinnych, jest obecność alternatywnych białek przenoszących elektrony (Rys. 1) i związanych z nimi niefosforylacyjnych dróg transportu elektronów. Oksydaza alternatywna (AOX) to białko mające zdolność redukcji O_2 do H_2O , jednak procesowi temu nie towarzyszy synteza ATP, a energia wydzielana jest jako ciepło.

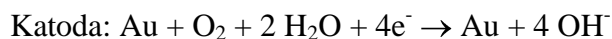
Zewnętrznym wyrazem procesu oddychania jest wymiana gazowa pomiędzy organizmem a środowiskiem zewnętrznym. U organizmów oddychających tlenowo sprowadza się ona do pobierania O_2 i wydzielania CO_2 . Oznaczając ilościowo wymieniane na drodze oddychania gazy, można wyznaczyć współczynnik oddechowy (RQ), wyrażony jako stosunek liczby cząsteczek wydzielonego dwutlenku węgla do liczby cząsteczek pobranego tlenu. O wartości RQ decyduje rodzaj utlenianego substratu: im bardziej zredukowany jest substrat, tym więcej potrzeba cząsteczek O_2 , aby go utlenić, a to wpływa na wzrost RQ. Na natężenie oddychania z kolei ma wpływ szereg czynników zewnętrznych, jak stężenie tlenu i dwutlenku węgla, wilgotność, temperatura, światło, zawartość soli mineralnych.

Zadanie 1. Pobieranie tlenu podczas oddychania

Celem ćwiczenia jest zapoznanie ze sposobem oznaczania oddychania w środowisku wodnym przy pomocy elektrody tlenowej.

Zasada działania

Elektroda tlenowa Clarka zbudowana jest ze złotej katody połączonej mostkiem KCl z elektrodą Ag/AgCl służącą jako anoda odnośnikowa. Cały zestaw oprawiony jest w masę plastikową, elektrody zaś oddzielone są od roztworu (cały czas mieszanego podczas pomiaru, aby zapewnić stałą i równomierną dyfuzję O_2) cienką teflonową błonką przepuszczalną dla gazów, ale nieprzepuszczalną dla innych rozpuszczalnych związków mogących uszkodzić katodę. Gdy do elektrod przyłożyć napięcie (0,5 – 0,8 V), tlen reagując na katodzie powoduje przepływ prądu. Natężenie prądu jest proporcjonalne do stężenia tlenu. Zachodzące reakcje chemiczne można przedstawić następująco:



Wykonanie ćwiczenia

1. Połączyć elektrodę z miernikiem. W celu kalibracji miernika na badany zakres stężenia tlenu włożyć elektrodę do wody o znanej zawartości tlenu (napowietrzanej max. w danej temperaturze).
2. Odcięte korzenie badanej rośliny umieścić w termostatyзованej kamerze (25°C). Na dnie kamery położyć mieszadło.
3. Do kamery wlać ok. 10 ml wody napowietrzanej i umieścić czujnik elektrody.
4. Tak przygotowany zestaw umieścić na mieszadle magnetycznym. Włączyć mieszadło oraz rejestrator.
5. Rejestrować na taśmie zapis stężenia tlenu przez 15 – 20 minut. Powinno zachodzić wyraźne pobieranie tlenu.
6. Przy pomocy igły i strzykawki wprowadzić do kamery 10 µl azydku sodowego (NaN₃). Rejestrować na taśmie zmiany stężenia tlenu.
7. Po pomiarze zmierzyć objętość wody w kamerze i zważyć korzenie.

Opracowanie wyników

Na podstawie zarejestrowanego na taśmie zapisu zmiany stężenia tlenu i objętości kamery, uwzględniając rozpuszczalność tlenu w wodzie w temperaturze 25°C, obliczyć natężenie oddychania korzeni w mg O₂/g świeżej masy/godz. lub w nmol O₂/g świeżej masy/godz.

Zadanie 2. Oddychanie w warunkach beztlenowych

Celem ćwiczenia jest zapoznanie z metodą oznaczania etanolu – jednego z produktów oddychania beztlenowego.

Przebieg doświadczenia

Po około 20 siewek grochu umieszczono:

1. w kolbie na 50 ml, zalano wodą przedmuchiwaną azotem i zamknięto szczelnie korkiem z kapilarą – warunki beztlenowe,

- na szalce Petriego w 50 ml wody, uważając aby nie były całkowicie zanurzone w wodzie – warunki tlenowe.

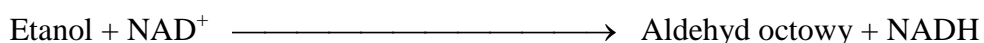
Oba warianty zostawiono na 24 h w temperaturze 25°C.

Zadanie polega na oznaczeniu stężenia etanolu w wodzie, w której umieszczone były siewki.

Oznaczanie etanolu

Do oznaczenia etanolu należy wykorzystać reakcję katalizowaną przez dehydrogenazę alkoholową polegającą na utlenieniu etanolu do aldehydu octowego z jednoczesną redukcją NAD^+ do NADH.

Dehydrogenaza alkoholowa



Wzrost absorbancji przy długości fali 340 nm (maksimum absorpcji dla NADH) jest wprost proporcjonalny do stężenia etanolu w próbce.

Przeprowadzenie oznaczenia

Do kuwety na 1,5 ml odpipetować 900 μl buforu glicynowego o pH 9,0, 100 μl 12 mM NAD oraz od 5 do 100 μl próby (zgodnie ze wskazówkami prowadzącego) i zanotować objętość. Jako próbę ślepią zastosować bufor glicynowy. Wstawić kuwety do spektrofotometru i rozpocząć pomiar przy długości fali 340 nm. Reakcję rozpocząć dodaniem 3 μl enzymu dehydrogenazy alkoholowej. Pomiar prowadzić do momentu aż absorbancja przestanie ulegać zmianom. Zanotować maksymalną wartość i wyliczyć procentowe stężenie etanolu wiedząc, że milimolowy współczynnik absorbancji dla NADH wynosi 6,22, a masa molowa etanolu to 46 g/mol.

ŻYWIENIE MINERALNE ROŚLIN

Tkanki roślinne składają się z substancji organicznej, wody (od 95% w soczystych owocach i świeżych liściach do ok. 7% w niektórych nasionach), oraz składników mineralnych tzn. popielnych (ok. 6%). Mimo, że składniki mineralne stanowią niewielką część suchej masy są one niezmiernie ważne, ponieważ umożliwiają roślinie wytwarzanie materii organicznej. Roślina pobiera zawarte w roztworze glebowym sole mineralne w postaci jonów zgodnie z elektrochemicznym gradientem stężeń (pobieranie bierne) lub wbrew elektrochemicznemu gradientowi stężeń (pobieranie aktywne). Na zawartość związków mineralnych w roślinie wpływa szereg czynników zewnętrznych takich jak: stężenie i skład chemiczny soli w roztworze glebowym, jego pH, struktura podłoża, dostęp tlenu do systemu korzeniowego, warunki świetlne, temperatura oraz natężenie procesów metabolicznych w roślinie.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z niektórymi aspektami żywienia mineralnego roślin – wykrywanie makroelementów w popiele roślin, objawy niedoboru poszczególnych pierwiastków, zakładanie kultur wodnych i piaskowych, wpływ pH na pobieranie kationów i anionów, wpływ warunków środowiskowych na aktywność reduktazy azotanowej.

Przygotowując się do ćwiczeń należy zwrócić uwagę na następujące zagadnienia: skład chemiczny roślin, funkcje biochemiczne i fizjologiczne poszczególnych pierwiastków, wybiórczy charakter pobierania jonów, antagonizm, synergizm i akumulacja jonów, mechanizm pobierania jonów, budowa błon cytoplazmatycznych, wpływ czynników zewnętrznych na pobieranie kationów i anionów, zjawisko osmozy, czynniki wpływające na wartość potencjału osmotycznego.

Zadanie 1. Wpływ pH na szybkość pobierania anionów i kationów

Wykonanie ćwiczenia

1. Do trzech kolejno ponumerowanych zlewek wlać po 30 ml pożywki Knopa (10-krotnie rozcieńczonej), a następnie, używając 1 M roztworów HCl i NaOH, doprowadzić pH do następujących wartości:

Nr 1 pH ok. 4,0

Nr 2 pH ok. 6,2

Nr 3 pH ok. 8,0

2. W każdej zlewce umieścić po 4 siewki kukurydzy w ten sposób aby system korzeniowy był maksymalnie zanurzony w roztworze pożywki oraz zmierzyć wartości pH poszczególnych pożywek. Pomiar pH powtórzyć po 30, 60, 90 i 120 minutach oświetlania.

Zmiany wartości pH pożywek przedstawić graficznie. Z uzyskanych wyników wyciągnąć wnioski.

Zadanie 2. Pobieranie jonów NH_4^+ , wpływ pH

Wykonanie ćwiczenia

1. Do dwóch zlewek wlać po 30 ml roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zawierającego 40 μg jonów NH_4^+ w 1 ml i używając 1 M roztworów HCl i NaOH, doprowadzić pH do następujących wartości:
Nr 1 pH ok. 4,0
Nr 2 pH ok. 8,0
2. W każdej zlewce umieścić po 4 siewki kukurydzy dbając aby korzenie były dobrze zanurzone w roztworze. Po 24 godzinach oświetlania zmierzyć pH oraz oznaczyć stężenie jonów NH_4^+ .
3. Wykonanie oznaczenia:
 - a) Badany roztwór $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ przesączyć na lejku do czystej podpisanej zlewki.
 - b) Do probówki odpipetować 1 ml przesącza, dodać 9 ml wody destylowanej oraz 0,5 ml odczynnika Nesslerera.
 - c) Sporządzić próbę odczynnikową zawierającą 1 ml roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40 μg jonów NH_4^+), 9 ml wody i 0,5 ml odczynnika Nesslerera oraz próbę ślepa (10 ml wody, 0,5 ml odczynnika Nesslerera).
 - d) Po wymieszaniu wszystkich prób zmierzyć absorbancję przy długości fali 430 nm wobec próby ślepej.
 - e) Ilość μg NH_4^+ odczytać z krzywej wzorcowej.

Zestawić zmiany pH oraz stężenia jonów NH_4^+ , wyciągnąć wnioski.

Zadanie 3. Wpływ poszczególnych pierwiastków na wzrost roślin

Rośliny kontrolne hodowano na pełnej pożywce Knopa o składzie (w 1000 ml):

0,40 g NH_4NO_3

0,20 g KH_2PO_4

0,10 g KCl

0,25 g $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

0,25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

0,002 g Fe- EDTA

oraz 1 ml roztworu mikroelementów A-Z wg Hoaglanda w modyfikacji prof. dr K. Bassalika. W skład roztworu mikroelementów wchodzi sole manganu, litu, miedzi, cynku, aluminium, boru, kobaltu, molibdenu, bromu, jodu.

Doświadczenie przeprowadzono wg schematu umieszczonego w tabeli poniżej.

I	pożywka pełna + A-Z	
II	pożywka bez P	0,20 g KH_2PO_4 zastąpiono 0,13 g K_2SO_4
III	pożywka bez S	0,25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ zastąpiono 0,20 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
IV	pożywka bez K	0,10 g KCl zastąpiono 0,10 g NaCl
V	pożywka bez Mg	0,25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ zastąpiono 0,32 g $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10 \text{H}_2\text{O}$
VI	pożywka bez Ca	0,25 g $\text{CaCl}_2 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ zastąpiono 0,40 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
VII	pożywka bez N	
VIII	pożywka bez Fe	

Pożywka jest tak przygotowana, że stężenia pozostałych pierwiastków, prócz wyłączonych wg przepisu, są zachowane, a jej pH jest doprowadzone roztworem HCl lub NaOH do około 5.

W czasie wegetacji należy:

1. uzupełniać pożywkę do stałej objętości
2. przewietrzać pożywkę
3. utrzymywać pH na możliwie stałym poziomie

Wyhodowane rośliny należy obejrzyć następnie opisać objawy spowodowane niedoborem poszczególnych pierwiastków oraz znaczenie badanych makroelementów dla roślin.

Zadanie 4. Regulacja aktywności reduktazy azotanowej

Materiał do doświadczenia stanowią koleoptyle jęczmienia, uzyskane po 4 dobach kiełkowania ziarniaków w ciemności, w temperaturze 21 – 23°C.

Przebieg doświadczenia

1. Pracując w ciemności, przenieść odpowiednią ilość siewek do 4 zlewek, w których znajdują się następujące roztwory:
Zlewki 1 i 2 – 30 ml H₂O
Zlewki 3 i 4 – 30 ml 10 mM KNO₃
Zlewki 1 i 3 wystawić na 24 godziny na światło, natomiast 2 i 4 umieścić na 24 godziny w ciemności.
2. Oznaczanie aktywności reduktazy azotanowej.
 - a) Po 24 godzinach wzrostu siewek, ściąć po 1000 mg koleoptyli (odcinając je tuż przy ziarniakach) i umieścić w probówkach w roztworze inkubacyjnym o składzie:
2 ml 0,1 M KNO₃
5 ml 0,2 M buforu fosforanowego o pH 7,5
2 ml 5 % roztworu detergentu Triton X-100
1 ml 0,5 mM roztworu CCCP (karbonylocyjanek 3-chlorofenylohydrazonu) – inhibitor reduktazy azotanowej, zapobiega zużyciu NO₂ przez reduktazę azotanową
 - b) Próby inkubować 60 minut w temperaturze 30°C. Równolegle inkubować próbę ślepą, zawierającą roztwór inkubacyjny bez materiału roślinnego.
 - c) Wszystkie próby wstawić na 10 minut do wrzącej łaźni wodnej.
 - d) Po wystudzeniu oznaczyć zawartość azotanów w każdym wariancie w 2 powtórzeniach.

3. Oznaczanie azotynów:

- a) Do 2 ml inkubatu (lub próby ślepej) dodać odczynniki w następującej kolejności:
 - 1,5 ml 1 roztworu sulfonilamidu w 3 M HCl
 - 1,5 ml 0,02% roztworu N-naftyloetylodwuaminy
- b) Zawartość próbek wymieszać i po 15 minutach zmierzyć absorbancję przy $\lambda = 530 \text{ nm}$ wobec próby ślepej.
- c) Obliczyć ilość uwolnionych jonów NO_2 w poszczególnych wariantach doświadczenia. Aktywność reduktazy azotanowej wyrazić w $\mu\text{g NO}_2 \times \text{g}^{-1}$ tkanki. W celu przeliczenia otrzymanych wartości ekstynkcji na μg azotynów zastosować mnożnik $k = 2,85$, który wyznaczono z krzywej wzorcowej dla różnych stężeń NO_2 .

Opisać doświadczenie, omówić wyniki, wyciągnąć wnioski.

BARWNIKI ASYMILACYJNE

Wszystkie organizmy fotosyntetyzujące posiadają barwniki odpowiedzialne za absorpcję światła (reakcja fotofizyczna) i uwalnianie elektronów (reakcja fotochemiczna). Barwniki są związkami niskocząsteczkowymi i w błonach tylakoidów występują najczęściej w formie powiązanej (w sposób niekowalencyjny lub kowalencyjny) z polipeptydami tworząc kompleksy białkowo – barwnikowe.

Wyróżniamy trzy grupy barwników asymilacyjnych: chlorofile, karotenoidy i fikobiliny. Różnią się one budową, zakresami światła widzialnego, które mogą pochłaniać, właściwościami, a także pełnionymi funkcjami. Wspólną cechą tych związków, pozwalającą im absorbować promieniowanie świetlne jest obecność w ich budowie układu wiązań sprzężonych. Fotosyntetycznie aktywny, w sensie potencjalnych zdolności do przeprowadzenia reakcji fotochemicznej, jest tylko chlorofil *a* (fotoautotrofy eukariotyczne i sinice) i bakteriochlorofil *a* (bakterie fotosyntetyzujące). Chlorofile *b*, *c*, *d* oraz karotenoidy i fikobiliny określane są jako barwniki pomocnicze (towarzyszące). Są one odpowiedzialne za absorpcję światła i przekazywanie energii wzbudzenia do centrów reakcji oraz, jak to ma miejsce w przypadku karotenoidów, pełnią funkcje ochronne zabezpieczając aktywne fotochemiczne centra reakcji przed nieodwracalnym fotoutlenieniem.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z metodą ilościowego oznaczania barwników asymilacyjnych oraz ich składem ilościowym i jakościowym w dojrzałych i starzejących się liściach roślin wyższych.

Przygotowując się do ćwiczeń należy zwrócić uwagę na następujące zagadnienia: budowę i właściwości barwników asymilacyjnych; biosyntezę chlorofili, karotenoidów i fikobilin; rolę barwników w procesie fotosyntezy, zasady rozdziału, identyfikacji i oznaczania ilościowego barwników asymilacyjnych.

UWAGA! Ze względu na pracę z rozpuszczalnikami organicznymi podczas wykonywania ćwiczeń należy zachować szczególną ostrożność.

Zadanie 1. Otrzymywanie i ilościowe oznaczanie barwników asymilacyjnych

Wykonanie ćwiczenia

1. 0,5 g liści rozetrzeć dokładnie w moździerzu z 0,5 ml 100% acetonu, szczyptą CaCO_3 i odrobinę piasku, następnie przenieść ilościowo na lejek Schotta i przesączyć pod obniżonym ciśnieniem. Moździerz i pozostałość na filtrze dokładnie przemywać małymi porcjami acetonu (80% roztwór) i sączyć. Przesącz przenieść do kolby miarowej o pojemności 25 ml i uzupełnić 80% acetonem do kreski.
2. Otrzymany ekstrakt barwników rozcieńczyć 80% acetonem według wskazań prowadzącego, tak aby wartości absorpcji mieściły się w zakresie 0,1 – 0,6. Zmierzyć absorpcję przy długościach fal: 646,8; 663,2 i 470 nm, stosując 80% roztwór acetonu jako próbę odniesienia.
3. Wyliczyć:
 - zawartość chlorofili *a* i *b* oraz karotenoidów na 1 g świeżej masy liści uwzględniając dokonane rozcieńczenia
 - stosunek chlorofilu *a/b*
 - stosunek chlorofili do karotenoidów

Wzory do wyliczania stężeń barwników (w $\mu\text{g/ml}$):

$$C_{\text{chl } a} = 12.25A_{663,2} - 2.79A_{646,8}$$

$$C_{\text{chl } b} = 21.50A_{646,8} - 5.10A_{663,2}$$

$$\text{Kar} = (1000A_{470} - 1,82 C_{\text{chl } a} - 85,02 C_{\text{chl } b})/198$$

gdzie $C_{\text{chl } a}$ i $C_{\text{chl } b}$ – stężenie odpowiednio chlorofilu *a* i chlorofilu *b* ($\mu\text{g/ml}$).

Zadanie 2. Oznaczanie zawartości poszczególnych karotenoidów

Wykonanie ćwiczenia

1. 0,5 g liści rozetrzeć dokładnie w moździerzu z 0,5 ml 96% etanolu, szczyptą CaCO_3 i odrobinę piasku, następnie przenieść ilościowo na lejek Schotta i przesączyć pod obniżonym ciśnieniem. Moździerz i pozostałość na filtrze dokładnie przemywać małymi porcjami etanolu i sączyć. Przesącz przenieść do kolby miarowej o pojemności 10 ml i uzupełnić etanolem do kreski. 9 ml ekstraktu przenieść do

ciemnej butelki o poj.15 ml. Przeprowadzić reakcję zmydlania chlorofili dodając do próby 1 ml 60% KOH. Reakcję zmydlania chlorofili prowadzić przez 12 – 16 godzin w temperaturze 4°C (pozostawić próbę w lodówce do następnego dnia ćwiczeń).

2. Następnego dnia zmydloną próbę przenieść do rozdzielacza dodając 15 ml eteru etylowego oraz 35 ml 0,15 M NaCl.
3. Próbę intensywnie wytrząsać, a po rozdzieleniu faz zbierać frakcję eterową (warstwa górna), natomiast warstwę dolną wodno-etanolową wytrząsać jeszcze dwukrotnie, dodając za każdym razem po 10 ml eteru etylowego.
4. Połączone frakcje eterowe przemywać 4-krotnie 30 ml wody destylowanej (**po dodaniu wody ostrożnie zamieszać, aby nie dopuścić do wytworzenia emulsji**) aż do zaniku alkalicznego odczynu.
5. Frakcję eterową osuszyć bezwodnym Na₂SO₄, a następnie przesączyć na filtrze Schotta G-4 pod zmniejszonym ciśnieniem i odparować do sucha w wyparce próżniowej.
6. Osad barwników wymyć z kolby niewielką ilością mieszaniny eteru naftowego i acetonu (9:1). Próbę karotenoidów zatężyć przedmuchując strumieniem azotu..
7. Karotenoidy rozdzielić metodą chromatografii cienkowarstwowej. W tym celu mieszaninę karotenoidów nanieść przy pomocy kapilary na płytkę chromatograficzną pokrytą żelem krzemowym. Płytkę rozwijać w układzie rozpuszczalników: heksan: aceton: dwuetyloamina (57:43:1) przez 15 minut. Karotenoidy lokalizują się na płytce chromatograficznej w następującej kolejności (od linii startu): neoksantyna, wioloksantyna, luteina, β-karoten.

Zadanie 3. Badanie właściwości chlorofili

Wykonanie ćwiczenia

1. Około 2 g liści rozetrzeć w moździerzu w 96% etanolu z dodatkiem odrobiny piasku i CaCO₃.
2. Homogenat przesączyć na lejku Schotta pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość przemywać etanolem aż do uzyskania ok. 20 ml przesączu.
3. Otrzymany ekstrakt rozdzielić równomiernie do trzech probówek, do dwóch z nich dodać 3 – 4 krople stężonego HCl i ostrożnie wymieszać, zaobserwować powstawanie feofityny.

4. Do jednej z probówek z feofityną dodać niewielką ilość octanu miedzi i dokładnie wymieszać, zaobserwować zajście reakcji.
5. Roztwory w probówkach oświetlać światłem UV przy długości fali 365 nm i porównać ich zdolność do fluorescencji *in vitro*.

W opisie do ćwiczenia należy umieścić wyniki (razem z obliczeniami) przedstawiające zawartości barwników fotosyntetycznych i relacje między poszczególnymi ich grupami dla roślin kontrolnych i starzejących się, wyciągnąć wnioski. Przedstawić również zależność między budową cząsteczki chlorofilu i jego pochodnych a zdolnością do fluorescencji.

HORMONALNA REGULACJA WZROSTU TKANEK ROŚLINNYCH

Wzrost roślin polega m.in. na nieodwracalnym zwiększeniu rozmiarów komórki, organu lub całego organizmu. Dokonuje się on poprzez zwiększanie liczby oraz rozmiarów komórek. Zależy od rozlicznych czynników środowiskowych i endogennych, spośród których ważną rolę pełnią hormony roślinne: auksyny, gibereliny, cytokininy.

Auksyny działają przede wszystkim na wzrost elongacyjny komórek. W zależności od stężenia auksyny oraz wrażliwości tkanki, hormon ten wywołuje stymulację, bądź hamowanie wydłużania komórek określonego organu. Jednym z przejawów działania auksyny są wygięcia tropiczne zachodzące pod wpływem kierunkowego bodźca, a spowodowane zróżnicowaną szybkością wzrostu przeciwległych stron organu. Procesy zachodzące podczas wygięcia tropicznego poznano najlepiej dla grawitropicznej reakcji korzenia. Miejscem percepcji bodźca ciężenia mogą być zawarte w komórkach czapeczki korzeniowej statolity skrobiowe. Konsekwencją percepcji bodźca jest lokalne zwiększenie stężenia jonów wapnia w cytoplazmie i aktywacja za pośrednictwem kalmoduliny, pomp wapniowych i auksynowych w tkankach leżących po dolnej stronie korzenia. Powoduje to skierowanie strumienia auksyny do tych tkanek, a niesymetryczne (w przekroju organu) rozmieszczenie auksyny powoduje niesymetryczny wzrost komórek w strefie wydłużania, co powoduje wygięcie organu.

W regulacji wzrostu wydłużeniowego roślin biorą również udział gibereliny. Stymulują one zarówno podziały komórkowe (w części subapikalnej merystemu wierzchołkowego), jak i powiększanie się komórek. Wzrost tkanek na długość powodujący np. wydłużanie epikotyli i hypokotyli roślin dwuliściennych, zależy od ilości dostępnych giberelin. Blok genetyczny na szlaku biosyntezy giberelin prowadzi do karłowatości niektórych roślin. Karłowatość tego typu można przełamać podając roślinie egzogenną giberelinę.

Innym przejawem udziału hormonów w regulacji wzrostu roślin jest dominacja wierzchołkowa, polegająca na hamowaniu wzrostu pąków pachwinowych i pędów bocznych przez rosnący wierzchołek pędu (pąk szczytowy). Liczne dowody doświadczane wskazują, że auksyna, przede wszystkim IAA, syntetyzowana w szczytowej części roślin i transportowana bazypetalnie, może hamować wzrost pąków bocznych w sposób pośredni – współdziałając np. z innymi hormonami. Wykazano ponadto, że zahamowanie wzrostu pąków bocznych ustępuje pod wpływem cytokinin. Hormony te produkowane są w korzeniach i ich dystrybucja w roślinie może zależeć od poziomu IAA w pąku wierzchołkowym (duże stężenie IAA w pąku wierzchołkowym powoduje ukierunkowanie translokacji cytokinin do wierzchołka, co powoduje zwiększenie jego dominacji). Obniżenie ilości auksyny transportowanej bazypetalnie z pąka szczytowego umożliwia syntezę cytokinin w pąku bocznym i podjęcie procesów

wzrostowych. W zjawisku dominacji wierzchołkowej mogą brać udział również inne hormony (gibereliny, kwas abscysynowy, etylen), ale dane na ten temat są jeszcze stosunkowo nieliczne. Dominacja pąka szczytowego może ponadto zależeć od czynników troficznych.

Celem ćwiczenia jest:

- Wykazanie roli auksyny w regulacji wzrostu elongacyjnego (*Zadanie 1*).
- Wykazanie roli czapeczki korzeniowej, jonów wapnia i auksyny w regulacji wygięć grawitropicznych (*Zadanie 1*).
- Wykazanie wpływu giberelin na wzrost wydłużeniowy tkanek (*Zadanie 2*).
- Wykazanie, że pąk szczytowy oddziałuje hamująco na wzrost pąków pachwinowych oraz, że regulacji tego zjawiska mogą brać udział auksyny i cytokininy (*Zadanie 3*).

Przebieg ćwiczenia: grupa przeprowadza obserwację ustawionych wcześniej doświadczeń i dyskutuje o wymienionych wyżej procesach.

Zadanie 1. Rola auksyny w wygięciach tropicznych

Wpływ czapeczki korzeniowej, auksyny oraz jonów wapnia na reakcję grawitropiczną dodatnią korzenia bobu.

Materiałem do obserwacji grawitropizmu są kiełkujące w ciemności nasiona bobu. Nasiona z prostymi korzeniami o długości 1,5 – 3 cm przypięto do płytek styropianowych w położeniu pionowym i poziomym. Z jednego z korzeni usunięto czapeczkę, nałożono bocznie czystą lanolinę (L) lub pastę lanolinową zawierającą 10^{-3} M IAA (kwas indoliloctowy), 50 mM CaCl_2 , 50mM KCl, 100 mM EGTA wg podanego niżej schematu. Nasiona umieszczono w wilgotnych kamerach i pozostawiono na 24 godziny w ciemnym termostacie.

Przeprowadzić obserwacje. Wyniki przedstawić w formie graficznej. Wyciągnąć wnioski i je przedyskutować.

Położenie pionowe

Początek doświadczenia:

Po 24 godzinach:

Położenie poziome

Początek doświadczenia:

Po 24 godzinach:

Wpływ wierzchołka koleoptyli na reakcję fototropiczną koleoptyli owsa.

Materiałem do obserwacji są etiolowane, 3-dniowe siewki owsa. Pracując w ciemni biologicznej, przy włączonym świetle zielonym, odcięto 2 mm szczytowe fragmenty koleoptyli z ok.10 siewek. Wierzchołki części koleoptyli przykryto kapturkami z folii aluminiowej i wraz z siewkami nieuszkodzonymi umieszczono w kamerze umożliwiającej jednostronne oświetlenie i oświetlano przez 3 godziny światłem białym. Przeprowadzić obserwacje. Wyniki przedstawić w formie graficznej. Wyciągnąć wnioski i je przedyskutować

Początek doświadczenia



Po 3 godzinach

Wpływ auksyny na wygięcia pędów.

Materiałem do obserwacji wygięć są 5-dniowe etiolowane siewki grochu. Pracując przy świetle zielonym na połowę epikotyli nałożono bocznie (jednostronnie) pastę lanolinową zawierającą 10^{-3} M IAA, na pozostałe czystą lanolinę i umieszczono w ciemnym termostacie na 24 godziny.

Przeprowadzić obserwacje. Wyniki przedstawić w formie graficznej. Wyciągnąć wnioski i je przedyskutować

Początek doświadczenia:

Po 24 godzinach:

Zadanie 2. Wpływ gibereliny na wydłużanie epikotyła karłowatego grochu

Materiał. Siewki karłowatego grochu po 5 dniach hodowli w ciemności przeniesiono na światło dla przyspieszenia wykształcenia wierzchołka pędu. Na wierzchołki наносono po 30 μl wody destylowanej (kontrola) lub roztworu gibereliny GA_3 o różnych stężeniach w zakresie od 10^{-9} do 10^{-4} M (wszystkie roztwory z dodatkiem Tweenu-20). Rośliny hodowano następnie przy ciągłym świetle, w temperaturze ok. 25°C .

Wykonanie doświadczenia. Zmierzyć długość wszystkich epikotyli i obliczyć średnią długość epikotyła siewek poddanych działaniu różnych stężeń gibereliny. Wyniki przedstawić w formie wykresu długości epikotyła jako funkcji stężenia GA_3 .



Wyciągnąć wnioski.

Zadanie 3. Dominacja wierzchołkowa

Materiał. Dwutygodniowe rośliny fasoli poddano zabiegom dekapitacji pąka szczytowego, naniesienia pasty lanolinowej bez dodatków (L) oraz zawierającej 1% kwas indoliloctowy (IAA) lub 0.1% benzyloaminopurynę (BA) zgodnie z wariantami doświadczalnymi podanymi w tabeli. Rośliny hodowano następnie przez tydzień w komorze fitotronowej.

Wykonanie. Przeprowadzić obserwacje. Wyniki zamieścić w tabeli. Wyciągnąć wnioski.

Tabela 1. Wpływ pąka szczytowego, auksyny i cytokininy na dominację wierzchową u fasoli

W A R I A N T					
Zabieg	A	B	C	D	E
dekapitacja pąka szczytowego	-	-	+	+	+
traktowanie zdekapitowanego pędu	-	-	L	IAA	IAA
traktowanie pąków pachwinowych	L	BA	L	L	BA
obserwacje: rozwój pąków bocznych					

STARZENIE SIĘ TKANEK

Starzenie się jest ostatnim etapem rozwoju rośliny (tkanki, komórki), prowadzącym w efekcie do jej śmierci. Czas życia rośliny jest z jednej strony zdeterminowany przez program genetyczny, a z drugiej – zależy od warunków środowiska.

Oznakami starzenia się komórek roślinnych są m.in.: zmiany przepuszczalności błon komórkowych, utrata integralności błon komórkowych, utrata turgoru, degradacja barwników fotosyntetycznych, spadek zawartości białek. W starzejących się tkankach roślinnych obserwuje się ponadto przyspieszoną proteolizę oraz zwiększoną aktywność enzymów biorących udział w katabolizmie lipidów błon (np. lipoksygenazy). Uważa się, że jedną z przyczyn starzenia się komórek jest niekontrolowane powstawanie wolnych rodników, prowadzące do autooksydacji składników komórki. Proces starzenia podlega ponadto kontroli hormonalnej. Do hormonów opóźniających starzenie należą cytokininy i auksyny, natomiast etylen i ABA przyspieszają procesy degradacji w komórkach.

Celem ćwiczenia jest zaobserwowanie niektórych symptomów starzenia we fragmentach roślin (odcięte liście) oraz objawów starzenia się nasion.

Zadanie 1. Rola cytokinin i etylenu w regulacji starzenia się liści

Doświadczenia mają wykazać rolę cytokinin i etylenu w degradacji chlorofilu i białek rozpuszczalnych, oraz wpływ etylenu na własności półprzepuszczalne błon komórkowych w starzejących się odciętych liściach jęczmienia.

Materiałem do badań są liście jęczmienia, z siewek hodowanych przez 7 dni na świetle, w temperaturze 23°C.

Przebieg doświadczenia

1. Odciąć liście z 230 przygotowanych siewek. W odległości 2 cm od szczytu blaszki wyciąć 1 cm wycinki.
2. Do 2 oznaczonych szalek Petriego wlać po 10 ml 0,5% roztworu Tweenu 80 (kontrola) **lub** 0,8% roztworu Etrelu* w Tweenie. Do każdej szalki przenieść po 70 wycinków liści, starając się, by wszystkie były zanurzone w odpowiednim roztworze,

przez co najmniej 1 godz. Następnie wycinki dwukrotnie przepłukać na sączku wodą dejonizowaną (10 ml) i przenieść po 30 na nowe szalki (odpowiednio oznaczone), wyłożone bibułą zwilżoną wodą dejonizowaną (5 ml). Pozostałe wycinki przenieść po 10 (w 4 powtórzeniach) do odpowiednio oznaczonych probówek, zalać 4 ml wody dejonizowanej i przykryć folią. Tak przygotowane szalki i probówki ustawić na świetle, w temperaturze pokojowej, na 24 godz.

3. Równolegle, do 2 oznaczonych szalek Petriego nalać po 10 ml roztworu benzyloaminopuryny (BA) w stężeniu 10^{-5} M, **lub** H₂O. Do każdej szalki włożyć po 30 wycinków liści tak, aby stykały się dolną epidermą z powierzchnią cieczy, przykryć wieczkiem i wstawić na 24 godziny do ciemnej szafki.

***Etrek – kwas 2-chloroetylofosfonowy (źródło egzogenego etylenu)**

4. Oznaczyć zawartość chlorofilu i białka rozpuszczalnego w wyjściowym materiale roślinnym oraz po 24 godzinnej inkubacji wycinków liści w roztworze benzyloaminopuryny lub etreku.

Oznaczenie zawartości chlorofilu

Umieścić po 5 fragmentów liści ze wszystkich wariantów (w 3 powtórzeniach – w ponumerowanych i odpowiednio oznaczonych probówkach), zalać 4 ml 80% etanolu (zaznaczyć na probówce poziom rozpuszczalnika), przykryć folią i podgrzać na łaźni wodnej o temp. 70°C przez 5 – 10 min (do pełnego odbarwienia skrawków), następnie próby wystudzić i uzupełnić ewentualne ubytki etanolu. Zmierzyć absorbancję otrzymanego ekstraktu przy długości fali $\lambda = 665$ nm.

Wyniki zamieścić w tabeli.

Tabela 1. Wpływ cytokiny i etylenu na zawartość chlorofilu.

Nr próby	Absorbancja (665 nm)				
	Kontrola przed inkubacją H ₂ O	Kontrola po inkubacji H ₂ O	Kontrola po inkubacji Tween	Traktowane BA	Traktowane Etrek
1.					
2.					
3.					
średnia					

Oznaczenie zawartości białka rozpuszczalnego metodą kolorymetryczną Bradford

Pobrać po 5 wycinków liści ze wszystkich wariantów (każdy wariant w 2 powtórzeniach), osuszyć, zważyć, przenieść kolejno do schłodzonego moździerza i ucierać w 1 ml 0,1 M buforu fosforanowego pH 7,0 o temperaturze 4°C. Po dokładnym utarciu tkanki powstały homogenat przenieść ilościowo do probówek wirówkowych, moździerz popłukać 1 ml buforu i zlać go do homogenatu (całkowita objętość 2ml). Próby wirować przez 15 min przy 10 000 g w schłodzonej wirówce. Z każdego otrzymanego ekstraktu pobrać po 2 próby po 50 µl, dodać 2 ml odczynnika Bradford, dokładnie wymieszać. Po co najmniej 2 min zmierzyć absorbancję przy długości fali $\lambda = 595 \text{ nm}$ wobec ślepej próby odczynnikowej (50 µl buforu fosforanowego i 2 ml odczynnika Bradford). Ilość białka odczytać z krzywej wzorcowej. Zawartość białka w wycinkach liści z każdego wariantu doświadczalnego wyrazić w mg g^{-1} świeżej masy. Dane umieścić w tabeli.

Tabela 2. Wpływ cytokinin i etylenu na zawartość białka rozpuszczalnego w wycinkach liści jęczmienia.

Nr próby	Zawartość białka ($\mu\text{g g}^{-1}$ św. masy)				
	Kontrola przed inkubacją H ₂ O	Kontrola po inkubacji H ₂ O	Kontrola po inkubacji Tween	Traktowane BA	Traktowane Etrel
1.					
2.					
3.					
średnia					

Pomiar wycieku elektrolitów z komórek liści jęczmienia metodą konduktometryczną

Do każdej probówki z wycinkami liści dolać 10 ml H₂O dejonizowanej (przeznaczonej specjalnie do tych pomiarów). Zawartość probówek kilkakrotnie wymieszać, po czym zmierzyć przewodnictwo elektryczne wycieku z każdej próby.

Przeprowadzenie pomiaru:

1. Podłączyć elektrodę do aparatu. Elektrode przetrzymywać w zlewce z wodą destylowaną, zmieniając wodę co 4 pomiary.

2. Do naczynka pomiarowego przelewać kolejno roztwór z próbek i mierzyć jego przewodnictwo elektryczne. Należy zwrócić uwagę, aby w momencie odczytu nie było w probówce skrawków liści oraz pęcherzyków powietrza. Po wykonaniu pomiaru, każdy z roztworów zlać do odpowiedniej próbki. Przewodnictwo rejestrować w wartościach względnych, wskazywanych przez przyrząd.
3. Po wykonaniu pomiarów próbki przykryć folią i umieścić w suszarce, w temp. 150°C (zachować szczególną ostrożność) i gotować przez 10 min. Próby ostrożnie schłodzić pod strumieniem zimnej wody. Ponownie zmierzyć przewodnictwo elektrolityczne roztworu.
4. Dla każdej próby obliczyć % elektrolitów, które zostały uwolnione z badanej tkanki (100% przewodnictwa wykazuje roztwór uzyskany po zabiciu tkanek przez zagotowanie).

Uzyskane dane przedstawić w tabeli.

Tabela 3. Wpływ etylenu na przepuszczalność błon komórkowych.

Nr próby	Przewodnictwo wycieku (μS)		% uszkodzeń
	Kontrola	Traktowane etylem	
1			
2			
3			
4			
Średnia			

Opisać krótko doświadczenie i wyciągnąć wnioski dotyczące roli cytokinin i etylenu w regulacji starzenia się liści.

Zadanie 2. Starzenie się nasion

Materiałem do doświadczeń są nasiona rzepaku z dwu terminów zbiorów – 2006 i 2011.

Wpływ wieku nasion na szybkość ich kiełkowania (wigor)

Z otrzymanych grup nasion rzepaku ze zbiorów w latach 2006 i 2011, odliczyć 2 x po 100 nasion i wyłożyć (po 100 szt.) na szalki Petriego, zawierające dwie warstwy bibuły **obficie** zwilżonej wodą. Nasiona rozłożyć tak by nie przylegały do siebie. Nasiona kiełkować

w ciemności, w temperaturze ok. 25°C. Policzyc procent nasion kiełkujących po 24 godzinach oraz po tygodniu hodowli (ustawionej wcześniej przez asystenta). Wyniki zamieścić w tabeli.

Wpływ wieku nasion na zawartość aminokwasów w wycieku (efusacie) z nasion

Odważyć po 3 porcje nasion (300 mg każda), pochodzących ze zbiorów w latach 2006 i 2011, umieścić w probówkach, zalać 5 ml wody destylowanej, przykryć folią i pozostawić w temperaturze pokojowej na 24 godziny.

Następnego dnia, po dokładnym wymieszaniu zawartości probówek, z każdej próby pobrać do oddzielnych probówek po 100 µl roztworu (w 2 powtórzeniach) i oznaczyć zawartość aminokwasów metodą ninhydrynową. Poziom pozostałego roztworu zaznaczyć markerem na probówce. Następnie próbki z nasionami umieścić w suszarce o temperaturze 150°C i gotować przez 10 min, próby ostudzić, po czym uzupełnić ubytki roztworu wodą destylowaną do zaznaczonego poziomu wyjściowego. Próby dokładnie wymieszać, po czym z każdej pobrać po 100 µl roztworu (w dwóch powtórzeniach) i oznaczyć zawartość aminokwasów metodą ninhydrynową.

Oznaczenie zawartości aminokwasów metodą ninhydrynową

1. Do każdej z pobranych uprzednio prób oraz do próby ślepej zawierającej 100 µl H₂O dodać:
0,4 ml 0,2 M buforu Tris-HCl pH 7,0
1 ml 0,1 % ninhydryny w 60% etanolu
2. Zawartość probówek wymieszać, po czym gotować w łaźni wodnej przez 5 min. Następnie dodać 3,5 ml 60% etanolu i wymieszać. Zmierzyć absorpcję wobec próby ślepej przy długości fali $\lambda = 570$ nm. Ilość uwolnionych aminokwasów odczytać z krzywej wzorcowej.
3. Obliczyć ilość aminokwasów wypłukanych z 1 g nasion, wyrażając ją w µg azotu aminowego.

Wyniki zestawić w tabeli:

Tabela 4. Wpływ wieku nasion na kiełkowanie i zawartość aminokwasów.

		Kiełkowanie (%)		Zawartość aminokwasów w wycieku z 1 g nasion (μg azotu aminowego)		
Rok zbioru	Nr próby	po 1 dniu	po 7 dniach	początkowa	po gotowaniu	%
2006	1.					
	2.					
	średnia					
2011	1.					
	2.					
	średnia					

Opisać krótko doświadczenie i wyciągnąć wnioski.

REAKCJA ROŚLIN NA CZYNNIKI STRESOWE

Terminem "czynnik stresowy" (stresor) określamy ten czynnik środowiska, którego działanie może doprowadzić do zaburzeń funkcjonalnych lub/i uszkodzeń struktury w organizmie roślinnym, a w rezultacie może również spowodować śmierć osobnika. Reakcja rośliny na stres zależy od właściwości organizmu, które wynikają z programu genetycznego aktualnie realizowanego przez komórki. W zależności od reakcji na określony stresor dzielimy rośliny (organy, tkanki, komórki) na wrażliwe i odporne. Działanie stresu w dawce subletalnej może spowodować modyfikacje metabolizmu i zmiany własności fizyko-chemicznych struktur komórkowych, co w rezultacie doprowadzi do zwiększenia odporności rośliny. Wiele czynników stresowych powoduje naruszenie struktury i własności półprzepuszczalnych błon w komórce, co w konsekwencji prowadzi do powstawania stresu wtórnego np. deficytu wody lub stresu oksydacyjnego.

Reaktywne formy tlenu (ROS): (anionorodnik nadadtlenkowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy oraz tlen singletowy) powstają jako uboczne, zazwyczaj niepożądane, produkty metabolizmu komórkowego. Wytwarzanie ROS w normalnych warunkach jest niskie jednak wiele czynników stresowych (np. chłód, susza, zasolenie, jony metali ciężkich, promieniowanie ultrafioletowe, działanie ozonu) może zburzyć istniejącą równowagę wytwarzania i detoksyfikacji ROS, prowadząc, w konsekwencji, do występowania stresu oksydacyjnego. W komórkach roślinnych ROS są wytwarzane głównie w chloroplastach, peroksyzomach i mitochondriach. ROS uważa się głównie za metabolity powodujące uszkodzenia komórek, m.in. inicjujące peroksydację lipidów, inaktywujące białka, depolimeryzujące wielocukrowce, utleniające składniki kwasów nukleinowych. Pełnią one jednak również pozytywne funkcje, np. uczestniczą w procesie lignifikacji ściany komórkowej. Reaktywne formy tlenu są ponadto cząsteczkami sygnałowymi w warunkach stresu. Obronę komórek roślinnych przed szkodliwym działaniem ROS można charakteryzować na 3 poziomach: i) przeciwdziałanie wytwarzaniu ROS; ii) usuwanie powstałych ROS oraz iii) usuwanie negatywnych skutków działania ROS. Szczególną rolę w zapobieganiu wytwarzaniu ROS na terenie mitochondriów przypisuje się roślinnej alternatywnej drodze oddechowej. Oksydaza alternatywna (AOX) poprzez odbieranie nadmiaru elektronów ze zredukowanego ubichinonu w łańcuchu oddechowym przeciwdziała wytwarzaniu ROS. W tkankach roślinnych występują bardzo sprawne mechanizmy enzymatyczne i nieenzymatyczne regulujące stężenie ROS. Głównymi enzymami regulującymi stężenia reaktywnych form tlenu są dysmutazy nadadtlenkowe (SOD),

katalazy (CAT) i peroksydazy (POX) w tym głównie peroksydaza askorbinianowa (APX). Większość tych enzymów (z wyjątkiem CAT) występuje prawie we wszystkich kompartmentach komórkowych. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych wraz z chelatowaniem jonów metali koniecznych do katalizowanej reakcji Habera-Weissa przeciwdziała wytwarzaniu najbardziej reaktywnego rodnika wodorotlenowego i utrzymuje odpowiednie stężenia molekuł sygnałowych. We wszystkich kompartmentach komórkowych występuje również, bardzo aktywny w regulacji stężenia ROS, cykl glutationowo-askorbinianowy zależny od NADPH. Na system obronny tkanek roślinnych składają się ponadto niskocząsteczkowe przeciwutleniacze: glutation (występujący w stężeniu 1 – 5 mM), askorbinian (w stężeniu 5 – 20 mM), cysteina, tokoferol, karotenoidy, flawonoidy oraz zredukowany ubichinon. Usuwanie skutków działania ROS wiąże się głównie z enzymatycznymi mechanizmami naprawczymi struktur komórkowych.

Celem ćwiczenia jest określenie czy stresowi chłodu (traktowaniu temperaturą 4°C przez 3 kolejne noce), jakiemu poddane zostały rośliny ogórka (*Cucumis sativus*) towarzyszy stres oksydacyjny. W tym celu oznaczamy i) aktywność peroksydaz w żelu agarozowym; ii) poziom i stan redukcji askorbinianu; iii) poziom peroksydacji lipidów. Szersze omówienie zmian w systemie antyoksydacyjnym tkanek ogórka po stresie chłodu oraz zasygnalizowanie roli AOX będzie miało charakter demonstracyjny.

Zadanie 1. Oznaczenie aktywności peroksydaz

Aktywność POX oznaczamy w żelu agarozowym. Do studzienek przygotowanego żelu наносimy po 20 µl ekstraktów (zawierających po 15 µg białka) oraz przygotowane wzorce białek (schemat nanoszenia odpowiednich ekstraktów wg uwag prowadzącego ćwiczenia). Elektroforezę prowadzimy przy przyłożonym napięciu 100 V i natężeniu 40 mA na żel, w buforze o składzie 25 mM Tris (pH 8,3) i 192 mM glicyna. Podczas przeprowadzania elektroforezy natywnej żele należy utrzymywać w temp. ok. 4°C. Żel po zakończeniu elektroforezy zanurzamy na 30 min w 20 ml roztworu 0,2 M gwajakolu w 100 mM buforze octanowym (pH 5,0) a następnie dodajemy H₂O₂ do stężenia końcowego 0,1%. Żele inkubujemy w roztworze aż do pojawienia się prążków. Obraz utrwalamy (skanujemy).

Zadanie 2. Oznaczenie poziomu i stanu redukcji askorbinianu

Zaproponowana metoda spektrofotometryczna pozwala na oznaczenie stężenia zredukowanego askorbinianu (AsA). Poziom dehydroaskorbinianu (DHA) obliczany jest z różnicy pomiędzy próbkami, w których oznaczono sumę askorbinianu oraz dehydroaskorbinianu (po zredukowaniu puli DHA) a próbką, w której oznaczono występujący w tkance AsA. Otrzymane zamrożone fragmenty tkanek liści i korzeni (1 g tkanki) ucieramy w moździerzu z dodatkiem 3 ml 0,1 M HCl. Homogenat przenosimy do próbówki i wirujemy 15000 g przez 15 min. W każdym z otrzymanych ekstraktów oznaczamy zarówno AsA jak i sumę AsA + DHA.

Oznaczenie AsA	Oznaczenie AsA + DHA
Do próbówki typu eppendorf odpipetować:	
270 μ l ekstraktu	270 μ l ekstraktu
23 μ l 1 M NaOH	23 μ l 1 M NaOH
300 μ l 150 mM buforu fosforanowego (pH 7,4)	300 μ l 150 mM buforu fosforanowego (pH 7,4)
200 μ l wody	100 μ l 10 mM DTT: wymieszać, inkubować w temp. pokojowej przez 15 min.
	100 μ l (0,5%) NEM: wymieszać, inkubować 30 sek. w temp. pokojowej
500 μ l 10% TCA	500 μ l 10% TCA
Odwirować 3 min w temp. 4 °C	
Pobrać 500 μ l supernatantu do eppendorfa, a następnie dodać:	
200 μ l 42,5 % H ₃ PO ₄	200 μ l 42,5 % H ₃ PO ₄
200 μ l 4% dipirydyłu	200 μ l 4% dipirydyłu
100 μ l 3% FeCl ₃ (mieszać!)	100 μ l 3% FeCl ₃ (mieszać!)
Inkubować 45 min w temp. 37°C	
Zmierzyć absorbancję przy $\lambda = 525$ nm	

Zawartość AsA i DHA przeliczamy na 1 g świeżej masy tkanki. Obliczamy również stosunek AsA/(AsA+DHA).

Zadanie 3. Oznaczanie poziomu peroksydacji lipidów

W oznaczeniu wykorzystujemy reakcję produktu peroksydacji lipidów – dialdehydu malonowego (MDA) z kwasem tiobarbiturowym (TBA) dającą barwne produkty (w kwaśnym środowisku i wysokiej temperaturze). Pomiar ekstynkcji przy $\lambda = 440$ i 600 nm pozwala na korektę absorbancji spowodowaną obecnością antocyjanin i cukrowców. $0,5$ g zmrożonej tkanki ucieramy w moździerzu w obecności $12,5$ ml 80% (v/v) etanolu. Pobieramy po 1 ml homogenatu i dodajemy do: mieszaniny (-TBA) zawierającej: 20% (w/v) TCA i $0,01\%$ (w/v) BHT (butylowany hydroksytoluen) lub do mieszaniny (+TBA) o składzie: 20% (w/v) TCA; $0,01\%$ (w/v) BHT i $0,65\%$ (w/v) TBA. Próbki dokładnie mieszamy i inkubujemy przez 20 min w temperaturze 95°C a następnie ochładzamy (np. w lodzie). Mieszaniny wirujemy przy 5000 g przez 10 min w temp. 4°C . Absorbancję supernatantu mierzymy przy $\lambda = 440, 532$ i 600 nm. Stężenie (MDA) obliczamy ze wzoru:

$$[(\text{Abs } 532_{+TBA} - \text{Abs } 600_{+TBA}) - (\text{Abs } 532_{-TBA} - \text{Abs } 600_{-TBA})] = \mathbf{A}$$

$$[(\text{Abs } 440_{+TBA} - \text{Abs } 600_{+TBA})0,0571] = \mathbf{B}$$

$$\mathbf{MDA [nmol ml^{-1}] = [(A - B / 157000)] 10^6}$$

FUNKCJE SYSTEMU PRZEWODZACEGO

Transport międzykomórkowy związków organicznych u roślin odbywa się dwiema drogami: przez błony komórkowe lub przez plazmodesmy, liczne kanały cytoplazmatyczne łączące sąsiednie protoplasty. W drugim przypadku, transportowane związki nie opuszczają protoplastów komórek tworzących symplast zanurzony w apoplaście tworzonym przez ściany komórkowe i przestrzenie międzykomórkowe. Zjawiska transportowe zachodzące na poziomie komórkowym są u roślin przeniesione na poziom nadkomórkowy, Transport dalekodystansowy u roślin odbywa się bowiem wewnątrz wyspecjalizowanych komórek: żywych członów rurek sitowych w przypadku nisko- i wysokocząsteczkowych związków organicznych transportowanych z liści oraz wewnątrz członów martwych naczyń w przypadku transportu wody z korzeni.

System przewodzący bierze też udział w przenoszeniu różnego rodzaju sygnałów biochemicznych, takich jak hormony, białka oraz biofizycznych, np. fali ciśnienia hydrostatycznego lub potencjału czynnościowego.

Cechą charakterystyczną żywych komórek jest występowanie różnicy potencjałów elektrycznych między wnętrzem komórki a przestrzenią poza komórkową. Jest to efekt nierównomiernego rozmieszczenia jonów dodatnich i ujemnych. Gdy komórka jest stymulowana chemicznie, mechanicznie lub w inny sposób, otwarciu ulegają kanały jonowe w błonie, co prowadzi do jej przejściowej depolaryzacji. Zapoczątkowuje to powstanie fali potencjału pobudzenia, która może być przenoszona z komórki do komórki, a także wzdłuż całej rośliny

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się studentów z różnymi typami załadowania floemu (apoplastyczny, symplastyczny), transportem dalekodystansowym oraz symplastycznym mechanizmem rozładowania floemu w młodych liściach, z nowoczesnymi metodami stosowanymi przy badaniach procesów transportowych oraz ze zjawiskiem przekazywania sygnałów elektrycznych w roślinach w reakcji na bodźce środowiskowe oraz z podstawami elektrofizjologii.

I. Transport dalekodystansowy w roślinach.

Realizowane będą następujące zadania:

1. Identyfikacja liści donorowych i akceptorowych.
2. Identyfikacja typu załadowania floemu u roślin.

Wykonanie ćwiczeń

W eksperymentach zostaną wykorzystane barwniki fluorescencyjne: fluoresceina i karboksyfluoresceina (światło wzbudzenia, $E_x = 485 \text{ nm}$; światło emisji, $E_m = 525 \text{ nm}$). Pierwszy z nich nie dyfunduje przez błony komórkowe, wprowadzony więc do rośliny drogą transpiracyjną pozostaje w apoplacie. Drugi dyfunduje do wnętrza komórek, tam jest rozkładany przez niespecyficzne esterazy, a następnie przemieszcza się międzykomórkowo przez plazmodesmy. Brak plazmodesm lub ich zamknięcie powoduje zahamowanie dyfuzji karboksyfluoresceiny. Z tego względu jest stosowana jako znacznik ciągłości symplastu.

1. Przygotowanie roztworu karboksyfluoresceiny

- a) Odważyć 1200 μg karboksyfluoresceiny (CFDA).
- b) Rozetrzeć CFDA zwilżoną szklaną bagietką na szkiełku zegarkowym.
- c) Rozpuścić CFDA w 19 ml wody redestylowanej.
- d) Bardzo powoli doprowadzić pH roztworu CFDA do wartości 6,3 dodając po 50 μl przygotowanego wcześniej 0,0001 M NaOH (do 100 ml wody redst. dodać 100 μl 0,1 M NaOH).
- e) **UWAGA!** Nawet chwilowe przekroczenie pH 7 spowoduje nieodwracalny rozkład CFDA, o czym świadczy żółta barwa roztworu!
- f) Uzupełnić roztwór do 20 ml.
- g) Trzymać w ciemnym naczyniu, używać na świeżo, roztwór powinien być bezbarwny.

2. Przygotowanie roztworu fluoresceiny

- a) Rozcieńczyć roztwór bazowy fluoresceiny (94 mg fluoresceiny, 3 ml EtOH 96%, dopełnić wodą do 10 ml) 200 razy,
- b) Przechowywać w ciemnym naczyniu, nie wystawiać na silne światło, używać na świeżo.

Zadanie 1. Identyfikacja liści donorowych i akceptorowych

Zadanie polega na określeniu zdolności do rozładowania floemu rośliny dwuliściennej (grochu), w liściach pochodzących z różnych pięter. Barwniki zostaną podane do roślin drogą transpiracyjną.

1. Odciąć pod wodą pęd rośliny przy nasadzie.
2. Szybko przenieść odcięty pęd do naczynia z roztworem barwnika fluorescencyjnego.

warianty eksperymentalne: - woda, - fluoresceina, - CFDA.

2. Następnie pędy oświetlamy przez 30 minut (pobieranie badanych roztworów).
3. Odciąć 4 – 5 liści z różnych pięter i ułożyć je na płytce pomiarowej, przykryć szklaną szybką, zanotować sposób ułożenia (liście młode, liście dojrzałe, liście stare).
4. Zmapować poziom fluorescencji liści przy świetle wzbudzenia 485 nm i świetle emisji 538 nm.
5. Powtórzyć pomiar fluorescencji przy świetle wzbudzenia 444 nm i świetle emisji 612 nm (fluorescencja chlorofilu).
6. Policzyc średnią fluorescencję dla badanych liści.

Intensywna fluorescencja liścia w zakresie 538 nm świadczy o przemieszczaniu się barwnika w obrębie symplastu (stan charakterystyczny dla młodego, nierozwiniętego liścia, będącego akceptorem asymilatów), brak lub słaba fluorescencja świadczy o izolacji symplastycznej floemu od reszty liścia (stan charakterystyczny dla dojrzałego liścia rośliny o apoplastycznym typie załadowania floemu, będącego donorem asymilatów).

Zadanie 2. Identyfikacja typu załadowania floemu u roślin

Zadanie obejmie śledzenie przemieszczania karboksyfluoresceiny w liściach roślin z symplastycznym (dynia olbrzymia) i apoplastycznym (fasola) typem załadowania floemu i obliczenie szybkości przemieszczania się karboksyfluoresceiny w liściach dyni olbrzymiej. W eksperymencie zostanie wykorzystana karboksyfluoresceina podana bezpośrednio do liścia.

1. Do małego naczynka wagowego wlać ok. 2 ml roztworu karboksyfluoresceiny.

2. Umieścić w nim mały (0,5 cm x 0,5 cm) skrawek papieru ryżowego, zostawić na 20 min.
3. Niewielki obszar liścia dyni lub fasoli przetrzeć drobnym papierem ściernym, unikając uszkodzenia tkanki.
4. Na oczyszczonym miejscu umieścić skrawek papieru ryżowego nasączonego karboksyfluoresceiną.
5. Po 30 minutach liść odciąć, skrawek papieru ryżowego przykryć fragmentem folii aluminiowej i ułożyć je na płytce pomiarowej, przykryć szklaną szybą.
6. Zmapować poziom fluorescencji liści przy świetle wzbudzenia 485 nm i świetle emisji 538 nm.

Intensywna fluorescencja w zakresie 538 nm poza miejscem podania barwnika świadczy o symplastycznym typie załadowania floemu, brak fluorescencji o apoplastycznym typie załadowania floemu.

Jako poziom tła przyjąć wartość 1 JU (jednostki umowne fluorescencji). Policzyć szybkość przemieszczenia się barwnika przyjmując, że rozdzielczość skanowania powierzchni liścia wynosi 6 mm.

II. Przesyłanie fali potencjału pobudzenia w roślinie.

Zadanie obejmie:

1. Określenie potencjału spoczynkowego u fasoli.
2. Stymulację fali potencjału pobudzenia przez różne bodźce zewnętrzne (gorąco, zimno, stres mechaniczny).
3. Obliczenie szybkości przemieszczania się fali potencjału pobudzenia.
4. Blokowanie przemieszczania się fali potencjału pobudzenia wzdłuż rośliny przez obrączkowanie łodygi.

Opis układu eksperymentalnego

Układ pomiarowy składa się z elektrod Ag/AgCl₂ podłączonych przez przedwzmacniacz do rejestratora. Systemiczne przekazywanie sygnałów elektrycznych w roślinach odbywa się wzdłuż systemu przewodzącego i najlepsze efekty uzyskuje się po włączeniu elektrod do

komórek floemu (elektrody wewnętrzne). Możliwe jest jednak wykorzystanie tzw. elektrod zewnętrznych, wklutych jedynie do łodygi lub ogonka liściowego.

Elektrody

Elektrodę stanowi mikrokapilara wypełniona 0,1 M roztworem KCl oraz umieszczony w niej cienki drut srebrny. Pojedynczy układ pomiarowy składa się z dwóch elektrod, referencyjnej i pomiarowej, podłączonej odpowiednio do ujemnego i dodatniego wejścia przedwzmacniacza. Wykonanie elektrody polega na napełnieniu mikrokapilary roztworem KCl, umieszczeniu w niej drutu srebrnego, przymocowanego do niej następnie klejem cyjanopanowym. Kolejnym krokiem jest podłączenie (przylutowanie) jednej z elektrod do „+” przedwzmacniacza (odtąd będzie to elektroda pomiarowa), a drugiej do „-” przedwzmacniacza (odtąd będzie to elektroda referencyjna). Należy pamiętać, aby podczas wszystkich operacji z elektrodami przedwzmacniacz był odłączony od zasilania i od rejestratora!

Elektrodę referencyjną należy delikatnie wkluć w podstawę łodygi fasoli, natomiast elektrodę pomiarową kilka – kilkanaście centymetrów wyżej. Należy pamiętać, że mikrokapilara jest krucha i podczas wkluwania może ulec ukruszeniu bądź złamaniu, co może prowadzić do skaleczenia.

Przedwzmacniacz

Przedwzmacniacz jest prostym układem elektronicznym wyposażonym w układ wejścia i wyjścia, układ zasilania (9 V prądu stałego lub akumulator), oraz wysokooporowy ($> 10^{14} \Omega$) wzmacniacz operacyjny. Układy wejścia/wyjścia nie są zabezpieczone przed zwarciami, należy więc zachować szczególną ostrożność przy układaniu przewodów, aby uniknąć zetknięcia się niez izolowanych końcówek (zwarcie może spowodować uszkodzenie przedwzmacniacza).

Po przylutowaniu elektrod do wejść przedwzmacniacza, wyjście należy podłączyć do rejestratora, pamiętając o zachowaniu biegunowości, dopiero teraz można włączyć zasilanie przedwzmacniacza oraz, na końcu, rejestratora. Wyłączanie układu odbywa się w odwrotnej kolejności, tzn. rejestrator – zasilanie przedwzmacniacza – elektrody.

Obserwacje

Badane będą reakcje rośliny na następujące bodźce:

- dotyk,
- uszkodzenie liścia
- chłód

– gorąco

Ponadto, po podłączeniu drugiego układu pomiarowego (z jedną wspólną elektrodą referencyjną) zmierzona zostanie szybkość przesyłania impulsów elektrycznych wzdłuż rośliny.

Opis wyników

W sprawozdaniu należy wskazać, jakie bodźce powodują powstawanie impulsów elektrycznych oraz jaki jest kształt impulsów wywoływanych przez różne bodźce. Wyniki należy przedstawić w postaci tabelki.

Obliczeń szybkości przesyłania impulsów elektrycznych w roślinie należy dokonać w oparciu o zapisy rejestratora i znaną odległość między elektrodą pomiarową nr 1 i elektrodą pomiarową nr 2. Szybkość przesyłania impulsów elektrycznych należy wyrazić w cm/sek.