

Laboratórne cvičenie č. 7

Vypracoval: Samuel Nalevanko

Odbor: 2FBb

Školský rok: 2018/19

Predmet: Fyziológia rastlín

Cvičiaci: RNDr. Michal Goga, PhD.

Cvičenie dňa: 4. 4. 2019

Názov témy: Hormóny

Úlohy:

A.) Cytokinínový biotest na oddial'ovanie senescencie listov

Princíp: Fytohormóny cytokiníny (CKs) regulujú veľké množstvo procesov počas rastu a vývinu rastlín. Jedným z ich účinkov je aj schopnosť oddialiť senescenciu (starnutie) listov v tme. Tma urýchľuje proces rozkladu chlorofylu a dochádza k voľným okom pozorovateľnému žltnutiu (t.j. starnutiu - senescencii). CK biotest je založený na schopnosti CKs tento senescenčný proces spomaliť. Dnes je predstava mechanizmu tohto účinku založená na spomalení dýchania, ako aj degradačných procesov vedúcich k rozkladu chlorofylu. Rozklad fotosyntetických pigmentov vedie k nefunkčnosti fotosyntetického aparátu a tým k obmedzenému prísunu energie z procesov fotosyntézy. Pôvodná práca, ktorá dokazovala dôležitosť CK signálnej dráhy, zahŕňala pokusy s mutantnými rastlinami *Arabidopsis thaliana* (Riefler et al., 2006). Tieto rastliny mali poškodené gény pre CK receptory. Sledovalo sa, či mutantná rastlina dokáže aj s vyradeným receptorom prijať CK signál (CK pridaný experimentátorom) a brániť rozkladu chlorofylu 75 v tme. Takto sa začalo odkrývanie signálnej dráhy fyziologického pôsobenia CKs na molekulárnej úrovni.

Pomôcky: 4 skúmavky so zábrusom s objemom do 10ml, laboratórny stojan na skúmavky, hodinové sklíčko, lievik, skalpel, 5 malých kadičiek, automatické pipety a špičky, nožnice (korkovrt a drevená podložka), pinzeta

Materiál: listy jačmeňa alebo v prípade ich nedostupnosti sa použijú 50 mm² terčiky z listov muškátu *Pelargonium* sp., benzyladenín, 0,1 M NaOH, 0,1 M HCl, destilovaná voda, morský piesok

Postup:

- navážime 1mg BA na hodinové sklíčko
- BA rozpustíme v 0.2ml 0.1M NaOH tak, aby neobsahoval zrazeniny
- vypočítame objem rozpúšťadla nevyhnutného na prípravu zásobného roztoku smolaritou 5mM
- roztok prelejeme do uzatvárateľnej nádoby a zneutralizujeme 0.2ml 0.1M HCl
- do troch skúmaviek napipetujeme 1ml dest. vody, 1ml 5mM BA a 1ml 0.05mM BA
- odrežeme listové čepele, odvážime ich a ponoríme do roztoku
- uzavrieme skúmavky a vložíme do termostatu s teplotou 25°C a inkubujeme 7 dní v tme
- odoberieme listy na extrakciu chlorofylu, aby sa vedel obsah fotosyntetického pigmentu na začiatku experimentu
- listy rozotrieme na morskom piesku v 2ml 80% acetónu
- extrakt prefiltrujeme do kalibrovannej skúmavky a doplníme ju 80% acetónom do 4ml

- obsah vyextrahovaného chlorofylu stanovíme spektrofotometricky
- odmeriame absorbanciu pri 663, 646 a 750nm, zohľadníme šum vo výpočtoch, pretože skresľuje výsledky
- po týždni inkubácie sa skúmavky vyberú a spektrofotometricky sa stanoví obsah chlorofylu
- získané výsledky sa vynesú do grafu

Výpočet na prípravu $5 \cdot 10^{-4}M$ a $5 \cdot 10^{-6}M$ roztoku BA

$$1M = \frac{mol}{l} = 225.25g$$

$$1mM \dots 1000ml \dots 225.25mg$$

$$0.5mM \dots 1000ml \dots 112.625mg$$

$$1000ml \dots 112.625mg$$

$$x \text{ ml} \dots 1mg$$

$$x = 8.9ml$$

$$x - 0.2ml(NaOH) - 0.2ml(HCl) = 8.5ml \text{ (dest. voda)}$$

Pre prípravu $5 \cdot 10^{-6}M$ roztoku odoberieme $100\mu l$ z $5 \cdot 10^{-4}M$ roztoku a dolejeme do $1ml$ destilovanou vodou.

Záver


