

UNIVERZITA P. J. ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA

Ústav biologických a ekologických vied

Katedra botaniky



Návody na cvičenia z fyziológie rastlín

4. prepracované vydanie

Miroslav Repčák, Martin Bačkor,
Peter Paľove-Balang, Silvia Gajdošová

Košice 2015

Návody na cvičenia z fyziológie rastlín

Vysokoškolské skriptá



Autori: doc. RNDr. Peter Paľove-Balang, PhD.,

Katedra Botaniky, ÚBEV, Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach,

prof. RNDr. Miroslav Repčák, DrSc.,

Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach

prof. RNDr. Martin Bačkor, DrSc.,

Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach

Mgr. Silvia Gajdošová, PhD.,

Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach

© 2015 doc. RNDr. Peter Paľove-Balang, PhD., prof. RNDr. Miroslav Repčák, DrSc.,

prof. RNDr. Martin Bačkor, DrSc., Mgr. Silvia Gajdošová, PhD.,

Recenzent: Mgr. Veronika Zelinová, PhD., Botanický ústav SAV, Bratislava

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani jeho žiadnu časť nemožno reprodukovat', ukladať do informačných systémov alebo inak rozširovať bez súhlasu majiteľov práv.

Za odbornú a jazykovú stránku týchto vysokoškolských skript zodpovedajú autori. Rukopis neprešiel redakčnou ani jazykovou úpravou.

Elektronické vysokoškolské skriptá určené pre Prírodovedeckú fakultu UPJŠ v Košiciach.

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Umiestnenie: <http://unibook.upjs.sk>

Dostupné od: 11.02.2015

ISBN 978-80-8152-233-8

A. Úvod

Zriadenie cvičebne fyziológie rastlín na Katedre botaniky PF UPJŠ v Košiciach v roku 1969 bolo spojené s menom Ing. Štefana Kocúrika, CSc. (1923 - 2006), ktorý spracoval aj prvé „Návody na cvičenia z fyziológie rastlín“ (Košice 1972, 1976). Od roku 1980 sa využívala príručka doc. RNDr. Karola Erdelského, CSc. a Ing. Fridricha Friča, DrSc. „Praktikum a analytické metódy vo fyziológii rastlín“ (Bratislava 1980).

Po zvýšení počtu študentov, sa v roku 1991 ukázalo aktuálnym vydať „Návody na cvičenia z fyziológie rastlín“ v záujme lepšej prípravy a efektívnej organizácie práce na cvičeniach. Doc. RNDr. A. Košturiak, CSc. svojimi podnetnými radami prispel k podstatnému rozšíreniu úvodnej časti návodov, za čo sú mu autori zaviazaní vďakou.

Pre štvrté vydanie sme inovovali a modernizovali niektoré úlohy a zohľadnili sme možnosti inovovanej praktikárne. Výber úloh sme prispôbili aktuálnemu rozsahu cvičení jednotlivých predmetov fyziológie rastlín v bakalárskych a magisterských študijných programoch biológie a ekológie. Ide o predmety: Fyziológia rastlín, Metabolizmus rastlín, Minerálna výživa rastlín, Rast a vývin rastlín a Ekológia rastlín. Niektoré úlohy sú vhodné tiež pre stredoškolské pokusy. Výber tém ovplyvnila výskumná orientácia nášho pracoviska na sekundárny metabolizmus, ekofyziológiu a liečivé rastliny. V návodoch sa spravidla pridržujeme jednotiek SI sústavy, niekedy uvádzame iné zaužívané jednotky.

Štvrté prepracované vydanie „Návodov...“ pripravil nový autorský kolektív. Do tohto vydania prispeli úlohami spoluautori prof. RNDr. Martin Bačkor, DrSc. (úlohy: 1.3.2, 1.3.4, 1.4.3, 1.4.4, 3.3, 3.5, 4.1.2), doc. RNDr. Peter Paľove-Balang, PhD. (úlohy: 1.3.1, 1.3.5, 1.3.6, 1.3.9, 1.3.10, 1.4.7, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 2.10, 2.11, 2.12, 3.4), Mgr. Sylvia Gajdošová, PhD. (4.1.1, 4.3.2, 4.3.5, 4.3.6). Za cenné pripomienky autori ďakujú viacerým spolupracovníkom a najmä Mgr. Veronike Zelinovej PhD., oponentke 4. vydania.

M.R.

B. Bezpečnosť a ochrana zdravia pri práci

Pred začiatkom práce v cvičebni fyziológie rastlín študent musí ovládať pravidlá pre prácu s jedmi a žieravinami, elektrickými a plynovými zariadeniami, poznať princíp, funkciu a obsluhu používaných prístrojov (návody pre obsluhu sú pri prístrojoch). Študent je tiež povinný ovládať princíp a postup úlohy, ktorú má na cvičení robiť. Po skončení cvičenia má umyť sklo a opláchnuť ho destilovanou vodou, upratať a odovzdať stôl.

Z uvedených pravidiel upozorňujeme najmä na tieto zásady:

1. Žieraviny a jedy je zakázané nasávať do pipiet ústami, smú sa používať len bezpečnostné pipety alebo odmerné valce.
2. So silne zápachajúcimi a agresívnymi látkami (koncentrované kyseliny, prchavé rozpúšťadlá) sa má pracovať len v digestore.
3. Práce s horľavými a výbušnými látkami treba robiť opatrne a až po upozornení ostatných pracovníkov. Pozor na otvorený oheň!
4. Žieraviny, ktoré pri riedení alebo rozpúšťaní uvoľňujú teplo, sa musia riediť alebo rozpúšťať po častiach za stáleho miešania a chladenia. Vždy lejeme kyselinu do vody (dôležité najmä pri riedení koncentrovanej H_2SO_4).
5. Do výlevky sa môžu vylievať rozpúšťadlá len ak sú dokonale miešateľné s vodou, po desaťnásobnom nariadení, do množstva 0,5 l a tridsaťnásobne riedené vodné roztoky kyselín a hydroxidov. Nesmú sa vylievať toxické látky, rozpúšťadlá nemiešateľné s vodou, výbušné látky, kyseliny a hydroxidy nad uvedené koncentrácie a množstvo.
6. Rozliate kyseliny je potrebné ihneď spláchnuť vodou, zneutralizovať práškovou sódou a opäť spláchnuť vodou. Rozliate zásady stačí spláchnuť len vodou.
7. Pri zahrievaní skúmaviek nad kahanom sa musí používať ochranný štít. Nad jedným kahanom sa smie zahrievať len jedna skúmavka. Ústie skúmaviek sa má držať smerom od osôb.
8. Študenti nesmú zasahovať do elektrických častí prístrojov pod napätím.
9. Pri práci s odstredivkou veko musí byť za chodu bezpečne uzavreté.
10. Pri práci s vákuom alebo pretlakom v sklených aparátúrach sa používa iba nepoškodené laboratórne sklo. Podtlakové časti aparatúry sa musia zakryť ochranným štítom.

11. Plynové horáky sa nesmú nechať horieť bez dozoru.
12. V laboratóriu je zakázané jesť, piť a fajčiť. Laboratórne pomôcky, nádoby a zariadenia sa nesmú používať na jedenie, pitie a uschovávanie potravín a pod.
13. Všetky zistené nedostatky sa musia ihneď oznámiť zodpovednému pracovníkovi.
14. Študenti môžu opúšťať cvičebňu len s vedomím a súhlasom vedúceho cvičenia.
15. Každú poruchu, poškodenie alebo nesprávnu funkciu prístrojov a zariadení je potrebné ihneď hlásiť.
16. So spotrebným materiálom, chemikáliami, energiou a prístrojmi zaobchádzať šetrne.
17. Študenti sú povinní udržiavať poriadok na laboratórnom stole.

Prvá pomoc

a) Otrava vdychovaním škodliviny

- zamedziť prenikaniu škodliviny do organizmu, postihnutého vyviešť z miestnosti, opatrne odstrániť odev (obsahuje toxické látky)
- zabezpečiť základné životné funkcie umelým dýchaním
- podávať čaj, kávu

b) Otrava požitím škodliviny

- urýchlene odstrániť jed z organizmu, vyvolať zvracanie o vypití asi 1,5 l vlažnej vody, podať 2x po 5 tabliet podrveného živočíšneho uhlia, CITROCARBON, CARBANTOX, ktoré pôsobia ako protijed

c) Postriekanie kože žieravinou

- postihnuté miesto ihneď opláchnuť prúdom vody 5 až 10 minút
- použiť neutralizačný roztok (2% zažívacia sóda pri zasiahnutí kyselinami, 2% kyselina octová pri zasiahnutí hydroxidmi)
- priložiť sterilný obväz

d) Postriekanie oka žieravinou

- vypláchnuť oko ihneď prúdom vody
- použiť borovú vodu a opätovne vypláchnuť
- okamžite hlásiť vedúcemu cvičenia

e) úrazy elektrinou

-vyprostiť postihnutého z dosahu elektrického prúdu vypnutím stop spínača pri vchode do cvičebne

-odsunutím alebo odtiahnutím postihnutého suchým predmetom

-ihneď začať s umelým dýchaním

Každé poranenie okamžite hlásiť vedúcemu cvičenia. Vo všetkých prípadoch poškodenia zdravia je potrebné urýchlene zabezpečiť privolanie rýchlej lekárskej pomoci, alebo postihnutého dopraviť na najbližšie zdravotné stredisko.

Dôležité telefónne čísla:

Hasičský a záchranný zbor:	Záchranná zdravotná služba:	Polícia:	SOS:
150	155	158	112

Pomoc pri vykonávaní prvej pred lekárskej pomoci na bezplatnej linke 0850 11 13 13

C. Princípy použitých chemických a fyzikálnochemických metód

C.1 Váženie

Váženie je porovnávanie hmotnosti meraných pevných, prípadne kvapalných látok s hmotnosťou závažia. Na menej presné merania používame technické váhy. Na presné váženie používame analytické váhy. Najprv stanovíme približnú hmotnosť na predvážkach. Pre každé váhy je udané maximálne zaťaženie, ktoré sa nesmie prekročiť. Pri vážení je potrebné dodržiavať nasledujúce pravidlá:

1. Pred vážením skontrolujeme nulovú polohu.
2. Vážený predmet kladieme doprostred misky vždy len zaaretovaných váh.
3. Váženú látku nekladieme nikdy priamo na miskú váh, ale použijeme odvažovačku.
4. Na miskú váh nekladieme nečisté, mokré alebo horúce predmety. Horúce predmety vychladíme v exsíkátore. Váhy chránime pred akýmkoľvek stykom s agresívnymi látkami.
5. Pri vyvažovaní postupujeme od väčších závaží k menším.
6. Po skončení váženia skontrolujeme nulovú polohu.
7. Váhy udržiavame vždy v maximálnej čistote.

C.2 Odstred'ovanie

Na oddelenie pevných a kvapalných látok používame odstredivky, najmä ak nemôžeme použiť filtráciu alebo sedimentáciu, prípadne ak by dlho trvali. Pri odstred'ovaní pôsobením odstredivej sily sa utvorí ťažšia zložka sediment a ľahšia supernatant. Na odstred'ovanie pri malej frekvencii otáčania (do 5000 min^{-1}) používame hrubostenné sklené skúmavky. Pred odstred'ovaním protiľahlé skúmavky s plášťami musíme vyvážiť, doplnením potrebného množstva vody do plášťa. Počas odstred'ovania musí byť veko odstredivky bezpečne uzavreté.

C.3 Manometrické metódy

Manometrické metódy umožňujú sledovať všetky reakcie, spojené so zmenami objemu plynov. Používame ich na štúdium výmeny plynov biologického materiálu. Meranie môže prebiehať pri konštantnom objeme plynnej fázy, pri konštantnom tlaku, alebo aj za súčasnej zmeny objemu a tlaku. Klasický typ prístroja je Warburgov manometrický prístroj. Prístroj pozostáva z manometrov s manometrickými nádobkami, umiestnenými vo vodnom kúpeli. Trepacie zariadenie umožňuje rýchlu výmenu plynov. Konštantnosť teploty a objemu je dôležitou podmienkou, pretože obe uvedené veličiny vplyvajú na tlak. Platí nasledujúca závislosť:

$$\frac{P_1 \cdot V_1}{T_1} = \frac{P_2 \cdot V_2}{T_2}$$

P = tlak

V = objem

T = teplota

Reakcia prebieha v nádobke za konštantného objemu plynnej fázy a každú zmenu množstva plynu v nádobke vypočítame vynásobením zmeny tlaku, odčítanej na otvorenom ramene tzv. nádobkovou konštantou. Warburgovou metódou možno merať napríklad rýchlosť alebo celkovú spotrebu, prípadne produkciu kyslíka, oxidu uhličitého, produkciu kyselín, respiračné kvocienty a podobne.

C.4 Optické analytické metódy

Elektrónová absorpčná spektrometria

Elektrónová absorpčná spektrometria predstavuje časť optických analytických metód, ktoré využívajú absorpciu elektromagnetického žiarenia o vlnových dĺžkach 185 až 800 nm pri jeho prechode homogénnym hmotným optickým prostredím.

Absorbovaná časť elektromagnetického žiarenia uvedených vlnových dĺžok spôsobuje excitáciu valenčných σ , π a n elektrónov atómov a molekúl zo základného do vzбудeného stavu. Preto absorpčné spektrá nazývame elektrónové, pričom predstavujú ultrafialovú a viditeľnú oblasť elektromagnetického žiarenia.

Zmena energetického stavu valenčných elektrónov molekuly je spojená so zmenou jej vibračných a rotačných stavov. Prechod z nižšej do vyššej elektrónovej hladiny môže prebiehať do veľkého počtu rôznych vibračných a rotačných podhládín molekuly. Počet blízkych elektrónových prechodov pri molekulách je veľký a výsledkom merania absorpčného spektra molekúl sú absorpčné pásy, ktoré sa objavujú v okolí určitej vlnovej dĺžky, charakteristickej pre určitú molekulu. Absorpčný pás zo spektroskopického hľadiska charakterizuje poloha vlnovej dĺžky jeho maxima λ_{\max} a intenzita pásu, ktorý charakterizuje ε_{\max} t.j. molový absorpčný (lineárny) koeficient.

Zložitejšie molekuly organických látok obyčajne vykazujú viac maxim absorpčných pásov, ktoré sa môžu navzájom prekryvať a tvoriť krivky s málo výraznými maximami. Takéto absorpčné maximá sú menej vhodné pre kvantitatívnu chemickú analýzu. Ak je to nevyhnutné možno ich využiť, ale použité prístroje musia mať vyššiu rozlišovaciu schopnosť. Môžu však byť potenciálnym zdrojom chýb, najmä systematických.

Základným predpokladom aplikácie elektrónovej absorpčnej spektrometrie v chemickej analýze je lineárna platnosť Lambertovho-Beerovho zákona. Tento zákon vyjadruje vzťah medzi intenzitou monochromatického žiarenia I_0 dopadajúceho na hmotné homogénne optické prostredie s hrúbkou kyvety h (v cm), intenzitou žiarenia I , ktoré vychádza z tohto prostredia, koncentráciou absorbujúcej látky c ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a molovým absorpčným (lineárnym) koeficientom ε_γ ($\text{dm} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), ktorý je dôležitou spektrometrickou charakteristikou zlúčenín. Nech prechádza rovnobežný zväzok monochromatických lúčov o intenzite I_0 vrstvou absorbujúceho prostredia s hrúbkou h . Vplyvom absorpcie sa jeho intenzita zoslabuje na hodnotu I . Priepustnosť (transmitancia) T prostredia je daná vzťahom:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Prevrátená hodnota dekadického logaritmu priepustnosti T sa nazýva absorbančia alebo absorbančia (A) a platí rovnica, ktorá je vyjadrením spojeného Lambertovho-Beerovho zákona:

$$\frac{1}{T} = A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot h$$

Túto rovnicu je tiež možné matematicky vyjadriť v tvare:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_\lambda \cdot h \cdot c}$$

Z rovníc je vidieť, že zatiaľ čo absorbanca A je lineárnou funkciou ε_λ , c a h , priepustnosť T (udáva sa v %) je ich exponenciálnou funkciou a môže nadobúdať hodnoty od 0 po 1 (prípadne 0 až 100 %). Absorbanca A môže nadobúdať hodnoty od 0 po ∞ .

Lambertov-Beerov zákon platí iba pre monochromatické žiarenie a veľmi zriedené roztoky ($c < 10^{-2}$ M), kde sa už neuplatňuje závislosť ε od indexu lomu n . Nedodržiavanie týchto požiadaviek spôsobuje tzv. zdanlivé odchýlky od Lambertovho-Beerovho zákona. Právě odchýlky sú spôsobené chemickými pochodmi, ktoré prebiehajú v roztoku (hydrolýza, disociácia, tvorba komplexov a pod.).

Pri elektrónovej absorpčnej spektrometrii sa obyčajne používajú zdroje polychromatického žiarenia. Z nich je možné získať monochromatické žiarenie niekoľkými spôsobmi:

- lomom na hranole (refrakciu). Podľa požiadaviek na monochromatickosť žiarenia môžu na to slúžiť jednoduché hranoly z izotropného materiálu, alebo hranoly zložené z viacerých materiálov
- ohybom (difrakciu) na mriežke (transparentná doska s radom vrypov, ktorých stredy sú od seba umiestnené vo vzdialenosti d , danej konštantou mriežky),
- svetelnými filtrami, transparentnými len pre určitú oblasť vlnových dĺžok žiarenia. Toto žiarenie nie je prísne monochromatické.

Elektrónovú absorpčnú spektrometriu môžeme rozdeliť na:

1. Absorpčnú spektrometriu, pri ktorej sa sleduje závislosť absorbancie A od vlnovej dĺžky λ pri zvolenej koncentrácii c a hrúbke vrstvy h absorbujúceho prostredia. Grafická závislosť predstavuje absorpčné spektrum. Prístroje používané pri tejto metóde sa nazývajú spektrofotometre (objektívny, obyčajne automatický záznam).
2. Absorpčná fotometria, ktorá skúma závislosť absorbancie A od koncentrácie pri zvolenej vlnovej dĺžke λ a hrúbke vrstvy absorbujúceho prostredia h . Používané prístroje sa nazývajú spektrálne fotometre (objektívne alebo vizuálne)
3. Kolorimetria, pri ktorej sa sleduje závislosť hrúbky absorbujúcej vrstvy h od koncentrácie c pri konštantnej absorbancii A a konštantnej vlnovej dĺžke λ . Použité prístroje sa nazývajú kolorimetre.

Výber technického zariadenia a vhodnej metódy závisí od cieľa analýzy.

Refraktometria

Refraktometria je optická analytická metóda založená na meraní indexu lomu. Rýchlosť šírenia svetla optickým (priehľadným) prostredím závisí od jeho mernej hmotnosti (hustoty)

ρ , pričom rýchlosť je najvyššia vo vákuu ($3 \cdot 10^9 \text{ m.s}^{-1}$). Pri prechode svetla z jedného optického prostredia do druhého s rôznymi mernými hmotnosťami sa mení jeho prieniková rýchlosť, ktorá však v praxi nie je dosť dobre merateľná. Fyzikálnym dôsledkom zmeny prienikovej rýchlosti je zmena smeru jeho prieniku, čo sa prejaví ako lom na rozhraní dvoch optických prostredí. Pomer rýchlosti prieniku lúča v prvom prostredí k jeho rýchlosti v druhom prostredí alebo aj pomer sínusov uhla dopadu α_1 a uhla lomu α_2 na rozhraní dvoch prostredí (Snellov zákon) sa nazýva index lomu n :

$$n = \frac{v_1}{v_2} = \frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2}$$

Takto definovaný index lomu n je veličina relatívna, pričom jeho absolútnu hodnotu možno získať meraním vo vákuu. Index lomu n je funkciou hustoty ρ prostredia a v roztokoch má aditívny charakter. Závisí teda od zloženia a kvantitatívneho zastúpenia (koncentrácie) jednotlivých zložiek. Túto závislosť vyjadruje vzťah:

$$f(n) = r \cdot \rho$$

r = špecifická refrakcia, charakteristická pre každú látku

Funkčnú závislosť n od ρ rôzni autori definovali rozlične. Za jej najpresnejšiu definíciu sa považuje Lorentzov - Lorenzov vzťah:

$$r = \frac{n^2 - 1}{\rho(n^2 - 2)}$$

Index lomu n závisí od vlnovej dĺžky použitého žiarenia a hustota ρ od teploty. Preto pri meraní indexu lomu používame monochromatické žiarenie (dublet sodíkovej výbojky) udané exponentom a konštantnou teplotou (udaná indexom), napr. n_D^{25} .

Polarimetria

Polarimetria je optická metóda založená na meraní uhla otočenia roviny kmitov polarizovaného svetla opticky aktívnych látok. Opticky aktívne látky sú väčšinou organické molekuly obsahujúce asymetrický uhlík a niektoré anorganické látky s asymetrickou štruktúrou. Z pevných látok k nim patria kryštály všetkých kryštalografických sústav, okrem kubickej sústavy. Praktické využitie má vhodne zbrúsený klenec islandského vápenca (nikol). Ak dopadne lúč priečného elektromagnetického vlnenia na zbrúsenú plošku nikolu rozštiepi sa na riadny a mimoriadny lúč. Súčasne dôjde k ich polarizácii, t.j. k ich kmitaniu v jednej

polarizačnej roviny. Polarizačné roviny oboch polarizovaných lúčov sú na seba kolmé. Pre analytické ciele v polarimetroch sa využíva len mimoriadny lúč.

Podľa smeru otáčania roviny polarizovaného svetla rozdeľujeme opticky aktívne látky na pravotočivé (d) a ľavotočivé (l). Optická otáčavosť systému, t.j. schopnosť otáčať rovinu polarizovaného svetla, závisí od kvality (druhu) opticky aktívnej látky a aditívne závisí od množstva (koncentrácie) opticky aktívnych látok v roztoku, vlnovej dĺžky polarizovaného svetla a teploty. V kvantitatívnej polarimetrii sa využíva empirický vzťah:

$$\alpha = [\alpha]_{\lambda}^t \cdot l \cdot Q$$

$[\alpha]$ = špecifická otáčavosť látky pri teplote t a vlnovej dĺžke λ

l = hrúbka vrstvy v dm

Q = množstvo látky v $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$

Množstvo opticky aktívnej látky možno určiť buď zo známej hodnoty $[\alpha]_{\lambda}^t$ alebo z kalibračnej závislosti. Ako zdroj monochromatického žiarenia pri praktických meraniach použijeme sodíkovú výbojku.

C.5 Chromatografické metódy

Chromatografia je vysokoúčinná separačná (deliaca) metóda, založená na postupnom, mnohonásobne opakovanom ustaľovaní fázových rovnováh zložiek tvoriacich súčasť analyzovaných zmesí medzi dvoma navzájom nemiešateľnými fázami. Každý chromatografický systém tvoria tri základné prvky:

1. nepohyblivá (stacionárna) fáza, ktorá jednotlivé zložky z analyzovanej zmesi púta fyzikálnymi, chemickými alebo oboma druhmi síl
2. pohyblivá (mobilná) fáza, ktorá unáša jednotlivé zložky separovanej vzorky stacionárnou fázou
3. analyzované zložky vzorky.

Chromatografiu podľa skupenstva pohyblivej a nepohyblivej fázy rozdeľujeme:

- | | | |
|--------------|------------|-----------------------|
| a/ plyn | kvapalina | plynová |
| b/ kvapalina | tuhá látka | stĺpcová adsorpčná |
| c/ kvapalina | kvapalina | stĺpcová rozdeľovacia |

Podľa typu separačných síl môžeme chromatografiu rozdeliť na:

a/ adsorpčnú, pri ktorej je delenie jednotlivých zložiek zmesi dôsledkom ich rozdielnej adsorpcie na povrchu stacionárnej fázy

b/ rozdeľovaciu, pri ktorej stacionárnou fázou je kvapalina nemiešateľná s mobilnou fázou. Táto je zachytená (zakotvená) na povrchu tuhého nosiča, tvoriaceho náplň kolóny.

K rozdeleniu zmesi dochádza ak jednotlivé látky tvoriace zmes majú rozdielne rozdeľovacie koeficienty (rozpusťnosť) medzi mobilnou a stacionárnou fázou

c/ výmennú, pri ktorej stacionárnou fázou sú meniče iónov

d/ chromatografiu na molekulových sitách (gélová filtrácia), pri ktorej stacionárnou fázou tvoria molekulové sitá, t.j. látky vyznačujúce sa definovateľnými vzdialenosťami atómov v kryštálovej mriežke. Menšie časti tvoriace zmes môžu prenikať do ich štruktúry, a tým sa brzdia ich pohyb kolónou.

V praktickej chromatografii sa súčasne môže uplatňovať aj viac separačných dejov.

Tenkovrstvová chromatografia

Pri tenkovrstvovej chromatografii (TLC) prebieha delenie zložiek zmesi látok v tenkej vrstve stacionárnej pevnej fázy (sorbentu) pomocou kvapalnej mobilnej fázy. Používané sorbenty sú silikagél, oxid hlinitý, celulóza, polyamid a i. Počas vyvíjania putuje mobilná fáza vzostupne kapilárnymi silami medzi zrnami sorbentu a unáša delené látky pozdĺž deliacej vrstvy. V priebehu delenia sa neustále obnovuje rovnováha medzi pohyblivou a nepohyblivou fázou. Za rovnakých podmienok má určitá látka na chromatograme stále miesto (R_F). Retardačný faktor je pomer vzdialenosti unášanej látky od štartu ku vzdialenosti čela rozpúšťadla od štartu.

Plynová chromatografia

Pri plynovej chromatografii (GC) delené látky sú v plynnom skupenstve. Nosný plyn unáša plynnú zmes delených látok cez sorpčnú kolónu. Delenie látok prebieha v chromatografickej kolóne. Je to spravidla sklená rúrka rôznej dĺžky naplnená poréznym nosičom, na povrchu ktorého je zakotvená stacionárna fáza. Ako stacionárna fáza sa využívajú rôzne vysoko vrúce kvapaliny (napr. silikónové oleje) rôznej polarita a molekulovej hmotnosti. Od vlastností zakotvenej fázy závisí v rozhodujúcej miere kvalita separácie, pretože čím väčšou silou je

zložka analyzovanej zmesi v kolóne pútaná, tým neskôr ju opúšťa. V záujme zrýchlenia analýzy sa teplota kolóny počas delenia zvyšuje.

Po rozdelení vstupujú jednotlivé zložky spolu s nosným plynom do detektora. Detektor reaguje na zmeny fyzikálnochemických vlastností nosného plynu, ktoré sú zapríčinené prítomnosťou rozdelených látok. Signál detektora je úmerný množstvu látky v nosnom plyne. Jedným z najpoužívanějších detektorov je plameňový ionizačný detektor (FID), v ktorom je výsledný signál úmerný množstvu spálenej (ionizovanej) organickej látky. Po zosilení sa signál registruje ako chromatogram, ktorý možno použiť na kvalitatívne a kvantitatívne hodnotenie.

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia

HPLC (high performance liquid chromatography) je kolónová kvapalinová chromatografia, pri ktorej mobilnú fázu tvorí kvapalina a stacionárnu pevná látka. Systém HPLC pozostáva z pumpy, dávkovacieho ventilu, kolóny a detektora, ktoré sú navzájom prepojené v uvedenom poradí.

Pumpa zabezpečuje, s využitím vysokého tlaku, plynulý prietok mobilnej fázy cez celý systém, a to určitou voliteľnou rýchlosťou (ml/min.). Pri tzv. izokratickej elúcii systémom preteká vopred pripravená kvapalina určitého zloženia. Pri tzv. gradientovej elúcii sa zloženie mobilnej fázy v priebehu analýzy mení, keďže gradientová pumpa umožňuje podľa zvoleného programu zmiešavať dve i viac kvapalín s rôznou koncentráciou. Vzniká tak koncentračný gradient, ktorý zvyšuje účinnosť separácie a tým zlepšuje oddeľovanie zložiek aj v prípade komplikovanejších zmesí.

Dávkovací ventil umožňuje umiestniť do systému analyzovanú kvapalnú vzorku. Vzorka sa vstrekuje v nadbytku do dávkovacieho ventilu a určitá časť z nej (napr. 20 µl) sa zadrží v kovovej slučke. Posunutím páky dávkovacieho ventilu dôjde k prepojeniu medzi slučkou a tokom mobilnej fázy, čím sa vzorka v krátkom čase premiestni na začiatok kolóny.

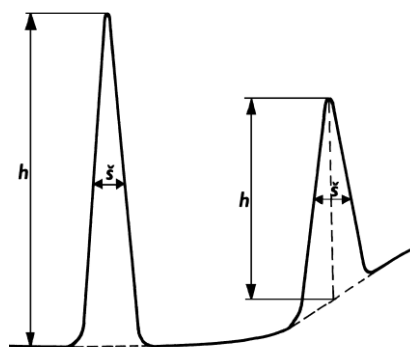
Kolóna pri HPLC je kovová prípadne sklenená trubica naplnená sorbentom. Stĺpec chromatografickej náplne má väčšinou priemer 2 až 18 mm, dĺžku 5 až 25 cm a častice náplne majú veľkosť od 5 do 50 µm. Keďže mobilná fáza preteká cez sorbent v kolóne, práve tu dochádza k samotnej chromatografickej separácii látok obsiahnutých v analyzovanej zmesi. Navzájom oddelené zložky zmesi unášané mobilnou fázou vystupujú z kolóny a prechádzajú do detektora.

Na detekciu sa najčastejšie používa spektrofotometrický detektor s voliteľnou vlnovou dĺžkou v ultrafialovej a viditeľnej oblasti, príp. fluorescenčný detektor, refraktometer, elektrochemický detektor a i. Detektor obsahuje priestor s malým objemom, cez ktorý preteká mobilná fáza spolu s molekulami látky po separácii v kolóne. V tomto priestore sa opakovane v krátkych časových intervaloch za sebou uskutočňuje meranie fyzikálnej veličiny prislúchajúcej typu detektora (napr. spektrofotometrický detektor meria absorpciu žiarenia s určitou vlnovou dĺžkou). Hodnoty fyzikálnej veličiny zodpovedajú koncentrácii látky a v podobe elektrických signálov ich zaznamenáva zapisovač. V súčasnosti funkciu zapisovača zabezpečuje integrátor zabudovaný v počítači, ktorý nielen zapisuje, ale aj vyhodnocuje údaje z detektora.

Vyhodnotenie chromatogramov

Záznam analýzy (chromatogram) pri HPLC znázorňuje časový priebeh zmien elektrického signálu z detektora (os x – čas, os y – el. napätie). Obsahuje chromatografické vlny, pričom každá vlna zodpovedá jednej látke zo separovanej zmesi. Pre identifikáciu určitej látky je dôležitá jej poloha v chromatograme – elučný čas, t.j. časový interval medzi začiatkom záznamu a vrcholom chromatografickej vlny. Pre kvantitatívne vyhodnotenie látky je potrebné poznať plochu (príp. výšku) chromatografickej vlny, keďže táto hodnota zodpovedá veľkosti elektrického signálu a tým aj množstvu látky vo vzorke.

Ak nemáme k dispozícii údaje z integrátora, môžeme využiť grafickú metódu hodnotenia plochy vln zakreslených zapisovačom (obr. 1).



Obr. 1. Vyhodnotenie chromatografických kriviek grafickou metódou: plocha vlny = výška vlny [h] x šírka vlny [š] v polovičnej výške

Na identifikáciu látky a stanovenie jej množstva v analyzovanej vzorke využijeme roztok štandardnej látky so známou koncentráciou. V samostatnej analýze, uskutočnenej za rovnakých podmienok ako pri analýze vzorky, vyhodnotíme elučný čas a plochu chromatografickej vlny štandardnej látky.

C.6 Spracovanie výsledkov

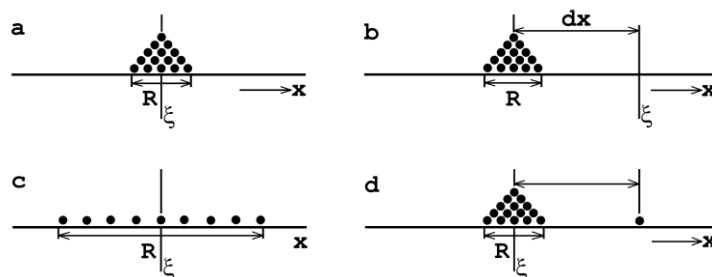
Merania realizované počas laboratórnych cvičení nie sú samoúčelné. Majú smerovať k získaniu čo najväčšieho množstva čo najobjektívnejších informácií o fyziologických javoch prebiehajúcich v rastlinnom tele. Všetky výsledky meraní, získané aj tou najdokonalejšou technikou a s najväčšou starostlivosťou, sú zaťažené nepresnosťami, t.j. chybami. Chyby, podľa ich povahy, môžeme rozdeliť na:

- systematické
- hrubé
- náhodné (štatistické)

Systematické chyby majú stály charakter, skresľujú výsledky meraní vždy určitým smerom a majú celkom určitú príčinu. Môžu spočívať buď v samotnej použitej metóde merania, v nepresnosti použitého prístroja, v nevyhovujúcej čistote použitých chemikálií, v spôsobe kalibrácie, buď v použití nevhodného štandardu pri kalibrácii a pod. Dajú sa odstrániť alebo aspoň obmedziť voľbou vhodnejších metód, štandardov, prístrojov a pod.

Hrubé chyby vznikajú najmä nedodržiavaním pracovných postupov alebo aj chybou pri výpočte. Výsledky s hrubými chybami je potrebné zo súboru vylúčiť.

Náhodnými (štatistickými) chybami, ktoré sú celkom nepravidelné a väčšinou malé, sú zaťažené všetky merania. Spôsobujú, že paralelné merania sa od seba čiastočne líšia a riadia sa určitým pravdepodobným, štatistickým rozdelením tvoriacim pravdepodobnostný systém.



Obr. 2. Grafické znázornenie chýb merania (vysvetlenie v texte).

Uvedené druhy chýb ovplyvňujú presnosť meraní, t. j. opakovateľnosť po sebe nasledujúcich (paralelných) meraní, ich správnosť, teda zhodnosť so skutočnou hodnotou meranej veličiny ξ , resp. odľahlosť jednotlivého výsledku zo série opakovaných meraní. Výsledky presné a správne, t.j. spoľahlivé sa dobre zhodujú so skutočnou hodnotou veličiny ξ a rozpätie hodnôt R je malé (obr. 2a). Výsledky presné, ale nesprávne (zaťažené systematickou chybou) sú také, ktoré sú síce presné (R je malé), ale pozorované hodnoty sa líšia od skutočnej hodnoty ξ (obr. 2b). Výsledky nepresných meraní znázorňuje obr. 2c, z ktorého vidieť, že rozpätie R je príliš veľké. Odľahlý výsledok, ktorý treba zo súboru meraní vylúčiť je znázornený na obr. 2d. Väčšina nameraných hodnôt je v rozpätí R menšom ako je vzdialenosť odľahlého výsledku merania od ξ .

Presnú hodnotu ξ však obyčajne nepoznáme. Určujeme ju pomocou štandardov (referenčných materiálov). Táto hodnota by mala byť zbavená systematickej chyby. Tiež je však zaťažená štatistickými chybami. Praktické zisťovanie rozloženia chýb je pomerne náročné, preto sa uspokojujeme s ich vyjadrením približnými hodnotami (odhadom), to znamená z podstatne menšieho množstva opakovaných meraní. Najjednoduchším odhadom býva aritmetický priemer nameraných hodnôt, ktorý vypočítame tak, že súčet hodnôt všetkých opakovaných meraní delíme počtom meraní:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}$$

Z aritmetického priemeru je potom možné vypočítať smerodajnú odchýlku podľa vzťahu:

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Takto vypočítaná štatistická charakteristika sa nazýva odhadom absolútnej hodnoty smerodajnej odchýlky jednotlivého merania. Absolútne chyby nedávajú vždy dostatočný obraz presnosti meraní. Preto používame ich relatívne hodnoty. Zo smerodajnej odchýlky s_x (tiež SD) môžeme vypočítať obojstranný interval spoľahlivosti $L_{1,2}$, pričom indexy 1,2 znamenajú jeho hornú a dolnú hranicu pre príslušnú, ľubovoľne zvolenú hladinu významnosti, a to podľa vzťahu:

$$L_{1,2} = \bar{x} \pm t_{1-\alpha/2} \cdot (n-1) \cdot \frac{s_x}{\sqrt{n}}$$

kde štatistický koeficient $t_{1-\alpha/2}$ je tabuľková hodnota Studentovho rozdelenia, $n-1$ je príslušný počet stupňov voľnosti (tab. 1). Interval spoľahlivosti L predstavuje také rozpätie R , v ktorom ležia výsledky merania aritmetického priemeru \bar{x} s pravdepodobnosťou $(1-\alpha)$.

Grafické znázornenie výsledkov meraní je menej presné než numerické, ale oveľa názornejšie. Preto pri viacerých pokusoch je vhodné uviesť výsledky aj graficky. Najčastejšie sa využíva dvojsúradnicové zobrazenie. Na os x (abscisa) sa nanáša nezávisle premenná a na os y (ordináta) veličina závisle premenná. Mierku volíme tak, aby priamka alebo krivka bola približne pod 45° uhlom.

Tab. 1. Kvantily Studentovho rozdelenia pre $1-\alpha/2 = 0,975$

n-1	0,975	n-1	0,975	n-1	0,975
1	12,706	13	2,160	25	2,060
2	4,303	14	2,145	26	2,056
3	3,182	15	2,131	27	2,052
4	2,776	16	2,120	28	2,048
5	2,571	17	2,110	29	2,045
6	2,447	18	2,101	30	2,042
7	2,365	19	2,093		
8	2,306	20	2,086	40	2,021
9	2,262	21	2,080		
10	2,228	22	2,074	60	2,00
11	2,201	23	2,069	120	1,980
12	2,179	24	2,064	∞	1,960

D. Návod k pokusom

1. Analýza rastlín

1.1 Stanovenie obsahu vody a sušiny v rastlinnom materiáli

Princíp: Obsah vody v rastline a v jej orgánoch kolíše v širokom rozmedzí. Zvyšok tela rastlín po odparení vody tvorí sušinu. Spôsob sušenia závisí od materiálu a účelu. Rastliny obsahujú prchavé látky a tiež látky, ktoré sa pri vyšších teplotách rozkladajú. Vysušené rastliny sú hygroskopické a obsah vody závisí od podmienok uskladnenia. Výsledky rôznych analýz rastlín vzťahujeme najčastejšie na sušinu stanovenú vysušením do konštantnej hmotnosti pri 105 °C.

Pomôcky: analytické váhy a predvážky, sušiareň, exsikátor, hliníkové odvažovačky, kliešte.

Materiál: čerstvé alebo suché rastliny.

Postup: štyri odvažovačky s vrchnákmi vysušíme pri 105 °C a po vychladení v exsikátore (asi 10 minút) ich presne zvážime. Potom do každej odvažovačky vložíme asi 1 g rastlinného materiálu, zatvoríme vrchnákom a zvážime. Odvažovačky vložíme do nahriatej sušiarne, vrchnáky odkryjeme. V prípade ak rastlinný materiál má vysoký obsah vlhkosti predsušíme ho pri 80 °C, potom zvýšime teplotu na 105 °C. Odvažovačku pomocou klieští prikryjeme a vložíme do exsikátora. Po odvážení sušíme znova asi 20 minút a zopakujeme váženie. Ak sa hmotnosť nezmenila ($\pm 0,1$ mg) dosiahli sme konštantnú hmotnosť. V opačnom prípade pokračujeme v sušení ďalej.

Vyhodnotenie: Vypočítame percento sušiny.

1.2 Sacharidy

1.2.1 Dôkazové reakcie sacharidov

Sacharidy v zelených rastlinách sú produktmi fotosyntézy a tvoria základ energetického metabolizmu. Predstavujú tiež hlavný stavebný materiál rastlinných buniek a pletív. Mono- a oligosacharidy sa obvykle akumulujú v rastlinných plodoch.

1.2.1.1 Príprava extraktu voľných sacharidov

Pomôcky: roztieracia, sklená tyčinka, lievik, kadičky, váhy

Materiál: rastlinné plody (jablká, hrušky).

Postup: Navážime asi 5 g rastlinných plodov a dokonale rozotrieme, potom sacharidy vylúhujeme asi 30 ml teplej vody. Výluh homogenátu filtrujeme a filtrát použijeme na dôkazové reakcie.

1.2.1.2 Dôkaz redukujúcich sacharidov v extrakte (Fehlingova skúška)

Princíp: Voľná poloacetálová hydroxylová funkčná skupina sacharidov sa vyznačuje redukčnými vlastnosťami.

Pomôcky: skúmavky, držiak na skúmavky, vodný kúpeľ.

Materiál: výluh sacharidov (podľa úlohy 1.2.1.1), roztok Fehling I (40 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v 1000 ml vody), Fehling II (200 g vínanu sodnodraselného a 150 g NaOH v 1000 ml vody), 10% roztok sacharózy.

Postup: Fehlingov roztok pripravíme krátko pred reakciou zmiešaním rovnakých objemov roztokov Fehling I a II. K 2 ml výluhu sacharidov a k 2 ml roztoku sacharózy v ďalšej skúmavke pridáme rovnaké množstvá Fehlingovho roztoku. Roztoky v skúmavkách zahrejeme vo vodnom kúpeli do varu. Za prítomnosti redukujúcich látok sa Cu^{2+} redukuje a vyzráža ako Cu_2O (červenohnedá zrazenina).

1.2.1.3 Tymolová skúška

Materiál: výluh sacharidov, 3% etanolový roztok tymolu, konc. HCl, kryštalický NaCl.

Princíp: Sacharidy sa v prostredí silných minerálnych kyselín menia na fural a jeho deriváty, ktoré reagujú s tymolom, pričom pozorujeme karmínové zafarbenie.

Postup: K 0,5 ml výluhu v skúmavke pridáme niekoľko kvapiek roztoku tymolu, 5 ml koncentrovanej HCl a niekoľko kryštálov NaCl. Obsah skúmavky zahrejeme.

1.2.1.4 Molischova reakcia

Materiál: výluh sacharidov, 10% etanolový roztok α -naftolu, konc. H_2SO_4 .

Princíp: Sacharidy v prostredí kyseliny sírovej reagujú s α -naftolom a dávajú intenzívne fialové zafarbenie. Po zriedení sa vylúči fialová zrazenina.

Postup: K 1 ml výluhu pridáme 2 kvapky roztoku α -naftolu, podvrstvíme 2 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Pozorujeme fialový prstenec, po premiešaní fialové zafarbenie celého roztoku.

1.2.1.5 Selivanova reakcia

Materiál: výluh sacharidov, 1% roztok glukózy, 1% roztok fruktózy, HCl (1:3), rezorcín.

Princíp: V prostredí kyseliny chlorovodíkovej sa ketózy menia na 5-hydroxymetylfural, ktorý reaguje s rezorcínom a dáva červené zafarbenie. Aldózy s rezorcínom nereagujú.

Postup: K 2 ml roztokov cukrov v skúmavkách pridáme 2 ml HCl (1:3), niekoľko kryštálov rezorcínu a zahrejeme.

1.2.1.6 Rozlíšenie pentóz od hexóz

Materiál: výluh sacharidov, 10% roztoky arabinózy, xylózy, glukózy, fruktózy, sacharózy, zriedená HCl (1:3), floroglucín.

Princíp: Pôsobením HCl z pentóz vzniká fural, ktorý s floroglucínom dáva višňovo červené zafarbenie. Hexózy sa menia na deriváty furalu, ktoré v tejto reakcii dávajú žlté zafarbenie.

Postup: K roztokom cukrov (asi po 1 ml) v skúmavkách pridáme rovnaký objem HCl (1:3) a niekoľko kryštálov floroglucínu a zahrejeme.

1.2.1.7 Bialova reakcia na dôkaz pentóz

Pomôcky: skúmavky.

Materiál: výluh sacharidov, 10% roztoky arabinózy, xylózy, glukózy, fruktózy, sacharózy, Bialov roztok (1,5 g orcinolu rozpustíme v 500 ml konc. HCl, pridáme 20 až 30 kvapiek 10% FeCl_3).

Princíp: Fural, ktorý vzniká z pentóz v silne kyslom prostredí, dáva s aromatickými farebnými derivátmi širokým absorpčným pásom okolo 670 nm a úzkym okolo 610 nm. Hexózy takéto absorpčné spektrum nedávajú.

Postup: Do skúmaviek napipetujeme po 0,5 ml roztokov sacharidov. Pridáme 0,5 ml Bialovho roztoku a krátko zahrejeme na vriacom vodnom kúpeli. Vznikne tmavozelené zafarbenie dokazujúce prítomnosť pentózy.

Vyhodnotenie: Do protokolu zapíšeme výsledky jednotlivých reakcií a urobíme čiastkové závery o prítomnosti alebo vlastnostiach látok v analyzovaných vzorkách. Zhrnieme výsledky reakcií pre výluh a urobíme záver o tom, ktorý cukor je dominantný v jablkách.

1.2.2 Kvantitatívne stanovenie rozpustných cukrov podľa Bertranda

Princíp: Redukujúce sacharidy z Fehlingovho roztoku vyredukujú Cu_2O . Jeho množstvo stanovíme po rozpustení titráciou 0,02 M KMnO_4 . Po hydrolýze oligosacharidov pomocou HCl stanovíme celkový obsah rozpustných sacharidov. Obsah neredukujúcich sacharidov je daný rozdielom množstva rozpustných a redukujúcich cukrov vynásobený koeficientom 0,95, čím korigujeme získanú hodnotu o molekulu vody.

Pomôcky: roztieračka, 100 ml odmerná banka, 250 ml titračné banky, centrifugačné skúmavky, kadička, pipety, centrifúga, byreta.

Materiál: rastlinné plody, 10% octan olovnatý, Fehlingov roztok I a II, roztok síranu železitoamónneho (50 g síranu železitoamónneho a 108 ml konc. H_2SO_4 v 1000 ml vody), 0,02 M KMnO_4 (faktorizovaný), 0,05 M H_2SO_4 , konc. HCl , K_2CO_3 .

Postup: 20 g rastlinných plodov rozotrieme v roztieračke, pridáme 0,5 ml octanu olovnatého na vyzrážanie bielkovín a kvantitatívne premyjeme horúcou vodou do 100 ml odmernej banky. Doplníme destilovanou vodou po značku a dôkladne premiešame. Roztok prefiltrujeme cez suchý filtračný papier do suchej kadičky. Z filtrátu pipetujeme do 6 centrifugačných skúmaviek po 2 ml. Tri použijeme na stanovenie redukujúcich sacharidov a tri na stanovenie množstva rozpustných cukrov po hydrolýze. Do skúmaviek, v ktorých sú vzorky na hydrolýzu oligosacharidov, pridáme po 0,5 ml konc. HCl a varíme na vodnom kúpeli 15 minút. Po ochladení skúmaviek zneutralizujeme ich obsah K_2CO_3 , ktorý pridávame po malých množstvách, kým neprestane uvoľňovanie bubliniek CO_2 . Ďalší postup je spoločný aj pre nehydrolyzované vzorky. Do skúmaviek pridáme po 5 ml Fehlingovho roztoku (pripravíme zmiešaním rovnakých dielov roztokov Fehling I a II), premiešame a skúmavky ponoríme na 20 minút do vriaceho vodného kúpeľa. Skúmavky ochladíme, vyvážíme a centrifugujeme 5 minút pri 2000 otáčkach za minútu. Kvapalinu nad zrazeninou Cu_2O opatrne zlejeme, do skúmaviek pridáme po 4 ml horúcej vody, zrazeninu zviráme a centrifugujeme. Vodu zlejeme a zrazeninu rovnako premyjeme ešte raz. Po druhom premytí a centrifugácii zlejeme supernatant a sediment v skúmavke rozpustíme v 10 ml roztoku síranu

železitoamónneho a kvantitatívne prenesieme do 250 ml titračnej banky. Centrifugačnú skúmavku tri razy vypláchneme 5 ml 0,05 M H_2SO_4 a kyselinu vlietame do tej istej titračnej banky. Obsah banky titrujeme 0,02 M KMnO_4 do slabo ružového zafarbenia, ktoré musí byť stále aspoň jednu minútu.

Vyhodnotenie: Zo spotreby 0,02 M KMnO_4 vypočítame celkové množstvo sacharidov v 2 ml extraktu podľa vzťahu:

$$\text{mg invertných sacharidov} = \text{ml } 0,02 \text{ M } \text{KMnO}_4 \cdot f \cdot 3,3042$$

Výsledok uvedieme ako percento redukujúcich a neredukujúcich sacharidov v čerstvej hmotnosti hodnoteného rastlinného materiálu.

1.2.3 Stanovenie redukujúcich sacharidov podľa Somogyiho a Nelsona

Princíp: Voľná poloacetálová hydroxylová skupina sacharidov sa vyznačuje redukčnými vlastnosťami. Pri zahrievaní týchto tzv. redukujúcich sacharidov s meďnatým komplexom obsiahnutým v Somogyiho roztoku sa vylučuje oxid meďný. Jednomocnou meďou oxidu meďného sa redukuje arzénomolybdénová kyselina (Nelsonov roztok) za vzniku modrého zafarbenia. Na základe jeho intenzity sa množstvo redukujúcich sacharidov stanoví spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 710 nm.

Pomôcky: vodný kúpeľ, varná banka, spätný chladič, roztieračka s tlčíkom, 50 ml odmerná banka, centrifugačná skúmavka, kalibrované skúmavky, pipety, analytické váhy, centrifúga, spektrofotometer.

Materiál: sušené hrozienka alebo čerstvé jablko, glukóza p.a., Somogyiho roztok I (12 g Na_2CO_3 , 8 g NaHCO_3 , 6 g vínanu sodnodraselného, 72 g Na_2SO_4 na 400 ml vody), Somogyiho roztok II (8 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 72 g Na_2SO_4 do 400 ml vody), roztoky I a II sa zmiešajú pred použitím v pomere 4:1, Nelsonov roztok [25 g $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ rozpustíme v 450 ml vody, pridáme 21 ml konc. H_2SO_4 , potom pridáme roztok 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v 25 ml vody. Roztok necháme dozrieť 48 hodín pri 37 °C a uchováваме v tmavej fľaši.]

Postup: Vodný extrakt sacharidov pripravíme z približne 50 mg hrozienuk alebo 500 mg jablka (presnú hmotnosť zaznamenáme). Materiál zahrievame vo varnej banke s 5 ml destilovanej vody vo vriacom vodnom kúpeli pod spätným chladičom 20 minút. Potom ho zhomogenizujeme v roztieračke a spolu s obsahom varnej banky kvantitatívne prenesieme do centrifugačnej skúmavky. Necháme stáť aspoň 30 minút, potom centrifugujeme 15 minút pri

3000 otáčkach za minútu. Supernatant preniesieme do 50 ml odmernej banky. Sediment znovu premyjeme dvakrát s 5 ml teplej vody, centrifugujeme, supernatanty spojíme a objem extraktu v odmernej banke doplníme na 50 ml. Na farebnú reakciu pipetujeme do kalibrovaných skúmaviek po 0,1 ml (príp. 0,05 ml) extraktu v troch opakovaniach. Pridáme 2 ml Somogyiho roztoku, premiešame a 20 minút zahrievame vo vriacom vodnom kúpeli. Po ochladení pridáme 1 ml Nelsonovho roztoku, doplníme destilovanou vodou na celkový objem 10 ml a premiešame. Necháme stáť aspoň 30 minút a opakovane pretrepávame kvôli odstráneniu vznikajúcich bubliniek. Spektrofotometricky zistíme absorbanciu pri vlnovej dĺžke 710 nm. Meriame oproti slepému roztoku, ktorý pripravíme rovnakým spôsobom, ale bez extraktu sacharidov, t.j. počnúc napipetovaním 2 ml Somogyiho roztoku. Obsah sacharidov vyhodnotíme s využitím kalibračnej krivky pre glukózu. Krivku zhotovíme z hodnôt absorbancie roztokov glukózy (30, 60, 90, 120 a 150 μg na skúmavku) zistených po reakcii so Somogyiho a Nelsonovým roztokom.

Vyhodnotenie: Po zohľadnení návazku rastlinného materiálu a použitého riedenia extraktu a glukózy vypočítame obsah redukujúcich sacharidov a vyjadríme ho v % z hmotnosti suchého resp. čerstvého rastlinného materiálu.

1.2.4 Hydrolýza celulózy

Princíp: Molekula štruktúrneho polysacharidu celulózy pozostáva z molekúl glukózy viazaných β -D-glukozidovou väzbou. Kyslou hydrolýzou sa táto väzba štiepi, pričom vzniká glukóza.

Pomôcky: kadička, sklená tyčinka, skúmavky, vodný kúpeľ, univerzálny indikátorový papier.

Materiál: vata, konc. H_2SO_4 , NaOH (pevný).

Postup: Do kadičky nalejeme 5 ml koncentrovanej H_2SO_4 a za stáleho miešania a chladenia pridávame postupne asi 0,5 g vaty. Roztok nesmie zhnednúť (karamelizovať). Po rozpustení celulózy roztok za stáleho miešania vlejeme do 20 ml vody. Časť zriedeného roztoku celulózy nalejeme do skúmavky a 10 až 15 minút hydrolyzujeme na vodnom kúpeli. Po ochladení asi 2 ml hydrolyzátu opatrne zneutralizujeme pevným NaOH. V hydrolyzáte urobíme Fehlingovu a Selivanovu skúšku (podľa úlohy 1.2.1.2 a 1.2.1.5).

Vyhodnotenie: Na základe výsledkov skúšok hydrolyzátu urobíme záver o zložení celulózy a jej vlastnostiach.

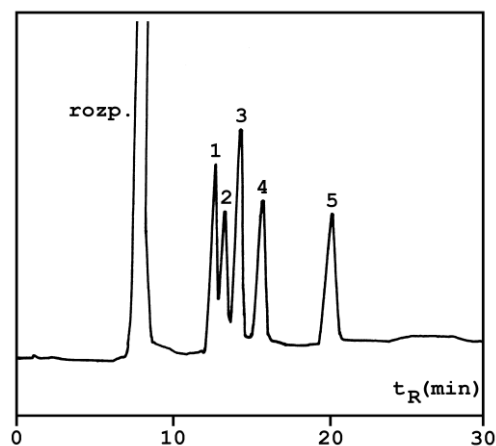
1.2.5 Stanovenie sacharidov v rastlinných plodoch metódou HPLC

Princíp: V rastlinných plodoch sa akumulujú mono- a oligosacharidy. Pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie rozdelíme sacharidy na jednotlivé látky, ktoré pomocou refraktometrického detektora identifikujeme ako samostatné píky. Veľkosť píku je priamo úmerná koncentrácii sledovanej látky.

Pomôcky: 100 ml varná banka, 50 ml odmerná banka, chladič, vodný kúpeľ, kvapalinový chromatograf (izokratická pumpa, slučkový dávkovač, refraktometrický detektor, kolóna 150x3,3 mm Separon SIX NH₂).

Materiál: rastlinné plody (hrozienka, hruška), 75% etanol, odvzdušnená mobilná fáza acetonitril:voda (49:1).

Postup: Navážime 500 mg narezaných rastlinných plodov a extrahujeme v 100 ml varnej banke 15 ml 75% etanolu (trikrát) po 20 minút na vodnom kúpeli pod spätným chladičom. Extrakty zlievame do 50 ml odmernej banky a po ochladení doplníme na presný objem. Súčasne pripravíme kvapalinový chromatograf na analýzy. Zapneme refraktometer, ktorý necháme stabilizovať asi 30 minút. Potom zapneme pumpu a po ustálení prietoku (0,2



Obr. 3. Chromatogram sacharidov po rozdelení HPLC.

1 – xylóza; 2 – arabinóza; 3 – fruktóza; 4 – glukóza; 5 – sacharóza

ml.min.⁻¹) zapneme zapisovač. Podľa návodu priloženého k prístroju nastavíme nulovú hodnotu refraktometra. Ak je základná línia na zapisovači stála, pomocou slučkového dávkovača nadávkuje analyzovanú vzorku (20 µl). Jednotlivé sacharidy identifikujeme na základe retenčných časov štandardných látok (obr. 3).

Vyhodnotenie: V analyzovaných vzorkách vyhodnotíme grafickou metódou obsah jednotlivých sacharidov a výsledky vyjadríme ako g glukózy a fruktózy v 100 g suchých rastlinných plodov

1.3 Bielkoviny a enzýmy

1.3.1 Stanovenie aminokyselín ninhydrínovou metódou

Princíp: Voľné aminokyseliny sú dôležitým substrátom pre syntézu bielkovín, ako aj pre iné metabolické procesy. Extrahujeme ich z homogenizovaného rastlinného materiálu 80% metanolom. Ich celkový obsah stanovíme kolorimetricky po farebnej reakcii s ninhydrínovým roztokom.

Pomôcky: kadičky, pipety, centrifugačné skúmavky, centrifúga, odmerné skúmavky, filtračný papier, trecia miska, váhy, vodný kúpeľ, spektrálny kolorimeter

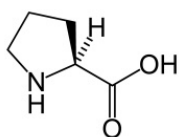
Materiál: listy muškátu, alebo korene kukurice, 80% metanol, 0,8 M citrátový tlmivý roztok (s NaOH) pH 4,8, ninhydrínový roztok (0,575 g ninhydrínu rozpustíme v 50 ml čistého etanolu, 0,2 g kyseliny askorbovej rozpustíme v 20 ml vody, potom oba roztoky zmiešame, roztok musí byť čerstvý).

Postup: Rastlinný materiál (0,2 g) zhomogenizujeme v trecej miske s 5 ml 80% metanolu a kvantitatívne prenesieme do centrifugačnej skúmavky. Roztok centrifugujeme 10 min. pri 6000 otáčkach za minútu, aby sme sa zbavili zvyškov koreňov. Do čistej skúmavky napipetujeme 1 ml extraktu (v prípade listov muškátu najprv zriedime extrakt v pomere 1:4), pridáme 0,5 ml citrátového tlmivého roztoku a 2 ml ninhydrínového roztoku a zamiešame. Roztok inkubujeme 20 minút vo vodnom kúpeli pri 70 °C. Po ochladení doplníme vzorky na 10 ml s 60 % etanolom. Absorbanciu meriame na spektrálnom kolorimetri pri vlnovej dĺžke 570 nm. Na kalibráciu môžeme použiť 1 mM glycín. Na zostrojenie kalibračného grafu pridávame 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 ml glycínu a roztoky doplníme vodou na 1 ml. Ďalší postup je rovnaký ako pri vzorkách. Zo získanej absorbancie si nakreslíme kalibračnú krivku.

Vyhodnotenie: Pomocou kalibračnej krivky si vypočítame množstvo aminokyselín vo vzorkách. Výsledok vyjadríme v μmol voľných aminokyselín na gram čerstvej hmotnosti.

1.3.2 Stanovenie prolínu v rastlinách podľa Batesa

Princíp: Prolín (Pro) je z chemického hľadiska unikátna aminokyselina, pretože jeho molekula obsahuje cyklický pyrrolidínový postranný reťazec. Prolín je pomerne rozšírenou aminokyselinou v organizmoch. K akumulácii voľného prolínu v bunkách rastlín dochádza v prípade abiotického i biotického stresu. Prítomnosť ťažkých kovov v bunkách rastlín je tiež dôvodom jeho zvýšenej akumulácie. Prolín je pravdepodobne osmotikom a regulačným signálom súčasne. Zabezpečuje ochranu enzýmov, biologických membrán a polyribosómov. Prolín sa zúčastňuje detoxifikácie ťažkých kovov tak, že s nimi vytvára komplexy. Vďaka tomu sa v živých rastlinných bunkách udržiava pomer $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ počas trvania stresu na úrovniach porovnateľných pre metabolizmus bunky nevystavenej účinku stresu. Detekcia prolínu je založená na reakcii ninhydrínu s aminokyselinami. Napriek interferencii ostatných aminokyselín s ninhydrínom je táto metodika pomerne špecifická, pretože vplyvom stresu sa obsah voľného prolínu zvyšuje podstatne viac ako je tomu pri iných voľných aminokyselinách. Detekčný limit metodiky je v rozsahu 0,1 až 36 μmol voľného prolínu.



prolín

Pomôcky: plastové skúmavky (50 ml a 15 ml), pipety, trecie misky s tľičkami, centrifúga, spektrofotometer

Materiál: stielky diskovky bublinatej (*Hypogymnia physodes* L. Nyl.), ľadová kyselina octová, kyslý ninhydrín (pripravíme rozpustením 1,25 g ninhydrínu v 30 ml ľadovej kyseliny octovej a 20 ml 6 M kyseliny fosforečnej za zvýšenej teploty, roztok je stabilný pri teplote 4°C približne 24 hodín), 3% kyselina sulfosalicylová, toluén, štandard prolínu, inertný morský piesok

Postup: Stielky diskovky bublinatej (približne 100 mg suchej hmotnosti) ponoríme na 24 hodín do 50 ml roztoku 5 mM HEPES tlmivého roztoku v plastových skúmavkách (kontrola) a do 50 ml roztokov 100 a 500 μM Cu pripravených v 5 mM HEPES. Meď dodávame ako CuSO_4 . Rastliny umiestnime do kultivačnej miestnosti.

Stielky lišajníka (0,25 – 0,5 g čerstvej hmotnosti) mierne osušíme na filtračnom papieri a homogenizujeme inertným morským pieskom v tretej miske s prídavkom 5 ml 3 % kyseliny sulfosalicylovej (vyzrážanie proteínov). Homogenát prenesieme do centrifugačnej skúmavky

a centrifugujeme 20 minút (3000 rpm). Supernatant (2 ml) zmiešame s 2 ml ľadovej kyseliny octovej a 2 ml kyslého ninhydrínu (zásobný roztok). Zmes premiešame a zahrievame 1 hodinu pri teplote 90 až 100 °C. Reakciu, ktorú sprevádza tvorba farebného komplexu zastavíme ponorením skúmaviek so vzorkami do ľadového kúpeľa. Po ochladení vzoriek pridáme do každej skúmavky 4 ml toluénu. Použitím vortexu (20 až 30 sekúnd) prechádza farebný komplex do toluénu. Obsah prolínu stanovujeme spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 520 nm, oproti toluénu. Prolín používame ako štandard na vytvorenie kalibračnej krivky.

Vyhodnotenie: Obsah prolínu vo vzorkách prepočítame na jednotky suchej hmotnosti stielok. Výsledky uvedieme v tabuľke. Porovnáme vplyv zvýšenej koncentrácie medi na obsah prolínu v stielkach lišajníka.

1.3.3 Kvalitatívne reakcie zásobných bielkovín

Princíp: V zásobných orgánoch rastlín sú uložené bielkoviny so špecifickými vlastnosťami. Najčastejšie ich charakterizujeme rozpustnosťou. Napríklad lepok pšenice je vo vode nerozpustný a sú v ňom zastúpené prolamíny rozpustné v 70% alkohole a glutelíny rozpustné v zriedených roztokoch hydroxidov.

1.3.3.1 Príprava bielkovinového extraktu

Pomôcky: kadičky, sklené tyčinky, filtračný lievik, roztieračka.

Materiál: rozomleté semená hrachu siateho (*Pisum sativum* L.), pšeničná múka, 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 70% etanol, 0,2% NaOH.

Postup: 5 g rozomletých semien hrachu extrahujeme v kadičke v 50 ml 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a necháme usadiť. Pred použitím prefiltrujeme. Z pšeničnej múky pripravíme husté cesto. Miesením cesta v gáze medzi prstami pod tečúcou studenou vodou odstránime vymývateľné zložky a získame lepok. Polovicu lepku rozpustíme v 50 ml 70% etanolu, druhú polovicu v 50 ml 0,2% NaOH. V nasledujúcich úlohách, pri jednotlivých dôkazoch, použijeme každý z troch extraktov.

1.3.3.2 Zrážanie bielkovín

Princíp: Natívne vlastnosti bielkovín sa ireverzibilne menia denaturáciou. Možno ju vyvolať zahrievaním, pridaním katiónov ťažkých kovov, prípadne ďalších látok a pod.

Pomôcky: skúmavky, vodný kúpeľ.

Materiál: extrakty bielkovín (podľa úlohy 1.3.3.1), konc. CH_3COOH , NaCl kryšt., metanol, 10% $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$, 10% $\text{K}_4\text{Fe}[\text{CN}]_6$.

Postup: Do troch skúmaviek dáme asi po 2 ml z prvého extraktu, do ďalších troch z druhého a do posledných troch z tretieho extraktu. V deviatich skúmavkách urobíme nasledujúce reakcie:

- do prvých troch skúmaviek s rôznymi extraktmi pridáme po kvapke kyseliny octovej a zahrejeme. K vyzrážaným bielkovinám pridáme niekoľko kryštálov NaCl a 5 ml metanolu. Bielkovina sa vyvločkuje.
- do ďalších troch pridáme dvojnásobný objem 10% $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$. Bielkoviny vytvoria nerozpustnú zrazeninu.
- do posledných troch pridáme 10% $\text{K}_4\text{Fe}[\text{CN}]_6$ a niekoľko kvapiek kyseliny octovej. Bielkoviny sa vyzrážajú.

1.3.3.3 Farebné reakcie bielkovín

Princíp: Funkčné skupiny a iné zložky bielkovín ($-\text{NH}_2$, fenolová skupina, indolové jadro, tiolová skupina a i.) reagujú s organickými farbivami a iónmi za vzniku charakteristického zafarbenia.

Pomôcky: skúmavky, vodný kúpeľ.

Materiál: extrakty bielkovín (podľa úlohy 1.3.3.1), Millonov roztok (40 g kovovej ortuti sa rozpustí v 57 ml koncentrovanej HNO_3 najprv za studena, potom zahrievaním na vodnom kúpeli. Roztok zriedime vodou 1:2), koncentrovaná HNO_3 , 20% NaOH , 1% CuSO_4 , vodný roztok amoniaku, 5% $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$, 50% NaOH , 0,1% etanolový roztok ninhydrínu, konc. H_2SO_4 , konc. CH_3COOH , 30% CH_3COOH

Postup: Všetky používané skúmavky umyjeme a opláchneme destilovanou vodou.

a) Millonova reakcia

Do skúmavky nalejeme asi 1 ml Millonovho roztoku a podvrstvíme rovnakým objemom extraktu. Vznikne červenastý prstenec na rozhraní roztokov, po zahriatí celý roztok sčervenie. Pozitívna reakcia dokazuje prítomnosť tyrozínu v molekule bielkoviny.

b) Biuretova reakcia

K 1 ml extraktu pridáme 1 ml 20% NaOH a 1 až 2 kvapky 1% CuSO₄. Vznikne fialové zafarbenie, ktoré je dôkazom prítomnosti peptidovej väzby v bielkovinách. Reakcia je založená na tvorbe tetraamóniovej soli s komplexne viazanou meďou.

c) Xantoproteínová reakcia

Do skúmavky nalejeme asi 1 ml extraktu bielkovín, pridáme 5 až 6 kvapiek koncentrovanej HNO₃ a opatrne zahrejeme. Po ochladení pridávame vodný roztok amoniaku do vzniku žltkastého zafarbenia. Aromatické aminokyseliny (tyrozín, tryptofán, fenylalanín) tvoria žltlo sfarbené nitroderiváty, ktoré po zalkalizovaní roztoku menia zafarbenie.

d) Ninhydrínová reakcia

K 1 ml etanolového roztoku ninhydrínu pridáme 2 ml extraktu bielkovín a povaríme. Roztok lepku v 0,2% NaOH pred povarením zneutralizujeme pridaním kvapky 30% kyseliny octovej. Ninhydrín reaguje s voľnými aminoskupinami za vzniku intenzívneho modrého zafarbenia.

e) Adamkiewiczova reakcia

K 3 ml extraktu bielkovín pridáme 1 ml koncentrovanej CH₃COOH a dobre zamiešame. Po stene skúmavky opatrne nalejeme 1 ml koncentrovanej H₂SO₄. Červenofialový prstenec na rozhraní roztokov dokazuje prítomnosť tryptofánu v analyzovanej bielkovine.

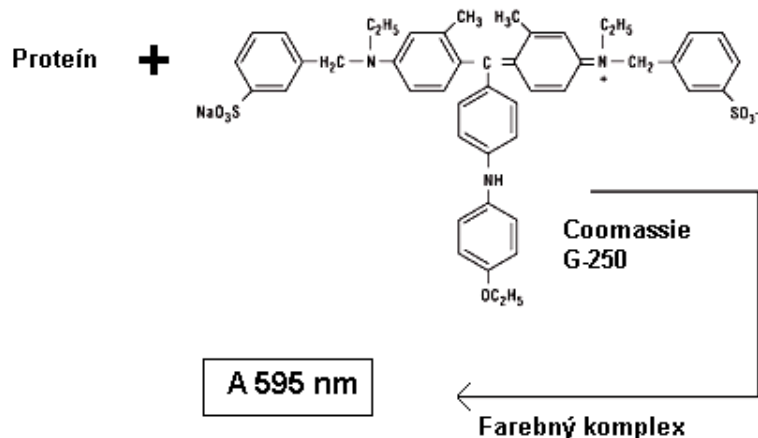
f) Reakcia na síru v bielkovinách

K 3 ml bielkovinového extraktu pridáme niekoľko kvapiek 5% (CH₃COO)₂Pb. Zrazeninu rozpustíme pridávaním 50% NaOH. Po opatrnom zahriatí sa vytvorí hnedé až čierne zafarbenie, prípadne zrazenina PbS.

Vyhodnotenie: Do protokolu uvedieme výsledky jednotlivých reakcií s extraktmi bielkovín. Urobíme záver o prítomnosti zásobných bielkovín v sledovaných vzorkách. Vysvetlíme význam peptidovej väzby a dôvod prítomnosti síry v bielkovinách.

1.3.4 Stanovenie rozpustných proteínov podľa Bradfordovej

Princíp: Farbivo Coomassie blue (pomenované podľa mesta Kumasi v africkej Ghane) bolo pôvodne vyvinuté na farbenie vlny. Dr. Marion Bradfordová (1976) zistila, že proteíny v kyslom prostredí reagujú s týmto farbivom, pričom sa mení pôvodné červenkasto-hnedé sfarbenie (maximum absorbancie pri 465 nm) na modré (maximum absorbancie pri 610 nm) v závislosti od množstva proteínov v prostredí. Rozdiely medzi oboma formami farbiva sú najlepšie viditeľné pri vlnovej dĺžke 595 nm. Použitie tejto metodiky umožňuje stanovenie proteínov v intervale koncentrácií od 100 do 1500 µg/ml. Farebná reakcia je pomerne rýchla a komplexy proteínov s farbivom sú stabilné v čase od 5 do 60 minút, čo umožňuje stanovenie koncentrácie proteínov aj v pomerne veľkej sérii vzoriek (obr. 4). Voľné aminokyseliny, peptidy a proteíny s nízkou molekulovou hmotnosťou s farbivom nereagujú, minimálna relatívna molekulová hmotnosť proteínov stanovovaných použitím tejto metodiky je 3 kDa a viac. Touto metódou je možné stanoviť obsah rozpustných proteínov v nižších aj vyšších rastlinách a je možné porovnávať aj obsah rozpustných proteínov v jednotlivých orgánoch vyšších rastlín (napr. koreň, resp. nadzemná časť rastliny).



Obr. 4. Reakcia proteínu s Bradfordovej roztokom.

Pomôcky: mikroskúmavky (eppendorfký) 2 ml, trecie misky s tĺčkami, pipety, plastové skúmavky (50 ml), chladená centrifúga, spektrofotometer

Materiál: živé rastliny (kontrolné, ako aj rastliny vystavené vybranému typu abiotického stresu, napr. nadbytku Cu), inertný morský piesok, 50 mM fosfátový tlmivý roztok, ľad, Bradfordovej roztok (farbivo Coomassie Brilliant Blue G 250 v zmesi etanolu a kyseliny fosforečnej).

Postup: Stielky lišajníkov, alebo machorastov (približne 100 mg suchej hmotnosti) preniesieme do plastových skúmaviek a ponoríme na 24 hodín do 50 ml 5 mM HEPES tlmivého roztoku (kontrola) a do 50 ml roztokov 100 a 500 μ M Cu (ako CuCl_2) v 5 mM HEPES. Umiestnime do kultivačnej miestnosti.

Po 24 hodinách stielky vyberieme z roztokov pinzetou a mierne osušime na filtračnom papieri. Vzorky homogenizujeme na ľade v trecích miskách v 2 ml 50 mM fosfátového tlmivého roztoku s prídavkom inertného morského piesku. Homogenát preniesieme pipetou do mikroskúmaviek a centrifugujeme 15 min pri teplote 4 °C (15 000 rpm). Na stanovenie rozpustných proteínov vo vzorkách použijeme 50 μ l supernatantu, ktorý pridáme do 950 μ l Bradfordovej roztoku v spektrofotometrickej kyvete (objem 1,5 ml). Roztoky zmiešame a necháme stáť pri laboratórnej teplote minimálne 5 minút (farebný komplex je stabilný do 60 minút). Absorbanciu meriame pri 595 nm oproti slepému pokusu (950 μ l Bradfordovej roztoku + 50 μ l fosfátového tlmivého roztoku). Hovädzí sérový albumín použijeme ako štandard na vytvorenie kalibračnej krivky.

Vyhodnotenie: Obsah rozpustných proteínov vo vzorkách prepočítame na jednotky suchej hmotnosti stielok. Výsledky uvedieme v tabuľke. Porovnáme vplyv zvýšenej koncentrácie medi na obsah rozpustných proteínov v stielkach machov, resp. lišajníkov, v závislosti od použitého rastlinného materiálu.

1.3.5 Analýza rastlinných bielkovín pomocou polyakrylamidovej gélovej elektroforézy

Princíp: Analýza bielkovín je základnou vedeckou metódou v rôznych oblastiach rastlinnej aj živočíšnej biológie alebo biomedicíny. Polyakrylamidová gélová elektroforéza za prítomnosti dodecylsírany sodnej (SDS-PAGE) -patrí medzi významné techniky, pretože umožňuje rozdeliť bielkoviny extrahované z biologických objektov, porovnávať ich celkové bielkovinové zloženie a odhadnúť molekulovú hmotnosť jednotlivých polypeptidových reťazcov. SDS-PAGE je taktiež prvým krokom pri metóde Western blot, v ktorej jednotlivé polypeptidové reťazce môžu byť jednoznačne identifikované použitím špecifických protilátok. Tieto cvičenia zahŕňajú prípravu extraktu, stanovenie rozpustných proteínov podľa Bradfordovej (podrobnosti v úlohe 1.3.4) a ich základnú analýzu pomocou metódy SDS-PAGE.

1.3.5.1 Príprava extraktov na elektroforézu

Pomôcky: sklenené skúmavky, centrifugačné skúmavky, trecie misky, pipety, centrifúga, váhy,

Materiál: listy a korene kukurice, tekutý dusík, ľad, extrakčný roztok (50 mM Tris-HCl, pH 7,5 + 0,5 mM EDTA + 27 μ l β -merkaptoetanol \approx 14 mM)

Postup: Odvážime si 0,3 g čerstvých listov alebo 0,6 g koreňov mladých rastlín kukurice. Vložíme ich do separátnych trecích misiek, pridáme tekutý dusík a zhomogenizujeme. Pridáme 1 ml extrakčného roztoku a prenesieme plastovou pipetou do centrifugačných skúmaviek. Trecie misky potom ešte dvakrát prepláchneme 1 ml extrakčného roztoku, ktorý potom pridáme do príslušných skúmaviek (konečný objem roztoku v skúmavkách pre každú vzorku bude teda 3 ml). Vzorky vložíme do centrifúgy a centrifugujeme ich 15 minút pri 4000 otáčkach za min. Supernatant zlejeme do sklenených skúmaviek a vložíme do nádoby s ľadom.

1.3.5.2 Stanovenie celkových proteínov

Pomôcky: sklenené skúmavky, pipety, spektrofotometer

Materiál: extrakty z rastlín kukurice, albumín z kravského séra (BSA), Bradfordovej činidlo

Postup: Z časových dôvodov budeme túto úlohu robiť až dodatočne počas priebehu elektroforézy. Z extraktu z listov odoberieme 50 μ l do čistej skúmavky a pridáme 450 μ l destilovanej vody (finálny objem bude 500 μ l, t.j. extrakt sme rozriedili v pomere 1:10). Extrakty z koreňov neriedime. Pripravíme si čisté skúmavky na stanovenie obsahu proteínov v extraktoch, ako aj na vytvorenie kalibračnej krivky (BSA1 – BSA4). Do jednotlivých skúmaviek budeme pridávať roztoky podľa tabuľky 2:

Tab. 2. Kalibrácia a meranie obsahu bielkovín

	Slepý pokus	BSA 1 (6 μ g)	BSA 2 (12 μ g)	BSA 3 (18 μ g)	BSA 4 (24 μ g)	riedený extrakt z listov	extrakt z koreňov
destilovaná voda	2,4 ml	2,34 ml	2,28 ml	2,22 ml	2,16 ml	2,40 ml	2,37 ml
albumín z kravského séra (BSA) 0,1 μ g/ μ l)	-	60 μ l	120 μ l	180 μ l	240 μ l	-	-
extrakt	-	-	-	-	-	60 μ l	20 μ l
Bradfordovej činidlo	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml

Po piatich minútach odmeráme absorbanciu vzoriek pri vlnovej dĺžke $\lambda=595$ nm.

Vyhodnotenie: Vytvoríme si kalibračnú krivku a pomocou nej vypočítame množstvo bielkovín vo vzorke.

1.3.5.3 Metóda SDS-PAGE

Pomôcky: mikroskúmavky, vodný kúpeľ, zariadenie na elektroforézu, pipety, horizontálna trepačka, malá centrifúga na mikroskúmavky

Materiál: extrakty z kukurice, markery pre elektroforézu, butanol, Coomassie Blue R-250 (0,1% v 10% kyseline octovej a 5% metanole), odfarbovací roztok (10% kyselina octová a 25% etanol), roztoky pre elektroforézu:

- A. 30% (m/V) akrylamid
0,45% (m/V) bisakrylamid (rozpustiť vo vode, filtrovať a skladovať v tme a chlade)
- B. 25% (m/V) akrylamid
2,5% (m/V) bisakrylamid
- C. Tris-HCl 1,875 M, pH 8,8 (22,7 g/100 ml)
- D. Tris-HCl 0,6 M, pH 6,8 (3,63 g/50 ml)
- E. 10% (m/V) SDS
- F. 10% (m/V) persíran amónny (AMPS) vo vode
- G. 5x roztok pre elektroforézu 1 liter (pH 8,3):
5,0 g SDS
15 g Tris
72 g glycín
- H. 5 x tlmivý roztok pre vzorky:
1 g SDS
5 g sacharóza
5 ml Tris-HCl 0,6 M, pH 6,8
1 ml brómfenolová modrá (7,5 mg/ml)
Doplniť na 9 ml, rozdeliť po 0,45 ml do plastových skúmaviek a uchovávať zmrazené.
Pred použitím je potrebné pridať 50 μ l β -merkaptoetanolu
- I. TEMED (komerčný roztok)

Postup: Zariadenie na elektroforézu premyjeme etanolom. Pripravíme si separačný gél (10% akrylamidu):

Dest. H ₂ O	3,9 ml
Roztok C	2,0 ml
Roztok A	4,0 ml
Roztok E	0,1 ml
TEMED	6,0 µl
Roztok F	50 µl

Roztok nalejeme medzi dve sklenené platne zariadenia do výšky niekoľkých cm od horného okraja (závisí od typu elektroforézy, hladina gélu by mala byť 1-2 cm nižšie ako zasahuje vsunutý hrebeň). Povrch zalejeme butanolom, aby sa hladina zarovnala, a necháme polymerizovať aspoň hodinu. Keď je gél stuhnutý, zlejeme butanol a premyjeme povrch gélu destilovanou vodou. Zvyšky vody odstránime filtračným papierom tak, aby sme neporušili povrch gélu.

Pripravíme si zaostrovací (stacking) gél:

Dest. H ₂ O	3,6 ml
Roztok D	0,5 ml
Roztok B	0,85 ml
Roztok E	50 µl
TEMED	5,0 µl
Roztok F	25 µl

Roztok nalejeme na vrch separačného gélu a vložíme doň hrebeň tak, aby sme pri tom nevytvorili bubliny. Gél necháme tuhnúť asi 30 minút. Potom vyberieme hrebeň, povrch prepláchneme destilovanou vodou a nakoniec gél zalejeme roztokom pre elektroforézu.

Pripravíme si vzorky do mikroskúmaviek zmiešaním 80 µl extraktu a 20 µl 5x tlmivého roztoku H. Do separátnej mikroskúmavky si pripravíme 10 µl markerov (obsahujúcich približne 10 µg bielkovín). Všetky mikroskúmavky ponoríme na 5 minút do vriacej vody. Krátko centrifugujeme na mikrocentrifúge. Do jednotlivých komôrok pomaly nanesieme 10, 20 alebo 40 µl vzorky, kým modrá farba brómfenolovej modrej nedosiahne dno. Nezabudnime do jednej z komôrok naniest' roztok s markermi. Elektroforézu necháme bežať pri napätí 60 mV, kým čiara brómfenolovej modrej nedosiahne separačný gél. Potom napätie zvýšime na 100 mV a necháme prebiehať asi 2 hodiny (až kým brómfenolová modrá nedosiahne dno gélu).

Po skončení elektroforézy vyberieme gél zo zariadenia a ponoríme ho na 30 min. do farbiaceho roztoku Coomassie Blue R-250 za stáleho mierneho pretrepávania. Potom roztok zlejeme a nadbytočné farbivo odstránime odfarbovacím roztokom. Odfarbovací roztok necháme pôsobiť tak dlho, kým úzke prúžky proteínov nebudú zreteľne viditeľné, roztok niekoľkokrát vymeníme podľa potreby.

Vyhodnotenie: Porovnáme extrakty z listov a koreňov. Nachádzajú sa v listoch rovnaké alebo rozdielne proteíny? Môže sa jeden proteín vyskytovať na gély aj na rôznych miestach? Prečo? Ktorý proteín je najviac zastúpený v listoch? Určíme veľkosť najvýraznejšieho polypeptidového reťazca na základe použitých markerov. Vypočítame relatívnu elektroforetickú mobilitu proteínov (R_f) ako podiel absolútnej mobility proteínu (μ) a brómfenolovej modrej (μ_0). Vytvoríme si záznam podľa tabuľky 3. a zapíšeme jednotlivé hodnoty. Vytvoríme graf, kde nanesieme $\log M_r$ oproti R_f . Z grafu určíme M_r hľadaného polypeptidu.

Tab. 3. Vyhodnotenie elektroforézy

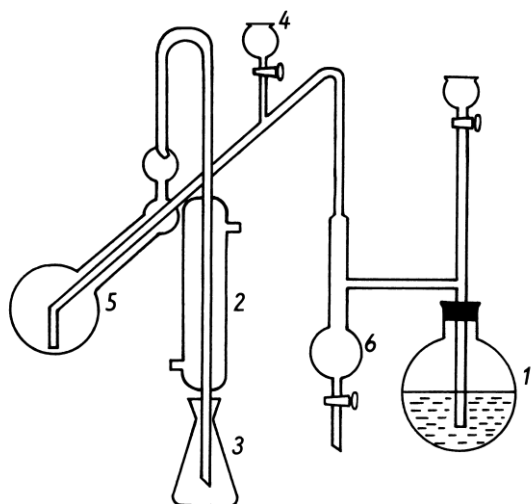
Poradie markeru zvrchu*	M_r	$\log M_r$	μ (cm)	$R_f = \mu / \mu_0$
1	200 000			
2	116 000			
3	97 000			
4	66 000			
5	55 000			
6	45 000			
7	36 000			
8	29 000			
9	24 000			
10	20 000			
11	14 200			
12	6 500			
Brómfenolová modrá	-			1
Najviac zastúpený proteín v listoch				

* môže sa stať, že niektoré markery nebudú dostatočne viditeľné (vytvorené pre Sigmamarkers wide range – markery iných výrobcov sa budú viac alebo menej líšiť).

1.3.6 Stanovenie celkového dusíka Kjeldahlovou metódou

Princíp: Dusík sa v rastlinách vyskytuje v organickej aj v anorganickej forme. Pri stanovení celkového dusíka v rastlinných pletivách mineralizujeme suchý rastlinný materiál koncentrovanou H_2SO_4 za prítomnosti selénového katalyzátora na pieskovom elektrickom kúpeli. Týmto spôsobom sa dusík uvoľní z organických látok vo forme $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Po mineralizácii roztok zalkalizujeme za tepla v Parnasovom-Wagnerovom prístroji a uvoľnený amoniak zachytávame v roztoku H_3BO_3 . Amoniakový dusík je možné stanoviť titráciou s roztokom H_2SO_4 . Táto modifikácia metódy neumožňuje stanoviť dusičnanový dusík a heterocyklicky viazaný dusík.

Pomôcky: Parnasov-Wagnerov destilačný prístroj (obr. 5), 50 ml Kjeldahlove banky, 150 ml kadičky, pieskový elektrický kúpeľ, automatická byreta, elektromagnetická miešačka.



Obr. 5. Parnasov-Wagnerov destilačný prístroj
1 - varná banka, 2 – chladič, 3 – predloha, 4 –
lievik, 5 - reakčná banka, 6 - vyprázdňovacia
banka

Materiál: suchý rastlinný materiál, konc. H_2SO_4 , selénový katalyzátor, 40% NaOH, 0,01M H_2SO_4 (odmerný roztok), 3% H_3BO_3 , Tashirov indikátor (20 ml 0,1% etanolového roztoku metylčervene a 5 ml 0,1% etanolového roztoku metylénovej modrej zmiešame a uchováваме v tmavej fľaši).

Postup: Zo suchého rastlinného materiálu navážime trikrát po 0,1 g do Kjeldahlových baniek. Pridáme malé množstvo selénového katalyzátora a 5 ml koncentrovanej H_2SO_4 . Vzorky spaľujeme na pieskovom kúpeli, až kým nie sú úplne priehľadné.

Na ďalší postup použijeme Parnasov-Wagnerov prístroj. Pod vyústenie chladiča položíme predlohu, 20 ml 3% H_3BO_3 tak, aby jeho koniec bol ponorený pod jej hladinu. Cez lievik

nalejeme do reakčnej banky 10 ml zmineralizovanej vzorky a banku, v ktorej bola vzorka, ešte dvakrát opláchneme malými množstvami vody, aby sme mineralizát preniesli kvantitatívne. Potom cez ten istý lievik nalejeme 30 ml 40% NaOH a lievik dvakrát prepláchneme vodou pomocou stričky. Uzavrieme všetky zábrusové kohúty a vzorku vo varnej banke zahrievame až do varu v elektrickom ohrievači. Unikajúce vodné pary strhávajú amoniak, prechádzajú cez chladič a zachytávajú sa v predlohe s H_3BO_3 . Priemerná doba destilácie je približne 20 minút, pričom je potrebné získať asi 100 ml destilátu. Krátko pred skončením destilácie predlohu znížime tak, aby kondenzát voľne odkvapkával a opláchneme ústie chladiča. Po ukončení varu sa vo varnej banke a reakčnej nádobe zníži tlak a obsah reakčnej nádoby sa automaticky odsaje do vyprázdňovacej nádoby. Odtiaľ ho vypustíme kohútom. Reakčnú nádobu prepláchneme vodou a po ukončení práce aj všetky zábrusy. Množstvo amoniaku zachyteného v H_3BO_3 titrujeme odmerným roztokom H_2SO_4 , za použitia Tashirovho indikátora. Použijeme automatickú byretu a elektromagnetickú miešačku.

Vyhodnotenie: Z byrety odčítame spotrebované množstvo H_2SO_4 a dosadíme do vzorca:

$$\text{mg N} = \text{ml H}_2\text{SO}_4 \cdot f \cdot 0,28$$

Takto získame množstvo dusíka (v mg) v našej vzorke. Výsledky prepočítame na % N v sušine.

1.3.7 Dôkaz niektorých enzýmov v zemiakovej hľuze

Princíp: Oxidázy a dehydrogenázy, ktoré sú prítomné v zemiakovej hľuze, dávajú s niektorými substrátmi charakteristické reakcie.

Pomôcky: Petriho misky, pinzeta, vodný kúpeľ, kadička.

Materiál: zemiaková hľuza, 3% H_2O_2 , 0,5% 3-fenyltetrazóliumchlorid (TTC).

Postup: Zemiakovú hľuzu dôkladne umyjeme a odrežeme šesť tenkých plátok. Na dôkaz každého enzýmu použijeme dva plátky, vždy jeden čerstvý a jeden povarený 3 minúty vo vode. Plátky položíme vedľa seba do Petriho misky.

Tyrozínáza. Čerstvý disk na vzduchu zhnedne. Tyrozínáza oxiduje aromatickú aminokyselinu tyrozín.

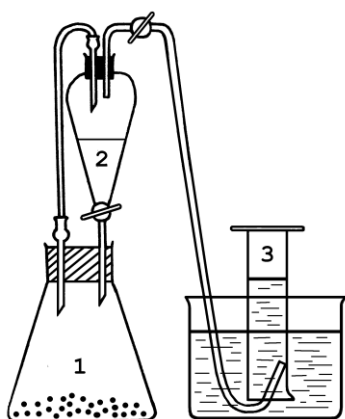
Kataláza. Zemiakové disky polejeme 3% H_2O_2 . Aktivita enzýmu sa prejaví uvoľňovaním plynného kyslíka (pena).

Dehydrogenáza. Disky zalejeme 0,5% TTC. Po 30 minútach pôsobenia v tme sa prejaví reakcia vyredukovaným červeným formazanom (pozri úlohu 4.2.3).

1.3.8 Aktivita katalázy v závislosti od klíčivosti semien

Princíp: Aktivita katalázy v semenách hrachu je úmerná ich klíčivosti. Aktivitu hodnotíme meraním objemu uvoľneného O_2 pomocou katalázomeru (obr. 6).

Pomôcky: Aparatúra na stanovenie aktivity katalázy.



Obr. 6. Aparatúra na stanovenie aktivity katalázy.

1–rastlinný materiál, 2–roztok H_2O_2 , 3–uvoľnený O_2

Materiál: dve vzorky rozomletých semien hrachu (*Pisum sativum* L.) s rôznou klíčivosťou, 3% H_2O_2 .

Postup: 5 g homogenizovaných semien hrachu nasypeme do reakčnej nádoby aparatury na stanovenie aktivity katalázy (obr. 6). Výstupnú trubicu vložíme do odmerného valca naplneného vodou. Pomocou kohúta vpustíme zo zásobnej do reakčnej nádoby 50 ml 3% H_2O_2 a premiešame. V pravidelných časových intervaloch zaznamenávame pribúdanie objemu plynného kyslíka vo valci.

Vyhodnotenie: Výsledky meraní oboch vzoriek semien zaznamenávame do tabuľky a spracujeme graficky. Strmšia krivka ukazuje na vyššiu klíčivosť semien. Vyjadríme enzymatickú aktivitu v ml uvoľneného kyslíka za hodinu na gram semien.

1.3.9 Stanovenie aktivity nitrátreduktázy metódou *in vivo*

Princíp: Nitrátreduktáza je kľúčovým enzýmom dusíkového metabolizmu. Katalyzuje prvý krok dusíkového metabolizmu, redukcii dusičnanov prijatých z pôdy na dusitany. Jej aktivita

má dôležitý význam pre rast a vývin rastlín. Nitrátreduktázu je možné stanoviť v živých segmentoch rastlín. Ako substrát sa pridáva KNO₃, pričom po uplynutí dostatočného času sa stanoví množstvo NO₂⁻, ktorého produkciu nitrátreduktáza katalyzovala.

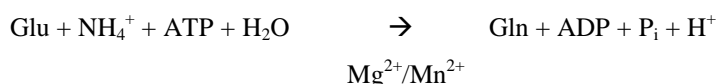
Pomôcky: kadičky, pipety, centrifugačné skúmavky, skúmavky, filtračný papier, alobal, vodná výveva, váhy, vodný kúpeľ, spektrálny kolorimeter

Materiál: mladé rastliny kukurice (7 – 14 dňové), inkubačný roztok (100 mM fosfátový tlmivý roztok (pH 7,5) + 100 mM KNO₃ + 1 mM EDTA + 1% n-propanol), farbiaci roztok (4 g sulfanylamidu a 0,2 g naftyletylén diamónium dichloridu v 100 ml 10% H₃PO₄ (V/V)).

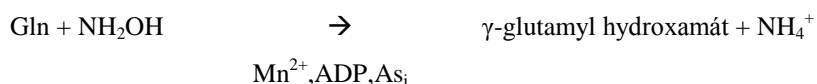
Postup: Z 0,2 - 0,3 g listov narežeme 0,5 cm dlhé segmenty, vložíme do skúmaviek a pridáme 5 ml inkubačného roztoku. Roztok odvzdušníme vo vákuu pomocou vodnej vývevy, skúmavky zabalíme do hliníkovej fólie (ochrana pred svetlom) a necháme ich inkubovať 30 min. pri 30 °C. Potom zo vzorky odoberieme 0,5 ml do novej skúmavky a pridáme 0,75 ml farbiaceho roztoku. Absorbanciu stanovujeme pri vlnovej dĺžke 540 nm. Množstvo vyprodukovaného dusitanu určíme na základe vopred pripravenej kalibračnej krivky a výsledok vyjadríme ako μmol (NO₂⁻) . g⁻¹ (čerstvej hmotnosti) . hod⁻¹.

1.3.10 Stanovenie transferázovej aktivity glutamínsyntetázy, závislosť jej aktivity od koncentrácie a od reakčného času.

Princíp: Glutamínsyntetáza je kľúčovým enzýmom asimilácie dusíka. V rastlinách katalyzuje nasledujúcu reakciu:



Túto biosyntetickú aktivitu je však pomerne zložitá stanoviť. Preto sa využíva schopnosť enzýmu v *in vitro* podmienkach katalyzovať aj inú reakciu, ktorá sa nazýva transferázová. Reakcia, ktorej výsledkom je produkt hnedastej farby, prebieha podľa nasledujúcej rovnice:



Pomôcky: Skúmavky, odmerné valce, pipety, trecie misky, nádoby na ľad, stojany, centrifúga, vodný kúpeľ, spektrofotometer.

Materiál: Listy a korene kukurice, MOPS 0,4 M, pH=7, glutamín 0,3 M, MnCl_2 24 mM, ADP 2,5 mM, NH_2OH 1,2 M, NaOH 0,6 M, DTT 50 mM, HAsO_4^{2-} 0,5 M, farbiaci roztok (106,64 g $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 24,72 ml 35% HCl, 38,4 g trichlóroctovej kyseliny).

Postup: Extrakt z rastlín vyrobíme podobne ako v úlohe 1.3.5. Na reakciu použijeme sklenené skúmavky. Postupujeme podľa údajov v tabuľke 4. Jedna skupina študentov bude sledovať závislosť aktivity enzýmu od množstva použitého extraktu a iná skupina bude sledovať vplyv dĺžky reakčného času. Preto si pripravíme vlastné tabuľky podľa príkladu v tabuľke 5. Po uplynutí inkubačného času pridáme do skúmaviek 2 ml farbiaceho roztoku. Absorbanciu meráme pri vlnovej dĺžke 500 nm.

Tab. 4. Postup na meranie transferázovej aktivity glutamínsyntetázy. (Objemy látok sú uvedené v μl)

	Slepý pokus	Vzorka
MOPS 0,4 M, pH 7,0	100	100
Glutamín 0,3 M	200	200
MnCl_2 24 mM	100	100
ADP 2,5 mM	100	100
NH_2OH 1,2 M	100	100
NaOH 0,6 M	100	100
DTE (/DTT) 50 mM	100	100
extrakt	-	100
H_2O	100	-
HAsO_4^{2-}	100	100
	Inkubácia 10 min pri 40 °C	Inkubácia 10 min pri 40 °C

Vyhodnotenie: Skontrolujeme linearitu oboch sledovaných závislostí použitím programu Excel. Aktivitu enzýmu v roztoku vypočítame podľa vzorca: $\text{GS (mU/ml)} = (A_{500} \cdot 2778) \text{ nmol } \gamma\text{-GH} / (t [\text{min}] \cdot V [\text{ml}])$. Aktivitu prepočítame na $\text{mU} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{FW}}$, $\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{bielkovín}}$ a $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{FW}} \cdot \text{hod}^{-1}$. Obsah bielkovín v extrakte stanovíme metódou podľa Bradfordovej (pozri úlohu 1.3.5). Enzymatická jednotka (U) je definovaná ako množstvo enzýmu, ktoré katalyzuje vytvorenie 1 μmol produktu za minútu. Porovnáme enzymatickú aktivitu v listoch a v koreňoch kukurice vo všetkých uvedených jednotkách. V závere vysvetlíme rozdiely medzi jednotlivými vyjadreniami enzýmovej aktivity. Líšia sa jednotlivé výsledky pre koreň a list? Prečo?

Tab. 5. Varianty stanovenia aktivity glutamínsyntetázy potrebné pre kontrolu linearitu reakcie v závislosti od množstva použitého extraktu (A) a reakčného času (B)

A		1	2	3	4
MOPS 0,4 M		100	100	100	100
Gln 0,3 M		200	200	200	200
MnCl ₂ 24 mM		100	100	100	100
ADP 2,5 mM		100	100	100	100
NH ₂ OH 1,2 M		100	100	100	100
NaOH 0,6 M		100	100	100	100
DTE (/DTT) 50 mM		100	100	100	100
extrakt		0	25	50	100
H ₂ O		100	75	50	0
HAsO ₄ ²⁻ 0,5 M		100	100	100	100
Reakčný čas (40° C)		10 min	10 min	10 min	10 min
Absorbancia 500 nm					

B		5	6	7	8
MOPS 0,4 M		100	100	100	100
Gln 0,3 M		200	200	200	200
MnCl ₂ 24 mM		100	100	100	100
ADP 2,5 mM		100	100	100	100
NH ₂ OH 1,2 M		100	100	100	100
NaOH 0,6 M		100	100	100	100
DTE (/DTT) 50 mM		100	100	100	100
Extrakt		100	100	100	100
H ₂ O		0	0	0	0
HAsO ₄ ²⁻ 0,5 M		100	100	100	100
Reakčný čas (40° C)		0 min	5 min	10 min	20 min
Absorbancia 500 nm					

1.4 Sekundárne metabolity

1.4.1 Dôkaz lignínu

Princíp: Lignín je vysokopolymérna látka s priestorovou štruktúrou, pozostáva z fenypropánových jednotiek. Lignín spôsobuje zdrevnatenie bunkových stien.

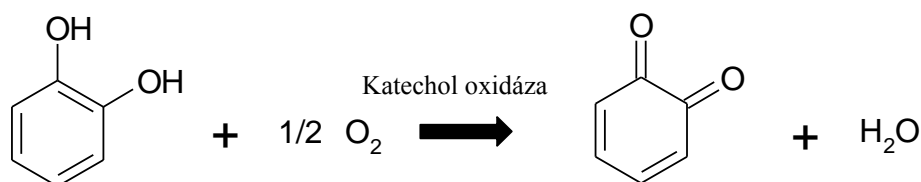
Pomôcky: kadičky.

Materiál: zápalky, konáriky bazy čiernej (*Sambucus nigra* L.), 1% etanolvý roztok floroglucínu, konc. HCl, roztok anilínchloridu (1 ml anilínu + 1 ml HCl + 8 ml vody), drevný konceptný papier, filtračný papier.

Postup: Z konárika bazy pripravíme priečne a pozdĺžne rezy. Na reznú plochu nanesieme floroglucín a potom HCl. Lignifikované bunkové steny sa zafarbia červeno až fialovo. Nelignifikované steny buniek stržňa sa nezafarbia. Tú istú reakciu urobíme aj s drevným filtračným papierom. Drievko zo zápalky ponoríme na pol minúty do roztoku floroglucínu a potom do HCl. Ďalšie drievko namočíme do roztoku anilínchloridu. Túto reakciu urobíme aj s oboma druhmi papiera. Lignín sa zafarbí na zlatožlté.

1.4.2 Reakcie trieslovín

Princíp: Triesloviny sú rôznorodé polyfenolové zlúčeniny, v ktorých sú zastúpené najmä pyrokatechol, pyrogallol a floroglucín. Polymerizácia fenolových zlúčenín nastáva vplyvom polyfenoloxidáz katalyzujúcich oxidáciu fenolov na benzochinóny (Obr. 7). Tie potom polymerizujú na polyfenoly hnedej farby. Proces je možné pozorovať na plodoch rastlín, ktoré na vzduchu hnednú (napr. jablko) a je možné ho zastaviť pridaním kyselín (napr. kys. citrónovej).



Obr. 7. Enzymatická oxidácia pyrokatecholu na benzochinón.

Pomôcky: skúmavky, kadičky, centrifúga.

Materiál: oplodie pagaštana konského (*Aesculus hippocastanum* L.), 10% FeCl₃, 1% roztok želatíny (v 10% NaCl), 1% AgNO₃, konc. NH₄OH, 10% zásaditý octan olovnatý, pevný KOH, 20% H₂SO₄, Fehlingov roztok I, II.

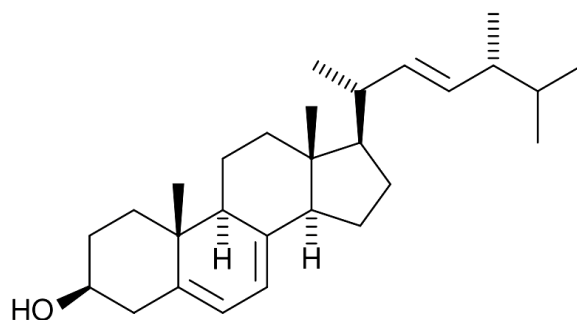
Postup: 10 g rozdrveného rastlinného materiálu varíme niekoľko minút v 100 ml vody a potom filtrujeme. K 2 ml extraktu trieslovín pridáme niekoľko kvapiek 10% FeCl₃. V prítomnosti pyrokatecholových trieslovín sa roztok zafarbí na čiernozeleno. Pyrogalolové triesloviny zafarbia roztok na čiernomodro. Do ďalšej skúmavky k extraktu trieslovín opatrne prikvapkáme roztok želatíny. Vyzráža sa žltá klkovitá zrazenina, ktorá sa v nadbytku pridávaného roztoku rozpustí. K 2 ml trieslovinového extraktu pridáme 1 ml 1% AgNO₃, niekoľko kvapiek amoniaku a krátko povaríme. Vyzrážajú sa triesloviny a vyredukuje sa čierne koloidné striebro. K 5 ml trieslovinovému roztoku pridáme 2 ml zásaditého octanu olovnatého. Triesloviny a ďalšie fenolové látky sa vyzrážajú.

K 10 ml trieslovinového extraktu v kadičke pridávame zásaditý octan olovnatý. Po vytvorení zrazeniny a krátkom povarení zlejeme kvapalinu nad zrazeninou. Zrazeninu centrifugujeme, premyjeme destilovanou vodou, potom pridáme 7 ml 20% H₂SO₄ a 20 minút hydrolyzujeme varom. Časť ochladeného roztoku zneutralizujeme pevným KOH a urobíme Fehlingovu skúšku podľa úlohy 1.2.1.2.

Vyhodnotenie: Uvedieme výsledky jednotlivých reakcií a záver o prítomnosti trieslovín v sledovanej vzorke.

1.4.3 Stanovenie ergosterolu v lišajníkoch

Princíp: Je známe, že obsah ergosterolu v lišajníkoch, ktorý je hlavným sterolom cytoplazmatickej membrány húb, citlivo reaguje na prítomnosť xenobiotík v životnom prostredí, vrátane prítomnosti ťažkých kovov. Typický obsah ergosterolu v stielkach lišajníkov je v intervale od 0,1 po 1,8 mg/g suchej hmotnosti. Zistilo sa, že obsah ergosterolu v lišajníkoch klesá v dôsledku zvýšenej akumulácie medi, ortuti a niklu. Ergosterol môže byť považovaný za jeden z viacerých parametrov na stanovenie integrity membrán v lišajníkoch, v tomto prípade dokonca veľmi špecifickým, pretože sa nachádza len v plazmaleme heterotrofného symbionta – mykobionta.



Ergosterol

Pomôcky: mikroskúmavky (eppendorfký) 2 ml, trecie misky s tlčikmi, pipety, plastové skúmavky (50 ml), trepačka, centrifúga, HPLC (izokratická pumpa, UV detektor)

Materiál: stielky diskovky bublinatej (*Hypogymnia physodes* L. Nyl.), inertný morský piesok, 96% etanol, ľad

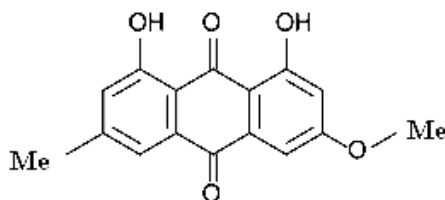
Postup: Stielky diskovky bublinatej (približne 100 mg suchej hmotnosti) ponoríme na 24 hodín do 50 ml roztoku 5 mM HEPES tlmivého roztoku v plastových skúmavkách (kontrola) a do 50 ml roztokov 100 a 500 μM Cu (prípadne Cd), rozpustených v 5 mM HEPES. Cd pridávame vo forme $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ a meď ako CuSO_4 . Rastliny umiestnime do kultivačnej miestnosti.

Vzorky lišajníkov po 24 hodinách opláchneme destilovanou vodou. Po miernom osušení filtračným papierom ich homogenizujeme na ľade, v chladenej trecej miske s prídavkom inertného morského piesku a 2 ml 96% etanolu. Pretože ergosterol je citlivý na svetlo, všetky nasledujúce kroky realizujeme v tmavej miestnosti. Extrakty pipetou odoberieme do mikroskúmaviek a miešame na trepačke pri laboratórnej teplote 30 minút. Na záver vzorky centrifugujeme pri 10 000 g počas 20 minút. Výsledný supernatant následne analyzujeme vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) pri nasledujúcich podmienkach: kolóna Tessek SGX C18 5 μm (4 x 250 mm), prietok 1,5 ml/min., mobilná fáza: metanol. Celkový čas analýzy je 15 minút (izokraticky), detekcia pri 280 nm. Ako štandard používame ergosterol (Sigma-Aldrich, 1-20 μg ergosterolu v 1 ml 96% etanolu).

Vyhodnotenie: Obsah ergosterolu vo vzorkách lišajníkov prepočítame na jednotky suchej hmotnosti stielok. Výsledky uvedieme v tabuľke. Porovnáme vplyv zvýšenej koncentrácie medi na obsah ergosterolu v lišajníkoch.

1.4.4 Izolácia parietínu a stanovenie jeho obsahu použitím HPLC

Princíp: Väčšina sekundárnych metabolitov lišajníkov patrí medzi extracelulárne fenoly, ktoré mykobiont vylučuje na povrch svojich hýf. Tieto zlúčeniny sa v lišajníkoch vyskytujú vo významnom množstve, zvyčajne od 0,1 do 5 % suchej hmotnosti. V súčasnosti poznáme viac ako 800 sekundárnych metabolitov lišajníkov, pričom väčšina z nich sa nenachádza v žiadnej inej skupine organizmov. Sekundárne metabolity lišajníkov majú viaceré ekologické funkcie, napr. chránia lišajníky pred UV žiarením (napr. parietín) a pred požieraním stielok bylinožravcami. Majú tiež antibiotický a alelopatický účinok. Niektoré z nich vytvárajú cheláty s ťažkými kovmi. Parietín je dominantný sekundárny metabolit lišajníka *Xanthoria parietina*, ktorý tvorí 0,5 až 5 % suchej hmotnosti stielok a je lokalizovaný na povrchu hýf mykobionta.



Parietín, Me = -CH₃

Pomôcky: mikroskúmavky (eppendorfky) 2 ml, pipety, HPLC (izokratická pumpa, UV detektor)

Materiál: stielky diskovníka múrového (*Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr.), acetón, acetonitril

Postup: Stielky lišajníka *X. parietina* (10 – 15 mg suchej hmotnosti periférnych lalokov) zbavíme viditeľných nečistôt a premiestnime ich do mikroskúmviek. Parietín extrahujeme použitím acetónu (1,5 ml) počas 60 minút. Extrakciu zopakujeme s identickými vzorkami trikrát. Acetónové extrakty zlejeme, odparíme a rozpustíme v 1,5 ml acetónu.

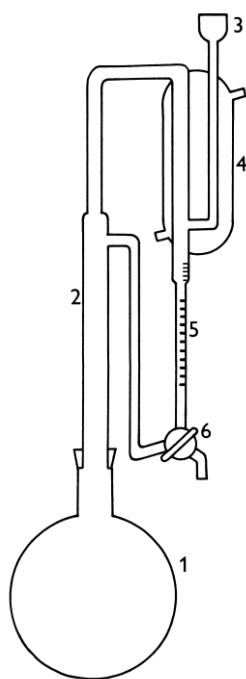
Obsah parietínu stanovujeme izokraticky HPLC pri nasledujúcich podmienkach: kolóna Tessek SGX C18 (4 x 250 mm), prietok 0,7 ml / min., mobilná fáza: acetonitril, detekcia pri vlnovej dĺžke 245 nm.

Vyhodnotenie: Obsah parietínu vo vzorkách lišajníkov prepočítame na jednotky suchej hmotnosti stielok. Výsledky uvedieme v tabuľke.

1.4.5 Stanovenie obsahu silice destilačnou metódou

Princíp: Silice sú zmesi látok s prevažným zastúpením mono- a seskviterpénov. Z rastlín sa najčastejšie izolujú destiláciou vodou. Rastlinný materiál sa varí ponorený do vody. Unikajúce vodné pary strhávajú kvapôčky éterického oleja. Po ochladení v chladiči sa silica akumuluje na povrchu vodnej hladiny. Aparatúry na destiláciu silíc majú bočnú spojovaciu trubicu, ktorou sa voda vracia späť do varnej banky. Množstvo silice sa stanovuje volumetricky alebo gravimetricky.

Pomôcky: lievik, aparátúra na destiláciu silíc (obr. 8), varná banka 500 ml, kahan, 100 ml destilačná banka.



Obr 8. Aparatúra na destiláciu silíc

1 - varná banka, 2 - destilačná aparátúra, 3 – lievik, 4 – chladič,
5 - spojovacie rameno, 6 - trojcestný kohút

Materiál: siličnatá droga (vňať materejnej dúšky obyčajnej, *Thymus vulgaris* L.).

Postup: Do varnej banky nasypeme pomocou suchého lievika so širokou stopkou 2 g suchej drogy a nalejeme 150 ml vody. Na destilačnej aparátúre namastíme zábrusy a nasadíme ju na banku. Do bočného spojovacieho ramena nalejeme destilovanú vodu. Počas destilácie sledujeme var. Po dvoch hodinách destilácie necháme aparátúru vychladnúť. Potom silicu opatrne vypustíme do kalibrovanej časti bočného ramena a odčítame jej objem.

Vyhodnotenie: Výsledok uvedieme ako ml silice v 100 g drogy.

1.4.6 Delenie rumančekovej silice metódou TLC

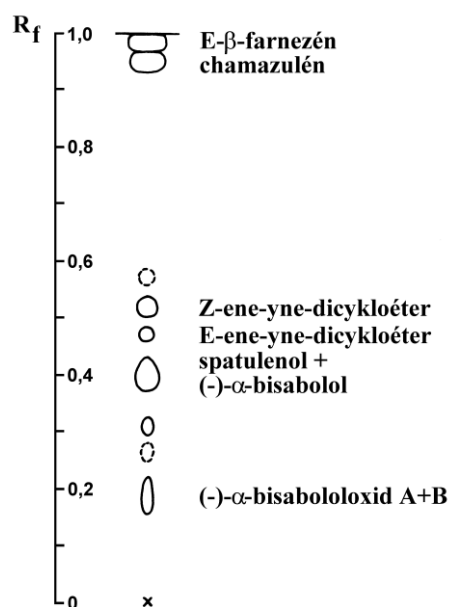
Princíp: Rumančeková silica obsahuje ako hlavné komponenty uhľovodíkové a kyslíkaté seskviterpény a polyacetylény. Najviac zastúpené sú látky bisabolánového typu a chamazulén. Z polyacetylénov je význačný cis en-in-dicykloéter.

Pomôcky: chromatografická nádoba, Silufol, sklené kapiláry, rozprašovač, infražiarič.

Materiál: rumančeková silica, hexán, vyvíjacia zmes (toluén : octan etylnatý; 95 : 5), konc. H_2SO_4 , vanilín.

Postup: Na silikagéllovú chromatografickú platňu Silufol kapilárkou nanesieme, asi 15 mm od spodného okraja, rôzne množstvá éterického oleja nariadeného hexánom. Platňu orientujeme tak, aby delenie prebiehalo kolmo na smer nanosenia silikagélovej vrstvy. Nanesená vzorka má tvoriť škvrnu s priemerom asi 4 mm. Do chromatografickej nádoby nalejeme vyvíjaciú zmes a vložíme platňu s nanesenou vzorkou. Rozpúšťadlo nesmie prekryvať nanesenú vzorku. Keď čelo rozpúšťadla dosiahne úroveň asi 10 mm od horného okraja, platňu vyberieme a necháme odpariť zvyšky vyvíjacej zmesi. Potom platňu postriekame 1% roztokom vanilínu v konc. H_2SO_4 a zahrejeme infražiaričom.

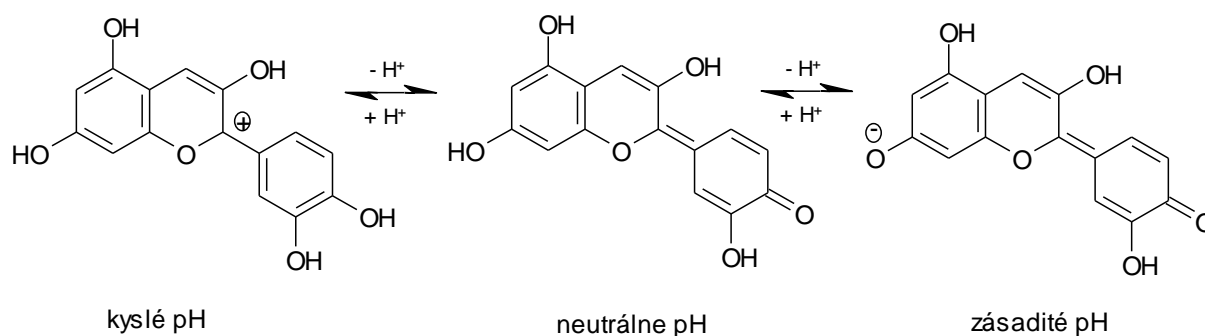
Vyhodnotenie: Na chromatograme identifikujeme jednotlivé látky. Chromatogram zakreslíme do protokolu a zaznamenáme hodnoty R_F (obr. 9).



Obr. 9. TLC chromatogram silice rumančeka
kamilkového

1.4.7 Závislosť farby antokyánov od pH

Princíp: Antokyány sú rastlinné pigmenty rozpustné vo vode, ktoré patria medzi flavonoidy. Sú zodpovedné za modré, alebo fialové sfarbenie niektorých kvetov alebo plodov. Vyskytujú sa aj v listoch a koreňoch, kde sa môžu akumulovať vplyvom stresu. Typická pre antokyány je ich zmena farby vplyvom pH. Pri nízkom pH existujú vo forme kladne nabitých katiónov červenej farby, pri neutrálnom (až mierne zásaditom) pH sú to zvyčajne neutrálne modro-fialové anhydrobázy, v alkalickom prostredí sa z nich stávajú zelenkasté anióny (obr. 10). Tieto reakcie sú vratné a na každú zmenu pH bude farbivo reagovať. Pri veľmi vysokom pH dochádza k rozkladu centrálného pyránového cyklu, pričom vznikajú žltkasté chalkóny. Rozklad pyránového cyklu už nie je možné zvrátiť vplyvom zmeny pH.



Obr. 10. Vratné reakcie antokyánov.

Pomôcky: Skúmavky, pipety, umelohmotné kvapkadlo, sklenená tyčinka, kadičky, trecia miska, indikátorový papier.

Materiál: Plody vtáčieho zobu (*Ligustrum vulgare* L.), zried. HCl (1:3), 0,002% NaOH, 0,2% NaOH, 50% NaOH.

Postup: Plody vtáčieho zobu rozotrieme v trecej miske s 4 ml destilovanej vody, aby sa farbivo uvoľnilo do roztoku. Pripravíme si 5 skúmaviek. Do prvej pridáme 0,5 ml zriedenej HCl a 2,5 ml destilovanej vody, do druhej pridáme 3 ml obyčajnej vodovodnej vody, do tretej 3 ml 0,002% NaOH, do štvrtej 3 ml 0,2% NaOH a do piatej 3 ml 50% NaOH. Do každej skúmavky nakvapkáme 5 kvapiek roztoku antokyánov. Pozorujeme rozdiely v zafarbení jednotlivých skúmaviek. Pomocou indikátorového papiera môžeme stanoviť pH jednotlivých roztokov.

Vyhodnotenie: Vyhodnotíme farbu antokyánov v kyslom, neutrálnom a zásaditom prostredí. Výsledky zapíšeme do tabuľky.

2 Vodný režim a minerálna výživa

2.1 Semipermeabilita živých buniek

Princíp: Živé bunky rastlinných pletív sú semipermeabilné. Po usmrtení buniek (povarením, pôsobením jedov a pod.) plazmalema, tonoplast a ďalšie membrány stratia semipermeabilitu. Jedným z prejavov je difúzia zložiek bunkovej šťavy do prostredia.

Pomôcky: kadičky, nôž;

Materiál: cvikla, dekalín, 30% CH_3COOH .

Postup: Očistený koreň cvikly nakrájame na malé kocky, ktoré asi 20 minút premývame v prúdiacej vode. Niekoľko kociek v kadičke vo vode prevaríme dve až tri minúty. Na pokus použijeme štyri kadičky. Do dvoch nalejeme vodu, do tretej dekalín a vodu a do štvrtej 30% CH_3COOH . Do jednej kadičky s vodou umiestnime povarené kocky cvikly, do ostatných troch živé kocky. Po hodine pozorujeme difúziu betanínu, pigmentu bunkovej šťavy.

Vyhodnotenie: Na základe pozorovania urobíme záver o stave buniek v jednotlivých variantoch pokusu a o polarite betanínu.

2.2 Stanovenie transpirácie Ivanovovou vážkovou metódou

Princíp: List po oddelení od stonky transpiruje spočiatku normálnym spôsobom ako na intaktnej rastline. Intenzitu transpirácie možno preto vyjadriť úbytkom hmotnosti listu za časový interval. V niektorých prípadoch dochádza krátko po oddelení listu k prechodnému zvýšeniu úbytku hmotnosti, tzv. Ivanovovmu skoku. Príčinou je pravdepodobne prerušenie kohéznych stĺpcov vody v cievach alebo otvorenie zavretých prieduchov.

Pomôcky: stopky, skalpel, odvažovačky, váhy, milimetrový papier.

Materiál: listy muškátu (*Pelargonium* sp.).

Postup: Asi dve hodiny pred pokusom muškát pestovaný v kvetináči výdatne zavlažíme. Z muškátu odrežeme tri približne rovnaké listy a oddelíme listové stopky. Čepele listov okamžite vážime na analytických váhach. Váženie opakujeme v dvojminútových intervaloch, hmotnosti zaznamenávame. Medzi vážením listy zavesíme na laboratórny stojan. Každý list vážime aspoň šesťkrát po oddelení od rastliny. Po ukončení váženia položíme listy na milimetrový papier, zakreslíme ich obrysy a zistíme listovú plochu.

Vyhodnotenie: Hodnotu transpirácie vyjadríme v g vytranspirovanej vody na 1 g čerstvej hmotnosti a jednotku listovej plochy (1 m^2) za 1 hodinu (priemery z troch meraní).

2.3 Meranie osmotického potenciálu rastlinných pletív

Princíp: V segmentoch pletív ponorených v roztokoch sacharózy sa difúziou zmenia hodnoty vodného potenciálu. V hypotonických roztokoch sa zvýši koncentrácia sacharózy a segmenty sa predĺžia príjmom vody do vakuoly. V hypertonických roztokoch sa segmenty skrátia a voda, ktorá vystúpi z vakuol, zníži koncentráciu roztoku sacharózy. V roztoku, ktorý je oproti pletivu izotonický, ku zmene dĺžky segmentu ani koncentrácie nedôjde a jeho koncentrácia sa bude rovnáť hodnote vodného potenciálu pletiva. Koncentrácie roztokov sacharózy presne stanovíme refraktometricky meraním indexu lomu.

Pomôcky: korkovrt, skúmavky, refraktometer, pravítko.

Materiál: zemiakové hľuzy, 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 a 1,0 M sacharóza.

Tab. 6. Meranie vodného potenciálu zemiakových hľúz (vzor tabuľky pre protokol)

[M] sacharóza	Brix hodnota refraktometra		molarita roztokov			dĺžka segmentov		
	pred pokusom	po pokuse	pred pokusom	po pokuse	rozdiel	pred pokusom	po pokuse	rozdiel
0								
0,1								
1,0								

Postup: Zo zemiakovej hľuzy korkovrtom rovnobežne vyrežeme 11 segmentov dlhých 5 až 10 cm s priemerom 5 mm. Do prvej skúmavky nalejeme destilovanú vodu a do ďalších po 10 ml roztokov sacharózy. Potom do skúmaviek vložíme segmenty a exponujeme dve hodiny. Medzitým stolným refraktometrom odmeriame hodnoty Brix pre každý roztok sacharózy. Hodnota Brix udáva percento sacharózy vo vodnom roztoku (1 Brix = 1g sacharózy v 100 ml vody = 1%). Hodnoty zaznamenané refraktometrom prepočítame na molárnu koncentráciu sacharózy. Tým zistíme skutočnú koncentráciu použitých roztokov.

Po dvoch hodinách vyberieme segmenty a zmeriame ich dĺžku. Potom refraktometricky stanovíme zmenenú koncentráciu roztokov v skúmavkách.

Tab. 7. Osmotické potenciály (Φ_s) a index lomu (n_D^{20}) roztokov sacharózy

M	n_D^{20}	Φ_s	M	n_D^{20}	Φ_s
0,00	1,3329	0,000	0,51	1,3579	-1,483
0,01	1,3335	-0,026	0,52	1,3584	-1,516
0,02	1,3340	-0,054	0,53	1,3589	-1,549
0,03	1,3345	-0,080	0,54	1,3594	-1,585
0,04	1,3350	-0,107	0,55	1,3599	-1,620
0,05	1,3355	-0,133	0,56	1,3604	-1,657
0,06	1,3359	-0,161	0,57	1,3608	-1,693
0,07	1,3364	-0,187	0,58	1,3613	-1,729
0,08	1,3369	-0,214	0,59	1,3618	-1,765
0,09	1,3374	-0,241	0,60	1,3623	-1,801
0,10	1,3379	-0,267	0,61	1,3628	-1,837
0,11	1,3384	-0,295	0,62	1,3633	-1,875
0,12	1,3386	-0,321	0,63	1,3638	-1,912
0,13	1,3394	-0,347	0,64	1,3642	-1,949
0,14	1,3398	-0,375	0,65	1,3647	-1,987
0,15	1,3404	-0,401	0,66	1,3652	-2,024
0,16	1,3408	-0,428	0,67	1,3657	-2,062
0,17	1,3413	-0,454	0,68	1,3662	-2,099
0,18	1,3418	-0,481	0,69	1,3667	-2,138
0,19	1,3423	-0,508	0,70	1,3672	-2,177
0,20	1,3428	-0,536	0,71	1,3677	-2,217
0,21	1,3433	-0,564	0,72	1,3682	-2,256
0,22	1,3438	-0,594	0,73	1,3687	-2,296
0,23	1,3443	-0,622	0,74	1,3691	-2,336
0,24	1,3448	-0,650	0,75	1,3696	-2,375
0,25	1,3452	-0,679	0,76	1,3700	-2,416
0,26	1,3457	-0,707	0,77	1,3705	-2,459
0,27	1,3462	-0,737	0,78	1,3710	-2,502
0,28	1,3467	-0,765	0,79	1,3715	-2,544
0,29	1,3471	-0,794	0,80	1,3720	-2,588
0,30	1,3476	-0,824	0,81	1,3725	-2,630
0,31	1,3481	-0,853	0,82	1,3729	-2,673
0,32	1,3487	-0,883	0,83	1,3734	-2,716
0,33	1,3491	-0,912	0,84	1,3739	-2,756
0,34	1,3496	-0,941	0,85	1,3744	-2,797
0,35	1,3501	-0,971	0,86	1,3749	-2,837
0,36	1,3506	-1,000	0,87	1,3754	-2,878
0,37	1,3511	-1,030	0,88	1,3759	-2,918
0,38	1,3516	-1,062	0,89	1,3764	-2,969
0,39	1,3521	-1,094	0,90	1,3769	-3,009
0,40	1,3525	-1,126	0,91	1,3773	-3,060
0,41	1,3531	-1,158	0,92	1,3778	-3,111
0,42	1,3536	-1,190	0,93	1,3782	-3,151
0,43	1,3540	-1,222	0,94	1,3788	-3,202
0,44	1,3545	-1,253	0,95	1,3793	-3,253
0,45	1,3550	-1,286	0,96	1,3797	-3,303
0,46	1,3555	-1,318	0,97	1,3802	-3,354
0,47	1,3560	-1,351	0,98	1,3807	-3,405
0,48	1,3564	-1,384	0,99	1,3811	-3,455
0,49	1,3569	-1,418	1,00	1,3816	-3,506
0,50	1,3574	-1,450	1,01	1,3822	-3,556

Tab. 7. (pokračovanie)

M	n_D^{20}	Φ_s
1,02	1,3827	-3,617
1,03	1,3832	-3,668
1,04	1,3836	-3,719
1,05	1,3841	-3,769
1,06	1,3846	-3,820
1,07	1,3851	-3,871
1,08	1,3856	-3,931
1,09	1,3860	-3,982
1,10	1,3865	-4,033
1,11	1,3869	-4,094
1,12	1,3874	-4,144
1,13	1,3878	-4,205
1,14	1,3883	-4,256
1,15	1,3888	-4,306
1,16	1,3893	-4,367

M	n_D^{20}	Φ_s
1,17	1,3898	-4,428
1,18	1,3902	-4,479
1,19	1,3908	-4,539
1,20	1,3912	-4,600
1,21	1,3917	-4,661
1,22	1,3921	-4,722
1,23	1,3926	-4,783
1,24	1,3931	-4,843
1,25	1,3936	-4,904
1,26	1,3941	-4,965
1,27	1,3945	-5,026
1,28	1,3950	-5,097
1,29	1,3955	-5,157
1,30	1,3960	-5,228

Vyhodnotenie: Hodnoty odčítané z refraktometra zapíšeme do tabuľky podľa vzoru (tab. 6), do ďalších stĺpcov uvedieme ich prepočet na molaritu pred pokusom a po pokuse, rovnako aj dĺžky segmentov zemiaku. Stanovíme koncentráciu izotonického roztoku. Porovnáme hodnoty izotonického roztoku zistené na základe merania zmien dĺžok segmentov a zmien koncentrácie meraných roztokov. Z tabuľky 7 odčítame výslednú hodnotu osmotického potenciálu pletiva zemiakovej hľuzy.

2.4 Dôkaz katiónov v rastlinnom popole

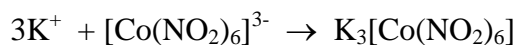
Princíp: Nespáliteľný podiel rastlinného materiálu sa rozpustí vo vode alebo v zriedenej HCl. Analytickými reakciami dokazujeme prítomnosť katiónov.

Pomôcky: lievnik, stojan na skúmavky, skúmavky, pipety.

Materiál: popol z rastlín, 5% dusitan sodno-kobaltitý, 5% $K_4[Fe(CN)_6]$, 5% NH_4SCN , 10% $(NH_4)_2CO_3$, 5% Na_2HPO_4 , zriedená HCl, 5% šťaveľan amónny, zriedený NH_4OH , zriedená CH_3COOH , roztok Kalionu (0,2 g dipikrylamínu rozpustíme v 2 ml 10% Na_2CO_3 a pridáme 15 ml vody), roztok Magnezón I (1 mg Magnezónu I rozpustíme v 100 ml 8% NaOH), 0,1M NH_4OH .

Postup: Na navlhčený filtračný papier v lieviku nasypeme trochu popola, premyjeme ho malým množstvom vriacej destilovanej vody a filtrát zachytíme do skúmavky.

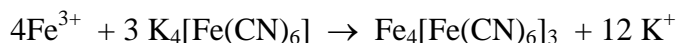
Dôkaz draslíka. Do skúmavky k zneutralizovanému filtrátu pridáme niekoľko kvapiek dusitanu sodno-kobaltitého. Za prítomnosti draslíka vznikne žltý zákal. Reakcia prebieha podľa tejto rovnice:



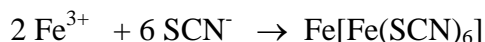
Na filtračný papier kvapneme roztok Kalionu a na to isté miesto pridáme kvapku filtrátu. Papier vysušíme a potom ponoríme do 0,1M NH_4OH . Filtračný papier ožltne, na mieste kde je prítomný draslík očervenie.

Dôkaz železa. Do lievika na filtračný papier pridáme trocha popola a premyjeme zriedenou HCl do troch skúmaviek:

Do prvej skúmavky k filtrátu pridáme niekoľko kvapiek $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Prítomnosť trojmocného železa dokazuje modré zafarbenie roztoku (berlínska modrá) podľa reakcie:

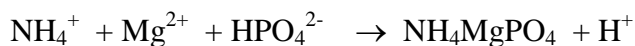


V druhej skúmavke, po pridaní niekoľkých kvapiek 5% NH_4SCN , vznikne červené zafarbenie na dôkaz prítomnosti Fe^{3+} podľa reakcie:



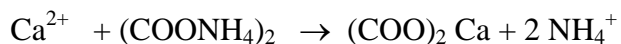
Filtrát v tretej skúmavke použijeme na dôkaz horčíka.

Dôkaz horčíka. Do skúmavky pridávame zriedený amoniak až do alkalickéj reakcie a potom pridaním $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ vyzrážame vápnik. Zrazeninu odfiltrujeme a použijeme na dôkaz vápnika. Vo filtráte, po pridaní niekoľkých kvapiek 5% Na_2HPO_4 , vznikne biely zákal ako dôkaz prítomnosti Mg^{2+} .



Dôkazom prítomnosti Mg je najmä modré zafarbenie po zmiešaní niekoľkých kvapiek filtrátu a roztoku Magnezónu I.

Dôkaz vápnika. Zrazeninu CaCO_3 na filtri premyjeme zriedenou CH_3COOH . Po pridaní 5% šťaveľanu amónneho vznikne biela zrazenina šťaveľanu vápenatého.



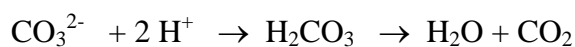
2.5 Dôkaz aniónov v rastlinnom popole

Princíp: V kyslom extrakte rastlinného popola dokazujeme anióny CO_3^{2-} , S^{2-} , SO_4^{2-} a Cl^- .

Pomôcky: lievik, stojan na skúmavky, skúmavky, pipety a sklená tyčinka.

Materiál: zriedená HNO_3 , 5% BaCl_2 , 1% AgNO_3 , 5% $\text{Ba}(\text{OH})_2$, NH_4OH .

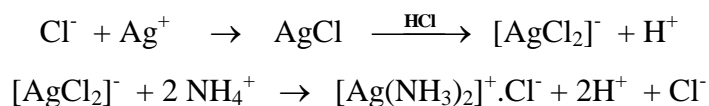
Postup: Na filtračný papier nasypeme malé množstvo popola a prelejeme zriedenou HNO_3 . Šumenie je dôkazom prítomnosti uhličitanov. Charakteristický zápach vzniká uvoľňovaním sírovodíka po rozklade sulfidov.



Ak sklenú tyčinku namočenú v 5% $\text{Ba}(\text{OH})_2$ podržíme nad šumiacim popolom, zakalí sa od vyzrážaného BaCO_3 .

Dôkaz síranov. K časti filtrátu pridáme roztok BaCl_2 . Za prítomnosti síranov sa vyzráža stála biela zrazenina BaSO_4 .

Dôkaz chloridov. K druhej časti filtrátu pridáme niekoľko kvapiek AgNO_3 . Biela zrazenina AgCl sa v zriedenom amoniaku rozpúšťa za vzniku komplexnej zlúčeniny.



2.6 Stanovenie rýchlosti príjmu dusičnanov meraním ich úbytku z príjmového roztoku

Princíp: Dusičnany sú hlavným zdrojom dusíka pre väčšinu poľnohospodársky významných rastlín. Ak ponoríme korene rastlín do roztoku s presne stanoveným množstvom dusičnanov, budú ho z roztoku pomaly odoberať. Meraním ich úbytku v pravidelných časových intervaloch, môžeme vypočítať akou rýchlosťou dokážu rastliny dusičnan prijímať.

Pomôcky: odmerné valce, kadičky, pipety, skúmavky, filtračný papier, váhy, orbitálna trepačka, vodný kúpeľ, spektrálny kolorimeter

Materiál: desaťdňové rastliny kukurice, 100 mM KNO_3 , 0,1 mM KNO_3 (štandard), 1 mM CaSO_4 , CuSO_4 (pripravíme 0,25 g na 100 ml, potom roztok zriedime v pomere 1:100), hydrazínsulfátový roztok (0,14g v 200 ml), 0,3 M NaOH , farbiaci roztok (4 g sulfanilamidu a 0,2 g naftyletylén diamónium dichloridu v 100 ml 10 % H_3PO_4 V/V).

Postup: Kukuricu pestujeme v hydroponii v $\frac{1}{2}$ Hoaglandovom roztoku bez dusíka asi 9 dní, potom im pridáme 100 mM KNO_3 (1ml na liter roztoku) na 12 až 24 hodín na indukciu tvorby prenášačov. Korene rastlín opláchneme v 1 mM CaSO_4 a 5 až 7 rastlín premiestnime do 150 ml kadičiek krúživým pohybom tak, aby sme im nepoškodili korene. Korene zalejeme 40 ml 1 mM CaSO_4 a necháme trepať na orbitálnej trepačke asi 5 minút pri nízkych otáčkach. Po 5

minútach roztok zlejeme a nahradíme 1 mM CaSO_4 + 0,1 mM KNO_3 . Necháme trepať na svetle 1 až 2 minúty a potom pipetou odoberieme 0,5 ml roztoku ako prvú vzorku. Ďalšie vzorky odoberáme po každých 20 minútach počas 1 hodiny. Po skončení pokusu korene odrežeme, mierne osušime filtračným papierom a odvážime ich čerstvú hmotnosť.

Ku každej vzorke, ku štandardu a aj k slepému pokusu (0,5 ml dest. vody) pridáme 0,3 ml roztoku CuSO_4 , 0,2 ml hydrazínsulfátového roztoku a inkubujeme 5 minút vo vodnom kúpeli pri 37 °C. Potom pridáme 0,3 ml 0,3 M NaOH a inkubujeme 10 minút. Nakoniec pridáme 0,75 ml farbiaceho roztoku a inkubujeme 15 minút. Absorbanciu vzoriek a štandardu odmeráme oproti slepému pokusu pri vlnovej dĺžke 546 nm.

Vyhodnotenie: Absorbancia štandardu predstavuje 1 bodovú kalibráciu (pre presnejšiu kalibráciu potrebujeme kalibračnú krivku, ktorú zhotovíme tak, že si pripravíme viacero roztokov s rôznymi koncentraciami štandardnej látky a zmeriame ich absorbancie). Vypočítame množstvo dusičnanov vo vzorkách. Rozdiel medzi počiatočným a konečným množstvom dusičnanov vo vzorke predstavuje množstvo prijatých dusičnanov. Rýchlosť ich príjmu vyjadríme ako $\mu\text{mol NO}_3^-$ na gram čerstvej hmotnosti za hodinu.

2.7 Obsah dusičnanov v pletivách

Princíp: Množstvo dusičnanov v rastlinných pletivách závisí od ich momentálnej dostupnosti pre korene. Ak má rastlina dostatok dusičnanov, ukladá si ich do zásoby, hlavne do vakuol listov aj koreňov. Naopak, pri nedostatku dusíka môže rastlina svoje zásoby dusičnanov minúť počas niekoľkých dní. Množstvo dusičnanov môžeme stanoviť kolorimetricky na základe nitrácie kyseliny salicylovej, ktorej produkt je žlto sfarbený.

Pomôcky: odmerné valce, pipety, skúmavky, trecia miska, váhy, centrifúga, spektrálny kolorimeter

Materiál: korene (prípadne listy) kukurice, 5% (m/V) kyselina salicylová v konc. H_2SO_4 , 2 M NaOH, 0,1 mM KNO_3

Postup: Dusičnany extrahujeme v 0,5 ml destilovanej vody na 0,1 g čerstvej hmotnosti. Rastlinný materiál zhomogenizujeme v roztieračke a kvantitatívne preniesieme do centrifugačnej skúmavky. Roztok centrifugujeme 10 min. pri 10000 otáčkach za minútu, aby sme sa zbavili zvyškov koreňov. Do čistej skúmavky napipetujeme 0,1 ml vzorky, pridáme 0,4 ml roztoku kyseliny salicylovej v H_2SO_4 a necháme postáť 20 min. Potom pridáme 9,5 ml

NaOH. Slepý pokus pripravíme rovnako, ale pridávame 0,4 ml H_2SO_4 (bez kyseliny salicylovej). Množstvo dusičnanov stanovíme kolorimetricky pri vlnovej dĺžke 405 nm. Ako štandard použijeme 0,1 mM roztok KNO_3 .

Vyhodnotenie: Z nameraných hodnôt absorbie vypočítame množstvo dusičnanov v skúmaných vzorkách, ktoré potom vyjadríme ako $\mu\text{mol NO}_3^-$ na gram čerstvej hmotnosti.

2.8 Stanovenie množstva fosfátov v povrchových vodách

Princíp: Fosfát je jednou z najdôležitejších živín pre suchozemské aj vodné rastliny. Jeho obsah v povrchových vodách veľmi vplyva na zloženie rastlinného spoločenstva rastúceho stojatých aj tečúcich vodách. Množstvo fosfátov v roztoku môžeme stanoviť kolorimetricky, farbením s molybdát-sírovým farbiacim roztokom. Zvýšené množstvo fosfátov môže byť spôsobené priemyselným, alebo poľnohospodárskym znečistením.

Pomôcky: odmerné valce, pipety, skúmavky, váhy, spektrálny kolorimeter

Materiál: voda z jazera, vodnej nádrže, alebo rieky (v prípade dlhšieho skladovania je potrebné ju zamraziť), farbiaci roztok [14,4 ml konc. H_2SO_4 zmiešame s 30 ml destilovanej vody a po ochladení pridáme 10 ml kyseliny amidosulfónovej (1 g/10 ml), 1,25 g molybdenanu amónneho $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ a 34,29 mg vlnanu antimonylo-draselného, roztok doplníme na 100 ml], kyselina askorbová (1 g/10 ml, skladovateľnosť 30 dní).

Postup: Zo vzorky odoberieme 2 ml do skúmavky a pridáme 80 μl farbiaceho roztoku a 20 μl roztoku kyseliny askorbovej. Po 10 minútach stanovíme absorbienciu pri vlnovej dĺžke 720 nm. Množstvo fosfátov vo vode vypočítame na základe vopred pripravenej kalibračnej krivky. Výsledok vyjadríme ako $\mu\text{mol PO}_4^{2-}$ v jednom litri vody. Urobíme záver o tom, či je daný vodný tok, alebo nádrž bohatá, alebo chudobná na fosfáty.

2.9 Obsah fosfátov v pletivách

Princíp: Keďže fosfor je málo dostupný prvok pre rastliny, jeho množstvo v rastlinných pletivách je dôležitým ukazovateľom výživy rastlín. Jednou zo špecifických metód na stanovenie anorganického fosfátu je jeho farbenie roztokom malachitovej zelene s molybdenanom amónnym.

Pomôcky: odmerné valce, pipety, skúmavky alebo mikroskúmavky, váhy, trecia miska, centrifúga, spektrálny kolorimeter

Materiál: Korene alebo listy kukurice, 100 mM Tris (pH 7,5), roztok malachitovej zelene [30 mg malachitovej zelene rozpustíme v 90 ml redestilovanej vody a pomaly za stáleho miešania pridáme 30 ml roztoku $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (1,26 mg v 30 ml 4 M HCl), potom roztok prefiltrujeme do kadičky obsahujúcej 0,2 g suchého CHAPS (roztok sa nesmie vyzrážať, trvanlivosť roztoku je maximálne 1 týždeň)], 34% citrónan trojsodný.

Postup: Fosfáty extrahujeme v 0,5 ml 100 mM Tris pH 7,5 na 0,1 g čerstvej hmotnosti. Rastlinný materiál zhomogenizujeme v trecej miske a kvantitatívne prenesieme do centrifugačnej skúmavky. Roztok centrifugujeme 10 min. pri 10000 otáčkach/min., aby sme sa zbavili zvyškov koreňov. Z roztoku koreňov zoberieme 10 μl do skúmavky, alebo do mikroskúmavky a pridáme 90 μl destilovanej vody. Ak sme použili listy, tak roztok najprv zriedime v Tris pH 7,5 v pomere 1:50 (0,02 μl na 1 ml Tris), a potom z neho odoberieme 30 μl a doplníme 70 μl destilovanej vody. V oboch prípadoch budeme mať výsledný objem roztoku 100 μl . K nemu pridáme 1 ml farbiaceho roztoku malachitovej zelene, počkáme presne 1 minútu a potom pridáme 0,1 ml citrónanu trojsodného. Absorbanciu roztoku stanovíme najneskôr do 15 minút pri vlnovej dĺžke 660 nm. Množstvo fosfátov v pletivách vypočítame na základe vopred pripravenej kalibračnej krivky. Výsledok vyjadríme ako $\mu\text{mol PO}_4^{2-}$ na 1 g čerstvej hmotnosti pletiva.

2.10 Stanovenie pH reakcie pôdy a dostupnosť hliníka

2.10.1 Meranie pH pôdy

Princíp: Pôdna reakcia je dôležitým faktorom, ktorý silne ovplyvňuje dostupnosť niektorých živín pre rastliny, ako aj dostupnosť toxického hliníka (je rozpustný len pri $\text{pH} < 4,9$). Rôzne druhy rastlín majú rôzne požiadavky na pH pôdy. Vápnomilné rastliny uprednostňujú neutrálne až mierne zásadité pôdy (napr. mnohé skalničky), naopak na kyslých pôdach rastú kyslomilné rastliny (napr. niektoré ihličnany, vresy a vresovce a podobne). Pôdnu reakciu rozlišujeme na aktuálnu (aktívnu), ktorú meriame vo vodnom výluhu pôdy a výmennú, ktorú meriame vo výluhu s 1 M KCl. Výmenná reakcia pôdy je časovo stálejšia a umožňuje zohľadniť aj ióny adsorbované na pôdne častice, ktoré sa nám do vodného výluhu neuvoľnili.

Pomôcky: odmerné valce, kadičky, pipety, skúmavky, váhy, pH-meter

Materiál: vzorka pôdy, 1 M KCl

Postup: Do kadičky si navážime 20 gramov pôdy, ktorú zalejeme 40 ml destilovanej vody, alebo 1 M KCl. Necháme trepať na trepačke asi 5 minút a potom počkáme, kým pôdne častice klesnú na dno kadičky. Vrchný roztok prelejeme do novej kadičky, kde za stáleho miešania odmeráme pH.

2.10.2 Obsah rozpustného hliníka v pôde

Princíp: Ak je pH reakcia pôdy kyslá, hliník je rozpustný a uvoľní sa do vodného výluhu. Z neutrálnych a z alkalických pôd sa hliník neuvolňuje. Množstvo rozpustného hliníka môžeme stanoviť aluminónovým farbivom.

Pomôcky: odmerné valce, kadičky, pipety, skúmavky, váhy, spektrálny kolorimeter

Materiál: Vzorka pôdy, farebný roztok aluminónu (2,4 g NaOH rozpustíme v 20 ml vody, pridáme 12 ml ľadovej kyseliny octovej a 17,5 mg aluminónu. Roztok doplníme vodou na 50 ml objemu).

Postup: Zo vzorky pôdy si urobíme vodný výluh, ku 10 g vzorky pôdy pridáme 20 ml vody, vzorku zamiešame a pretrepeme podobne ako v predošlej úlohe. Vzorku prefiltrujeme a z filtrátu odoberieme 1 ml do čistej skúmavky. Pridáme 0,32 ml aluminónu a roztok inkubujeme 15 minút pri laboratórnej teplote. Absorbanciu meriame na spektrálnom kolorimetri pri vlnovej dĺžke 530 nm.

Tab. 8. Prehľad potreby vápnenia pôd v závislosti od pH.

	Výmenná kyslosť pôdy	Navrhované vápnenie (orná pôda, sady)
Silne kyslé pôdy	pod 4,5	1,20 – 1,50 t/ha
Kyslé pôdy	4,5 – 5,0	0,80 – 1,00 t/ha
	5,1 – 5,5	0,60 – 0,70 t/ha
Mierne kyslé pôdy	5,6 – 6,0	0,30 – 0,40 t/ha
	6,1 – 6,5	0,20 – 0,25 t/ha
	6,6 – 6,7	menej ako 0,20 t/ha
Neutrálne pôdy	6,7 – 7,2	bez vápnenia
Alkalické pôdy	nad 7,2	bez vápnenia

Vyhodnotenie: Určíme mieru kyslosti, alebo alkality pôdy, porovnáme pH vo vodnom výluhu a vo výluhu s KCl. Na základe získaných údajov zhodnotíme dostupnosť hliníka pre rastliny v našej vzorke pôdy. Na základe údajov výmennej kyslosti rozhodneme o potrebe vápnenia podľa nasledujúcej tabuľky (8):

2.11 Sledovanie obsahu hliníka v koreňoch rastlín

Princíp: Hliník je po kremíku a kyslíku tretí najrozšírenejší prvok v zemskej kôre. Pri neutrálnom pH sa nachádza v pôde hlavne vo forme nerozpustných aluminosilikátov a nie je dostupný pre rastliny. Pri kyslom pH ($< 4,9$) sa však uvoľňuje do pôdneho roztoku, kde pôsobí na rastliny toxicky. Väčšina prijatého hliníka sa v rastlinách vyzráža v bunkovej stene, kde ho môžeme vyfarbiť hematoxylínom.

Pomôcky: kadičky, pipety, žiletky, mikroskop, potreby na mikroskopovanie, spektrálny kolorimeter.

Materiál: korene kukurice, 0,5 mM CaSO_4 , AlCl_3 , roztok 0,2 % hematoxylínu + 0,02 % KIO_3 , 1 M HCl.

Postup: Korene rastlín, ktoré boli vystavené 24 hodín pôsobeniu hliníka (0,5 mM CaSO_4 + 0,1 mM AlCl_3) a kontrolné korene (0,5 mM CaSO_4) opláchneme v destilovanej vode a ponoríme na 15 min. do 0,2 % hematoxylínu + 0,02 % KIO_3 . Potom korene prepláchneme v destilovanej vode asi 10 minút. Z koreňov si môžeme pripraviť tenké priečne rezy niekoľko milimetrov od koreňového apexu a rozloženie hematoxylínu pozorovať pod mikroskopom. Z apikálnej časti zvyšku koreňov odrežeme desať 0,5 cm dlhých segmentov a ponoríme ich do 200 μl 1 M HCl na 60 minút. Kyselina chlorovodíková vytesní hematoxylín z bunkových stien a jeho množstvo stanovíme kolorimetricky pri vlnovej dĺžke 490 nm.

Vyhodnotenie: Urobíme záver o lokalizácii hliníka v koreni, porovnáme korene vystavené hliníku s kontrolnými.

2.12 Meranie obsahu uhličitanov metódou titrácie

Princíp: Uhličitaný a hydrogenuhličitaný sú dôležitou zložkou vodných ekosystémov, kde zvyšujú ich pufrovaciu schopnosť, a tým pomáhajú udržiavať stabilné pH. Ich množstvo je možné stanoviť titráciou s H_2SO_4 . Reakcia uhličitanov prebieha pri $\text{pH} \approx 8,3$ a pokles pH

roztoku pod túto hodnotu je možné sledovať fenolftaleínovým indikátorom. Reakcia hydrogénuhličitanov prebieha až k $\text{pH} \approx 3,8$, čo je možné sledovať použitím metyloranže.

Pomôcky: kadičky, pipety, automatická byreta, magnetické miešadlo.

Materiál: vzorky vody, 0,01N H_2SO_4 , fenolftaleínový indikátor (0,25% v 60% etanole), metyloranž (0,5% v čistom etanole)

Postup: Do kadičky napipetujeme 10 ml roztoku a pridáme asi 2 kvapky fenolftaleínového indikátora. Ružová farba poukazuje na prítomnosť uhličitanov. Roztok titrujeme s 0,01N H_2SO_4 do odfarbenia. Spotrebu si zaznačíme ako „A“. Pridáme asi 2 kvapky metyloranže, roztok by mal byť žltej farby. Pokračujeme v titracii, až kým sa farba roztoku nezmení na červenú. Spotrebu si označíme ako „B“.

Vyhodnotenie: Vypočítame si koncentráciu uhličitanov a hydrogénuhličitanov podľa vzorcov:

$$\text{CO}_3^{2-} \text{ (mg/ml)} = (0,01 \cdot A \cdot 60) / \text{ml vzorky}$$

$$\text{HCO}_3^- \text{ (mg/ml)} = (0,01 \cdot B - A \cdot 61) / \text{ml vzorky}$$

(Kde 0,01 je normalita kyseliny sírovej, 60 je molekulová hmotnosť uhličitanového aniónu, 61 je molekulová hmotnosť hydrogénuhličitanového aniónu, A a B sú spotreby H_2SO_4 z titrácie).

3 Fotosyntéza a dýchanie

3.1 Delenie asimilačných pigmentov pomocou tenkovrstvovej chromatografie

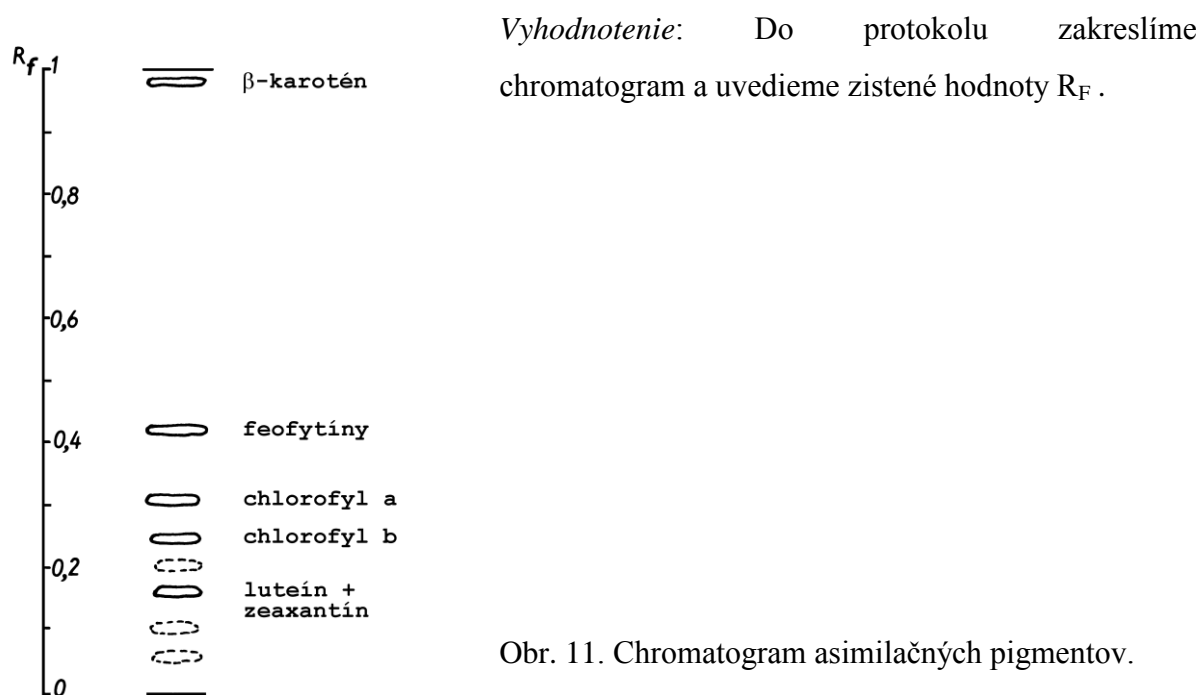
Princíp: Chlorofyly a karotenoidy extrahujeme acetónom z čerstvých listov a rozdelíme tenkovrstvovou chromatografiou (TLC) na silikagélovej platni. Pracujeme v tmavej miestnosti pri nepriamom osvetlení a bez zbytočných časových strát, aby sme minimalizovali degradáciu pigmentov.

Pomôcky: razidlo na vysekávanie terčikov z listov, roztieračka, sklená kapilára, chromatografická nádoba, silikagélová platňa.

Materiál: list muškátu (*Pelargonium zonale* L.), acetón, vyvíjacia zmes (petroléter-izopropanol -voda 120:10:0,25), MgCO_3 , morský piesok.

Postup: Z listu, pomocou razidla na gumovej podložke, vysekáme päť alebo viac terčikov (podľa obsahu chlorofylov). Do roztieračky k terčíkom z listov nasypeme malé množstvo

morského piesku, na špičku noža MgCO_3 a zalejeme malým množstvom acetónu. Rozotieraním extrahujeme pigmenty. Extrakcia pigmentov je dostatočná vtedy, keď fragmenty listového pletiva nie sú zelené. Sýtozelený acetónový extrakt nanášame sklenou kapilárou na platňu Silufol asi 15 mm od spodného okraja tak, aby priemer škvrny bol asi 5 mm. Po rozdelení zmesi pigmentov ich identifikujeme podľa polohy na chromatograme a farby (obr. 11).



Obr. 11. Chromatogram asimilačných pigmentov.

3.2 Spektrofotometrické stanovenie chlorofylu *a* a *b*

Princíp: Spektrofotometrické stanovenie chlorofylov *a* a *b* v extrakte pigmentov spočíva v meraní absorpčných maxím v červenej oblasti viditeľného spektra, kde karotenoidy neabsorbujú (nerušia stanovenie). Na meranie sa musí použiť spektrofotometer s dostatočnou rozlišovacou schopnosťou. Výpočet koncentrácie oboch chlorofylov v extrakte umožňujú rovnice so známymi mólovými absorpčnými (lineárnymi) koeficientmi stanovenými pre príslušné rozpúšťadlo. Pri analýze chlorofylov je dôležité zabrániť ich degradácii, preto pracujeme pri nepriamom osvetlení a bez zbytočných časových strát.

Pomôcky: razidlo na vysekávanie terčikov z listov, roztieračky, 20 ml kalibrované skúmavky, lieviky, spektrofotometer

Materiál: list muškátu (*Pelargonium zonale* L.), 80% acetón, MgCO_3 , morský piesok

Postup: Z čerstvého listu vysekneme trikrát po päť terčikov (tri opakovania analýzy). Každú vzorku rozotrieme zvlášť v roztieračke s veľmi malým množstvom MgCO_3 (na špičku noža) spolu s morským pieskom a asi 2 ml 80% acetónu. Extrakt kvantitatívne prefiltrujeme cez vatový filter v lieviku do kalibrovannej skúmavky. Použijeme len malé množstvo dobre utlačenej vaty. Po ukončení filtrácie malými dávkami rozpúšťadla vytesníme absorbované pigmenty a objem v skúmavke doplníme na 5 ml. Extrakt musí byť číry. Absorbancie extraktov zmeriame oproti rozpúšťadlu na spektrofotometri, podľa návodu priloženého k prístroju, pri vlnovej dĺžke 649, 665 a 750 nm.

Vyhodnotenie: Namerané hodnoty absorbancie pri 649 a 665 nm upravíme odčítaním absorbancie nameranej pri 750 nm (korigujeme chybu vzniknutú disperziou svetla v roztoku).

Obsah chlorofylov v extraktoch vypočítame riešením nasledujúcich rovníc:

$$c_a = 11,63 \cdot A_{665} - 2,39 \cdot A_{649} \text{ (mg.l}^{-1}\text{)}$$

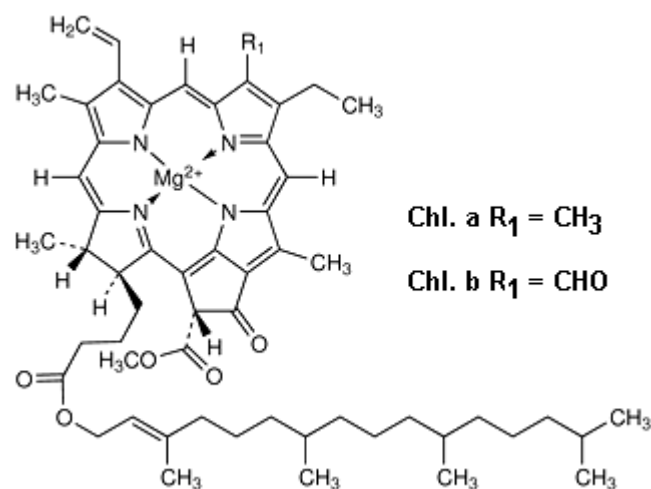
$$c_b = 20,11 \cdot A_{649} - 5,18 \cdot A_{665} \text{ (mg.l}^{-1}\text{)}$$

Výsledky prepočítame na listovú plochu (1 m^2). Plocha 1 terčika je 50 mm^2 .

3.3 Stanovenie asimilačných pigmentov v lišajníkoch

Princíp: Stanovenie zmien v zložení asimilačných pigmentov patrí medzi najcitlivejšie parametre stresovej fyziológie lišajníkov. Schopnosť niektorých externe aplikovaných ťažkých kovov meniť zloženie asimilačných pigmentov v lišajníkoch sa preukázala len nedávno. Chlorofyl *a* (obr. 12) v lišajníkoch je veľmi citlivý na prítomnosť medi v prostredí. V krátkodobých (24 hodinových) experimentoch jeho obsah klesá s rastúcou koncentráciou medi. Je pravdepodobné, že časť chlorofylu *a* sa konvertuje na chlorofyl *b* oxidáciou metylovej skupiny na porfyrínovom skelete. Z tohto dôvodu v krátkodobých experimentoch pomer chlorofylov *a/b* klesá, zatiaľ čo suma chlorofylov je stálym parametrom. Obsah celkových karotenoidov v lišajníkoch je tiež pomerne citlivým parametrom a pri niektorých typoch štúdií sa môže využívať pri kvantifikácii stresu. Jedným z najčastejšie využívaných parametrov stresovej fyziológie lišajníkov je stanovenie tzv. integrity chlorofylu *a*. Tento parameter predstavuje pomer absorbancií vzoriek extraktov asimilačných pigmentov zmeraných pri vlnovej dĺžke 435 nm a 415 nm. Integrita chlorofylu *a* sa tiež často nazýva ako „feofytinizačný kvocient“, pretože zodpovedá pomeru chlorofylu *a* ku feofytínu *a*. V zdravých stielkach lišajníkov a bunkách fotobiontov zodpovedá táto hodnota číslu 1,4. Prítomnosť

ťažkých kovov v prostredí (napr. Cu a Hg) znižuje integritu chlorofylu na hodnotu nižšiu ako 1.



Obr. 12. Chlorofyl *a* ($R_1 = \text{CH}_3$) a chlorofyl *b* ($R_1 = \text{CHO}$)

Pomôcky: plastové skúmavky s obsahom 10 ml, laboratórna sušiareň, pipety, spektrofotometer

Materiál: stielky diskovníka múrového (*Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr.), dimetylsulfoxid - DMSO

Postup: Stielky diskovníka múrového (približne 20 mg suchej hmotnosti) ponoríme na 24 hodín do 10 ml roztoku 5 mM HEPES tlmivého roztoku v plastových skúmavkách (kontrola) a do 10 ml roztokov 100 a 500 μM Cu, rozpustených v 5 mM HEPES. Med' aplikujeme ako CuSO_4 . Rastliny umiestnime do kultivačnej miestnosti.

Chlorofyly a karotenoidy extrahujeme z lišajníka v tme počas 1 hodiny v 5 ml DMSO pri 65 °C v termostate. Po inkubácii extrakty necháme vychladiť (asi 10 minút) a zriedime v pomere 1:1 s DMSO. Zákal extraktov testujeme pri 750 nm použitím spektrofotometra, pričom absorbancia vzoriek má byť vždy menšia ako 0,01. Absorbanciu extraktov meriame pri hodnotách 665, 648, 435 a 415 nm. Koncentrácie chlorofylov vypočítame použitím rovníc odvodených pre chlorofyl *a*, alebo chlorofyl *b* v DMSO. Celkový obsah karotenoidov meriame pri vlnovej dĺžke 480 nm. Pomery absorbancie pri 435 nm a 415 nm (A_{435} / A_{415}) interpretujeme ako feofytinizačné kvocienty, odrážajúce pomer chlorofylu *a* ku feofytínu *a*.

Obsah chlorofylov a celkových karotenoidov (Chl.a = chlorofyl *a*, Chl.b = chlorofyl *b*, CAROT. = celkové karotenoidy) v mg l^{-1} vypočítame podľa nasledujúcich rovníc:

$$C_{\text{Chl.a}} = 12,19 \cdot A_{665} - 3,45 \cdot A_{649}$$

$$C_{\text{Chl.b}} = 21,99 \cdot A_{649} - 5,32 \cdot A_{665}$$

$$C_{\text{CAROT.}} = (1000 \cdot A_{480} - 2,14 \cdot C_{\text{Chl.a}} - 70,16 \cdot C_{\text{Chl.b}}) / 220$$

Vyhodnotenie: Obsah asimilačných pigmentov vo vzorkách lišajníkov prepočítame na jednotky suchej hmotnosti stielok. Výsledky uvedieme v tabuľke. Tabuľka obsahuje koncentrácie chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, sumu chlorofylov a pomer chlorofylu *a/b*. V tabuľke uvedieme aj obsah celkových karotenoidov a hodnoty feofytinizačných kvocientov. Porovnáme vplyv zvýšenej koncentrácie medi na obsah asimilačných pigmentov v lišajníkoch.

3.4 Stanovenie fluorescence chlorofylu *a* v listoch vyšších rastlín

Princíp: Fluorescencia chlorofylov vzniká vtedy, ak sa ich molekula dostáva z excitovaného stavu do základného, bez odovzdania elektrónu. Zo zmien úrovne fluorescence je možné získať základný obraz o fungovaní fotosystému II (PS II). Listy adaptované na tmu vykazujú minimálnu fluorescenciu (F_0), ktorá je v podstate fluorescenciou pozadia a nezávisí od fotochemických procesov. Po osvetlení listu sa aktivizujú molekuly chlorofylov vo fotosystéme II a začnú odovzdávať elektróny na plastochinón (Q_A). Tento proces je veľmi rýchly, takže sa po krátkom čase redukuje všetok plastochinón a elektrónový transportný reťazec nedokáže absorbovať ďalšie elektróny z molekúl chlorofylu *a*. Tieto molekuly sa začnú vracat' do základného stavu bez odovzdania elektrónu, čím sa zvýši fluorescence. Hodnota tejto fluorescence sa označuje ako maximálna fluorescence (F_M). Po niekoľkých minútach sa aktivizuje celý elektrónový transportný reťazec a hodnota fluorescence sa ustáli na novej rovnovážnej hodnote.

Rozdiel $F_M - F_0$ je tzv. variabilná zložka fluorescence (F_V). Čím je variabilná zložka fluorescence väčšia, tým výkonnejší je fotosystém II. Jej hodnota sa vyjadruje ako pomer F_V/F_M a označuje sa aj ako Q_V (potenciálny kvantový výťažok fotosyntézy). Jeho priemerná hodnota pre listy vyšších rastlín sa pohybuje v rozmedzí 0,75 – 0,85. Vplyvom stresu, napr. chladu, môže dochádzať k poškodeniu fotosystému II, ako aj iných zložiek fotosyntetického aparátu, kvôli čomu sa táto hodnota zníži.

Pomôcky: kadičky, termostat, chladnička, fluorimeter.

Materiál: listy muškátu

Postup: Z rastlín muškátu odtrhneme dva listy a ponoríme do kadičiek s vodou. Jeden list vložíme do termostatu nastaveného na laboratórnu teplotu, druhý položíme do výparníka chladničky. Listy inkubujeme 20 minút, čím na ne pôsobia rozdielne teploty a súčasne sa adaptujú na tmu. V zatemnenej miestnosti osvetlenej zeleným svetlom nízkej intenzity odmeráme hodnoty Q_v . Prístroj zapneme tlačidom SET a nastavením príslušného merania v menu (podľa manuálu). Fluorescenciu meráme trikrát na rôznych častiach kontrolného listu, ako aj listu vystaveného stresu chladom.

Vyhodnotenie: Vypočítame si priemerné hodnoty Q_v pre oba listy. Urobíme záver o miere poškodenia fotosystému II vplyvom chladu.

3.5 Stanovenie fluorescence chlorofylu *a* v machorastoch a lišajníkoch

Princíp: Potenciálny kvantový výťažok elektrónového transferu cez fotosystém II (PS II) sa zvyčajne vyjadruje ako pomer variabilnej a maximálnej fluorescence. Výsledky sú takto vyjadrené ako pomer F_v/F_M , vypočítaný ako maximálna fluorescence (F_M) mínus minimálna fluorescence (F_0), tzv. variabilná fluorescence (F_v) delená hodnotou F_M :

$$(F_M - F_0) / F_M = F_v / F_M.$$

Zníženie hodnoty F_v/F_M , ktorá je pri zdravých lišajníkoch približne 0,6 - 0,7 (relatívny parameter), indikuje poškodenie fotosystému II. Meranie fluorescence chlorofylu *a* nie je deštruktívnou metódou, a tak ho môžeme realizovať spolu s ďalšími fyziologickými, alebo biochemickými meraniami na identických vzorkách.

Pomôcky: 50 ml plastové skúmavky, fluorimeter

Materiál: stielky diskovky bublinatej (*Hypogymnia physodes* (L.) Nyl.), alebo diskovníka múrového (*Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr.)

Postup: Stielky lišajníkov (približne 100 mg suchej hmotnosti) ponoríme na 24 hodín do 50 ml roztoku 5 mM HEPES tlmivého roztoku v plastových skúmavkách (kontrola) a do 50 ml roztokov 100 a 500 μ M Cu (prípadne Cd), rozpustených v 5 mM HEPES. Cd je vo forme $Cd(NO_3)_2$ a meď ako $CuSO_4$. Rastliny umiestnime do kultivačnej miestnosti.

Hydratované stielky lišajníkov adaptujeme na tmu počas 30 minút. Pracujeme v miestnosti čiastočne osvetlenej zeleným svetlom nízkej intenzity. Na prístroji nastavíme saturačný pulz a meriame podľa návodu dodaného výrobcom. Parametre chlorofylovej fluorescence meriame na troch nezávislých miestach jednej stielky lišajníka a priemernú hodnotu z nich použijeme pre ďalšie štatistické spracovanie ako jedno meranie.

Na výpočet fluorescence použijeme vzorec: $F_v/F_M = (F_M - F_0)/F_M$

Vyhodnotenie: Výsledky uvedieme v tabuľke. V tabuľke porovnáme vplyv zvýšených koncentrácií testovaných kovov na lišajníky. Porovnáваме medzi sebou aj oba testované kovy, prípadne rozdiely v citlivosti medzi oboma testovanými druhmi lišajníkov.

3.6 Spotreba kyslíka pri dýchaní semien

Princíp: Pri dýchaní dochádza k spotrebe kyslíka a k uvoľňovaniu CO₂. Spotrebu kyslíka môžeme určiť sledovaním jeho úbytku z roztoku, v ktorom máme ponorené zrná pšenice. Množstvo kyslíka odmeriame kyslíkovou elektródou.

Pomôcky: Prístroj na meranie rozpusteného kyslíka s elektródou, pinzeta, pipety, kadičky, trepačka.

Materiál: zrná pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) naklíčené v tme (48 hodín), fosfátový tlmivý roztok s pH 5,5, 1% glukóza.

Postup: Do 3 kadičiek napipetujeme po 10 ml fosfátového tlmivého roztoku, 10 ml 1% glukózy a pridáme 20 ml destilovanej vody. Potom elektródou odmeriame množstvo rozpusteného kyslíka v každej kadičke. Do 2 kadičiek pridáme 15 zrn pšenice, tretia kadička ostane bez zrn (kontrola). Kadičky uzavrieme zátkou a položíme na orbitálnu trepačku, ktorú nastavíme na malé obrátky (80 rpm). Množstvo rozpusteného kyslíka v každej kadičke odmeriame po 30 a po 60 minútach a výsledky zapíšeme do tabuľky.

Vyhodnotenie: Hodnoty koncentrácie rozpusteného kyslíka namerané po 30 alebo 60 minútach odčítame od počiatočnej hodnoty. Množstvo spotrebovaného kyslíka prepočítame na objem našej vzorky (40 ml). Od spotreby kyslíka vo vzorkách odčítame spotrebu v kontrole bez semien. Výsledok vydělíme počtom použitých semien a vyjadríme ho ako množstvo spotrebovaného kyslíka v jednom zrne pšenice za hodinu.

4 Rast a vývin

4.1 Pestovanie pokusných rastlín

V biológii rastlín sa ako modelový druh najčastejšie využíva arábkovka Thalova (*Arabidopsis thaliana*), ale aj ďalšie druhy (tabak virgínsky - *Nicotiana tabacum*, pšenica siata – *Triticum aestivum* a iné). Pre experimenty sa často kultivujú klíčence alebo mladé rastliny. Pre reprodukovateľnosť výsledkov je dôležité, aby sa použilo kvalitné osivo so známym pôvodom a štandardizované podmienky pestovania. Semená a plody pred výsevom povrchovo sterilizujeme.

4.1.1 Pestovanie rastlín na pevných *in vitro* médiách

Princíp: Technika pestovania rastlín v sterilných uzavretých systémoch s presne daným zložením živín umožnila rozvoj explantátových kultúr a významne očistila experimentálnu prácu od niektorých dovtedy ťažko definovateľných javov spojených s použitím zeminy. Kultivačné médiá obsahujú presne definované typy chemických zlúčenín (napr. Fe v podobe FeSO_4 vs. chelátované Fe-EDTA) a ich koncentrácie. Ak sú živiny rozpustené iba v destilovanej vode s upraveným pH, tak v tejto podobe ide o „primitívnu vodnú kultúru“, v ktorej nie je zabezpečený prísun kyslíka do živného roztoku. Novou kvalitou oproti klasickej hydropónii je, že *in vitro* systém je voči okolitému prostrediu uzatvorený a sterilný. Sterilita prostredia umožňuje pridávať do roztoku aj také látky (napr. cukor, vitamíny), ktoré by v otvorenom systéme mohli viesť k množeniu nežiadúcich organizmov od baktérií až po rôzne plesne. V *in vitro* kultúrach je možné pestovať baktérie, riasy, rastlinné bunky, rôzne pletivá, orgány i celé rastliny a samozrejme i živočíšne bunky. Výhodou pestovania *in vitro* je aj fakt, že takto pestované kultúry nevyžadujú priebežnú starostlivosť až do bodu, kým nedôjde k úplnému odčerpaniu výživných látok z média. Nadstavbou k jednoduchému vznášaniu sa v sterilnom živnom roztoku je použitie rôznych nosičov, na ktoré sa rastlinný materiál uloží (sklené guľôčky, špeciálne plastové mostíky, sieťky) a je iba čiastočne ponorený. Výmena plynov a premiešavanie v médiu sa dajú pomerne jednoducho zabezpečiť umiestnením kultivačných nádob na trepačky s primeraným rpm (*revolutions per minute*).

Niektorý rastlinný materiál vyžaduje rast na pevnom médiu a vtedy sa do pripraveného roztoku pridáva želirujúca látka, zvyčajne polysacharid (agar). Vznikne výživná želatína, ktorá má fyzikálne vlastnosti bližšie pôde než hydropónii. Zatemnenie, napr. pre rast koreňov, sa docieli pridávaním aktívneho uhlia do média, prípadne obalením časti kultivačných nádob nepriesvitnou tkaninou či alobalom. Najznámejším a najpoužívaným médiom je upravené Murashige-Skoog médium, ktoré sa nielenže dostalo do komerčného predaja vo forme práškovej zmesi, ale vzniklo aj nespočetné množstvo jeho verzií s pridaním/odstránením rôznych ďalších solí, hormónov, vitamínov atď. pre pestovanie materiálu vyžadujúceho inú výživu.

Do základného MS média je možné pridávať pred autoklávaním termostabilné látky a po sterilizácii i látky termolabilné. Sterilitu termolabilných látok môžeme zabezpečiť rôzne, napríklad ich roztoky filtrujeme cez sterilné membrány s priemerom pórov menším než 0,45 μm . Výber materiálu membrány závisí od fyzikálnochemických vlastností sterilizovanej látky. Tiež je možné sterilizovať ožiarením UV alebo γ radiáciou. V niektorých prípadoch je jednoduchšie rozpustiť takéto látky v rozpúšťadle so sterilizačnými účinkami (napr. DMSO – dimetylsulfoxid, etanol, metanol) a pridať ich do vysterilizovaných živných pôd vychladených na cca. 40 °C ešte pred stuhnutím.

Pomôcky: kadička, navažovacie lodičky, chemická lyžička, magnetická miešačka alebo sklená tyčinka, jednorázové sterilné Petriho misky alebo uzatvárateľné sklenené kultivačné nádoby, Pasteurova pipeta, autoklárovateľná fľaša, parafilm, pH meter, váhy, sterilný box, autokláv.

Materiál: základné soli upraveného Murashige-Skoog (MS) média (Duchefa), agar, sacharóza, 1N KOH, 1N HCl, destilovaná voda.

Postup: Na prípravu MS média s 1/2 koncentráciou minerálnych solí navážime 2,151 g/l MS zmesi, 10 g/l sacharózy (na 1% roztok sacharózy) a dôkladne rozmiešame. Upravíme pH pomocou KOH prípadne HCl na hodnotu 5,7. Do autoklárovateľnej fľaše nasypeme 10 g/l agaru, zalejeme pripraveným živným roztokom a sterilizujeme v autokláve 15 minút pri 120 °C a 120 kPa. Vysterilizované médium nalejeme v prostredí sterilného boxu do sterilných nádob, ktoré necháme otvorené stuhnúť. Nádoby uzatvoríme a utesníme parafilmom. Hotové médiá ihneď použijeme, alebo ich dočasne uskladníme v chlade a tme.

4.1.2 Stanovenie viability rias použitím farbiva trypanová modrá

Princíp: Test viability buniek rias je založený na tom, že trypanová modrá preniká plazmalémou mŕtvych buniek, ktoré sú potom farebne rozlíšiteľné od živých, zeleno sfarbených buniek.

Pomôcky: mikroskúmavky (eppendorfký), pipety, mikroskop, pomôcky na mikroskopovanie

Materiál: kultúry rias *Trebouxia erici* Ahmadjian, alebo *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brebisson, 0,4% roztok trypanovej modrej

Postup: Kvapalnú kultúru rias vystavíme vybranému typu stresu, napr. prídavok ťažkého kovu do živného média, zvýšená teplota, alebo zníženie pH prostredia počas 24 hodín. Nasledujúci deň bunky z média odoberieme pipetou do mikroskúmavky (100 µl) a pridáme identické množstvo 0,4 % roztoku trypanovej modrej. Roztoky zmiešame a necháme stáť 5 minút. Časť roztoku s bunkami preniesieme na podložné mikroskopické sklíčko, prikryjeme krycím sklíčkom a pozorujeme v mikroskope. Bunky s poškodenou cytoplazmatickou membránou sa sfarbia na modro. Viabilitu stanovujeme ako množstvo zelených, na modro nesfarbených buniek, vydelené počtom všetkých počítaných buniek (analyzujeme minimálne 3 x 100 buniek pre každý variant experimentu). Násobením číslom 100 získame výsledok v percentách.

Vyhodnotenie: Výsledky uvedieme v tabuľke. V tabuľke porovnáme vplyv vybraného typu abiotického stresu na viabilitu buniek rias.

4.2 Klíčenie

4.2.1 Klíčivosť malých semien

Princíp: Klíčivosť je schopnosť semien vyklíčiť udaná v %. Klíčivosť malých semien, prípadne plodov sa stanoví po vyklíčení v Petriho miskách na filtračnom papieri. Semená a plody klíčia a rastú, kým klíčne rastliny dosiahnu potrebnú veľkosť. Rýchlosť klíčenia ovplyvňuje teplota. Pri stanovení klíčivosti je doba, po ktorej sa vyhodnotí, uvedená v normách pre jednotlivé plodiny.

Pomôcky: Petriho misky, filtračný papier, pinzeta, preparačná ihla, sklené guľôčky

Materiál: semená ľanu sateho (*Linum usitatissimum* L.), 1% chloramín

Postup: Semená povrchovo sterilizujeme 10 minút v 1% chloramíne. Z filtračného papiera vystrihneme kruh, na ktorom vyznačíme sieť 10 x 10 štvorcov. Papier uložíme na vrstvu sklenených guľôčok do Petriho misiek a navlhčíme destilovanou vodou. Na filtračný papier pomocou pinzety alebo preparačnej ihly ukladáme povrchovo sterilizované semená do jednotlivých štvorcov. Petriho misky prikryjeme, pravidelne kontrolujeme a obsah udržiavame vo vlhkom stave.

Vyhodnotenie: Klíčivosť semien (%) vyhodnotíme po týždni. Semená s nevyvinutými, a deformovanými koreňmi sa za vyklíčené nepovažujú.

4.2.2 Klíčenie semien v miskách s trvalým zavlažovaním

Princíp: Pri klíčení väčších semien a pri pestovaní klíčnych rastlín sa často používa spôsob, ktorý umožňuje trvalé zavlažovanie semien.

Materiál: semená hrachu siateho (*Pisum sativum* L.), zrná pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.).

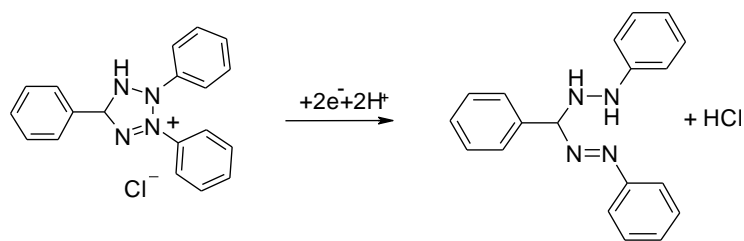
Pomôcky: klíčidlá, filtračný papier, pinzeta.

Postup: Klíčidlo pozostáva zo spodnej misky, strednej misky a zvonu s vetracím otvorom. Do spodnej misky nalejeme destilovanú vodu. Do strednej misky vložíme dva na seba kolmé pásy filtračného papiera tak, aby ich konce siahali po vyhnutí do spodnej misky. Na pásy položíme kruh filtračného papiera s vyznačenou sieťou 10 x 10 štvorcov. Filtračný papier navlhčíme a pinzetou naň ukladáme semená do narysovaných štvorcov tak, aby sa navzájom nedotýkali. Klíčidlo prikryjeme zvonom. Pásy filtračného papiera, ponorené do spodnej nádoby, umožňujú trvalé zavlažovanie pokusných rastlín. Vetrací otvor vo zvone zabezpečuje prísun kyslíka.

Vyhodnotenie: Ako v predchádzajúcej úlohe.

4.2.3 Stanovenie klíčivosti redukciou tetrazoliovej soli

Princíp: Biochemický test klíčivosti semien je založený na odlišnom zafarbení živého a mŕtveho pletiva zárodka. Bunky živého pletiva obsahujú aktívne dehydrogenázy, ktoré redukujú akceptory vodíka, napríklad 2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid (TTC). Z bezfarebnej tetrazoliovej soli vznikne červený trifenylformazan (obr. 13).



2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid

trifenylformazan

Obr. 13. Tvorba trimetylformazánu z tetrazoliovej soli

Pomôcky: odsávačky, výveva, vodný kúpeľ

Materiál: 2% 2,3,5-trifenyltetrazoliumchlorid, semená hrachu sateho (*Pisum sativum* L.) rôznej klíčivosti

Postup: Semená hrachu prepláchneme vodou a necháme napučať. Z napučaných semien vypreparujeme embryá, vložíme ich do odsávačky a zalejeme roztokom TTC. Odsávačky ďalej na 30 minút ponoríme do vodného kúpeľa s teplotou 40 °C a prikryjeme (reakcia prebieha v tme). Teplotu kúpeľa kontrolujeme. Potom roztok TTC zlejeme do zásobnej fľaše a embryá prepláchneme vodou.

Vyhodnotenie: Vyhodnotíme percento klíčivosti. Za živé, teda klíčivé, považujeme embryá celé zafarbené a embryá s nezafarbenou špičkou korienka. Vysvetlíme ako súvisí klíčivosť so zmenami zafarbenia.

4.2.4 Stratifikácia semien

Princíp: Semená dormantných druhov rastlín (napríklad ovocných drevín z čeľade ružovitých) klíčia lepšie, keď sú dlhšiu dobu v turgescentnom stave vystavené chladovej stratifikácii, pôsobeniu nízkych teplôt okolo +5 °C. Vplyv nízkej teploty sa prejaví znížením obsahu inhibítora klíčenia - kyseliny abscisovej a zvýšením obsahu giberelínov, ktoré stimulujú klíčenie. Dormanciu semien možno prerušiť aj exogénnou aplikáciou kyseliny giberelovej.

Pomôcky: kvetináče, Petriho misky, piesok, chladnička

Materiál: semená jablone domácej (*Malus domestica* BORKH.), hrušky obyčajnej (*Pyrus communis* L.), ruže šípovej (*Rosa canina* L.), kyselina giberelová (50 mg.l⁻¹), hliníková fólia

Postup: Semená drevín rozdelíme na tri časti. Kontrolnú časť semien uložíme do Petriho misiek a umiestnime v tme pri 20 °C. Udržiavame v mierne vlhkom stave. Druhú časť semien

uložíme tiež do Petriho misiek v tme pri 20 °C, ale semená pravidelne zvlhčujeme roztokom kyseliny gibberelovej. Tretiu časť semien zmiešame v kvetináčoch s pieskom v pomere 1:4, zakryjeme a uložíme v chladničke pri teplote približne +5 °C. Piesok udržiavame mierne vlhký.

Vyhodnotenie: V pravidelných intervaloch zaznamenávame počet vyklíčených semien v pokusných aj kontrolných variantoch. Do tabuľky zaznamenávame percentuálne hodnoty. Za vyklíčené považujeme semená, ktorých korienok má aspoň dĺžku semena a výhonok dĺžku aspoň polovice semena.

4.3 Hormóny

4.3.1 Biotest na subapikálnych segmentoch koleoptíl pšenice

Princíp: Biotesty sú metódy dôkazu alebo stanovenia biologickej aktivity látok na základe ich vplyvu na rastliny. Biologicky aktívne látky ovplyvňujú rastové procesy, ktoré sa prejavujú napríklad v zmenách intenzity predlžovacieho rastu, delenia buniek a i. Testom na segmentoch koleoptíl pšenice sa stanovuje vplyv hormónov a podobných látok na rast segmentov pšeničných koleoptíl. Predlžovací rast segmentov je priamo úmerný obsahu pridaného hormónu. Test možno využiť aj na zistenie účinku rôznych biologicky aktívnych látok na rast.

Pomôcky: tmavá miestnosť so zeleným osvetlením, pomôcka na vysekávanie segmentov koleoptíl, Petriho misky o priemere 40 a 100 mm, termostat

Materiál: zrná jarnej odrody pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.), Truelsenov roztok (8 ml 0,1 M KOH, 3,15 ml 0,1 M kyseliny citrónovej, 1,5 ml 0,5 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a 1,5 g sacharózy doplniť destilovanou vodou na 150 ml), roztoky kyseliny 3-indolyloctovej (IAA) s obsahom 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 mg.1000 ml⁻¹ v Truelsenovom roztoku, 1% chloramín.

Postup: Zrná pšenice necháme dve hodiny napučiať vo vode pri difúznom osvetlení. Potom ich prepláchneme v roztoku chloramínu (10 minút) a uložíme v jednej vrstve do misiek s trvalým zavlažovaním. Necháme klíčiť v tme pri 25 °C, pri vysokej vzdušnej vlhkosti. Na štvrtý deň koleoptily dosiahnu dĺžku asi 25 mm. Hodnotenie priebehu klíčenia a ďalšie práce robíme v zatemnenej miestnosti pri zelenom osvetlení. Na biotest vyberieme vyrovnané,

rovnako dlhé koleoptily, ktoré oddelíme od zrna a uložíme do zariadenia na vysekávanie subapikálnych segmentov. Segmenty dĺžky 4,2 mm vysekávame z koleoptíl asi 2 mm pod vrcholom. Segmenty vkladáme na 1 hodinu do destilovanej vody. Potom ich pomocou pinzety vyberieme na filtračný papier, osušíme a ukladáme po 15 až 20 ks do Petriho misiek s pripravenými roztokmi IAA v Truelsenovom roztoku:

0,001 mg IAA v 1000 ml

0,01 mg IAA v 1000 ml

100 mg IAA v 1000 ml

kontrola (Truelsenov roztok)

Pokus urobíme v troch opakovaniach. Petriho misky so segmentmi vložíme do termostatu a kultivujeme 20 hodín v tme pri 25 °C. Potom segmenty vyberieme, osušíme filtračným papierom a zmeriame ich dĺžku.

Vyhodnotenie: Od hodnoty nameranej dĺžky segmentov odčítame hodnotu dĺžky segmentov pred kultiváciou, t.j. 4,2 mm. Z každej série 12 segmentov vyradíme segment s najvyššou a najnižšou hodnotou. Dĺžky prírastkov v jednotlivých variantoch vyjadríme v percentách stimulácie oproti kontrole a vyhotovíme graf závislosti % stimulácie od koncentrácie IAA (mg/L). V prípade inhibície uvedieme % inhibície oproti kontrole.

4.3.2 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

v tme. Takto sa začalo odkrývanie signálnej dráhy fyziologického pôsobenia CKs na molekulárnej úrovni.

Materiál: listy jačmeňa alebo v prípade ich nedostupnosti sa použijú -50 mm^2 terčíky z listov muškátu *Pelargonium* sp., benzyladenín, 0,1 M NaOH, 0,1 M HCl, destilovaná voda, morský piesok

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

Postup: Pripravíme si roztoky cytokinínu - benzyladenínu (BA).

1. Navážime približne 1 mg BA na hodinové sklíčko. (V prípade nedostatočnej presnosti analytických váh je potrebné navážiť aspoň desaťnásobné množstvo, t.j. asi 10 mg.)
2. Podľa navážky vypočítame objem rozpúšťadla nevyhnutného na prípravu zásobného roztoku s molaritou $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$. Keďže ide o nepolárnu látku, ktorá má v destilovanej vode obmedzenú rozpustnosť, je potrebné BA najprv rozpustiť v 200 μl 0,1M NaOH. Roztoky rozpúšťadiel musia byť číre, nesmú obsahovať zákal ani zrazeninu.
3. Roztok kvantitatívne prelejeme pomocou lievika do sklenenej uzatvárateľnej nádoby (skúmavka so zábrusom). Zvyšky rozpusteného BA z hodinového sklíčka a lievika kvantitatívne vymyjeme vypočítaným objemom destilovanej vody a zneutralizujeme 200 μl 0,1M HCl. (rovnakým objemom ako v prípade NaOH) na požadovanú molárnu koncentráciu $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$.
4. Do 3 čistých označených sklenených skúmaviek s uzáverom (popis musí obsahovať meno študenta, dátum a typ inkubačného roztoku) sa napipetuje 1ml destilovanej vody, 1ml $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ BA a 1ml $5 \cdot 10^{-6}\text{M}$ BA.
5. Medzitým odrežeme približne 5-10 cm dlhé listové čepele (alebo vyrežeme 5 terčikov z listu muškátu). Čepele odvážeme, ich hmotnosť si zapíšeme a ponoríme ich do príslušného inkubačného roztoku.
6. Skúmavky s pokusným materiálom uzavrieme, vložíme do termostatu s teplotou 25°C a inkubujeme v tme 7 dní.
7. Z toho istého rastlinného materiálu odoberieme aj listy na extrakciu chlorofylu, aby sa vedel obsah fotosyntetického pigmentu na začiatku experimentu. Listy rozotrieme v trecej miske so štipkou morského piesku a asi 2ml 80% acetónu. Extrakt prefiltrujeme pomocou vaty v lieviku do kalibrovannej skúmavky, aby sa odfiltrovali

zvyšky rastlinného materiálu a piesku. Skúmavku doplníme 80% acetónom na objem 4 ml. Obsah vyextrahovaného chlorofylu stanovíme spektrofotometricky.

Absorbancia sa meria pri 663, 646 nm (absorpčné maximá chlorofylu *a* resp. *b*) a 750nm. (Pri tejto vlnovej dĺžke chlorofyl neabsorbuje, preto je táto absorpcia považovaná za šum. Šum je potrebné zohľadniť vo výpočtoch, inak skresľuje namerané výsledky).

8. Po týždni inkubácie sa skúmavky vyberú a spektrofotometricky sa v nich stanoví obsah chlorofylu podľa úlohy 3.2.

Vyhodnotenie: Získané výsledky spolu s dátami z predošlého týždňa sa vynesú do grafu. Graf bude zobrazovať zmeny obsahu chlorofylu v závislosti od koncentrácie pridaného cytokinínu. Záver bude obsahovať komentár k výsledku pokusu, zhodnotenie úspešnosti experimentu a odôvodnenie, prečo sa dospelo k takým výsledkom.

4.3.3 Apikálna dominancia

Princíp: Apikálny (vrcholový) púčik brzdí rast púčikov v pazuchách klíčnych listov. Je to prejav apikálnej dominancie, vyvolanej hormónom auxínom, ktorý sa syntetizuje v apexe a translokuje jednosmerne bazipetálne. Po amputácii vrcholu, v dôsledku zrušenia apikálnej dominancie, pazušné púčiky začnú rásť. Ich rast inhibuje aplikácia exogénnej IAA na reznú plochu po dekapitovanom vrchole.

Pomôcky: kyveta so skleným vekom, polystyrénová platňa.

Materiál: semená hrachu siateho (*Pisum sativum* L.), vodná lanolínová pasta (1 g bezvodého lanolínu s 1 ml vody v roztieračke roztierame dovtedy, kým pasta nadobudne tuhšiu konzistenciu a voda je s tukom celkom spojená.) a lanolínová pasta s obsahom IAA (1 g vodnej lanolínovej pasty 5 minút roztierame s 5 mg IAA. Uchováваме v chladničke).

Postup: Semená hrachu predpestujeme v pilinách v plastovej nádobe. Piliny povaríme 30 minút pri 100 °C. Vodu zlejeme a po osušení na piliny navrstvíme napučané semená hrachu bez osemenia, prikryjeme pilinami. Piliny navlhčíme vodou v pomere 1:1 a nádobu prikryjeme sklom. Po troch dňoch, keď sú koreňky klíčencov približne 50 až 170 mm dlhé a epikotyly sa ešte nepredĺžili, ich preložíme do kyviet naplnených vodou na perforovanú platňu z penového polystyrénu tak, aby korene prechádzali otvormi do vody. Kyvety

umiestnime v tme, kým epikotyly dosiahnu dĺžku asi 30 mm. Ďalej rastliny rozdelíme do 3 skupín, každú po 20 rastlinách.

1. skupina: kontrolná,
2. skupina: epikotyly dekapitujeme 5 až 10 mm nad klíčovými listami a na reznú plochu vysušenú filtračným papierom nanesieme kontrolnú vodnú lanolínovú pastu.
3. skupina: na dekapitovaný epikotyl nanesieme IAA pastu.

Pokusné rastliny kultivujeme v tme pri konštantných podmienkach.

Vyhodnotenie: Po 10 až 14 dňoch pokus vyhodnotíme.

1. skupina: etiolované rastliny, v pazuchách klíčnych listov sú axilárne púčiky inhibované.
2. skupina: dekapitáciou terminálneho púčika sa prerušil inhibičný vplyv na pazušné púčiky, ktoré začali rásť. Jeden z náhradných epikotylů sa stáva dominantným a spomaľuje rast druhého.
3. skupina: exogénna IAA funkčne nahradila inhibičným vplyvom chýbajúci vrchol, axilárne púčiky sa nevyvíjajú.

Prejav apikálnej dominancie vplyvom IAA zaznamenáme a zakreslíme do protokolu.

4.3.4 Prejavy polarity na výhonkoch vrby

Princíp: Typickým prejavom polarity stoniek je tvorba koreňov na bazálnom a tvorba výhonkov na apikálnom póle. Na báze stonky sa hromadí auxín a stimuluje pericykel k tvorbe kalusu a adventívnych koreňov. Stimulačné látky sa transportujú lykom a primárnou kôrou. Dôkazom toho je, že ak sa konárik okružkuje, čiže sa odstráni krycie pletivá a lyková časť, nad miestom zásahu regenerujú korene a pod ním púčiky. Keď okružkujeme konárik tesne pod apikálnym pólom, tvoria sa púčiky na oboch stranách krúžku, lebo v krátkom neporušenom úseku konárika sa nenahromadí dostatočné množstvo auxínu potrebné na regeneráciu koreňa.

Pomôcky: ostrý nôž, 500 ml odmerné valce, papierová vata, hodinové sklíčka.

Materiál: jednoročné výhonky vrby (*Salix* sp.) dĺžky asi 0,2 m.

Postup: Odrezky vrby, na ktorých extirpujeme všetky púčiky, rozdelíme do štyroch skupín po päť kusov:

1. skupina: Odrezky vložíme apikálnym pólom hore do valca, na dno ktorého sme uložili 20 mm vrstvu vlhkej papierovej vaty. Valce prikryjeme hodinovým sklom.

2. skupina: postupujeme ako pri 1. skupine, ale odrezky v strede okružujeme, t. j. odstránime asi 10 mm široký prstenec kôry a lyka.

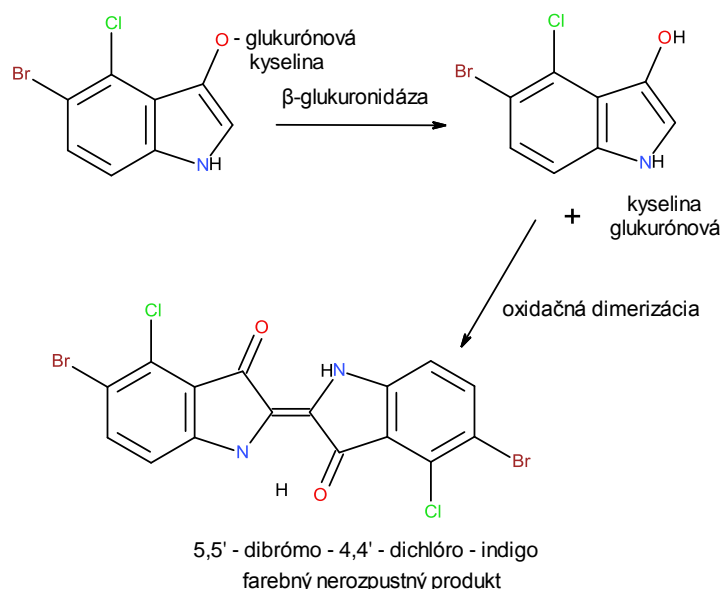
3. skupina: postupujeme ako pri prvej skupine, ale asi 10 mm pod vrcholom odrezky okružujeme.

4. skupina: odrezky vložíme do valca obrátene, t.j. apikálnym koncom dolu.

Vyhodnotenie: Vo všetkých variantoch sledujeme prejavy polarity, tvorbu kalusu a regeneráciu adventívnych koreňov a výhonkov. Zakresľujeme po dvoch a štyroch týždňoch od založenia pokusu.

4.3.5 Histochemický test aktivity β -glukuronidázy v *Arabidopsis thaliana*

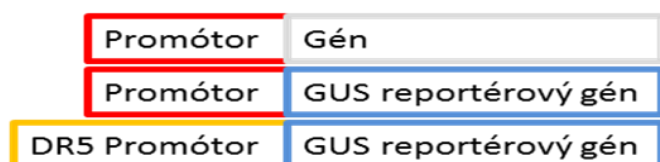
Histochemický test aktivity β -glukuronidázy (GUS) je často používaná histochemická metóda v rastlinnej, ale aj bakteriálnej biológii. Cieľom tejto techniky je analýza aktivity promótoru pre špecifický gén v rôznych pletivách, tkanivách alebo za rôznych podmienok. Aktívny enzým GUS (pôvodne pochádza z *Escherichia coli*) premieňa bezfarebný substrát na nerozpustný farebný produkt. Najbežnejšie používaným substrátom je 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glukuronid (X-gluc) a za prítomnosti oxidačných katalyzátorov $K_3Fe(CN)_6$ a $K_4Fe(CN)_6$ sa vytvorí derivát indiga (Obr. 14).



Obr. 14. Farebná reakcia X-gluc za prítomnosti β -glukuronidázy a oxidačných katalyzátorov.

Upravené podľa <https://www.bio.purdue.edu/people/faculty/karcher/blue2000/fig1.gif>

V tomto prípade pôjde o syntetický auxínový promótor DR5 (Ulmasov *et al.*, 1997, Obr. 15), ktorý pozostáva zo sekvencie z vírusu mozaiky karfiolu obohateného o niekoľko repetitívnych sekvencií auxín-responzívneho elementu (AuxRE). AuxRE motív (TGTCTC) sa nachádza v promótoroch génov, ktoré sú exprimované za prítomnosti transkripčných faktorov odpovedajúcich na auxínový signál (Liu *et al.*, 1994).



Obr. 15. Schéma natívneho promótora s génom, natívneho promótora s reportérovým génom GUS a syntetického promótora s GUSom

Pomôcky: pinzeta, pipety, mikroskúmavky, pH meter, krycie a podložné sklička, termostat, mikroskop.

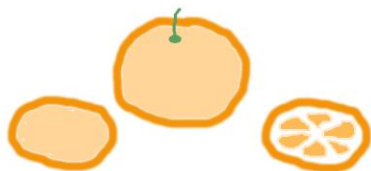
Materiál: 7 dňové klíčence *Arabidopsis thaliana* s GUS génom pod syntetickým promótorom DR5, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glukuronid, DMSO, fosfátový pufer pH=7 (100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 50mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 50mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, etanol, detergent.

Postup: Pripravíme si 100mM fosfátový pufer zmiešaním $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a upravíme pH na hodnotu 7 (počítame 1ml pufru na 1 vzorku), rozriedime katalyzátory oxidácie na 50mM koncentráciu (pridávame 10 μl z každého na 1 vzorku). Rozpustíme X-gluc v DMSO na koncentráciu 1mg/ml (použijeme 0,01 mg X-gluc na 1 vzorku). Zmiešame 1ml fosfátového pufru, 10 μl 50mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10 μl 50mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 10 μl detergentu a 10 μl rozriedeného X-gluc. Odoberieme vzorky z rastlín, listy alebo korene, do mikroskúmavky a pripipetujeme pripravený inkubačný roztok. Skúmavky uzavrieme a dáme zahrievať do termostatu na 37°C po dobu 30 minút. V prípade zelených pletív nahradíme inkubačný roztok etanolom na odfarbenie chlorofylu, nezelené pletivá môžeme okamžite prezerat' pod mikroskopom v preparáte s kvapkou vody.

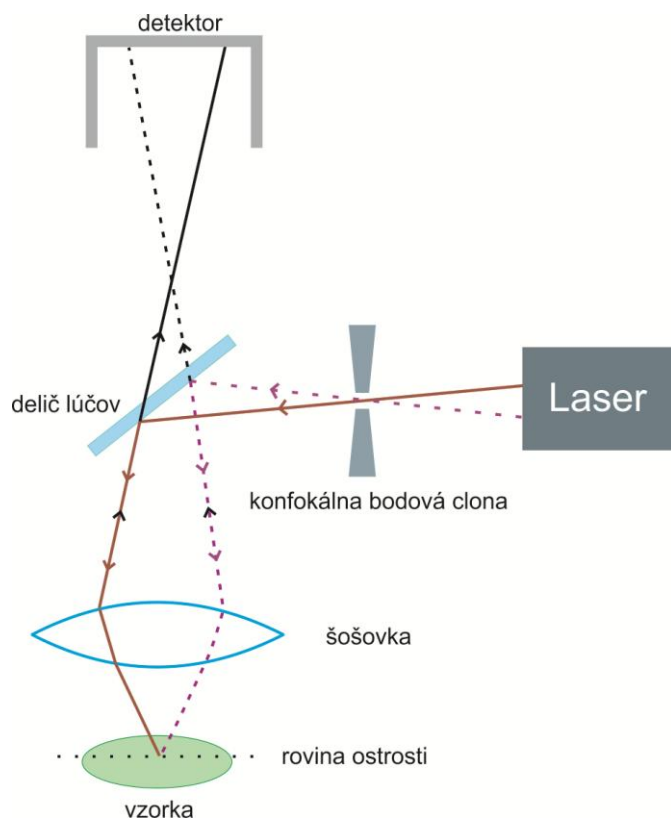
Vyhodnotenie: Určíme a zakreslíme zafarbené oblasti z preparátu - bunky, pletivá, prípadne rastlinné orgány. Vyhľadáme v literatúre informácie o miestach s najvyššou koncentráciou auxínu v rastline a odiskutujeme pozorované zafarbenie.

4.3.6 Konfokálna mikroskopia

Nedostatočné rozlíšenie objektu pri fluorescenčnej mikroskopii v minulosti neumožňovalo jednoznačné zobrazovanie mikroskopických štruktúr (obr. 16). Problém nízkeho rozlíšenia sa vyriešil objavom konfokálneho laserového skenovacieho mikroskopu (KLSM).

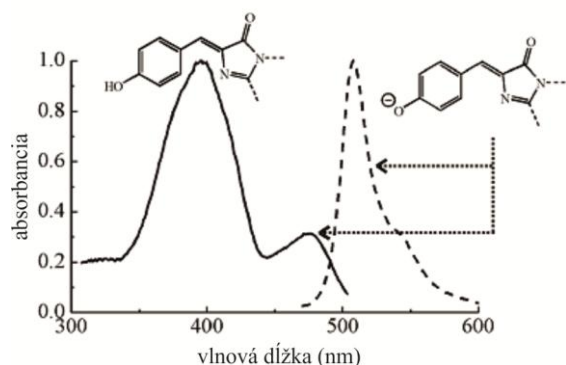


Obr. 16. Schematický obraz rozlíšenia toho istého rezu z objektu nasnímaný fluorescenčným mikroskopom (naľavo) a obraz z konfokálneho laserového skenovacieho mikroskopu (napravo).



Obr. 17. Schéma princípu KLSM. Šošovkou usmernený lúč svetla (laser) prechádza cez apertúru a delič lúčov odrazí iba svetlo žiadúcej vlnovej dĺžky smerom na objektív. Ostatné vlnové dĺžky cezeň prechádzajú s nezmeneným smerom. V šošovke objektívu sa lúče nasmerujú do jedného bodu vzorky a excitujú fluorofór vo vzorke. Emitované fluorescenčné svetlo voľne prechádza deličom lúčov až do detektoru, kde sa signál zachytí a následne softvérovo spracuje do podoby výsledného obrazu na monitore.

Základná sústava mikroskopu (obr. 17) obsahuje zdroj svetla (laser), sadu zrkadiel (delič lúčov), detektor a softvér. Tento mikroskop sníma fluorescenciu iba z určitého bodu jednej roviny – ohniska (bod, v ktorom sa zbiehajú svetelné lúče zo zdroja, t.j. je konfokálny), a nie z celej plochy ako je to u klasického fluorescenčného, teda umožňuje odfiltrovať nežiaducu fluorescenciu z vrstiev nad a pod rovinou ostrosti. Nasnímané body spája do rovín a tieto vrstvy (virtuálne rezy bez porušenia štruktúry objektu) je možné softvérovo zložiť a pozorovať objekty i v 3D a reálnom čase.



Obr. 18. Excitačné (plná čiara) a emisné (prerušovaná čiara) spektrum GFP štandardného typu. Štruktúra nad vrcholom je rôzne protónovanou formou chromofóru GFP (Tsien, 1998). Častejšie sa ale využívajú rôzne modifikácie štandardného GFP s pozmenenými spektrálnymi profilmi.

Pre *Arabidopsis* bol na základe DR5::GUS (Ulmasov *et al.*, 1997) konštruktu vytvorený DR5rev::GFP pozostávajúci z deviatich repetícií AuxRE (TGTCTC) sfúzaných v inverznej orientácii s CaMV minimálnym 35S promótorom (Friml *et al.*, 2003). GFP (Green Fluorescent Protein) sa po ožiarení svetlom určitej vlnovej dĺžky excituje, protonizuje a následne tento nestabilný stav vedie k deprotonizácii a emisii fluorescencie (obr. 18), ktorú zachytáva detektor mikroskopu.

Pomôcky: plastové Petriho misky hranaté, pH meter, miešadlo, magnetická miešačka, lyžička, navažovačky, lepiaca páska, parafilm, pinzeta, pipety, sterilné špičky, mikroskúmvky, skalpel, krycie a podložné sklička, konfokálny laserový skenovací mikroskop.

Materiál: semená *Arabidopsis thaliana* s GFP génom pod syntetickým promótorom DR5rev, upravené Murashige-Skoog (MS) médium, agar, sacharóza, 1N KOH, 1N HCl, DMSO, cytokinín (benzyladenín), auxín, kyselina giberelová, kyselina salicylová, 70% etanol, SAVO, detergent, sterilná destilovaná voda, 0,05% autoklávovaný agar, netkaná lepiaca páska, alobal.

Postup: Pripravíme si zásobné roztoky fytohormónov v DMSO, tak aby výsledná koncentrácia v médiu bola 0,1 μ M. Dbáme na to, aby koncentrácia DMSO vo finálnom médiu bola všade rovnaká. Médiá prichystáme podľa úlohy 4.1.1, po ochladení na 40°C v sterilnom boxe do nich pridáme adekvátne množstvo zásobného roztoku fytohormónu a nalejeme do misiek, aby médium stuhlo. Pripravíme si aj dve kontroly, jednu s DMSO a druhú bez DMSO. Vysterilizujeme si semená s vloženým DR5rev::GFP ponorením do 1ml 70% etanolu na 2 minúty a na 10 minút do 10 % roztoku SAVA s trochou detergentu. Semená trikrát prepláchneme sterilnou destilovanou vodou a pripipetujeme 0,05% autoklávovaný agar. Na takto pripravené médiá vysejeme vysterilizované semená *Arabidopsis* pomocou pipety so

sterilnými špičkami do jedného radu vo vrchnej časti misky s rozstupmi cca 5mm. Misky oblepíme netkanou lepiacou páskou, zabalíme do alobalu a uložíme na 3 dni do chladu a tmy. Stratifikované semená na miskách vyberieme do kultivačnej miestnosti (režim 16/8 svetlo/tma a 23°C) a po 7 dňoch pozorujeme pod mikroskopom koreňové špičky. Pripravíme natívny preparát koreňa v kvapke vody, nastavíme excitáciu na 484 nm a emisiu na 510 nm a pozorujeme. Pozorované objekty nafotíme.

Vyhodnotenie: Na snímkach koreňových špičiek s oblasťami fluorescencie určíme pletivá (bunky), kde je exprimovaný DR5rev::*GFP*. V odbornej literatúre pohl'adáme informácie ako vplývajú jednotlivé hormóny na auxín-responzívne gény a vyhodnotíme pozorované javy. Zhodnotíme anatomický i morfológický vzhľad rastlín a v literatúre nájdeme molekulárny mechanizmus účinku exogénne aplikovaných látok.

E. Literatúra

- ERDELSKÝ, K., FRIČ, F.: Praktikum a analytické metódy vo fyziológii rastlín. SPN Bratislava 1979
- FRIML, J., VIETEN, A., SAUER, M., WEIJERS, D., SCHWARZ, H., HAMANN, T., OFFRINGA, R., JURGENS, G. 2003: Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* **426**, 147-153.
- HASPELOVÁ - HORVATOVIČOVÁ, A.: Asimilačné farbivá v zdravej a chorej rastline. Veda Bratislava 1981
- CHOLVADOVÁ, B., ERDELSKÝ, K., MASAROVÍČOVÁ, E.: Praktikum z fyziológie rastlín. Univerzita Komenského, Bratislava 1999
- KLEINZELLER, A. a kol.: Manometrické metódy a jejich použitie v biológii a biochemii. SZN Praha 1964
- KOCÚRIK, Š.: Návod na cvičenia z fyziológie rastlín. UPJŠ Košice 1972, 1976
- LIU, Z.B., ULMASOV, T., SHI, X.Y., HAGEN, G., GUILFOYLE, T.J. 1994: Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell* **6**, 645-657.
- MIKEŠ, O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody. SNTL Praha 1980
- REPČÁK, M., ČERNAJ P.: Návod na cvičenia z fyziológie rastlín. UPJŠ Košice 1991. 88 s.
- REPČÁK, M., GREJTOVSKÝ A.: Návod na cvičenia z fyziológie rastlín. 2. preprac. vyd. UPJŠ Košice, 2002, 80 s.
- RIEFLER, M., NOVAK, O., STRNAD, M., SCHMULLING, T. 2006: Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* **18**, 40-54.
- TSIEN, R.Y. 1998: The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**, 509-544.
- ULMASOV, T., MURFETT, J., HAGEN, G., GUILFOYLE, T.J. 1997: Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**, 1963-1971.

Obsah

A. ÚVOD	3
B. BEZPEČNOSŤ A OCHRANA ZDRAVIA PRI PRÁCI	4
C. PRINCÍPY POUŽITÝCH CHEMICKÝCH A FYZIKÁLNO-CHEMICKÝCH METÓD	7
C.1 VÁŽENIE	7
C.2 ODSŤREĎOVANIE	7
C.3 MANOMETRICKÉ METÓDY	8
C.4 OPTICKÉ ANALYTICKÉ METÓDY	8
C.5 CHROMATOGRAFICKÉ METÓDY	12
C.6 SPRACOVANIE VÝSLEDKOV	16
D. NÁVODY K POKUSOM	19
1. ANALÝZA RASTLÍN	19
1.1 Stanovenie obsahu vody a sušiny v rastlinnom materiáli	19
1.2 SACHARIDY	19
1.2.1 Dôkazové reakcie sacharidov	19
1.2.2 Kvantitatívne stanovenie rozpustných cukrov podľa Bertranda	22
1.2.3 Stanovenie redukujúcich sacharidov podľa Somogyiho a Nelsona	23
1.2.4 Hydrolýza celulózy	24
1.2.5 Stanovenie sacharidov v rastlinných plodoch metódou HPLC	25
1.3 BIELKOVINY A ENZÝMY	26
1.3.1 Stanovenie aminokyselín ninhydrínovou metódou	26
1.3.2 Stanovenie prolínu v rastlinách podľa Batesa	27
1.3.3 Kvalitatívne reakcie zásobných bielkovín	28
1.3.4 Stanovenie rozpustných proteínov podľa Bradfordovej	31
1.3.5 Analýza rastlinných bielkovín pomocou polyakrylamidovej gélovej elektroforézy.	32
1.3.6 Stanovenie celkového dusíka Kjeldahlovou metódou	37
1.3.7 Dôkaz niektorých enzýmov v zemiakovej hľuže	38
1.3.8 Aktivita katalázy v závislosti od klíčivosti semien	39
1.3.9 Stanovenie aktivity nitrátreduktázy metódou <i>in vivo</i>	39
1.3.10 Stanovenie transferázovej aktivity glutamín syntetázy, závislosť jej aktivity od koncentrácie a od reakčného času	40
1.4 SEKUNDÁRNE METABOLITY	43
1.4.1 Dôkaz lignínu	43
1.4.2 Reakcie trieslovín	43
1.4.3 Stanovenie ergosterolu v lišajníkoch	44
1.4.4 Izolácia parietínu a stanovenie jeho obsahu použitím HPLC	46
1.4.5 Stanovenie obsahu silice destilačnou metódou	47
1.4.6 Delenie rumančekovej silice metódou TLC	48
1.4.7 Závislosť farby antokyánov od pH	49
2 VODNÝ REŽIM A MINERÁLNA VÝŽIVA	50
2.1 Semipermeabilita živých buniek	50
2.2 Stanovenie transpirácie Ivanovovou vážkovou metódou	50
2.3 Meranie osmotického potenciálu rastlinných pletív	51
2.4 Dôkaz kationov v rastlinnom popole	53
2.5 Dôkaz aniónov v rastlinnom popole	54
2.6 Stanovenie rýchlosti príjmu dusičnanov meraním ich úbytku z príjmového roztoku	55
2.7 Obsah dusičnanov v pletivách	56

2.8 Stanovenie množstva fosfátov v povrchových vodách	57
2.9 Obsah fosfátov v pletivách	57
2.10 Stanovenie pH reakcie pôdy a dostupnosť hliníka	58
2.11 Sledovanie obsahu hliníka v koreňoch rastlín	60
2.12 Meranie obsahu uhličitanov metódou titrácie	60
3 FOTOSYNTÉZA A DÝCHANIE	61
3.1 Delenie asimilačných pigmentov pomocou tenkovrstvovej chromatografie	61
3.2 Spektrofotometrické stanovenie chlorofylu <i>a</i> a <i>b</i>	62
3.3 Stanovenie asimilačných pigmentov v lišajníkoch	63
3.4 Stanovenie fluorescence chlorofylu <i>a</i> v listoch vyšších rastlín	65
3.5 Stanovenie fluorescence chlorofylu <i>a</i> v machorastoch a lišajníkoch	66
3.6 Spotreba kyslíka pri dýchaní semien	67
4 RAST A VÝVIN	68
4.1 PESTOVANIE POKUSNÝCH RASTLÍN	68
4.1.1 Pestovanie rastlín na pevných <i>in vitro</i> médiách	68
4.1.2 Stanovenie viability rias použitím farbiva trypanová modrá	70
4.2 KLÍČENIE	70
4.2.1 Klíčivosť malých semien	70
4.2.2 Klíčenie semien v miskách s trvalým zavlažovaním	71
4.2.3 Stanovenie klíčivosti redukciou tetrazoliovej soli	71
4.2.4 Stratifikácia semien	72
4.3 HORMÓNY	73
4.3.1 Biotest na subapikálnych segmentoch koleoptíl pšenice	73
4.3.2 Cytokinínový biotest na oddial'ovanie senescencie listov	74
4.3.3 Apikálna dominancia	76
4.3.4 Prejavy polarity na výhonkoch vřby	77
4.3.5 Histochemický test aktivity β -glukuronidázy v <i>Arabidopsis thaliana</i>	78
4.3.6 Konfokálna mikroskopia	80
E. LITERATÚRA	83

Návody na cvičenia z fyziológie rastlín

Vysokoškolské skriptá

Autori: doc. RNDr. Peter Paľove-Balang, PhD.,
prof. RNDr. Miroslav Repčák, DrSc.,
prof. RNDr. Martin Bačkor, DrSc.,
Mgr. Silvia Gajdošová, PhD.,

Recenzent: Mgr. Veronika Zelinová, PhD., Botanický ústav SAV, Bratislava

Rozsah strán: 85

Rozsah AH: 4

Vydanie: 4. prepracované vydanie

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Umiestnenie: <http://unibook.upjs.sk/predaj-vydanych-titulov/prirodovedecka-fakulta>

Dostupné od: 11.02.2015

ISBN 978-80-8152-233-8