Laboratórne cvičenie č. 7

**Vypracoval:** Samuel Nalevanko

**Odbor:** 2FBb

**Školský rok:** 2018/19

**Predmet:** Fyziológia rastlín

**Cvičiaci**: RNDr. Michal Goga, PhD.

**Cvičenie dňa:** 4. 4. 2019

**Názov témy: Hormóny**

**Úlohy:**

**A.) Cytokinínový biotest na oddiaľovanie senescencie listov**

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

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

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

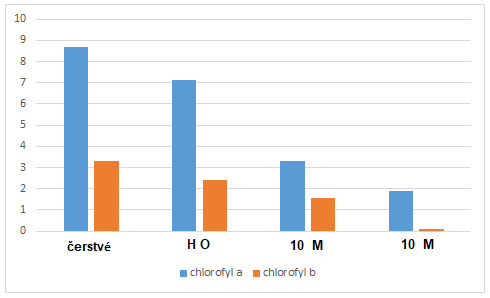
***Postup:***

* navážime 1mg BA na hodinové sklíčko
* BA rozpustíme v 0.2ml 0.1M NaOH tak, aby neobsahoval zrazeniny
* vypočítame objem rozpúšťadla nevyhnutného na prípravu zásobného roztoku smolaritou 5mM
* roztok prelejeme do uzatvárateľnej nádoby a zneutralizujeme 0.2ml 0.1M HCl
* do troch skúmaviek napipetujeme 1ml dest. vody, 1ml 5mM BA a 1ml 0.05mM BA
* odrežeme listové čepele, odvážime ich a ponoríme do rotozku
* uzavrieme skúmavky a vložíme do termostatu s teplotou 25°C a inkubujeme 7 dní v tme
* odoberieme listy na extrakciu chlorofylu, aby sa vedel obsah fotosyntetického pigmentu na začiatku experimentu
* listy rozotrieme na morskom piesku v 2ml 80% acetónu
* extrakt prefiltrujeme do kalibrovanej skúmavky a doplníme ju 80% acetónom do 4ml
* obsah vyextrahovaného chlorofylu stanovíme spektrofotometricky
* odmeriame absorbanciu pri 663, 646 a 750nm, zohľadníme šum vo výpočtoch, pretože skresľuje výsledky
* po týždni inkubácie sa skúmavky vyberú a spektrofotometricky sa stanoví obsah chlorofylu
* získané výsledky sa vynesú do grafu

***Výpočet na prípravu 5·10-4M a 5·10-6M roztoku BA***

*Pre prípravu 5·10-6M roztoku odoberieme 100μl z 5·10-4M roztoku a dolejeme do 1ml destilovanou vodou.*

**Záver**



|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |