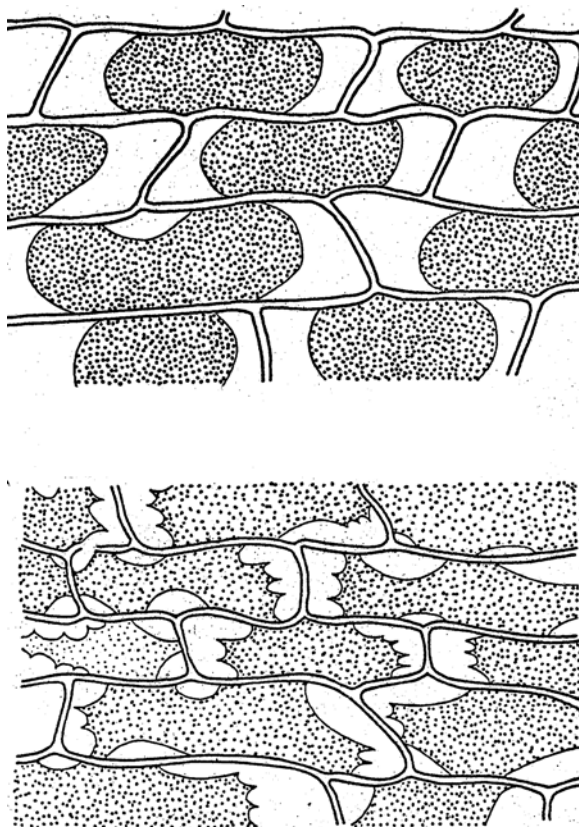


CVIČENÍ 1: VLASTNOSTI ROSTLINNÉ BUŇKY

Pokus č. 1: Stanovení osmotického potenciálu buněčné šťávy metodou hraniční plazmolýzy

Hodnotu osmotického tlaku roztoku buněčné šťávy lze vypočítat podle Van't Hoffa z rovnice $p = R \cdot T \cdot c \cdot i$ na základě zjištění koncentrace buněčné šťávy (c). Tu zjistíme pomocí metody hraniční plazmolýzy, kterou vyvoláme plazmolytikem (např. roztokem sacharózy), jehož koncentrace je jen o málo vyšší než je koncentrace buněčné šťávy.

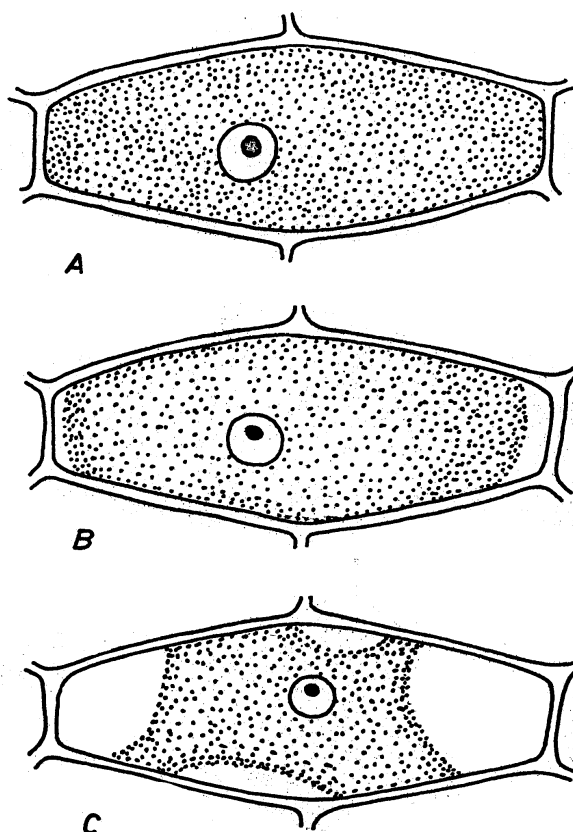


Obr. č. 1.1

Konvexní plazmolýza (nahore) a konkávní plazmolýza (dole) v buňkách pokožky cibule

K pokusu použijeme jako materiál lístky hydrofytního vodního moru (*Elodea densa*), hygroytního měříku (*Mnium sp.*) a nebo epidermis vnitřní suknice cibule kuchyňské (*Allium cepa L.*) patřící mezi mezofyta.

Do 6 menších epruvet odpipetujeme po 5 ml následujících roztoků: 0.2M, 0.3M, 0.4M, 0.5M, 0.6M a 0.7M sacharózy. Epruvety řádně označíme a do každé ponoříme dva lístky měříku nebo vodního moru čerstvě odtržené od lodyžky (asi 0.5 cm² epidermis suknice cibule). Epruvety uzavřeme hliníkovými víčky, abychom zabránili změně koncentrace vlivem odpařování roztoků. Pletivo ponecháme v roztocích 60 min. Po této době lístky (epidermis) vyjmeme a přeneseme s kapkou příslušného roztoku na podložní sklíčko. Po překrytí krycím sklíčkem pozorujeme preparát pod mikroskopem. Při



Obr. č. 1.2

Průběh plazmolýzy v buňkách pokožky *Zebrina pendula*, B - hraniční plazmolýza

mikroskopování postupujeme od nejvyšší koncentrace k nejnižší. Protože k nejrychlejší výměně roztoků dochází v okolí poraněných buněk, sledujeme nejprve stav buněk v okolí místa odtržení lístku od lodyžky. Stav buněk zakreslíme pro varianty s nejvyšší (0,7 M) a nejnižší (0,2 M) koncentrací. Stupeň plazmolýzy buněk pletiv ponořených do jednotlivých roztoků zaznamenáme schematicky do tabulky. Variantám, kde jsou všechny buňky plazmolizované, přiřadíme „*ano*“ variantám, kde není žádná buňka plazmolizovaná, přiřadíme „*ne*“. Variantě, kde došlo k plazmolýze jen některých buněk, přiřadíme „*částečně*“. Hledaná koncentrace *c*, při níž dochází k hraniční plazmolýze, je nejvyšší koncentrace roztoku označeného výrazem „*ne*“.

Výpočet:

$$p = R \cdot T \cdot c \cdot i$$

R je molární plynová konstanta 8314 pro plyny i kapaliny [$\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{kmol}^{-1}$]

T je absolutní teplota v Kelvinech ($273 + \text{teplota místnosti v } ^\circ\text{C}$)

c je molární koncentrace roztoku, který vyvolává hraniční plazmolýzu (pro přesnější výpočet lze použít střední hodnotu mezi roztokem, který vyvolal hraniční plazmolýzu a roztokem, ve kterém ještě k plazmolýze nedošlo) [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]

i je disociační koeficient (pro sacharózu a ostatní neelektrolyty se rovná jedné)

p je osmotický tlak buněčné šťávy v pascálech [Pa]

Poznámka:

$$1 \text{ Pa} = \text{N} \cdot \text{m}^{-2} = 9.869232 \cdot 10^{-6} \text{ atm}$$

$$1 \text{ MPa (megapascal)} = 10^6 \text{ Pa}$$

Úkol: Zakreslete buňky měříku (epidermis cibule) ve stadiu pokročilé plazmolýzy a buňky normální.

Vypočítejte osmotický tlak buněčné šťávy (*p*) v megapascálech a převedte na osmotický potenciál Ψ_s .

Kontrolní otázky:

Vysvětlete, co je osmotický potenciál, plazmolýza a plazmoptýza. Jaký je vztah mezi osmotickým potenciálem a vodním potenciálem? Jakých hodnot nabývá vodní potenciál v rostlinných pletivech? Jaký je rozdíl mezi osmotickým tlakem a osmotickým potenciálem? Proč ve většině rostlinných buněk nedochází k plazmoptýze?

Pokus č. 2: Porušení integrity buněčných membrán vlivem vysoké teploty

Připravíme 10 ks výkrojků pletiva z bulvy červené řepy (*Beta vulgaris L.*) o tloušťce asi 5 mm a průměru 8 mm. Výkrojky vložíme do kádinky a důkladně opereme pod tekoucí vodovodní vodou (asi 5

min), abychom z poraněných buněk odstranili volně unikající barvivo. Do 5 zkumavek odpipetujeme po 10 ml destilované vody a do každé vložíme dva výkrojky z bulvy červené řepy. Zkumavky sepne gumičkou, vložíme do regulovatelné vodní lázně a začneme zahřívat. Od dosažení hodnoty 40 °C odebíráme vždy jednu zkumavku a teplotu lázně zvýšíme o 10 °C. Teplotu zvyšujeme v desetiminutových intervalech na 50, 60, 70 a 80 °C. Každou zkumavku, kterou vyjmeme z vodní lázně, označíme tužkou na sklo (popisovačem). Po vychladnutí a jednominutovém protřepání změříme na spektrofotometru při vlnové délce 535 nm světelnou propustnost (transmitanci) roztoků. Výsledky měření zaznamenejme do tabulky a sestrojíme křivku transmitancí (na osu y nanášíme transmitanci v %, na osu x teplotu). Z křivky stanovíme teplotu, při níž došlo k porušení membrán.

Úkol: Z grafického vyjádření určete teplotu (°C), při které došlo k porušení plazmalemy, a podejte vysvětlení.

Kontrolní otázky:

Co to je transmitance? V jakých jednotkách ji měříme? Jak je definována nulová transmitance? Jaké faktory mohou ovlivňovat zbarvení roztoku ve zkumavce?

Pokus č. 3: Význam cukrů jako ochrany protoplazmy při nízkých teplotách

Z obecné praxe je známo, že rostlinná pletiva s vysokým obsahem cukrů v buněčné šťávě jsou odolnější proti nízkým teplotám než pletiva nebo orgány s relativně nízkým obsahem těchto látek. Buněčná šťáva vytlačená rostlinou mrzne až několik stupňů pod nulou. Snížení bodu mrznutí závisí na její koncentraci. Vložíme-li tkáň do hypertonického roztoku plazmolytika (sacharózy), snížíme obsah vody ve vakuole (zvýší se koncentrace buněčné šťávy), takže v případě promrznutí pletiva nedochází k mechanickému porušení buňky v důsledku vytvořených ledových krystalů uvnitř buňky.

Do 3 označených zkumavek odpipetujeme po 10 ml následujících roztoků - dest. voda, 0.5 M a 1.0 M roztok sacharózy. Připravíme 6 výkrojků z červené řepy (viz pokus č. 1.2), opereme a po dvou vložíme do každé ze zkumavek. Zkumavky vložíme do mrazničky s teplotou -21 °C na dobu 40 minut. Potom zkumavky vyjmeme a necháme roztát. Během tání obsah zkumavky několikrát důkladně protřepeme. Měříme transmitanci roztoků na kolorimetru při vlnové délce 535 nm. Uvolnění antokyanu z vakuol do vnějšího roztoku je důkazem ztráty selektivní permeability membrán.

Úkol: Zaznamenejte naměřené hodnoty propustnosti a vysvětlete ochranný význam roztoku sacharózy při nízkých teplotách.

Kontrolní otázky:

V pokuse jsme ponořili pletivo červené řepy do roztoku osmoticky aktivní látky - sacharózy. Do jakých částí pletiva či buněk sacharóza proniká? Jaká je úloha osmózy v ochraně buněčného obsahu před poškozením mrazem?