



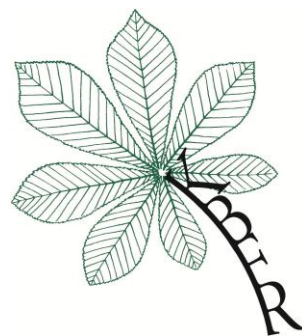
Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra botaniky a fyziologie rostlin**

**Vybrané experimenty z fyziologie  
rostlin  
(doplňěk k Pracovnímu sešitu  
z fyziologie rostlin)**

**Helena Hniličková, Václav Hejnák,  
František Hnilička, Jaroslava Martinková**



**2012**

## OBSAH

Obsah .....	2
1. Úvod .....	3
2. Stanovení vodního potenciálu kompenzační metodou v kapalně fázi refraktometricky .....	4
3. Konduktometrické stanovení poškození buněk působením stresových faktorů.....	8
4. Účinek auxinu, giberelinu a cytokininu na tvorbu adventivních kořenů.....	10
5. Pozorování spojitého spektra viditelného záření a stanovení absorpčních spekter chlorofylů a karotenoidů na ručním spektroskopu .....	13

## 1. ÚVOD

Následující experimenty z fyziologie rostlin slouží jako doplněk ke skriptům Cvičení z fyziologie rostlin (pracovní sešit) pro studenty předmětu Základy fyziologie rostlin a Fyziologie rostlin, případně studenty předmětu Základy růstu a vývoje rostlin.

Popisované experimenty sestávají z teoretické části, která vysvětluje použité metody a definuje základní pojmy a praktické části, kde je popsán postup vlastního experimentu. Následují předtištěné tabulky a volný prostor pro výpočty, grafy a závěr experimentu. V závěru každého experimentu jsou kontrolní otázky pro shrnutí probíraného tématu.

Zpracování těchto studijních materiálů, včetně pořízení některých přístrojů používaných při uskutečnění vybraných experimentů, bylo financováno prostřednictvím projektu Fondu rozvoje vysokých škol č. 1637/2012/F4/a: „Inovace výuky předmětu Základy fyziologie rostlin“.

## 2. Stanovení vodního potenciálu kompenzační metodou v kapalně fází refraktometricky

Základem **kompenzačních metod stanovení vodního potenciálu** rostlinného pletiva je hledání roztoku o známém osmotickém potenciálu, který se rovná vodnímu potenciálu měřeného pletiva a tedy je s ním izotonický.

Jednou z kompenzačních metod stanovení vodního potenciálu je **refraktometrická metoda** založená na změně koncentrace řady roztoků sacharózy o známé molaritě v důsledku probíhající plazmolýzy či deplazmolýzy vloženého rostlinného pletiva. Změny koncentrace měříme pomocí **indexu lomu** roztoku sacharózy na digitálním **refraktometru**.

**Refraktometrie** je optická metoda analytické chemie, založená na měření indexu lomu světla. Dopadne-li paprsek světla na rozhraní dvou fází, může se buď odrazit (tzv. reflexe), nebo zlomit (tzv. refrakce). Úhly dopadu, odrazu i lomu se měří mezi paprskem a kolmicí spuštěnou na fázové rozhraní.

Paprsek se láme v důsledku rozdílné rychlosti světla v obou fázích. Pokud paprsek dopadá do fáze, ve které je rychlost světla nižší oproti původní fázi, je úhel lomu menší než úhel odrazu (tzv. lom ke kolmici), v opačném případě nastává lom od kolmice.

Index lomu je poměr rychlosti světla ve fázích, kterými světlo prochází. Aby bylo možné porovnávat látky podle jejich indexu lomu, volí se shodné prostředí, ze kterého paprsek dopadá (ideálním prostředím je vakuum, v praxi se používá vzduch).

Průchod světla rozhraním dvou prostředí o indexech lomu  $n_1$  a  $n_2$  se řídí Snellovým zákonem.

Vzhledem k tomu, že relativní index lomu vzduchu je roven 1, vztah se používá ve zkrácené formě:

$$n = \sin \alpha / \sin \beta$$

U refraktometrické metody je nutné naměřené výsledky vztahovat na hodnotu koncentrace, vypočítané podle indexu lomu na počátku každého měření. Protože po vnoření měřeného pletiva do osmotika mohou nastat změny v jeho koncentraci způsobené výtokem buněčného roztoku na řezných plochách apod., je vhodné jako výchozí hodnotu pro stanovení změn použít index lomu kapky roztoku, kterou odebereme po vložení materiálu a promíchání.

**POSTUP:** Z listových čepelí fazolu, rajčete, bobu apod. vysekáme korkovrtem 11 paralelních vzorků (viz obr. 1) terčů po 10 ks v každém vzorku. Terče vložíme do plastových mikrozkušavek s víčkem (2 ml). Do 11 zkumavek odpipetujeme po 1 ml roztoků sacharózy v odstupňovaných koncentracích od 0 do 1 mol.l<sup>-1</sup>, promícháme opatrně plastovou tyčinkou a ihned měříme počáteční index lomu ( $n_0$ ) refraktometrem (viz návod k obsluze digitálního refraktometru) a zkumavky uzavřeme víčkem.

Po hodinové expozici roztoky ve zkumavkách opět promícháme čistou plastovou tyčinkou a opět změříme indexy lomu ( $n_1$ ). Hodnoty molárních koncentrací roztoků sacharózy, indexů lomu na počátku pokusu ( $n_0$ ) a indexů lomu po expozici ( $n_1$ ) a rozdíl indexů lomu na konci a na počátku pokusu ( $n$ ) zaneseme do tabulky. Zjištěné rozdíly indexů lomu ( $n$ ) vyneseme do grafu jako funkci koncentrace (obr. 2). Získanými body v grafu proložíme regresní přímkou, jejíž průsečík s osou x (tj. s hladinou nulové změny) udává izotonickou koncentraci, tj. koncentraci buněčné šťávy ( $c$ ) vyjádřenou v mol.l<sup>-1</sup>. Hodnotu osmotického potenciálu  $\Psi_s$  vypočítáme z Van't Hoffovy rovnice. Ze známé závislosti vodního a osmotického potenciálu určíme hodnotu vodního potenciálu  $\Psi_w$ .

**Úkoly:**

1. Sestrojte graf závislosti změn indexu lomu na molaritě osmotického roztoku sacharózy.
2. Stanovte hodnotu vodního potenciálu proměřovaného rostlinného pletiva.
3. Stanovte hodnotu osmotického potenciálu  $\Psi_s$  vypočtem z Van 't Hoffovy rovnice.

**Výsledky:**

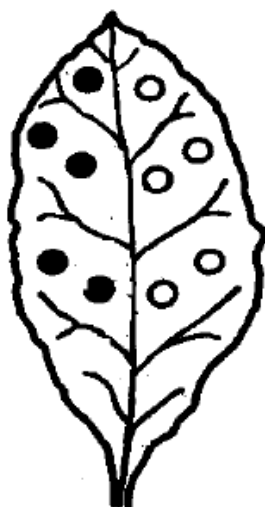
Tabulka:

	Molární koncentrace sacharózy ( $\text{mol.l}^{-1}$ )										
index lomu	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
$n_0$											
$n_1$											
$n$											

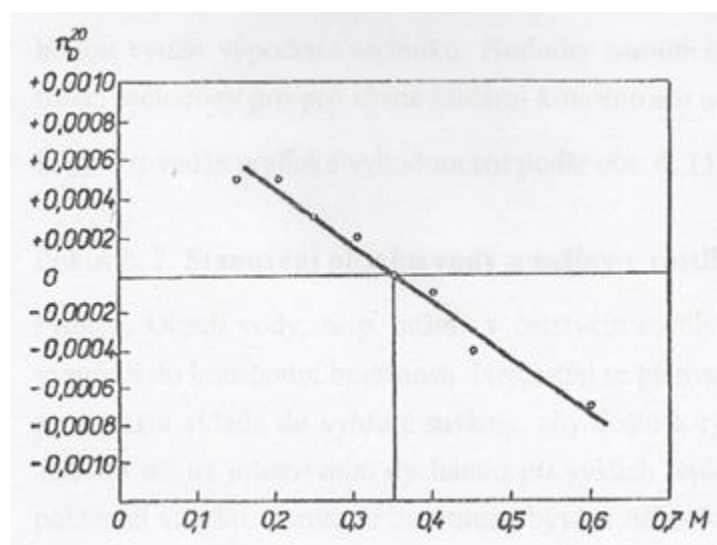
Graf:

Výpočet:

Závěr:



Obr. 1: Způsob paralelního odběru terčičků z listu.



Obr. 2: Graf závislosti změn indexu lomu na molaritě osmotických roztoků (Slavík et al., 1965).

Tabulka 1: Refrakce a osmotický potenciál pro různé molární koncentrace sacharózy při 20 °C.

koncentrace sacharózy mol dm <sup>-3</sup>	refrakce n <sub>0</sub>	osmotický potenciál			
		atm	bar	MPa	J kg <sup>-1</sup>
0,00	1,3330	0,00	0,00	<b>0,000</b>	0
0,05	1,3355	-1,20	-1,22	<b>-0,122</b>	-122
0,10	1,3379	-2,65	-2,68	<b>-0,268</b>	-269
0,20	1,3428	-5,27	-5,34	<b>-0,534</b>	-534
0,30	1,3476	-8,14	-8,25	<b>-0,825</b>	-826
0,40	1,3525	-11,12	-11,27	<b>-1,127</b>	-1129
0,50	1,3574	-14,10	-14,51	<b>-1,451</b>	-1432
0,60	1,3623	-17,81	-18,05	<b>-1,805</b>	-1808
0,70	1,3672	-21,47	-21,75	<b>-2,175</b>	-2179
0,80	1,3720	-25,54	-25,88	<b>-2,588</b>	-2601
0,90	1,3769	-29,70	-30,09	<b>-3,009</b>	-3014
1,00	1,3816	-34,60	-35,06	<b>-3,506</b>	-3512

### Kontrolní otázky:

1. Jakými způsoby můžeme vyjádřit vodní stav v rostlinách?
2. Charakterizujte jednotlivé složky vodního potenciálu.
3. Jakými metodami lze stanovit hodnotu vodního potenciálu rostlinných pletiv?
4. Jak stanovíme osmotický tlak buněčné šťávy?

### 3. Konduktometrické stanovení poškození buněk působením stresových faktorů.

Rostlinná buňka je tvořena buněčnou stěnou a protoplastem. Protoplast obsahuje cytoplazmu, v níž je jádro a ostatní buněčné orgány. Z vnějšku je protoplast ohraničen plazmatickou membránou (plazmalemou). Kromě cytoskeletu, cytoplazma obsahuje nestrukturální základní substanci - cytozol, ve kterém jsou orgány a membránová soustava rozptýleny. Cytosol je tvořený zejména vodou, proteiny, signálními molekulami a ionty. Tím, že řada rozpuštěných komponent má náboj, působí jako elektrolyt. Při porušení **semipermeability plazmalemy** (polopropustnosti) v důsledku působení stresových faktorů (teplo, mráz, chemické látky apod.), dochází k uvolnění cytosolu do mezibuněčného prostoru, odkud se dá snadno vytřepat do destilované vody. Změřením její vodivosti můžeme stanovit relativní míru poškození buněk.

K měření vodivosti roztoku se používá **konduktometrie**. Tu můžeme definovat jako elektroanalytickou metodu definující elektrické vlastnosti analyzovaného roztoku. Principem konduktometrického stanovení poškození rostlinného pletiva je stanovení množství vyteklého elektrolytu změření jeho vodivosti a porovnání s nepoškozeným rostlinným pletivem.

**POSTUP:** Z bulvy červené řepy (*Beta vulgaris sp.*) pomocí korkovrtu o průměru 5 mm vykrájíme potřebný počet 2 cm dlouhých válečků. Výkrojky důkladně promyjeme pod tekoucí studenou vodou, abychom z poraněných buněk odstranili volně unikající buněčný roztok.

Do očíslovaných zkumavek 1–4 vložíme po 2 výkrojcích rostlinného materiálu a pokus založíme podle následujícího schématu:

Zkumavka č.:	1	2	3	4
	5 ml dest. Vody	5 ml dest. Vody	5 ml 30% kyseliny octové	5 ml dest. Vody
Varianta	Kontrola – bez zásahu	1 minuta varu	15 minut působení chemické látky	20 minut působení mrazu

Varianta 1: Po vložení výkrojků do destilované vody, změřte hodnotu vodivosti destilované vody a údaj zanepte do tabulky.

Varianta 2: Zkumavku opatrně zahřejeme nad kahanem, přivedeme k varu a povaříme.

Varianta 3: Kyselinu octovou necháme působit po dobu 15 minut, poté lehce výkrojky propláchneme, aby se odstranil zbytek kyseliny octové a vložíme je do 5 ml destilované vody.

Varianta 4: Zkumavku vložíme do mrazicího boxu po dobu 20 minut. Potom zkumavky vyjmeme a necháme pomalu roztát.

Po uběhnutí času, po který byly zkumavky příslušných variant vystaveny působení stresových faktorů, vložíme zkumavky do třepačky a po dobu 20 minut necháme třepat (návod na provoz třepačky viz manuály k obsluze laboratorních přístrojů).



### Úkoly:

1. Porovnejte vizuálně a popište rozdíly v zabarvení roztoku u jednotlivých variant a uveďte, u kterých variant došlo k porušení semipermeability.
2. Pomocí konduktometru změřte vodivost elektrolytu (destilované vody) v jednotlivých zkumavkách. Naměřené údaje zanepte do tabulky.
3. Podle hodnot naměřené vodivosti stanovte u jaké varianty pokusu došlo k největšímu poškození membrán v důsledku působení stresového faktoru.

### Výsledky:

Tabulka:

Zkumavka	1	2	3	4
Vodivost na počátku pokusu		-	-	-
Vodivost po působení stresu				

### Závěr:

### Kontrolní otázky:

1. Vysvětlete pojem semipermeability plazmalemy.
2. Jaké znáte abiotické stresové faktory?
3. Jakým způsobem dochází k poškození membrán?
4. Popište princip odolnosti buněk vůči nízkým teplotám, uveďte příklad.

## 4. Účinek auxinu, gibberelinu a cytokininu na tvorbu adventivních kořenů

**Fytohormony** jsou endogenní růstové regulátory, které jsou účinné ve velmi nízkých koncentracích, ve stopových množstvích ( $< 1 \text{ mmol l}^{-1}$ , často i  $< 1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ ). Vyvolávají biochemické, fyziologické a morfologické reakce buď přímo v orgánu svého vzniku, nebo v místech, kam jsou transportovány vodivými pletivami či difúzí. Patří k nim především **auxiny**, **cytokininy**, **gibbereliny**, **kyselina abscisová** a **etylén**. Stimulační růstové vlivy jsou přitom spojeny především s nízkými koncentracemi auxinu, s cytokininy a gibbereliny, inhibiční vlivy pak hlavně s kyselinou abscisovou, s etylénem a s vyššími koncentracemi auxinu.

Auxiny se tvoří především ve vegetačním vrcholu a v nejmladších listech, v kambiu a v oplozeném vajíčku. V rostlině se pohybují výrazně polárně, od vrcholu k bázi. Podporují především prodlužování buněk, vznik partenokarpických plodů, zakořeňování řízků, hrají důležitou roli v apikální dominanci (nadvládě vrcholu) atd. Ve vyšších koncentracích působí na rostliny toxicky.

Cytokininy jsou tvořeny především v kořenech, odkud se pohybují polárně do nadzemních částí rostliny. Cytokininy vytvářené pupeny se pohybují polárně směrem ke kořenům. Mají široké spektrum účinků. Jsou nezbytné pro dělení buněk, ruší apikální dominanci vrcholu stonku, zpomalují stárnutí listů apod.

Gibbereliny jsou produkovány především kořeny, nejmladšími listy a semeny. Transport probíhá obousměrně, často ke zdroji auxinu. Gibbereliny podporují prodlužování buněk, prodlužovací růst stonků, přerušují dormanci (odpočinek rostlin), indukují syntézu enzymu  $\alpha$ -amylázy v aleuronové vrstvě klíčících obilíků atd. Ve vyšších koncentracích nepůsobí na rostliny toxicky.

Zakládání **laterálních a adventivních kořenů** lze stimulovat vlivem auxinů. Tvorba těchto kořenů v dolní části stonkových řízků souvisí s hromaděním auxinu při jeho polárním transportu. Pro tento účel lze užít kyselinu indolyl-3-octovou (IAA), a nebo  $\alpha$ -naftyloctová kyselina (NAA) a indolyl-3-máselná kyselina (IBA), které jsou stabilnější a nerozkládají se na světle tak rychle jako IAA. Stimulační efekt auxinů se projevuje na začátku iniciace kořenů a v časných stádiích jejich vývoje.

**POSTUP:** Účinek vybraných regulátorů (IAA, BA, GA) růstu ověříme u 10 dní starých klíčících rostlin fazolu obecného nebo hrachu setého. Rostlinám fazolu, rostoucím ve skleníku v agropertlitu odstraníme kořeny odříznutím na bázi hypokotylu. Rostliny umístíme po třech do kultivačních nádobek tak, aby řeznou plochou byly ponořeny v roztoku fytohormonu v nádobce. V nádobkách budou roztoky IAA, BA, GA v koncentracích  $10^{-4}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$ , jako kontrola bude použita destilovaná voda. Nádobky s rostlinami ponecháme na světle při laboratorní teplotě a za 1 týden měříme počet, délku a hmotnost kořenů.

### Úkoly:

1. Porovnejte vizuálně a popište rozdíly v tvorbě adventivních kořenů v závislosti na druhu a koncentraci použitých fytohormonů.
2. Změřte délku vytvořených adventivních kořenů a stanovte jejich hmotnost.
3. Navrhněte tabulku, do které zaznamenejte naměřené hodnoty a získané výsledky zpracujte graficky.

**Výsledky:**

Popis a nákres:

Tabulka:

**Graf:**

**Závěr:**

**Kontrolní otázky:**

1. Vysvětlete pojem regulátory rostlinného růstu?
2. Jaké znáte rostlinné fytohormony?
3. Které fytohormony ovlivňují zakládání adventivních kořenů?

## 5. Pozorování spojitého spektra viditelného záření a stanovení absorpčních spekter chlorofylů a karotenoidů na ručním spektroskopu

Viditelné světlo o vlnových délkách 400 - 700 nm je ta část spektra, na kterou je citlivé lidské oko. Tato část elektromagnetického spektra se také označuje jako **světelné spektrum**. Jednotlivé barvy, vyskytující se ve světelném spektru se nazývají **spektrálními barvami** a odpovídají jim určité intervaly vlnových délek elektromagnetického záření. Fialové světelné záření má vlnovou délku asi 380 až 425 nm, modré 425 až 490 nm, modrozelené 490 až 510 nm, zelené 510 až 550 nm, žluté 550 až 585 nm, oranžové 585 až 640 nm, červené 640 až 700 nm a dlouhovlnné červené 700 až 780 nm. Do výše uvedené oblasti viditelného záření spadá i radiační energie elektromagnetického záření, které využívají zelené rostliny pro průběh fotosyntetických procesů. Toto fotosynteticky účinné záření se označuje jako **fotosynteticky aktivní radiace (FAR)**.

Dopadem světelných paprsků na optický hranol dochází k jejich lomu a rozkladu na jednotlivá spektra, která lze pozorovat pomocí spektroskopu.

**Spektroskopie** je fyzikální obor zabývající se vznikem a vlastnostmi spekter. Je to metoda založená na interakci elektromagnetického záření se vzorkem. Zakladatelem spektroskopie je sir Isaac Newton, který pomocí optického hranolu objevil monochromatické světlo. První spektroskop vytvořili Kirchhoff a Bunsen a v roce 1860.

**Spektroskop** je přístroj pro rozkládání viditelného světla na jednotlivé složky a jejich vizuální pozorování. Skládá se z kolimátoru se štěrbinou, disperzního prvku (hranol, mřížka) a objektivu spojeného s dalekohledem. Kolimátor vytváří z rozbíhavých paprsků zkoumaného světla paprsky rovnoběžné, které dopadají na disperzní prvek, který zkoumané světlo rozkládá na spektrum. Dalekohled umožňuje podrobnější zkoumání vzniklého spektra.

Prochází-li bílé světlo skrze kapalinu, dochází k vzniku absorpčního spektra. Absorpční spektrum lze pozorovat např. na ručním spektroskopu.

Důležitou podmínkou fotosyntézy jsou fotosyntetické pigmenty. Jsou přítomny v zelených částech rostlin v chloroplastech a mají funkci fotoreceptorů. Nejdůležitějšími fotosyntetickými pigmenty jsou **chlorofyly**. U vyšších rostlin chlorofyl **a** a chlorofyl **b**. Jejich poměr je asi 3 : 1, není však stálý. Chlorofyly absorbují fialové a modré světlo s maximem mezi 440 a 480 nm a oranžovočervené světlo s maximem mezi 650 a 680 nm. Prakticky vůbec nepohlcují zelenou část spektra. Absorpční spektra mají mírně posunutá, takže se v uvedených částech spektra velice dobře doplňují. Chlorofyl **a** je nezbytný pro vlastní přeměnu energie ve fotosyntéze. Ostatní pigmenty mají jen pomocnou funkci, protože zachycují dopadající záření a energii svého excitovaného stavu předávají na chlorofyl **a**.

Funkci fotoreceptorů plní u vyšších rostlin také **karotenoidy**. Jsou to fotosyntetické pigmenty žluté, oranžové a červené barvy. Dělí se na bezkyslíkaté karoteny a kyslíkaté xantofyly. Tato pomocná fotosyntetická barviva absorbují světelné záření o vlnových délkách od 400 do 520 nm, tedy fialové a modré až modrozelené, a zachycená světelná energie je potom přenesena na chlorofyly, kde se využije v procesu fotosyntézy. Z karotenů se v listech vyšších rostlin nejčastěji vyskytuje  $\beta$ -karoten, z xantofylů pak violaxantin, lutein a zeaxantin. Bývají rovněž částečně vázány na bílkoviny. Jsou to doplňkové pigmenty, které ovšem také chrání fotosyntetický aparát před nevratnou fotooxidací.

Fotosyntetické pigmenty jsou převážně málo polární a rozpouštějí se tudíž velmi dobře i v málo polárních nebo téměř nepolárních organických rozpouštědlech (benzen, petroléter). Chceme-li je ale uvolnit z thylakoidních membrán (např. pro jejich spektrofotometrické stanovení), musíme použít silně polární organické rozpouštědlo. Nejčastěji se používá aceton nebo metanol.

K pozorování absorpčních spekter využijte acetonový extrakt fotosyntetických pigmentů připravený z listového pletiva vybraných rostlin a roztoky chlorofylínů a karotenoidů vzniklé separací acetonového extraktu pomocí petroléru.

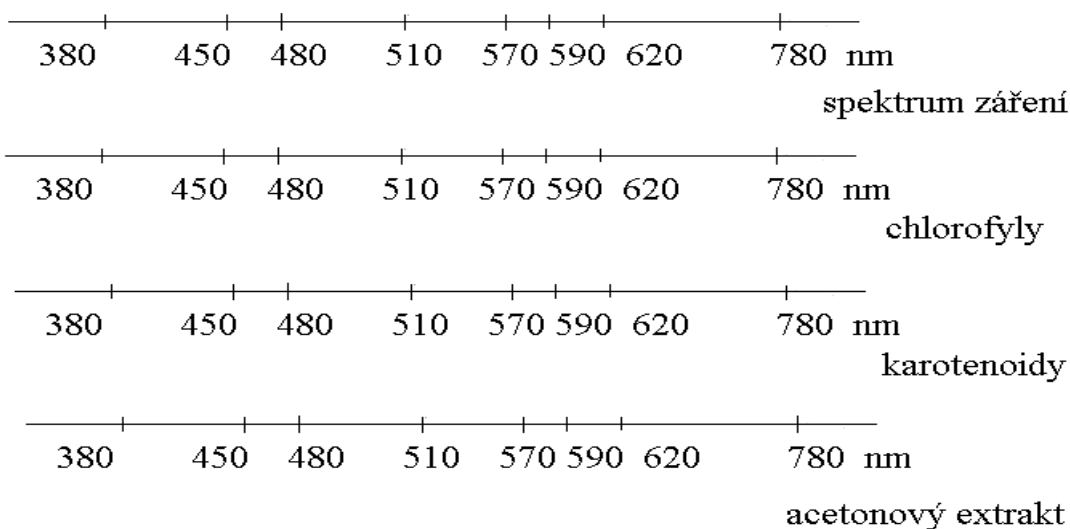
Do kyvetky postupně odpipetujete 2 ml připravených vzorků acetonového extraktu, chlorofylínů a karotenoidů. Po vložení kyvetky do držáku ručního spektroskopu pozorujte proti světlu pohledem do okuláru spektroskopu absorpční pásy jednotlivých vzorků.

### Úkoly:

1. Podle návodu pozorujte pomocí Kirchhoff-Bunsenova spektroskopu rozklad světelného záření na spojité spektrum.
2. Na ručním spektroskopu porovnejte absorpční spektra chlorofylů a karotenoidů s absorpčním spektrem acetonového extraktu. Absorpční pásy zakreslete.

### Výsledky:

Nákres:



### Popis:

### Závěr:

**Kontrolní otázky:**

1. Které fotosyntetické pigmenty vyšších rostlin znáte?
2. Jaká je funkce chlorofylů při fotosyntéze?
3. Jaká je funkce karotenoidů při fotosyntéze?
4. Vysvětlete princip spektroskopie?
5. Jaké rozpouštědlo použijete pro vzájemné oddělení chlorofylů a karotenoidů?