



Przewodnik do ćwiczeń z fizjologii roślin

pod redakcją

Marii Skłodowskiej

i Elżbiety Kuźniak-Gębarowskiej



WYDAWNICTWO
UNIwersytetu
ŁÓDZKIEGO

Przewodnik
do ćwiczeń
z fizjologii roślin

Autorzy rozdziałów

dr Katarzyna Bergier – rozdz. 2, 7, 11

dr hab. Ewa Gajewska – rozdz. 4, 9, 10

prof. dr hab. Elżbieta Kuźniak-Gębarowska – rozdz. 3, 12

dr hab. Urszula Małolepsza – rozdz. 19

dr Marcin Naliwajski – rozdz. 21

dr Justyna Nawrocka – rozdz. 5

dr hab. Jacek Patykowski – rozdz. 16

prof. dr hab. Maria Skłodowska – rozdz. 14

dr Marzena Wielanek – rozdz. 8, 13, 15, 17, 18, 20

dr Anna Wyrwicka – rozdz. 1, 6, 16

Rysunki

mgr inż. Urszula Świercz

Przewodnik do ćwiczeń z fizjologii roślin

pod redakcją

Marii Skłodowskiej
i Elżbiety Kuźniak-Gębarowskiej



WYDAWNICTWO
UNIWERSYTETU
ŁÓDZKIEGO
Łódź 2020

Elżbieta Kuźniak-Gębarowska, Maria Skłodowska – Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin
90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16

RECENZENT

Andrzej Kornaś

REDAKTOR INICJUJĄCY

Beata Koźniewska

REDAKCJA

Barbara Sikora

SKŁAD I ŁAMANIE

Munda – Maciej Torz

KOREKTA TECHNICZNA

Anna Sońta

PROJEKT OKŁADKI

krzysztof de mianiuk

Zdjęcie wykorzystane na okładce autorstwa Joanny Chojak-Koźniewskiej

© Copyright by Authors, Łódź 2020

© Copyright for this edition by Uniwersytet Łódzki, Łódź 2020

Publikacja jest udostępniona na licencji Creative Commons Uznanie autorstwa-Użycie
niekomercyjne-Bez utworów zależnych 4.0 (CC BY-NC-ND)

Wydane przez Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego

Wydanie I. W.09850.20.0.S

Ark. wyd. 9,0; ark. druk. 15,875

ISBN 978-83-8220-012-6

e-ISBN 978-83-8220-013-3

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6>

Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego

90-131 Łódź, ul. Lindleya 8

www.wydawnictwo.uni.lodz.pl

e-mail: ksiegarnia@uni.lodz.pl

tel. 42 665 58 63

SPIS TREŚCI

Przedmowa / 7

Rozdział I

SKŁAD CHEMICZNY ROŚLIN. WYKRYWANIE SKŁADNIKÓW
MINERALNYCH W ROŚLINACH / 9

Rozdział II

MINERALNE ODŻYWIANIE ROŚLIN / 23

Rozdział III

KOMÓRKA ROŚLINNA JAKO UKŁAD OSMOTYCZNY / 31

Rozdział IV

PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON PLAZMATYCZNYCH / 41

Rozdział V

DALEKI TRANSPORT WODY, TRANSPIRACJA / 53

Rozdział VI

BARWNIKI ASYMLACYJNE I ICH WŁAŚCIWOŚCI / 69

Rozdział VII

REAKCJA HILLA / 81

Rozdział VIII

ODDYCHANIE / 87

Rozdział IX

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA REGULATORÓW WZROSTU ROŚLIN / 97

Rozdział X

METABOLIZM AZOTOWY ROŚLIN. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI
REDUKTAZY AZOTANOWEJ / 115

Rozdział XI

WŁAŚCIWOŚCI GLEB / 123

Rozdział XII

KIEŁKOWANIE NASION / 133

Rozdział XIII

ALLELOPATIA. WPŁYW METABOLITÓW WTÓRNYCH NA KIEŁKOWANIE NASION I WZROST SIEWEK / 143

Rozdział XIV

AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW AMYLOLITYCZNYCH W PRZECHOWYWANYCH ORGANACH SPICHRZOWYCH / 157

Rozdział XV

TEST TOLERANCJI KOMÓREK ROŚLINNYCH NA ABIOTYCZNE CZYNNIKI STRESOWE / 167

Rozdział XVI

REAKCJE ROŚLIN NA STRES ABIOTYCZNY / 175

Rozdział XVII

CAŁKOWITA ZDOLNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH POCHODZENIA ROŚLINNEGO / 183

Rozdział XVIII

ZAWARTOŚĆ KWASU ASKORBINOWEGO (WITAMINY C) W WARZYWACH I OWOCACH / 193

Rozdział XIX

INDUKCJA TKANKI KALUSOWEJ I PĘDÓW PRZYBYSZOWYCH W KULTURZE *IN VITRO* FIOŁKA AFRYKAŃSKIEGO / 203

Rozdział XX

METABOLITY WTÓRNE O ZNACZENIU PROZDROWOTNYM. ANTRAZWIAZKI LIŚCI I KULTUR *IN VITRO* ALOESU / 209

Rozdział XXI

ANALIZA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA WYBRANYCH METABOLITÓW WTÓRNYCH W ROŚLINNYCH SUROWCACH LECZNICZYCH / 221

ZAŁĄCZNIKI DO ĆWICZEŃ / 233

PYTANIA POMOCNICZE DO POWTÓRKI MATERIAŁU / 247

Przedmowa

Przewodnik do ćwiczeń z fizjologii roślin adresowany jest głównie do studentów studiów licencjackich na kierunkach biologia, ochrona środowiska i biotechnologia. Może być również pomocny dla studentów innych kierunków przyrodniczych i rolniczych. Przy opracowaniu ćwiczeń autorzy wykorzystali swoje wieloletnie doświadczenie dydaktyczne w zakresie fizjologii i biochemii roślin, zdobyte w czasie prowadzenia zajęć praktycznych w Katedrze Fizjologii i Biochemii Roślin na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Ćwiczenia zostały tak opracowane, aby zapoznać studentów z podstawowymi procesami związanymi z funkcjonowaniem roślin, ułatwić ich zrozumienie i wzajemne relacje, co ma istotne znaczenie w kontekście praktycznego wykorzystania roślin w życiu człowieka. Zamiarem autorów było też wykazanie, że fizjologia roślin, będąca jednym z podstawowych działów biologii, posługuje się nowoczesnymi metodami z zakresu biochemii, biofizyki i biotechnologii. Każdy rozdział został poprzedzony krótkim wstępem teoretycznym, przygotowującym do zajęć laboratoryjnych dotyczących omawianych zagadnień, który ma ułatwić zrozumienie samego procesu lub reakcji i ich uwarunkowań.

Przewodnik zawiera zestaw ćwiczeń, które można wykonać bez zaawansowanej aparatury, przy jednoczesnym znacznym zaangażowaniu studentów w prowadzone doświadczenia. Autorzy wyrażają nadzieję, że niniejsze opracowanie będzie przydatne dla wszystkich zainteresowanych biologią eksperymentalną roślin.

ROZDZIAŁ I. **SKŁAD CHEMICZNY ROŚLIN**
WYKRYWANIE SKŁADNIKÓW
MINERALNYCH W ROŚLINACH

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Tkanki roślinne składają się z wody, związków organicznych oraz związków nieorganicznych. Zawartość wody w roślinach stanowi średnio 70–95% ogólnej ich masy i może różnić się znacznie w zależności od gatunku, wieku rośliny, organu, pory roku oraz aktualnie panujących warunków środowiska. Największą zawartością wody charakteryzują się tkanki, w których intensywność procesów metabolicznych jest najwyższa. Średnia zawartość wody wyrażona w procentach całkowitej masy rośliny jest najwyższa w płatkach kwiatów (90–95%), w liściach wynosi około 60–95%, a najmniej zasobne w wodę są nasiona i ziarniaki zbóż (5–15%). Naturalnie uwodniona, zważona bezpośrednio po pobraniu masa rośliny lub jej części to **świeża masa roślinna (ś. m.)**.

Z uwagi na dynamikę zmian zawartości wody w tkankach roślinnych, aby przeprowadzić analizę składu chemicznego pobranego materiału, pozyskuje się suchą masę roślinną. **Sucha masa roślinna (s. m.)** jest masą tkanki roślinnej otrzymaną w procesie ogrzewania próbki w temperaturze 105°C przez dwie godziny, a następnie w 80°C – aż do uzyskania stałej masy. Podczas ogrzewania lotne związki zawarte w tkance uchodzą do atmosfery, a substancje wrażliwe na działanie wysokiej temperatury zostają rozłożone do związków prostych. Sucha masa roślinna jest pozostałością zawierającą związki organiczne i nieorganiczne oraz wodę związaną chemicznie. Prawie połowę suchej masy roślinnej stanowi węgiel (ok. 45%), podobnie tlen (ok. 42%), około 6,5% – wodór, a 1,5% – azot. W celu dalszej analizy składu mineralnego tkanek suchą masę poddaje się procesowi spalenia prowadzonemu w temperaturze 600°C. Spaleniu ulega materiał organiczny, a powstające w tym procesie CO_2 , H_2O , NH_3 i H_2S ulatniają się do atmosfery. Pozostała część związków nielotnych otrzymana po prażeniu to **popiół roślinny**, który zawiera

pierwiastki pobrane z podłoża, z wyjątkiem azotu oraz częściowo siarki, i stanowi 0,2–20% suchej masy. W skład popiołu wchodzi głównie tlenki takich pierwiastków, jak: K, Mg, Na, Fe, P, S, Si, a także sole: chlorki, siarczki i fosforany.

Kryteria podziału pierwiastków występujących w organizmach roślinnych:

1. **Kryterium jakościowe** – dzieli pierwiastki na podstawie niezbędności pobieranych ze środowiska jonów oraz ich sposób działania:
 - a) **pierwiastki niezbędne** – są konieczne do przejścia całego cyklu rozwojowego rośliny, od kiełkowania do wydania żywotnych nasion, i nie mogą być zastąpione innymi pierwiastkami (N, K, Ca, Mg, P, S oraz Cl, Fe, Cu, B, Zn, Mn, Mo, Ni);
 - b) **pierwiastki korzystne (pożądane)** – wpływają pozytywnie na wzrost i rozwój roślin, ale nie są niezbędne w przebiegu ontogenezy (Na, Si, Co, Al, V);
 - c) **pierwiastki zbędne (balastowe)** – jeśli występują w podłożu, mogą być pobierane przez roślinę, jednak nie pełnią żadnych funkcji fizjologicznych lub mogą wykazywać działanie toksyczne (np. Pb, Cd, Hg).
2. **Kryterium ilościowe** – dotyczy ilości, w jakiej są pobierane pierwiastki z podłoża oraz ich zawartości w suchej masie roślin:
 - a) **makroelementy** – występują w roślinach na ogół w ilości powyżej 0,1% (1000 ppm) suchej masy. Są to: N, K, Ca, Mg, P, S;
 - b) **mikroelementy** – występują w roślinach w ilości około 1000-krotnie mniejszej niż makroelementy (0,01–0,00001%; 100–0,1 ppm). Są to: Cl, Fe, Cu, B, Zn, Mn, Mo, Ni.
3. **Kryterium właściwości chemicznych oraz fizjologiczno-biochemicznych:**
 - a) pierwiastki organogenne: C, H, O; roślina pobiera je w postaci CO_2 , H_2O i O_2 ;
 - b) niemetale: N, S, P, B, Cl;
 - c) metale alkaliczne i ziem alkalicznych: K, Ca, Mg, Na oraz półmetal Si;
 - d) metale ciężkie: Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, Ni, Co, Al, V.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Doświadczenie I

Mikroanaliza popiołu roślinnego

Cel ćwiczenia

Wykrycie obecności chloru, fosforu, magnezu, potasu, siarki, wapnia i żelaza w popiele roślinnym.

Zasada metody

Składniki mineralne popiołu roślinnego wykrywa się za pomocą charakterystycznych reakcji chemicznych, w wyniku których poszczególne jony tworzą łatwo krystalizujące lub barwne związki.

Materiał

popiół roślinny, np. z liści tytoniu lub z drewna

Odczynniki

10% HCl, 10% HNO₃, 1% AgNO₃, 1% (NH₄)₂MoO₄, 1% HNO₃, 10–25% NH_{3(aq)}, 1% Na₂HPO₄, 70% HClO₄, 96% C₂H₅OH, 5% BaCl₂, nasycony roztwór (NH₄)₂C₂O₄, 1% H₂SO₄, 2% heksacyjanożelazian (II) potasu – K₄[Fe(CN)₆]

Sprzęt laboratoryjny

waga analityczna, mikroskop świetlny, 2 probówki chemiczne, 7 szkiełek podstawowych, szkiełka nakrywkowe, płytka pH-metryczna, bagietki szklane

I.A. PRZYGOTOWANIE DWÓCH RODZAJÓW WYCIĄGÓW Z POPIOŁU

Na wadze odważyć dwie porcje po 50 mg popiołu roślinnego otrzymanego z liści tytoniu lub z drewna. Każdą z porcji przenieść do osobnych, podpisanych probówek i zalać 2 cm³:

- a) 10% HCl,
- b) 10% HNO₃.

Zawartość probówek ostrożnie wymieszać i pozostawić na 5 minut, aby osad opadł na dno. Do wykrywania składników mineralnych w popiele używać płynu znad osadu, bez uprzedniego sączenia przez bibułę. W celu wykrycia składników mineralnych wszystkie reakcje chemiczne przeprowadzać na szkiełkach podstawowych, bez używania szkiełek nakrywkowych.

Przeprowadzając poniższe doświadczenia, zawsze należy: (1) podpisać szkiełko podstawowe, (2) nałożyć za pomocą bagietki szklanej kroplę analizowanego wyciągu, (3) w odległości około 1 cm od kropli wyciągu nałożyć kroplę odczynnika, (4) za pomocą bagietki szklanej połączyć obie krople wąskim kanalikiem. Po upływie 2–5 minut (w zależności od rodzaju reakcji) w analizowanych preparatach obserwować pod mikroskopem (powiększenie obiektu 10× lub 20×) charakterystyczne kryształy, które zazwyczaj najszybciej będą widoczne na brzegach kropli. Po dokonaniu obserwacji:

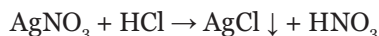
- 1) zapisać zasadę oznaczenia wraz z równaniem zachodzącej reakcji;
- 2) narysować kryształy wykrytych związków chemicznych, uwzględniając ich kształt, wielkość oraz barwę;
- 3) zapisać wnioski dotyczące obecności pierwiastków w analizowanym popiele.

UWAGA: Przy wykonywaniu reakcji na szkiełkach podstawowych zachować szczególną ostrożność, gdyż niektóre odczynniki są silnie żrące lub mają intensywną woń.

I.B. WYKRYWANIE PIERWIASTKÓW W POPIELE ROŚLINNYM

1. Wykrywanie chloru

Obok kropli wyciągu z popiołu w 10% HNO_3 umieścić kroplę 1% AgNO_3 . W miejscu połączenia płynów powstaje białe osad AgCl .



2. Wykrywanie fosforu

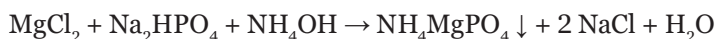
Obok kropli wyciągu z popiołu w 10% HNO_3 umieścić kroplę 1% molibdenianu (VI) amonu w 1% HNO_3 . W miejscu

połączenia kropli wytrącają się żółte kryształy fosfomolibdenianu amonu.



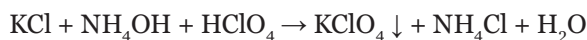
3. Wykrywanie magnezu

Kroplę wyciągu z popiołu w 10% HCl zobojętnić amoniakiem (1–2 krople), dodać kroplę 1% roztworu Na_2HPO_4 . Wytrącają się drobne kryształy fosforanu amonowo-magnezowego.



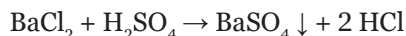
4. Wykrywanie potasu

Kroplę wyciągu z popiołu w 10% HCl zobojętnić amoniakiem (1–2 krople), dodać 2–3 krople kwasu chlorowego (VII). Wytrąca się biały osad nierozpuszczalny w 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.



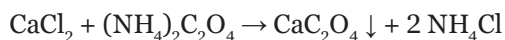
5. Wykrywanie siarki

Do wyciągu z popiołu w 10% HCl dodać kilka kropli 5% BaCl_2 . Wytrąca się biały, nierozpuszczalny osad BaSO_4 .

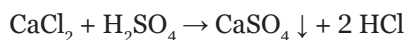


6. Wykrywanie wapnia

a) Wyciąg z popiołu w 10% HCl zobojętnić amoniakiem (1–2 krople), a następnie dodać kroplę nasyconego roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$. Wytrąca się biały osad szczawianu wapnia.

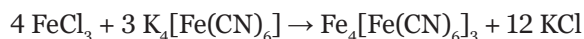


b) Do wyciągu z popiołu w 10% HCl dodać kroplę 1% H_2SO_4 . Powstaną kryształy siarczanu wapnia.



7. Wykrywanie żelaza

Do wyciągu z popiołu w 10% HCl dodać kroplę 2% heksacyjanożelazianu (II) potasu. Powstaje niebieskie zabarwienie – osad heksacyjanożelazianu (II) żelaza (III), czyli błękit pruski. Reakcję wykonać na płytce pH-metrycznej.



Doświadczenie II

Wykrywanie składników mineralnych w tkankach roślin (reakcje histochemiczne)

Cel ćwiczenia

Wykrycie obecności magnezu, wapnia, szczawianu wapnia oraz rozpuszczalnych szczawianów ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$), azotanów (V) (NO_3^-), jonów amonowych (NH_4^+) i żelaza w tkankach roślin.

Zasada metody

Reakcje histochemiczne służą do wykrywania niewielkich ilości poszczególnych pierwiastków bezpośrednio w tkankach roślinnych. Są to reakcje mikrochemiczne, podczas których powstają barwne lub krystaliczne substancje. Wyniki reakcji histochemicznych obserwuje się najczęściej pod mikroskopem.

Materiał

siewki pomidora, ogonki liściowe pelargonii, łuska cebuli, łodyga begonii, korzeń marchwi, liście pszenicy, łodyga skrzypu

Odczynniki

1% wodorofosforan sodowo-amonowy ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$), 25% $\text{NH}_3(\text{aq})$, 2% H_2SO_4 , 5% $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ w 5% CH_3COOH , 8% NaHCO_3 , 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, nasycony roztwór NaOH w 90–96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 0,5% difenylamina [$(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{NH}$] w 48% H_2SO_4 , 48% H_2SO_4 , 20% NaOH, odczynnik Nesslera [$\text{K}_2(\text{HgI}_4) + \text{KOH}$],

gorący C_2H_5OH , 2% $K_4[Fe(CN)_6]$, 2% HCl , 10% tiocyjanian potasu ($KSCN$), 10% HCl

Sprzęt laboratoryjny

zlewka 800 cm³, zlewka 50 cm³, kolba stożkowa 250 cm³, szkiełko zegarkowe o średnicy 7 cm, żyłetka, 2 skalpele, 2 pęsety, 10 szkiełek podstawowych, szkiełka nakrywkowe, mikroskop świetlny, 2 szalki Petriego, krystalizator na 50 cm³, bibuła filtracyjna, parownicza, waga analityczna, probówki chemiczne, bagietki szklane

1. Wykrywanie magnezu

W komórkach fotosyntetyzujących roślin magnez występuje głównie jako składnik chlorofilu. Spotyka się go również w formie mineralnej, szczególnie w nasionach i tkankach merystematycznych. Obecność magnezu mineralnego można łatwo wykazać przez wytrącenie go w formie kryształów fosforanu magnezowo-amonowego.

Na szkiełko podstawowe za pomocą bagietki szklanej nanieść kroplę 1% $NaNH_4HPO_4$, zanurzyć w niej wykonany żyłetką poprzeczny skrawek hipokotylu uzyskany z siewki pomidora. Całość umieścić w atmosferze nasyconej parami amoniaku, np. pod szklanym kloszem (zlewka 800 cm³), pod którym uprzednio wstawiono szalkę Petriego lub krystalizator ze stężonym amoniakiem. Po 5–15 minutach wyjąć spod klosza szkiełko podstawowe z preparatem. Preparat przykryć szkiełkiem nakrywkowym i obejrzeć pod mikroskopem (powiększenie obiektu 10× lub 20×). W preparacie są widoczne kryształy fosforanu amonowo-magnezowego, które należy narysować w zeszycie.

2. Wykrywanie wapnia

W tkankach roślinnych wapń wchodzi w skład blaszki środkowej (protopektyny), występuje również w formie rozpuszczalnej w soku komórkowym. Przeważająca ilość wapnia, szczególnie w starszych organach, znajduje się w komórkach w formie kryształów: szczawianów, węglanów lub winianów wapnia.

Wykonać skrawki poprzeczne z łodygi i ogonka liściowego pelargonii. Narysować kryształy oglądane w doświadczeniach a, b i c.

- a) Poprzeczny skrawek łodygi lub ogonka liściowego pelargonii umieścić na szkiełku podstawowym w kropli 2% H_2SO_4 . Po upływie około 30 minut na brzegach wysychającej kropli pojawiają się kryształy siarczanu wapnia o kształcie igiełek.
 - b) Poprzeczny skrawek łodygi lub ogonka liściowego pelargonii umieścić na szkiełku podstawowym w kropli 5% $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ w 5% CH_3COOH . Preparat przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Po 30 minutach obejrzeć pod mikroskopem (powiększenie obiektywu 10× lub 20×) powstałe kryształy szczawianu wapnia.
 - c) Poprzeczny skrawek łodygi lub ogonka liściowego pelargonii umieścić na szkiełku podstawowym w kropli 8% NaHCO_3 i przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Tak przygotowany preparat włożyć na 10 minut do zamkniętej szalki Petriego, następnie wyciągnąć i obejrzeć pod mikroskopem (powiększenie obiektywu 10× lub 20×). Opisać, jakie rodzaje kryształów wytwarzają się w komórkach i wokół skrawka łodygi.
3. Wykrywanie kryształów szczawianu wapnia w łusce cebuli
W starszych komórkach roślinnych wapń występuje w postaci w formie kryształów szczawianu wapnia, które powstają w wyniku reakcji obecnego w komórkach kwasu szczawowego z tym pierwiastkiem.

Mały skrawek suchej łuski cebuli włożyć na 24 godziny do 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, aby z martwych komórek usunąć powietrze, które przeszkadza przy oglądaniu preparatu pod mikroskopem. Następnie łuskę cebuli opłukać wodą, umieścić na szkiełku podstawowym w kropli wody destylowanej, przykryć szkiełkiem nakrywkowym i obejrzeć pod mikroskopem (powiększenie obiektywu 10× lub 20×). W komórkach można zaobserwować liczne, pryzmatyczne kryształy szczawianu wapnia. Nie zmieniając położenia preparatu, z jednej strony szkiełka nakrywkowego nanieść bagietką kroplę 2% H_2SO_4 , a z drugiej strony szkiełka nakrywkowego odciągać wodę za pomocą

paska bibuły filtracyjnej. W miejsce wody pod szkiełko wnika rozcieńczony H_2SO_4 . Obserwując w dalszym ciągu preparat pod mikroskopem, można zauważyć, że kryształy szczawianu wapnia ulegają rozpuszczeniu, a w różnych częściach preparatu tworzą się kryształy siarczanu wapnia o kształcie igiełek. W zeszycie narysować komórki łuski cebuli wraz z kryształami szczawianu wapnia i siarczanu wapnia.

4. Wykrywanie rozpuszczalnych szczawianów w łodydze begonii
W komórkach niektórych roślin szczawiany nie występują w formie kryształów, lecz w postaci rozpuszczalnej, może się też w nich gromadzić kwas szczawiowy.

Poprzeczny skrawek łodygi lub ogonka liściowego begonii umieścić na szkiełku podstawowym w kropli nasyconego roztworu NaOH w 90–96% C_2H_5OH . Przykryć szkiełkiem nakrywkowym i obserwować pod mikroskopem (powiększenie obiektywu 10× lub 20×). W komórkach parenchymatycznych pojawiają się kryształy szczawianu sodu o kształcie igiełek. Kryształy układają się w formie gwiazd, snopków lub dendrytów.

5. Wykrywanie azotanów (V)

Reakcja z 0,5% $(C_6H_5)_2NH$ w 48% H_2SO_4 jest charakterystyczna dla azotanów (V). Można ją wykorzystywać tylko do takiego materiału roślinnego, który nie zawiera dużych ilości karotenu, gdyż ten w reakcji z H_2SO_4 zabarwia się na niebiesko, podobnie jak azotany (V) w reakcji z $(C_6H_5)_2NH$ w obecności H_2SO_4 .

a) Na szkiełku podstawowym umieścić dwa poprzeczne skrawki łodygi pomidora. Na jeden skrawek nanieść kroplę 0,5% $(C_6H_5)_2NH$ w 48% H_2SO_4 , a na drugi – kroplę 48% H_2SO_4 . Skrawek traktowany roztworem difenyloaminy zabarwia się na niebiesko – jest to reakcja charakterystyczna dla jonów azotanowych (V). Obserwować również zmianę zabarwienia skrawka umieszczonego w 48% H_2SO_4 bez dodatku difenyloaminy i porównać zabarwienie obydwu skrawków.

b) Na szkiełko podstawowe przenieść dwa poprzeczne skrawki korzenia marchwi. Postępować podobnie jak w punkcie a. Obydwa skrawki przybierają barwę

niebieską. Zinterpretować wyniki uzyskane w doświadczeniach a i b.

6. Wykrywanie jonów amonowych

Rozgniecioną świeżą tkankę liści pszenicy zalać 20% NaOH i zagotować w probówce. U wylotu probówki umieścić bibułę nasyconą odczynnikiem Nesslera: $K_2(HgI_4) + KOH$. W obecności jonów amonowych bibuła barwi się na żółto lub brązowo.

7. Wykrywanie żelaza

Z liści pszenicy wyekstrahować chlorofil gorącym C_2H_5OH . W tym celu drobno posiekane liście umieścić w kolbie stożkowej o objętości 250 cm^3 i zalać $100\text{ cm}^3\text{ C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Kolbę wstawić do gorącej łaźni wodnej (80°C) i ostrożnie mieszając, prowadzić ekstrakcję chlorofilu do etanolu, aż do całkowitego odbarwienia tkanki. Mały skrawek tkanki uzyskanej po ekstrakcji chlorofilu (ok. 2 cm^2) umieścić na szkiełku zegarkowym w 2% $K_4[Fe(CN)_6]$. Po 15 minutach dodać kroplę 2% HCl, po chwili przemyć skrawek wodą w zlewce o objętości 50 cm^3 . W obecności żelaza powstaje niebieskie zabarwienie. Jeśli zamiast 2% $K_4[Fe(CN)_6]$ zostanie użyty 10% KSCN, powstanie tiocyjanian żelaza (III) o czerwonym zabarwieniu.

8. Przygotowanie spodogramów

Ściany komórek niektórych roślin impregnowane są składnikami mineralnymi, głównie krzemianami. Spalając ostrożnie materiał roślinny, można otrzymać zarysy komórek zbudowane wyłącznie z tych elementów.

Do parowniczkę włożyć kawałek lodygi skrzypu, spalać do chwili pojawienia się białego szkieletu. Jedną część otrzymanego preparatu umieścić na szkiełku podstawowym w wodzie destylowanej, drugą – w 10% HCl, w którym wszystkie składniki mineralne, nie krzemowe, ulegają rozkładowi. Dokonać obserwacji mikroskopowej, narysować obraz spod mikroskopu (powiększenie obiektywu $10\times$ lub $20\times$).

Opracowanie wyników

Narysować kryształki związków powstałych w poszczególnych reakcjach histochemicznych (pkt. 1–8).

Literatura

Kopcewicz J., *Podstawy biologii roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.

Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.02>

ROZDZIAŁ II. **MINERALNE ODŻYWIANIE ROŚLIN**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Składniki mineralne gleby są podstawowymi związkami pokarmowymi dla roślin. Poszczególne gatunki roślin mają odmienne wymagania pokarmowe w stosunku do każdego z pobieranych pierwiastków. Jedną z metod określania niezbędności związków mineralnych dla roślin jest metoda kultur wodnych (hydroponika). **Kultury wodne** umożliwiają wprowadzenie do podłoża dokładnej, znanej ilości badanego pierwiastka w postaci łatwo dostępnej dla roślin. Pozwalają też na eliminowanie z podłoża soli poszczególnych pierwiastków i zastępowanie ich równoważnymi ilościami innych soli, co powoduje, że rośliny wykazują charakterystyczne **objawy niedoboru** określonych pierwiastków. Na podstawie objawów niedoboru danego pierwiastka można wnioskować o jego roli w metabolizmie roślin oraz procesach wzrostu i rozwoju. Doświadczenia polowe mogą stanowić tylko uzupełnienie tych badań, ponieważ przeprowadzane są w zmieniających się warunkach i nie dają podstawy do ilościowej oceny niezbędności poszczególnych składników mineralnych. Istnieje kilka kryteriów podziału składników mineralnych (pierwiastków niezbędnych dla roślin), jednak najczęściej dzieli się je na **makro** i **mikroelementy** na podstawie ilości, w jakiej występują w roślinach (inne kryteria przedstawiono w części teoretycznej rozdziału *Skład chemiczny roślin. Wykrywanie składników mineralnych w roślinach*).

Roślina z rodziny rzęsowatych, spirodela wielokorzeniowa, jest szczególnie dogodnym materiałem do badania niezbędności składników mineralnych. W warunkach optymalnych bardzo szybko się namnaża, a jednocześnie jest bardzo wrażliwa na brak poszczególnych składników mineralnych w podłożu.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Zapoznanie się z fizjologiczną rolą makro- i mikroelementów w roślinach, rozpoznawanie objawów niedoboru pierwiastków u roślin oraz ocena wpływu pH podłoża na przyswajanie składników mineralnych.

Doświadczenie I

Określenie niezbędności wybranych składników mineralnych dla wzrostu i rozwoju roślin metodą kultur wodnych

Zasada metody

Poprzez wykorzystanie kultur wodnych o ściśle kontrolowanym składzie pożywki można określić niezbędność składników mineralnych w odżywianiu roślin. Niedobór bądź brak określonego składnika mineralnego prowadzi do zmian morfologicznych i metabolicznych w zależności od funkcji, jaką pełni on w roślinach.

Materiał

sterylna kultura spirodeli wielokorzeniowej

Odczynniki

pożywka Hoaglanda (por. załącznik 1)

Sprzęt laboratoryjny

7 kolb Erlenmeyera 100 cm³, eza, palnik, pH-metr, waga laboratoryjna, pęseta, linijka

I.A. SZCZEPIENIE I HODOWLA ROŚLIN

W doświadczeniu zakłada się hodowle roślin, wykorzystując pożywkę pełną oraz pożywki niezawierające jednego z następujących pierwiastków: N, P, K, Ca, Mg, Fe, przygotowane według załącznika 1.

Materiałem roślinnym jest wyjściowa, sterylna kultura spirodeli wielokorzeniowej na pożywce pełnej namnażającej (por. załącznik 1). Szczepienie roślin odbywa się w warunkach sterylnych,

w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Po przygotowaniu powierzchni roboczej do pracy sterylnej rozpocząć szczepienie przez opalenie ezy w płomieniu palnika. Następnie otworzyć kolbę z roślinami z kultury wyjściowej, opalić jej wylot i za pomocą ezy przenieść do nowej kolby ze sterylną pożywką po 10–12 członów pędowych (frondów), dodać niewielką ilość sterylnego CaCO_3 *in substantia* (dla utrzymania stałego pH pożywki w trakcie hodowli roślin), wylot kolby ponownie opalić i zamknąć. Na kolbie napisać liczbę przeniesionych członów pędowych (F_0). Czynność powtarzać aż do zaszczepienia wszystkich kolb z pożywką pełną i pożywkami pozbawionymi określonego pierwiastka – łącznie 7 kolb (por. załącznik 1).

Kolby z roślinami wstawić do pokoju hodowlanego o fotoperiodzie 16 godzin/8 godzin (światło/ciemność), gdzie temperatura powietrza wynosi $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, a natężenie światła $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Hodowlę prowadzić przez 1–2 tygodnie.

I.B. OCENA MORFOLOGICZNA

Dokonać oceny cech morfologicznych roślin wyhodowanych na pożywce pełnej i pożywkach pozbawionych określonego pierwiastka. W każdej kolbie policzyć człony pędowe i obliczyć wartość współczynnika wzrostu (MR) zgodnie ze wzorem:

$$\text{MR} = \frac{\log F_d - \log F_0}{d} \times 1000$$

gdzie:

F_d – liczba frondów po d dniach,

F_0 – liczba frondów w czasie 0,

d – liczba dni hodowli.

Opracowanie wyników

Zmierzyć wielkość i określić barwę spłaszczonych okrągłych pędów przypominających liście (górną i dolną powierzchnią). Zmierzyć długość i określić barwę korzeni. Następnie wyjąć rośliny znajdujące się w kolbie Erlenmeyera, delikatnie osuszyć na bibule i zważyć. Wyniki wpisać do tabeli 2.1. Po zważeniu roślin oznaczyć w nich zawartość antocyjanów i chlorofilu (por. Doświadczenie II).

Pożywka	Liczba roślin w kolbie			Pędy przypominające liście			Korzenie	
	F ₀	F ₇ (po 7 dniach)	MR	Wielkość	Barwa	Masa [g]	Długość	Barwa
Pełna								
– N								
– P								
– K								
– Ca								
– Mg								
– Fe								

Doświadczenie II

Oznaczenie zawartości antocyjanów

Zasada metody

Antocyjany absorbują UV i światło widzialne w zakresie 300–550 nm. Podczas ćwiczeń mierzy się absorpcję światła przy długości fali 515 nm.

Materiał

rośliny spirodeli wielokorzeniowej hodowane na różnych wariantach pożywek

Odczynniki

1 M HCl

Sprzęt laboratoryjny

moździerz, pipety (1–5 cm³), probówka Eppendorf, probówka szklana, wirówka, spektrofotometr, kuweta spektrofotometryczna o drodze optycznej 1 cm, waga laboratoryjna, pęseta, pipeta pasteurowska (w przeliczeniu na jeden wariant pożywki)

Wykonanie doświadczenia

Na wadze odważyć 100 mg roślin i rozetrzeć w moździerzu. Do otrzymanej miazgi dodać 3 cm³ 1 M HCl. Zawartość moździerza przenieść do probówki i odwirować. Pipetą pasteurowską zebrać płyn z nad osadu do szklanej probówki. W płynie nadosadowym

Tabela 2.1. Wpływ braku składników mineralnych na wzrost i wygląd spirodeli wielokorzeniowej

oznaczyć absorbancję w kuwecie spektrofotometrycznej przy długości fali 515 nm.

Opracowanie wyników

Zawartość antocyjanów odpowiada wartości absorbancji próby. Wyniki umieścić w tabeli 1.2.

Doświadczenie III

Oznaczenie zawartości chlorofilu

Zasada metody

Chlorofil ekstrahuje się acetonem. W otrzymanym ekstrakcie mierzy się absorbancję przy długości fali 646 i 664 nm. Stosując specyficzne współczynniki absorpcji, oblicza się zawartość chlorofilu *a* i *b* w materiale roślinnym.

Materiał

rośliny spirodeli wielokorzeniowej hodowane na różnych wariantach pożywek

Odczynniki

80% aceton (CH_3COCH_3)

Sprzęt laboratoryjny

moździerz, 2 cylindry 25 cm³, lejek, sącdek bibułowy, pipety (1–5 cm³), kuweta spektrofotometryczna o drodze optycznej 1 cm, spektrofotometr, waga laboratoryjna (w przeliczeniu na 1 wariant pożywki)

Wykonanie doświadczenia

UWAGA: Wszystkie czynności wykonać pod pracującym dygestorium.

100 mg roślin homogenizować w moździerzu. Dodać porcjami 15 cm³ 80% CH_3COCH_3 . Sączyć do cylindra miarowego i objętość uzupełnić acetonem do 20 cm³. W przesączu oznaczyć absorbancję w kuwecie spektrofotometrycznej przy długości fali 646 i 664 nm.

Opracowanie wyników

Zawartość chlorofilu obliczyć, korzystając ze wzorów:

$$\text{chl } a = (12,7 \times A_{664} - 2,7 \times A_{646} \times 1,40)$$

$$\text{chl } b = (22,9 \times A_{646} - 4,7 \times A_{664} \times 1,40)$$

Wyniki podać w tabeli 2.2.

Tabela 2.2.

Wpływ składników mineralnych na zawartość antocyjanów i chlorofilu w spirodeli wielokorzeniowej

Pożywka	Antocyjany [absorbancja A_{515}]	Chlorofil [$\mu\text{g mg}^{-1}$ świeżej masy]	
		Chlorofil <i>a</i>	Chlorofil <i>b</i>
Pełna			
– N			
– P			
– K			
– Ca			
– Mg			
– Fe			

Literatura

- Bergmann W. (ed.), *Nutritional Disorders of Plants. Development, Visual and Analytical Diagnosis*, Gustav Fischer Verlag, Jena 1992.
- Gorlach E., Mazur T., *Chemia rolna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.
- Kopcewicz J., *Podstawy biologii roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.
- Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Mercik S. (red.), *Chemia rolna. Podstawy teoretyczne i praktyczne*, Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2004.

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.03>

ROZDZIAŁ III. **KOMÓRKA ROŚLINNA**
JAKO UKŁAD OSMOTYCZNY

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Wymiana wody między komórką roślinną a środowiskiem zewnętrznym odbywa się zgodnie z prawami dyfuzji, osmozy i pęcznienia. Według teorii termodynamicznej u podstawy tych zjawisk leży dążenie do przyjęcia przez dany układ stanu mającego możliwie najniższą energię swobodną. Jeśli obok siebie znajdują się dwa układy różniące się energią swobodną, to nastąpi przenikanie wody z układu o wyższej energii swobodnej do układu o niższej energii swobodnej, aż do uzyskania stanu równowagi. Energia swobodna w odniesieniu do 1 mola jakiegokolwiek związku chemicznego w roztworze określana jest jako potencjał chemiczny tego związku. Potencjał chemiczny wody określa się skrótowo jako **potencjał wody** (Ψ). Jest on definiowany jako energia swobodna (zdolność do wykonania pracy użytecznej) wnoszona do układu przez 1 mol wody i mierzona w stosunku do wzorca, którym jest czysta woda pod ciśnieniem jednej atmosfery i w temperaturze 298 K. Potencjał wody stanowi więc różnicę między potencjałem chemicznym wody w układzie (w roztworze) (μ_w) a potencjałem chemicznym czystej wody (μ_w°), który przy ciśnieniu atmosferycznym ma wartość zero:

$$\Psi = \frac{\mu_w - \mu_w^\circ}{\bar{V}_w}$$

gdzie:

\bar{V}_w – molowa objętość wody ($18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$).

Rozpuszczenie jakiegokolwiek substancji w roztworze powoduje obniżenie jego potencjału wody. Potencjał wody przyjmuje zwykle wartości ujemne i wyrażany jest w jednostkach ciśnienia: Pa ($1 \text{ Pa} = 1 \text{ N m}^{-2}$) lub jego wielokrotności: MPa (10^6 Pa).

O stosunkach wodnych w komórce roślinnej oraz możliwości oddania lub pobrania wody przez komórkę decydują głównie dwa czynniki: (1) potencjał wody soku komórkowego w wakuoli, który przyjmuje zawsze wartości ujemne i zależy od stężenia substancji osmotycznie czynnych w wakuoli, oraz (2) potencjał turgorowy, odzwierciedlający ciśnienie wywierane przez ścianę komórkową na protoplast, równe co do wartości ciśnieniu wywieranemu przez protoplast na ścianę komórkową. W jądrowej komórce (stan turgoscencji) potencjał turgorowy przyjmuje wartości dodatnie, a w przypadku utraty turgoru jest równy zeru. Zależności te charakteryzuje pojęcie **potencjału wody komórki** (Ψ_k):

$$\Psi_k = \Psi_s + \Psi_t$$

gdzie:

Ψ_s – potencjał wody soku komórkowego (potencjał osmotyczny),

Ψ_t – potencjał turgorowy (potencjał ciśnienia).

Jeżeli potencjał wody w komórce będzie mniejszy (bardziej ujemny) od potencjału wody w otoczeniu, to woda będzie wnikała do komórki, jeśli zaś będzie większy (mniej ujemny) od potencjału wody w otoczeniu, woda będzie wypływała z komórki na zewnątrz. **Woda przemieszcza się zawsze w kierunku od wyższego potencjału wody do niższego.**

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Charakterystyka stosunków wodnych w komórce roślinnej poprzez oznaczenie potencjału wody soku komórkowego i potencjału wody komórki.

Doświadczenie I

Oznaczanie potencjału wody soku komórkowego metodą plazmolizy granicznej (De Vriesa)

Zasada metody

Punkt, w którym błona komórkowa pozostaje w kontakcie ze ścianą komórkową, ale nie jest wytwarzany potencjał turgorowy,

określa się jako punkt początkowy plazmolizy. W chwili zaniku potencjału turgorowego, czyli gdy $\Psi_t = 0$, potencjał wody komórki jest równy potencjałowi soku komórkowego ($\Psi_k = \Psi_s$). W fizjologii roślin przyjmuje się, że warunek taki jest spełniony w tkance, w której około 50% komórek znajduje się w punkcie początkowym plazmolizy (tzw. plazmoliza graniczna). Metoda polega na znalezieniu takiego roztworu, który wywołuje w badanej tkance plazmolizę graniczną. Potencjał wody takiego roztworu (Ψ) jest równy potencjałowi wody soku komórkowego (Ψ_s).

Materiał

cebula cebuli

Odczynniki

roztwór sacharozy o stężeniu 1 M

Sprzęt laboratoryjny

statyw z 9 probówkami, pipety (0,1–10 cm³), bagietka, skalpel, igła preparacyjna, 9 szkiełek podstawowych i nakrywkowych, 5 szalek Petriego, mikroskop świetlny

Wykonanie doświadczenia

Z wyjściowego roztworu sacharozy o stężeniu 1 M przygotować metodą rozcieńczeń po 10 cm³ roztworów o następujących stężeniach: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 M. Na czyste, odpowiednio opisane szkiełka podstawowe nanieść bagietką po kilka kropli przygotowanych roztworów. Bagietkę należy każdorazowo umyć i wytrzeć do sucha. Z wklęsłej strony zgrubiałych łusek wewnętrznych cebuli wycinać skalpelem skórkę o powierzchni mniej więcej 5 × 5 mm i przenosić igłą preparacyjną do roztworu na szkiełkach podstawowych. Następnie nakryć je szkiełkiem nakrywkowym. Wszystkie preparaty powinny pochodzić z jednego fragmentu cebuli. Tak przygotowane preparaty przykryć szalkami Petriego i pozostawić na około 30 minut. Po tym czasie obserwować pod mikroskopem (powiększenie obiektywu 10× lub 20×) różne stadia plazmolizy, zaczynając od największego stężenia sacharozy. Określić stężenie roztworu sacharozy, w którym tylko niektóre protoplasty komórek wykazują zmniejszenie objętości, widoczne jako oderwanie od ściany komórkowej w narożach (plazmoliza graniczna).

Opracowanie wyników

1. Narysować komórkę skórki cebuli w stanie zaawansowanej plazmolizy i plazmolizy granicznej.
2. Obliczyć potencjał wody roztworu sacharozy wywołującego plazmolizę graniczną.

Potencjał wody soku komórkowego będzie liczbowo w przybliżeniu równy potencjałowi wody roztworu sacharozy wywołującego plazmolizę graniczną. Można go wyliczyć, stosując równanie van't Hoffa:

$$\Psi = -iCRT$$

gdzie:

Ψ – potencjał wody roztworu sacharozy wywołującego plazmolizę graniczną [MPa],

C – stężenie roztworu wywołującego plazmolizę graniczną [M],

R – stała gazowa ($8,31 \text{ Nm K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$),

T – temperatura bezwzględna [K],

i – współczynnik izotoniczny dla substancji dysocjujących:

$$i = 1 + \alpha(n - 1)$$

gdzie:

α – stopień dysocjacji,

n – liczba jonów powstających przy dysocjacji (dla cząsteczek niezjonizowanych, takich jak sacharoza czy mannitol, $i = 1$).

Doświadczenie II

Oznaczenie potencjału wody komórki roślinnej

O możliwości pobrania lub oddania wody przez komórkę roślinną decyduje potencjał wody komórki (Ψ_k). Umieszczając tkankę w roztworach o różnym potencjale wody (seria rozcieńczeń), można oznaczyć Ψ_k poprzez znalezienie takiego roztworu, w którym komórka (tkanka) nie będzie ani pobierać, ani tracić wody. Oznacza to, że tkanka i roztwór znajdują się w stanie równowagi i potencjał wody tkanki jest równy potencjałowi wody roztworu. Badać można zarówno zmiany stężenia roztworu, w którym umieszczono tkankę, jak i zmiany objętości (masy) tkanki.

II.A. OZNACZANIE POTENCJAŁU WODY KOMÓREK ROŚLINNYCH NA PODSTAWIE ZMIANY STĘŻENIA ROZTWORU METODĄ SZARDAKOWA

Zasada metody

Potencjał wody komórki (tkanki) można oznaczyć poprzez ustalenie zmiany potencjału wody roztworu, w którym inkubowano tkankę. Jeżeli potencjał wody roztworu obniży się (stężenie roztworu wzrośnie), to znaczy, że tkanka pobrała wodę. Jeżeli zaś potencjał wody roztworu wzrośnie (stężenie obniży się) – tkanka oddała wodę. Kierunek przepływu wody każdorazowo jest zgodny z gradientem potencjału wody między komórką i roztworem zewnętrznym. W wyniku zmiany potencjału wody roztworu zmienia się również jego ciężar właściwy. Porównując ciężary właściwe roztworów wyjściowych i roztworów po inkubacji tkanki roślinnej, można wskazać roztwór, którego ciężar właściwy nie zmienił się wskutek przebywania w nim tkanki roślinnej. Potencjał wody takiego roztworu jest liczbowo równy potencjałowi wody komórki.

Materiał

liście roślin (begonia, cyklamen, pelargonja)

Odczynniki

0,5 M CaCl_2 , błękit metylenowy

Sprzęt laboratoryjny

statyw z 14 probówkami, pipety (0,1–10 cm³), pipety kapilarne, bagietka, korkobor, igła preparacyjna

Wykonanie doświadczenia

Z wyjściowego roztworu CaCl_2 o stężeniu 0,5 M przygotować po 10 cm³ roztworów o stężeniach: 0,03; 0,05; 0,08; 0,1; 0,13; 0,15; 0,20 M. Probówki z powyższymi roztworami (odpowiednio opisane) umieścić w pierwszym rzędzie statywu. Następnie z każdej probówki przenieść po 0,5 cm³ roztworu do probówki stojącej za nią w drugim rzędzie statywu. Z liści roślin wyciąć korkoborem krążki o średnicy 0,8–1 cm i wrzucić po 3–5 do każdej z probówek drugiego rzędu. Bagietką usunąć pęcherzyki powietrza i pozostawić próby na 30 minut, kilkakrotnie delikatnie mieszając w tym czasie. Po upływie czasu inkubacji krążki wyjąć igłą preparacyjną, a roztwór,

w którym się inkubowały, zabarwić błękitem metylenowym, wrzucając do każdej probówki po kilka kryształków barwnika. Pipetą kapilarną nabrać małą kroplę barwnego płynu z pierwszej probówki, w której inkubowała się tkanka, i przenieść do probówki stojącej przed nią w pierwszym rzędzie, zanurzając pipetę kapilarną do połowy wysokości roztworu i wypuszczając powoli barwny płyn. Czynność powtórzyć dla wszystkich badanych roztworów. Obserwować przemieszczanie się barwnej smugi. Jeśli kolorowa kropla pozostaje na powierzchni cieczy, oznacza to, że po inkubacji tkanki roztwór stał się bardziej rozcieńczony wskutek oddawania wody przez tkankę, a tym samym jego ciężar właściwy się zmniejszył. Natomiast opadanie kropli na dno wskazuje, że ciężar właściwy roztworu po inkubacji tkanki się zwiększył (tkanka pobrała wodę). Jeżeli kropla dyfunduje równomiernie we wszystkich kierunkach, ciężar właściwy roztworu nie uległ zmianie.

Opracowanie wyników

1. Obliczyć potencjał wody komórki, korzystając z równania van't Hoffa (por. Doświadczenie I) i danych dotyczących stopnia dysocjacji CaCl_2 (tabela 3.1). Potencjał wody komórki jest liczbowo równy potencjałowi wody roztworu, w którym obserwowano równomierną dyfuzję barwnej kropli, świadcząca o stanie równowagi między tkanką a środowiskiem zewnętrznym.
2. Przeprowadzić analizę zależności potencjału wody komórki i roztworu CaCl_2 w przypadku, gdy: (a) barwna kropla unosiła się ku górze i (b) barwna kropla opadała na dno.

α dla CaCl_2	Stężenie CaCl_2 [M]
0,88	0,01
0,82	0,03
0,77	0,05
0,75	0,08
0,74	0,10
0,71	0,15
0,68	0,20

Tabela 3.1. Stopień dysocjacji (α) CaCl_2

II.B. OZNACZANIE POTENCJAŁU WODY KOMÓREK ROŚLINNYCH NA PODSTAWIE ZMIANY OBJĘTOŚCI I MASY TKANKI METODĄ URSPRUNGA

Zasada metody

Fragmety tkanki roślinnej umieszcza się w roztworach o różnych stężeniach substancji osmotycznie czynnej w celu znalezienia takiego roztworu, w którym objętość (masa) tkanki nie ulegnie zmianie, czyli tkanka nie będzie ani pobierać, ani tracić wody. Wówczas Ψ roztworu jest równe Ψ tkanki. Jeśli Ψ roztworu zewnętrznego będzie mniejszy (bardziej ujemny) od Ψ tkanki, to tkanka będzie oddawała wodę i jej objętość się zmniejszy. Przy wyższym Ψ roztworu zewnętrznego tkanka pobierze wodę i jej objętość wzrośnie. Zmianie objętości towarzyszyć będzie proporcjonalna zmiana masy tkanki.

Materiał

bulwy ziemniaka

Odczynniki

roztwór sacharozy o stężeniu 1 M

Sprzęt laboratoryjny

statyw z 9 probówkami, korkobor, pipety (0,1–10 cm³), waga laboratoryjna, linijka

Wykonanie doświadczenia

Z wyjściowego roztworu sacharozy o stężeniu 1 M metodą rozcieńczeń przygotować w probówkach po 10 cm³ roztworów o stężeniach: 0; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 M. Z bulw ziemniaka wyciąć korkoborem 9 walców o średnicy 7–9 mm i długości 5–6 cm. Po dokładnym zmierzeniu linijką ich długości i zważeniu umieścić je w przygotowanych probówkach. Po upływie 90 minut walce wyjąć z roztworów, osuszyć delikatnie na bibule oraz ponownie zmierzyć ich długość i zważyć. Porównać wyniki z pomiarami wyjściowymi. Wyniki umieścić w tabeli 3.2.

Stężenie roztworu sacharozy [M]	0,0	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Długość początkowa [mm]									
Długość końcowa [mm]									
Zmiana długości [mm]									
Masa początkowa [g]									
Masa końcowa [g]									
Zmiana masy [g]									
Stan turgoru tkanek									

Opracowanie wyników

1. Znaleźć stężenie roztworu, w którym objętość (masa) tkanek nie uległa zmianie, i na tej podstawie, korzystając z równania van't Hoffa (por. Doświadczenie I), obliczyć potencjał wody komórek bulwy ziemniaka.
2. Określić stan turgoru tkanek ziemniaka po wyjęciu ich z roztworów sacharozy. Zaobserwowane zmiany wyjaśnić w oparciu o analizę zależności potencjału wody komórek bulwy ziemniaka i roztworu sacharozy.

Tabela 3.2. Zależność masy i objętości tkanek bulwy ziemniaka od stężenia roztworu sacharozy

Literatura

- Kopcewicz J., *Podstawy biologii roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.
- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.
- Szweykowska A., *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2002.

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.04>

ROZDZIAŁ IV. **PRZEPUSZCZALNOŚĆ
BŁON PLAZMATYCZNYCH**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Błony plazmatyczne zbudowane są z lipidów i białek. Zrąb błony stanowi podwójna warstwa fosfolipidów, których cząsteczki mają charakter amfifilowy. Fosfolipidy składają się z części hydrofilowej – nazywanej „głową” – utworzonej przez grupy aminowe, hydroksylowe i karboksylowe, oraz z części hydrofobowej – nazywanej „ogonem” – którą tworzą węglowodorowe łańcuchy kwasów tłuszczowych. Związki te są ułożone w błonie w ten sposób, że ich hydrofobowe części skierowane są do siebie, czyli do środka błony, natomiast części hydrofilowe są zwrócone na zewnątrz, do środowiska wodnego. W podwójną warstwę lipidową wbudowane są białka, wśród których wyróżniamy białka powierzchniowe i integralne. Pierwsze z nich wystają po jednej stronie błony, są luźno z nią związane i można je wyodrębnić z błony za pomocą wody, roztworów soli i czynników chelatujących. Natomiast białka integralne przechodzą przez całą szerokość warstwy lipidowej i wystają ponad obie jej powierzchnie. Są one silnie związane z błoną poprzez oddziaływania hydrofobowe i można je usunąć z błony tylko po zniszczeniu jej struktury, np. za pomocą detergentów.

Błona plazmatyczna jest strukturą dynamiczną, ponieważ zarówno cząsteczki fosfolipidów, jak i białek mogą zmieniać położenie w jej obrębie. Cząsteczki białek mogą obracać się wokół własnej osi, a także zanurzać się i wynurzać z warstwy fosfolipidów. Cząsteczki fosfolipidów wykonują ruchy rotacyjne, lateralne (zmiana położenia w płaszczyźnie warstwy) oraz tzw. ruchy flip-flop, polegające na przemieszczaniu się cząsteczek z jednej warstwy do drugiej.

Błony plazmatyczne oddzielają wnętrze komórki od środowiska zewnętrznego (plazmolema), a także dzielą wnętrze komórki na mniejsze obszary o różnych funkcjach metabolicznych (błony organelli wewnątrzkomórkowych). Błony plazmatyczne

biorą również udział w transporcie substancji między środowiskiem zewnętrznym a cytoplazmą komórki oraz w oddziaływaniu międzykomórkowym.

Ważną właściwością błon plazmatycznych jest selektywność, dzięki której jedne substancje mogą przenikać przez błonę, a inne nie. Selektywną przepuszczalność wykazują tylko błony komórek żywych, mające nieuszkodzoną strukturę. Przepuszczalność błon ulega zmianom pod wpływem różnych czynników fizycznych i chemicznych. Podwyższenie temperatury zwiększa ruchliwość składników błony oraz jej płynność, co w rezultacie powoduje wzrost przepuszczalności. W zakresie temperatur 0–50°C podniesienie temperatury o 10°C zwiększa przepuszczalność błony 2–3-krotnie. Alkohol, kwasy, zasady i rozpuszczalniki organiczne zwiększają przepuszczalność, wpływając negatywnie na budujące błonę cząsteczki białek i lipidów. Kationy dwuwartościowe, np. Ca^{2+} , mogą oddziaływać z ujemnie naładowanymi „głowami” fosfolipidów, niwelując ich wzajemne odpychanie, co prowadzi do ściślejszego upakowania składników błony. Tego typu kationy wywołują też odwodnienie błony, przez co zmniejszają jej przepuszczalność. Natomiast kationy jednowartościowe, np. K^+ , podwyższają uwodnienie błony i powodują wzrost jej przepuszczalności.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Zbadanie wpływu czynników fizycznych i chemicznych na przepuszczalność błon plazmatycznych komórek roślinnych.

Doświadczenie I

Wpływ temperatury na przepuszczalność błon plazmatycznych

I.A. WPŁYW TEMPERATURY NA PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON PLAZMATYCZNYCH KOMÓREK BULWY ZIEMNIAKA

Zasada metody

Wraz ze wzrostem przepuszczalności błony zwiększa się wpływ elektrolitów z komórki. Wpływ temperatury na przepuszczalność

błon można zatem ocenić, mierząc przewodnictwo roztworów, w których umieszcza się tkankę roślinną. Miarą przewodnictwa elektrolitu jest przewodnictwo właściwe (κ), które definiujemy jako przewodnictwo 1 cm³ roztworu. Wartość przewodnictwa właściwego roztworu jest zależna od stężenia i ruchliwości obecnych w nim jonów. Jednostką przewodnictwa właściwego jest S m⁻¹ (S-Siemens).

Materiał

bulwa ziemniaka

Sprzęt laboratoryjny

korkobory o średnicy około 1 cm, zlewki 800 cm³, 5 probówek o średnicy około 1,8 cm, cylinder miarowy 25 cm³, 3 łaźnie wodne z termostatem, konduktometr, linijka

Wykonanie doświadczenia

Dużą bulwę ziemniaka umyć pod bieżącą wodą. Za pomocą korkoboru wyciąć z niej 4 fragmenty w kształcie walca. Wyrównać długość wszystkich fragmentów do około 2 cm. Następnie umieścić je w zlewce i dokładnie wypłukać pod bieżącą wodą w celu usunięcia soku komórkowego wypływającego z uszkodzonych komórek. Wypłukane fragmenty bulwy ziemniaka osuszyć na bibule.

Cztery fragmenty wycięte z bulwy ziemniaka umieścić w oddzielnych, ponumerowanych probówkach i do każdej z nich wlać po 15 cm³ wody destylowanej. Wymieszać zawartość probówek i używając konduktometru, zmierzyć przewodnictwo właściwe znajdującego się w nich płynu (κ_1). Dodatkowo zmierzyć przewodnictwo właściwe samej wody destylowanej ($\kappa_{\text{H}_2\text{O}}$). Dla każdej probówki zapisać wartość przewodnictwa oraz temperatury, w której dokonano pomiaru. Następnie umieszczone w probówkach fragmenty bulwy ziemniaka przez 15 minut poddać działaniu temperatury: 20°C (pozostawić na stole roboczym), 50°C, 75°C i 100°C (umieścić w łaźniach wodnych). Po tym czasie doprowadzić zawartość probówek do temperatury pokojowej i ponownie zmierzyć przewodnictwo płynu w każdej probówce (κ_2). Temperatura ma znaczący wpływ na wartość przewodnictwa, więc należy zwracać uwagę na to, aby temperatura znajdującego się w probówkach płynu była taka sama podczas pierwszego i drugiego pomiaru.

Opracowanie wyników

Od wyznaczonych wartości przewodnictwa właściwego roztworów znajdujących się w poszczególnych probówkach odjąć przewodnictwo właściwe wody. Dla każdej próbki obliczyć różnicę przewodnictwa roztworu mierzonego po i przed inkubacją w badanych temperaturach, korzystając ze wzoru:

$$\Delta\kappa = (\kappa_2 - \kappa_{\text{H}_2\text{O}}) - (\kappa_1 - \kappa_{\text{H}_2\text{O}})$$

Narysować wykres zależności otrzymanych wartości przewodnictwa właściwego od temperatury, na osi odciętych (x) zaznaczając wartości temperatury [°C], a na osi rzędnych (y) wartości przyrostu przewodnictwa $\Delta\kappa$ [$\mu\text{S cm}^{-1}$].

I.B. WPŁYW TEMPERATURY NA PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON PLAZMATYCZNYCH KOMÓREK KORZENIA BURAKA CÍWIKŁOWEGO

Zasada metody

Wraz ze wzrostem przepuszczalności błony zwiększa się wypływ składników soku komórkowego wypełniającego wakuolę komórek roślinnych. W soku komórkowym komórek korzenia buraka ćwikłowego znajdują się czerwone barwniki betacyjaniny. Wpływ temperatury na przepuszczalność błon można ocenić na podstawie intensywności zabarwienia roztworów, w których umieszcza się tkankę korzenia buraka. Intensywność zabarwienia roztworu zawierającego betacyjaniny pochodzące z korzenia buraka określa się poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 525 nm.

Sprzęt laboratoryjny

korkobor o średnicy około 1 cm, zlewka 800 cm³, 5 probówek szklanych, cylinder miarowy 25 cm³, 3 łaźnie wodne z termostatem, zamrażarka, spektrofotometr, kuwety spektrofotometryczne, linijka

Wykonanie doświadczenia

Duży korzeń buraka ćwikłowego umyć pod bieżącą wodą. Za pomocą korkoboru wyciąć z niego 5 fragmentów w kształcie walca. Wyrównać długość wszystkich fragmentów do około 3 cm. Następnie umieścić je w zlewce i płukać pod bieżącą wodą przez

kilka minut, aż do momentu usunięcia barwnika wypływającego z uszkodzonych komórek. Wypłukane fragmenty z korzenia buraka osuszyć na bibule.

Pięć fragmentów wyciętych z korzenia buraka umieścić w oddzielnych suchych probówkach i przez 15 minut poddać działaniu temperatury: -20°C (umieścić w zamrażarce), 20°C (pozostawić na stole roboczym), 50°C , 75°C i 100°C (umieścić w łaźniach wodnych). Po zakończeniu inkubacji fragmentów korzeni buraka we wskazanych wartościach temperatury próbówki umieścić w statywie i do każdej wlać po 15 cm^3 wody destylowanej. Po upływie 1 godziny dokładnie wymieszać zawartość probówek i w kuwetach spektrofotometrycznych, przy długości fali 525 nm , zmierzyć w spektrofotometrze absorbancję uzyskanych roztworów wobec wody destylowanej.

Opracowanie wyników

Zanotować wyniki i narysować wykres zależności wartości absorbancji od temperatury, na osi odciętych (x) zaznaczając wartości temperatury [$^{\circ}\text{C}$], a na osi rzędnych (y) wartości absorbancji A_{525} .

Doświadczenie II

Wpływ rozpuszczalników organicznych, stężonych kwasów i zasad na przepuszczalność błon

II.A. WPŁYW ROZPUSZCZALNIKÓW ORGANICZNYCH, STĘŻONYCH KWASÓW I ZASAD NA PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON KOMÓREK KORZENIA BURAKA ĆWIKŁOWEGO

Zasada metody

Związki chemiczne, oddziałując na cząsteczki wchodzące w skład błony komórkowej, mogą powodować naruszenie struktury błony i w konsekwencji utratę jej selektywnej przepuszczalności, co skutkuje wypływem składników soku komórkowego wypełniającego wakuolę. Po umieszczeniu fragmentów tkanki korzenia buraka ćwikłowego w roztworach związków chemicznych nastąpi wyciek zawarty w soku komórkowym betacyjanin, co spowoduje zabarwienie tych roztworów. Intensywność ich zabarwienia jest zależna od stopnia uszkodzenia błony przez badane związki chemiczne.

Materiał

korzeń buraka ćwikłowego

Odczynniki

50% C_2H_5OH , chloroform ($CHCl_3$), aceton (CH_3COCH_3), 1M HCl, 30% CH_3COOH , 1M NaOH

Sprzęt laboratoryjny

korkobor o średnicy około 1 cm, 7 probówek szklanych, pipety ($0,5-5\text{ cm}^3$)

Wykonanie doświadczenia

Siedem wypłukanych i osuszonych fragmentów wyciętych korkoborem z korzenia buraka (przygotowanych jak w pkt. I.B) umieścić w oddzielnych probówkach. Do probówek dolać odpowiednio:

- a) 5 cm^3 H_2O destylowanej (kontrola),
- b) 5 cm^3 50% C_2H_5OH ,
- c) $4,5\text{ cm}^3$ H_2O destylowanej + $0,5\text{ cm}^3$ $CHCl_3$,
- d) $2,5\text{ cm}^3$ H_2O destylowanej + $2,5\text{ cm}^3$ CH_3COCH_3 ,
- e) 5 cm^3 1 M HCl,
- f) 5 cm^3 30% CH_3COOH ,
- g) 5 cm^3 1 M NaOH.

Wstawione do statywu probówki pozostawić na 30 minut. Następnie po dokładnym wymieszaniu zawartości probówek dokonać wizualnej oceny barwy oraz intensywności zabarwienia znajdujących się w nich płynów.

Opracowanie wyników

Intensywność zabarwienia płynu, w którym inkubowała się tkanka korzenia buraka, wyrazić w skali 1–5.

II.B. WPŁYW ROZPUSZCZALNIKÓW ORGANICZNYCH, STĘŻONYCH KWASÓW I ALKOHOLI NA SKŁADNIKI BŁONY KOMÓRKOWEJ (BIAŁKA I LIPIDY)

Zasada metody

Związki chemiczne mogą powodować uszkodzenie błony komórkowej poprzez oddziaływanie z wchodzącymi w skład jej struktury białkami i lipidami. Efekt działania związków chemicznych na

białka i lipidy można zademonstrować na przykładzie odpowiednio roztworu albuminy jaja kurzego i oleju roślinnego.

Materiał

1% roztwór albuminy jaja kurzego, olej roślinny

Odczynniki

96% C_2H_5OH , 20% HCl, CH_3COCH_3

Sprzęt laboratoryjny

3 probówki szklane, pipety (0,1–2 cm³)

Wykonanie doświadczenia

Do 2 probówek wlać po około 2 cm³ roztworu albuminy jaja kurzego. Następnie dodać:

a) 1 cm³ 96% C_2H_5OH ,

b) 1 cm³ 20% HCl.

Do trzeciej probówki wlać około 2 cm³ oleju roślinnego, a następnie dodać 2 cm³ CH_3COCH_3 . Obserwować wpływ zastosowanych związków na białka i lipidy.

Opracowanie wyników

Wyniki opisać i zinterpretować.

Doświadczenie III

Przepuszczalność błon plazmatycznych dla wodorotlenków

Zasada metody

Czerwień obojętna poniżej pH 6,8 ma zabarwienie czerwone, natomiast powyżej pH 8,0 – żółte. Szybkość zmiany zabarwienia komórek skórki liści okrywowych cebuli barwionych czerwiecią obojętną będzie zależała od szybkości zmiany pH w komórkach umieszczonych w roztworach wodorotlenków. Przepuszczalność błon biologicznych dla wodorotlenków jest odwrotnie proporcjonalna do stopnia ich dysocjacji.

Materiał

cebula cebuli

Odczynniki

0,1% roztwór czerwieni obojętnej w 70% C_2H_5OH , 0,025 M HCl, 0,025 M NH_4OH , 0,025 M KOH

Sprzęt laboratoryjny

żyłetka, igła preparacyjna, szalka Petriego o średnicy 9 cm, 2 szkiełka podstawowe, pęseta

Wykonanie doświadczenia

Kilka fragmentów wewnętrznej skórki łuski cebuli o powierzchni około 1 cm^2 umieścić na szalce Petriego w roztworze czerwieni obojętnej. Po 5 minutach fragmenty skórki przenieść do szalki zawierającej 0,025 M HCl. Po upływie kolejnych 5 minut dokładnie wypłukać je w szalce z wodą destylowaną i umieścić na szkiełku podstawowym w kropli:

- a) 0,025 M NH_4OH ,
- b) 0,025 M KOH.

Obserwować zmianę zabarwienia fragmentów skórki łuski cebuli.

Opracowanie wyników

Na podstawie szybkości zmiany zabarwienia fragmentów skórki łuski okrywowej cebuli ustalić, który z wodorotlenków szybciej wnika do komórek. Wyjaśnić, dlaczego tak się dzieje.

Doświadczenie IV

Wpływ kationów jedno- i dwuwartościowych na rodzaj plazmolizy

Zasada metody

Pod wpływem użytych w doświadczeniu stężonych soli w komórkach skórki łuski cebuli nastąpi plazmoliza, której charakter będzie zależny od obecnych w soli kationów.

Materiał

cebula cebuli

Odczynniki

1 M KNO_3 , 1 M $Ca(NO_3)_2$

Sprzęt laboratoryjny

żyłetka, igła preparacyjna, 2 szkiełka podstawowe, 2 szkiełka nakrywkowe, mikroskop świetlny

Wykonanie doświadczenia

Wykonać 2 preparaty mikroskopowe z wewnętrznej skórki łuski okrywowej cebuli w kropli:

a) 1 M KNO_3 ,

b) 1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

Po upływie 15–30 minut obejrzyć preparaty pod mikroskopem (powiększenie obiektywu 10× lub 20×).

Opracowanie wyników

W zeszycie wykonać rysunki splazmolizowanych komórek i wyjaśnić, dlaczego kationy jedno- i dwuwartościowe wywołują inny rodzaj plazmolizy.

Literatura

Kopcewicz J., *Podstawy biologii roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.

Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.05>

ROZDZIAŁ V. **DALEKI TRANSPORT WODY,
TRANSPIRACJA**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Wzrost roślin jest uzależniony od ciągłego zaopatrywania komórek w substancje pokarmowe i wodę. Zawartość wody w tkankach aktywnych metabolicznie może wynosić 70–95%. Woda pełni wielorakie funkcje w roślinie. Jest rozpuszczalnikiem wielu substancji, tworzy środowisko reakcji chemicznych, a w niektórych reakcjach bierze bezpośredni udział jako substrat lub produkt. Woda hydratacyjna związana z makromolekułami odpowiada za ich strukturę i aktywność metaboliczną. Woda podtrzymuje turgor, umożliwia szybki wzrost komórek oraz całej rośliny. Jest ważnym czynnikiem termoregulacji. Transportuje związki mineralne i niektóre metabolity w ksylemie oraz produkty asymilacji i substancje biologicznie czynne we floemie.

Przemieszczanie się wody w roślinie zachodzi w wyniku trzech podstawowych procesów: dyfuzji, osmozy oraz przepływu objętościowego (masowego), który odpowiada za **daleki transport wody w ksylemie** i transport floemowy. Warunkiem pobierania wody i jej dalekiego transportu w roślinie jest istnienie gradientu potencjału wody w układzie gleba-roślina-atmosfera, a działanie ssące transpiracji jest główną siłą napędową. **Transpiracja** to inaczej proces czynnego parowania wody z powierzchni liści oraz innych organów nadziemnych, wspomagany przez siły kapilarne, kohezję i adhezję. Szybkość transportu wody w naczyniach ksylemu uzależniona jest głównie od intensywności transpiracji, oznaczającej ilość wody, która wyparowała z rośliny, przeliczoną na jednostkę powierzchni liści, w określonym czasie. Jednostką intensywności transpiracji w układzie SI jest $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Woda paruje głównie przez szparki (transpiracja szparkowa) oraz w mniejszym stopniu przez skutynizowaną epidermę (transpiracja kutykularna) i przetchlinki. Intensywność transpiracji regulowana jest przez czynniki roślinne, takie jak: wielkość

i przepuszczalność powierzchni parowania wody, liczba i stopień rozwarcia szparek oraz opór kutykularny i szparkowy, a także przez czynniki środowiskowe, w tym: ilość i dostępność wody w glebie, temperatura i napowietrzenie gleby oraz temperatura i wilgotność powietrza, światło i wiatr.

Bilans wodny rośliny jest definiowany jako różnica między ilością wody pobranej i ilością wody wytranspirowanej przez roślinę w określonym czasie. Jeśli utrata wody dominuje nad jej pobieraniem, bilans wodny jest ujemny. Jego objawem jest więdnienie rośliny. Czynniki stresowe, takie jak: niedobór wody (susza), nadmiar wody (zalanie) i uszkodzenia mechaniczne tkanki przewodzącej, zakłócają transport wody. W warunkach deficytu wody zwiększa się **synteza kwasu abscysynowego (ABA)** w roślinach, natomiast nadmiar wody (zalanie) powoduje syntezę etylenu. Oba fitohormony są ważnymi przekaźnikami informacji o pogarszających się stosunkach wodnych między korzeniem i pędem. W regulacji ruchu szparek ważną rolę odgrywa ABA, przemieszczający się w ksylemie wraz z prądem transpiracyjnym do liści, powodujący szybkie zamknięcie szparek.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Doświadczenie I

Wpływ powierzchni liści na zdolność roślin do dalekiego transportu wody

Cel ćwiczenia

Zbadanie wpływu powierzchni liści na objętość wody pobranej przez roślinę w wyniku działania siły ssącej transpiracji.

Zasada metody

W wyniku transpiracji roślina pobiera wodę, co powoduje przemieszczanie się pęcherzyka powietrza w potometrze. Pobieranie wody przez roślinę jest wprost proporcjonalne do dystansu pokonanego przez pęcherzyk. W celu wyeliminowania zjawiska parcia korzeniowego w doświadczeniu wykorzystywane są pędy roślin pozbawione korzeni.

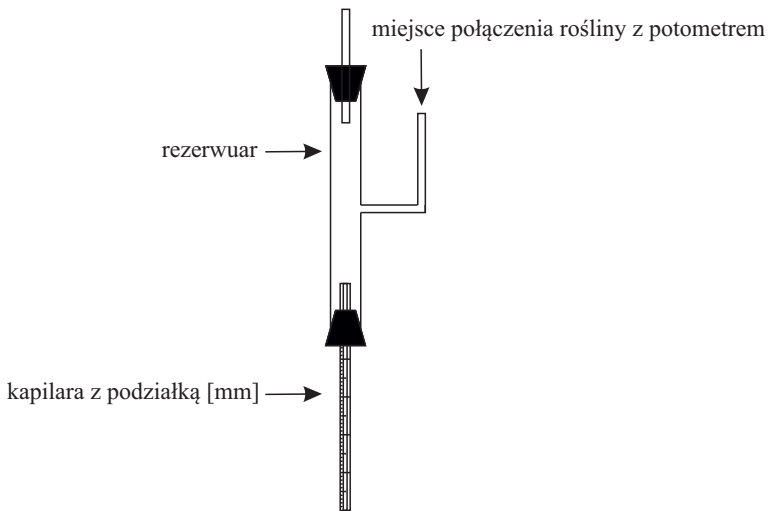
Materiał

pęd bzu, figowca lub rośliny innego gatunku mającej zdrewniałą łodygę oraz co najmniej 40 liści

Sprzęt laboratoryjny

potometr (przykład konstrukcji potometru przedstawia rysunek 5.1), zlewka (100–250 cm³), kuweta laboratoryjna (~10 dm³), statyw, waga laboratoryjna, smar silikonowy lub parafilm, papier, stoper

Rysunek 5.1. Schemat budowy potometru



Wykonanie doświadczenia

Kuwetę laboratoryjną napełnić wodą z kranu i zanurzyć w niej dolną część pędu świeżo uciętej rośliny oraz potometr. Potometr wraz z rezerwuarem powinien być całkowicie wypełniony wodą, bez pęcherzyków powietrza, które po dostaniu się do ksylemu mogłyby utrudnić lub całkowicie zahamować transport wody w roślinie. Następnie pod wodą włożyć koniec pędu rośliny do otwartego przewodu potometru i uszczelnić połączenie smarem silikonowym lub parafilmem. Po uszczelnieniu potometru zamknąć szczelnie rezerwuuar wody gumowym korkiem. Zlewkę wypełnić wodą z kranu. Po ostrożnym wyjęciu z kuwety rośliny z potometrem niezwłocznie zanurzyć koniec kapilary potometru w zlewce, tak aby zachować ciągłość pobierania wody przez roślinę. Całość zamontować w statywie. Przed rozpoczęciem pomiaru

pobierania wody przez roślinę wszystkie liście powinny zostać osuszone. Przygotować stoper. Wyjąć kapilarę ze zlewki. Po pojawieniu się pęcherzyka powietrza ponownie zanurzyć kapilarę w zlewce. Kiedy pęcherzyk przemieści się do początku podziałki na kapilarze, włączyć stoper i mierzyć odległość pokonaną przez pęcherzyk w ciągu 1 minuty. Wynik zanotować w tabeli 5.1.

Przygotować potometr do kolejnego pomiaru. W tym celu poczekać, aż pęcherzyk powietrza przemieści się do rezerwuaru, a woda ponownie wypełni całą kapilarę. Pomiar powtórzyć dwukrotnie. Wyniki uśrednić.

Po wykonaniu trzech pomiarów dystansu, jaki pokonał pęcherzyk powietrza, odciąć od pędu 10 liści oraz oznaczyć pole powierzchni liści metodą wagową (grawimetryczną). Kontury blaszek liściowych odciętych od rośliny obrysować na papierze. Wycięte, papierowe odwzorowania liści zważyć. Z tego samego papieru wyciąć fragment o znanej powierzchni, np. 1 dm², i zważyć. Znając masę jednostki powierzchni papieru i masę liści papierowych, z proporcji wyliczyć powierzchnię liści, korzystając ze wzoru:

$$X = \frac{A}{B \times 100}$$

gdzie:

X – powierzchnia liści [m²],

A – masa papierowego odwzorowania liści [g],

B – masa 1 dm² papieru [g].

Po odcięciu 10 liści ponownie wykonać pomiar dystansu pokonanego przez przemieszczający się pęcherzyk powietrza w ciągu 1 minuty. Pomiar powtórzyć dwukrotnie, a uzyskane wyniki uśrednić. Następnie odciąć kolejne 10 liści, oszacować ich powierzchnię i wykonać ponowne pomiary jak wyżej. Ostatnie pomiary dystansu pokonanego przez przemieszczający się pęcherzyk powietrza powinny zostać wykonane z wykorzystaniem pędu pozbawionego liści. Uśrednione wyniki zanotować w tabeli 5.1.

Opracowanie wyników

Obliczyć całkowite pole powierzchni liści usuniętych podczas całego eksperymentu, sumując pola powierzchni liści usuniętych w kolejnych etapach doświadczenia. Następnie obliczyć pole powierzchni

liści pozostających na pędzie na każdym etapie eksperymentu. Na zakończenie obliczyć objętość wody pobranej przez roślinę w wyniku transpiracji na każdym etapie działania, korzystając ze wzoru:

$$V = \frac{3,14 \times r^2 \times d}{1000}$$

gdzie:

V – objętość wody pobranej przez roślinę w wyniku transpiracji [$\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$],

3,14 – wartość π ,

r – promień podstawy kapilary [mm],

d – dystans pokonany przez pęcherzyk powietrza [mm].

Po uzupełnieniu tabeli 5.1 wykonać wykres zależności objętości wody pobranej przez roślinę w wyniku transpiracji [$\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$] od powierzchni liści [m^2]. Wyniki omówić i zinterpretować.

Tabela 5.1. Zależność objętości wody pobranej przez roślinę w wyniku transpiracji od powierzchni liści

Wariant	Powierzchnia liści [m^2]	Średni dystans pokonany przez pęcherzyk powietrza [mm min^{-1}]	Objętość wody pobranej przez roślinę w wyniku transpiracji [$\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$]
Pęd 40 liści			
Pęd 30 liści			
Pęd 20 liści			
Pęd 10 liści			
Pęd bez liści			

Doświadczenie II

Wpływ warunków środowiska na intensywność transpiracji

Cel ćwiczenia

Zbadanie wpływu oświetlenia, temperatury i wilgotności powietrza na intensywność transpiracji.

Zasada metody

Warunki środowiska, m.in. oświetlenie, temperatura oraz wilgotność powietrza, mogą wpływać na stopień rozwartości szparki oraz intensywność transpiracji, a w konsekwencji na ilość wody

pobranej przez rośliny. Pomiar ubytku wody w określonych warunkach środowiska pozwala na ocenę wpływu tych warunków na intensywność transpiracji.

Materiał

24 rośliny tulipana podobnej wielkości

Sprzęt laboratoryjny

12 probówek typu Falcon 15 cm³, statywy, pipety, zlewka (100–250 cm³), waga laboratoryjna, lampka biurkowa, wentylator, nawilżacz powietrza, olej lub parafina, skalpel

Wykonanie doświadczenia

12 probówek umieszczonych w statywach napełnić wodą z kranu do objętości 5 cm³. Następnie koniec łodygi każdej rośliny odciąć pod wodą w zlewce w celu usunięcia części, w której wiązki przewodzące mogły być zapowietrzone. Umieścić po dwie rośliny w każdej probówce. Na powierzchnię wody ostrożnie nanieść kroplę płynnej parafiny lub oleju, która utworzy warstwę zabezpieczającą przed ewaporacją. Określić masy początkowe (m_p) probówek z roślinami. Probówki z roślinami (dwie probówki/wariant) pozostawić na 2,5 godziny w określonych warunkach środowiska. Do przygotowania wariantów doświadczalnych wykorzystać odpowiednio lampkę biurkową, wentylator, nawilżacz powietrza.

Warianty doświadczalne obejmują:

- a)** światło/ $\sim 22^\circ\text{C}$, tj. rośliny pozostawione na świetle (np. na stole laboratoryjnym dodatkowo oświetlonym lampką biurkową), w temperaturze pokojowej, w atmosferze optymalnej wilgotności powietrza – rośliny kontrolne;
- b)** ciemność/ $\sim 22^\circ\text{C}$, tj. rośliny pozostawione w ciemności, w temperaturze pokojowej, w atmosferze optymalnej wilgotności powietrza (np. w wentylowanej komorze, bez dostępu światła);
- c)** światło/ $\sim 10^\circ\text{C}$, tj. rośliny pozostawione na świetle, w warunkach obniżonej temperatury (np. w chłodni, na stole laboratoryjnym, dodatkowo oświetlonym lampką biurkową);

- d) ciemność/ $\sim 10^{\circ}\text{C}$, tj. rośliny pozostawione w ciemności, w warunkach obniżonej temperatury (np. w chłodni, bez dostępu światła);
- e) powietrze suche/ $\sim 30^{\circ}\text{C}$, tj. rośliny pozostawione na świetle, w warunkach podwyższonej temperatury i obniżonej wilgotności powietrza (np. na stole laboratoryjnym, dodatkowo oświetlonym lampką biurkową, na którym stoi włączony wentylator skierowany bezpośrednio w stronę badanych roślin);
- f) powietrze wilgotne/ $\sim 30^{\circ}\text{C}$, tj. rośliny pozostawione na świetle, w warunkach podwyższonej temperatury i podwyższonej wilgotności powietrza (np. na stole laboratoryjnym, dodatkowo oświetlonym lampką biurkową, na którym stoi włączony nawilżacz powietrza skierowany bezpośrednio w stronę badanych roślin).

Po upływie 2,5 godziny określić masy końcowe (m_k) próbek z roślinami. Uśrednione wyniki z dwóch powtórzeń zanotować w tabeli 5.2.

Opracowanie wyników

Określić pole powierzchni liści zgodnie ze wzorem zamieszczonym w Doświadczeniu I. Określić intensywność transpiracji metodą wagową, polegającą na ocenie masy wody wytranspirowanej z liści, które mają jednocześnie możliwość pobierania wody. Ilość wody wytranspirowanej wylicza się z różnicy między masą początkową i końcową zestawu doświadczalnego. Intensywność transpiracji obliczyć, korzystając ze wzoru:

$$T = \frac{(m_p - m_k) \times 1000}{18 \times P_l \times t}$$

gdzie:

T – intensywność transpiracji [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$],

m_p – masa początkowa [g],

m_k – masa końcowa [g],

18 – masa molowa wody [g mol^{-1}],

P_l – powierzchnia liści [m^2],

t – czas pomiaru [s].

Wyniki omówić i zinterpretować.

Wariant	m_p [g]	m_k [g]	Powierzchnia liści [m ²]	Intensywność transpiracji [mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹]
Światło/~22°C				
Ciemność/~22°C				
Światło/~10°C				
Ciemność/~10°C				
Powietrze suche/~30°C				
Powietrze wilgotne/~30°C				

Tabela 5.2. Zależność intensywności transpiracji od warunków środowiska

Doświadczenie III

Wpływ deficytu wody na proces transpiracji

Cel ćwiczenia

Zbadanie wpływu deficytu wody na przyrost względnej wilgotności powietrza w wyniku transpiracji.

Zasada metody

Transpiracja wpływa istotnie na wilgotność powietrza. Pomiar przyrostu względnej wilgotności powietrza w wyniku transpiracji roślin rosnących w warunkach deficytu wody, a następnie po ich podlaniu pozwala pośrednio na ocenę wpływu braku wody na intensywność transpiracji.

Materiał

rośliny bazylii

Sprzęt laboratoryjny

pojemnik szklany lub plastikowy (~5 dm³), termometr, 2 higrometry, stoper, smar silikonowy

Wykonanie doświadczenia

Do pustego pojemnika szklanego włożyć termometr i higrometr. Odczytać wartość temperatury [°C] oraz wilgotności względnej powietrza [%] w czasie t_0 . Wyniki zanotować w tabeli 5.3. Następnie roślinę bazylii, która została podlana ostatni raz dwa

dni przed wykonaniem doświadczenia, włożyć do pojemnika. Pojemnik szczelnie zamknąć i uszczelnić. Włączyć stoper. Po 3 minutach ponownie odczytać wartość temperatury oraz wilgotności względnej powietrza w czasie t_3 , a następnie w kolejnych przedziałach 3-minutowych (odpowiednio czasy: t_6 , t_9 , t_{12} , t_{15} i t_{18}). Po wykonaniu doświadczenia roślinę wyjąć z pojemnika i podlać wodą z kranu. Odczekać 30 minut. Po tym czasie roślinę ponownie wstawić do pojemnika i odczytywać wartości temperatury oraz wilgotności względnej powietrza w czasach t_3 – t_{18} . Obliczyć średni przyrost względnej wilgotności powietrza poprzez odjęcie od względnej wilgotności powietrza w danym punkcie czasowym wartości w czasie t_0 . Wszystkie wyniki zanotować w tabeli 5.3.

Opracowanie wyników

Po uzupełnieniu tabeli 5.3 wykonać wykres zależności przyrostu względnej wilgotności powietrza [%] od czasu [min]. Na wykresie przedstawić wartości otrzymane dla rośliny rosnącej w warunkach deficytu wody oraz rośliny po podlaniu, w analizowanych przedziałach czasowych. Wyniki omówić i zinterpretować.

Tabela 5.3. Wpływ deficytu wody na proces transpiracji

Czas [min]	Roślina rosnąca w warunkach deficytu wody			Roślina po podlaniu		
	Temperatura [°C]	Względna wilgotność powietrza [%]	Przyrost względnej wilgotności powietrza [%]	Temperatura [°C]	Względna wilgotność powietrza [%]	Przyrost względnej wilgotności powietrza [%]
t_0						
t_3						
t_6						
t_9						
t_{12}						
t_{15}						
t_{18}						

Doświadczenie IV

Wpływ kwasu absycynowego (ABA) na proces transpiracji

IV.A. WPŁYW ABA NA FUNKCJONOWANIE APARATÓW SZPARKOWYCH

Cel ćwiczenia

Zbadanie wpływu ABA na rozwartość szparek.

Zasada metody

ABA jest jednym z głównych endogennych czynników regulujących rozwartość szparek w aparatach szparkowych. Egzogen-na aplikacja ABA na liście umożliwia obserwację zamykania szparek.

Materiał

rośliny trzykrotki i zielistki

Odczynniki

woda destylowana, 100 μM ABA

Sprzęt laboratoryjny

szklane szalki Petriego o pojemności około 0,5 dm³, żyłetki, pęsety, igły preparacyjne, szkiełka zegarkowe, szkiełka mikroskopowe, zlewka, pipety, mikroskop

Wykonanie doświadczenia

W szklanych szalkach wypełnionych wodą destylowaną umieścić 5 odciętych liści trzykrotki lub zielistki, dolną stroną blaszki liściowej. Liście pozostawić w szalkach na 24 godziny, w oświetlonym miejscu, w temperaturze pokojowej (ok. 23°C). Po 24 godzinach wyciąć żyłetką fragmenty dolnej i górnej skórki liści, a następnie umieścić je na 2 godziny na szkiełkach zegarkowych wypełnionych odpowiednio wodą destylowaną (kontrola) lub 100 μM ABA. Po inkubacji przygotować preparaty mikroskopowe i obserwować je przy powiększeniu obiektywu 10 \times .

Opracowanie wyników

Wyliczyć średnią liczbę aparatów szparkowych (otwartych i zamkniętych) przypadających na pole widzenia mikroskopu (10 pól widzenia/preparat). Średnie wartości liczby aparatów szparkowych w polu widzenia mikroskopu podać w tabeli 5.4. Obliczyć % otwartych szparek w poszczególnych wariantach. Wyniki omówić i zinterpretować. Opisać, jaki typ liści ze względu na usytuowanie aparatów szparkowych występuje u trzykrotki, a jaki u zielistki.

Tabela 5.4. Wpływ ABA na rozwartość szparek

Parametr	Rośliny trzykrotki		Rośliny zielistki	
	Kontrola	ABA	Kontrola	ABA
Górna skórka liścia				
Średnia liczba aparatów szparkowych				
% otwartych szparek				
Dolna skórka liścia				
Średnia liczba aparatów szparkowych				
% otwartych szparek				

IV.B. WPŁYW ABA NA INTENSYWNOŚĆ UTRATY WODY Z LIŚCI

Cel ćwiczenia

Zbadanie wpływu ABA na względną zawartość wody w liściach poddanych procesowi suszenia.

Zasada metody

Pomiar zmian względnej zawartości wody w liściach roślin kontrolnych oraz traktowanych egzogennie ABA, poddanych procesowi suszenia, pozwala na pośrednią ocenę wpływu ABA na spadek transpiracji, a w konsekwencji spadek ilości utraconej wody.

Materiał

siewki kukurydzy hodowane hydroponicznie

Odczynniki

woda destylowana, 100 μ M ABA

Sprzęt laboratoryjny

szalki Petriego, eksykator, ręczniki papierowe, waga laboratoryjna, papier, stoper

Wykonanie doświadczenia

Nasiona kukurydzy inkubować 4 godziny w wodzie, a następnie wyłożyć na szalki Petriego – z umieszczonymi na nich krążkami bibuły zwilżonymi wodą destylowaną. Szalki umieścić w ciemności, w temperaturze $\sim 28^{\circ}\text{C}$ celem skielkowania nasion. Siewki mające korzenie o długości około 1 cm umieścić w kielkownikach do hodowli hydroponicznej. Dalszą hodowlę prowadzić w temperaturze $\sim 28^{\circ}\text{C}$, przy fotoperiodzie 18 godzin/6 godzin (dzień/noc), aż do pojawienia się co najmniej 5 liści na roślinie. Następnie odciąć liście siewek kukurydzy i umieścić po 10 sztuk na szalkach Petriego wyłożonych bibułą filtracyjną zwilżoną 10 cm^3 wody destylowanej (kontrola) lub 10 cm^3 $100\ \mu\text{M}$ ABA (ABA). Dalszą inkubację prowadzić w ciemności, w temperaturze 25°C przez 24 godziny. Po 24 godzinach liście wyjąć z szalek, osuszyć i niezwłocznie zważyć w czasie t_0 . Następnie liście umieścić w eksykatorze na 2 godziny i ważyć co 20 minut. Wyniki zanotować w tabeli 5.5.

Opracowanie wyników

Określić względną zawartość wody w liściach (RWC), korzystając ze wzoru:

$$\text{RWC} = \frac{\text{masa liści w danym punkcie czasowym doświadczenia}}{\text{masa liści w czasie } t_0} \times 100$$

gdzie:

RWC – względna zawartość wody w liściach [%].

Uzyskane wyniki umieścić w tabeli 5.5 i na ich podstawie wykonać wykres zależności RWC [%] od czasu [min]. Na wykres nanieść wartości otrzymane dla rośliny inkubowanej w wodzie destylowanej (kontrola) lub $100\ \mu\text{M}$ ABA (ABA). Wyniki omówić i zinterpretować.

Czas [min]	Kontrola		ABA	
	Masa liści [g]	RWC [%]	Masa liści [g]	RWC [%]
t_0				
t_{20}				
t_{40}				
t_{60}				
t_{80}				
t_{100}				
t_{120}				

Tabela 5.5. Wpływ ABA na względną zawartość wody (RWC) w liściach kukurydzy poddanych procesowi suszenia

Literatura

Kopcewicz J., *Podstawy biologii roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2016.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.06>

ROZDZIAŁ VI. **BARWNIKI ASYMILACYJNE**
I ICH WŁAŚCIWOŚCI

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Chlorofile są najbardziej rozpowszechnionymi zielonymi barwnikami roślinnymi. Występują w tkankach fotosyntetycznych. Razem z karotenoidami biorą udział w absorpcji energii świetlnej i jej zamianie na energię chemiczną, wykorzystywaną w endoergicznym procesie syntezy związków organicznych z nieorganicznych związków niskocząsteczkowych, takich jak CO_2 i H_2O , według równania:



W budowie chlorofilu można wyróżnić dwie zasadnicze części: „głowę”, będącą pochodną tetrapirołu (chlorofilina), stanowiącą układ porfirynowy, w którego centrum znajduje się atom magnezu, związany koordynacyjnie z atomami azotu pierścieni pirolowych, oraz „ogon”, który jest utworzony przez 20-węglowy alkohol fitol połączony wiązaniem estrowym z magnezoporfiryną. Obecność w chlorofilinie układu wiązań sprzężonych sprawia, że chlorofil jest efektywnym fotoreceptorem, i nadaje mu charakterystyczną zieloną barwę. Silnie hydrofobowy fitol zakotwicza chlorofil w błonach tylakoidów, zapewniając jednocześnie jego odpowiednie ułożenie.

Znanych jest kilka rodzajów chlorofilu, jednak u roślin występuje głównie **chlorofil a** oraz **chlorofil b**. Wszystkie fotosyntetyzujące organizmy zawierają chlorofil a ($\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{O}_5\text{N}_4\text{Mg}$) o niebiesko-zielonym zabarwieniu, który absorbuje światło niebiesko-fioletowe o długości fali 430 nm oraz czerwone o długości 662 nm. Chlorofil b wykazujący żółto-zieloną barwę najintensywniej absorbuje światło niebieskie w zakresie 455 nm i czerwone o długości fali 642 nm. Różnica w budowie między chlorofilem a i chlorofilem b polega na obecności grupy metylowej przy drugim pierścieniu pirolowym chlorofiliny w przypadku

chlorofilu *a*, podczas gdy chlorofil *b* zawiera w tym miejscu grupę formylową. Chlorofile są uważane za najmniej trwałe barwniki roślinne. Charakterystyczną zieloną barwę zachowują tylko w żywych, nieuszkodzonych tkankach. Do czynników przyspieszających przemiany chlorofilu zalicza się: wysoką temperaturę, kwasowe środowisko oraz tlen i światło. Kierunki przemian i barwa powstających produktów zależą w dużej mierze od pH środowiska.

Drugą grupę barwników asymilacyjnych stanowią **karotenoidy**, będące tetraterpenami zbudowanymi z ośmiu reszt izoprenowych (40 atomów węgla w cząsteczce). W cząsteczkach tych związków znajdują się najczęściej dwa pierścienie jononu połączone łańcuchem węglowodorowym, w którym – podobnie jak w cząsteczce chlorofilu – wiązania między atomami węgla występują w układzie sprzężonym. Karotenoidy absorbują światło w niebiesko-fioletowym zakresie światła widzialnego. Do karotenoidów zalicza się dwie grupy związków: **karoteny** o barwie czerwono-pomarańczowej – nienasycone węglowodory niezawierające atomów tlenu; żółte **ksantofile** – węglowodory charakteryzujące się obecnością atomów tlenu. Obecność atomu (atomów) tlenu w cząsteczkach ksantofili zwiększa ich polarność względem karotenów.

Trzecią grupą barwników asymilacyjnych są **fikobiliny**, występujące u sinic i krasnorostów. W przeciwieństwie do chlorofilu i karotenoidów są rozpuszczalne w wodzie.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Doświadczenie I

Rozdział barwników fotosyntetycznych metodą chromatografii cienkowarstwowej (ang. thin layer chromatography, TLC)

Cel ćwiczenia

Identyfikacja barwników asymilacyjnych liści.

Zasada metody

Metoda chromatografii cienkowarstwowej polega na rozdzieleniu składników mieszaniny na podstawie różnic w prędkości przemieszczania się poszczególnych składników w danym układzie

rozwijającym. Prędkość ta jest zależna od oddziaływań międzycząsteczkowych między związkami chemicznymi obecnymi w analizowanej próbce a fazą rozdzielczą i eluentem (układ rozwijający). Im związek jest bardziej polarny, tym lepiej będzie adsorbowany przez żel krzemionkowy (stanowi fazę stacjonarną). Mało polarne związki słabo wiążą się z płytką pokrytą żelem krzemionkowym i przemieszczają się wraz z eluentem. Związki bardziej polarne są lepiej wiązane przez płytkę i nie przemieszczają się znacząco od miejsca, w którym zostały nałożone.

Materiał

liście ogórka, pomidora lub fasoli

Odczynniki

chloroform, CaCO_3 , mieszanina benzen–eter naftowy–aceton (10:2,5:1,5; v/v/v), 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, płytka chromatograficzna pokryta żelem krzemionkowym ze znacznikiem fluorescencyjnym (Merck 60 F₂₅₄)

Sprzęt laboratoryjny

moździerz porcelanowy, lejek szklany, sączki z bibuły, próbowniki wirownicze typu Eppendorf, pipety (1–5 cm³), pipety kapilarne, komora chromatograficzna, mikrowirówka, spektrofotometr, kuwety do spektrofotometru, ołówki, linijki, waga laboratoryjna, skalpel

UWAGA: Wszystkie czynności wykonać pod pracującym dygestorium.

I.A. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU Z LIŚCI

Rozdrobnione liście (2 g) rozetrzeć w moździerzu porcelanowym. Dodać 3 cm³ chloroformu oraz niewielką ilość CaCO_3 w celu zneutralizowania kwasów organicznych i ochrony cząsteczek chlorofilu przed usunięciem magnezu z układu porfiryнового. Homogenat przesączyć przez bibułę filtracyjną do suchej próbowniki typu Eppendorf. Przesącz, będący ekstraktem barwników fotosyntetycznych, użyć do wykonania rozdziału chromatograficznego.

I.B. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA

Wykonanie doświadczenia

Na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym zaznaczyć ołówkiem punkty startowe w odległości 2 cm od dolnej krawędzi płytki. Punkty powinny znajdować się w odległości 2 cm od siebie. Za pomocą pipety kapilarnej nanieść kroplami ekstrakt barwników fotosyntetycznych na zaznaczone punkty startowe. Kolejne krople ekstraktu powinny być наносzone (jedna na drugą) dopiero po wyschnięciu poprzedniej kropli. W każdym punkcie startowym powinno znajdować się 12–15 kropli ekstraktu.

Tak przygotowaną płytkę umieścić krawędzią startową do dołu w komorze chromatograficznej zawierającej 100 cm³ mieszaniny rozpuszczalników o składzie: benzen–eter naftowy–aceton (10:2,5:1,5; v/v/v). Płytkę chromatograficzną powinna być zanurzona na kilka milimetrów w eluencie tak, aby uniknąć kontaktu naniesionych substancji z rozpuszczalnikiem. Komorę chromatograficzną szczelnie przykryć wieczkiem, a chromatogram rozwijać przez 15–30 minut. W tym czasie eluent stopniowo przemieszcza się w kierunku górnej krawędzi płytki i dzięki zjawisku kapilarnemu powoduje rozdział substancji. Rozdział chromatograficzny prowadzi do całkowitego rozdzielania się barwników asymilacyjnych.

Po uzyskaniu wyraźnego rozdziału barwników wyjąć płytkę z komory chromatograficznej, zaznaczyć ołówkiem czoło rozpuszczalnika i pozostawić do wyschnięcia.

Opracowanie wyników

Suchą płytkę obejrzyć w promieniach lampy UV (365 nm), obserwując fluorescencję barwników. Dla każdego barwnika (identyfikacji poszczególnych barwników dokonać na podstawie charakterystycznej dla nich barwy) wyznaczyć współczynnik przesunięcia (ang. *retention factor*, R_f), będący ilorazem odległości przebytej przez substancję rozdzielaną przez odległość przebytą przez czoło eluentu:

$$R_f = \frac{\text{przesunięcie badanej substancji od linii startu}}{\text{przesunięcie czoła eluentu od linii startu}}$$

Po przeprowadzeniu obserwacji i obliczeń wykonać rysunek chromatogramu z zaznaczeniem barwy, nazwy barwnika i współczynnika R_f dla każdej plamy (por. rozdział XXI, rysunek 21.1).

I.C. WYZNACZANIE MAKSYMUM ABSORPCJI ŚWIATŁA DLA BARWNIKÓW FOTOSYNTETYCZNYCH

Wykonanie doświadczenia

Barwniki fotosyntetyczne rozdzielone metodą chromatografii cienkowarstwowej zdrapać z płytki razem ze złożem, po czym odzyskać je przez ekstrakcję 96% C_2H_5OH . Za pomocą skalpela zdrapać żel krzemionkowy z kilku plam tego samego barwnika i przenieść do probówki typu Eppendorf, a następnie dodać $1,5\text{ cm}^3$ C_2H_5OH . Probówkę silnie wytrząsać przez 15 sekund, a następnie 5 minut wirować w mikrowirówce przy działaniu siły odśrodkowej $6000 \times g$. Uzyskany supernatant przenieść do kuwety spektrofotometrycznej, a następnie oznaczyć wartości absorbancji dla poszczególnych barwników w zakresie długości fal 400–700 nm co 10 nm. Oznaczenia wykonać wobec C_2H_5OH stanowiącego próbę odnośnikową.

Opracowanie wyników

Zapisać wyniki pomiarów i narysować widmo absorpcji dla poszczególnych barwników, zaznaczając na osi odciętych (x) długość fali świetlnej [nm], a na osi rzędnych (y) otrzymane wartości absorbancji.

Doświadczenie II

Rozdział barwników metodą Krausa i określenie ich właściwości fizykochemicznych

Cel ćwiczenia

Zbadanie właściwości fizycznych i chemicznych barwników fotosyntetycznych.

Materiał

liście ogórka, pomidora lub fasoli

Odczynniki

96% C_2H_5OH , $CaCO_3$, cykloheksan, 20% HCl, octan miedzi (II), 20% alkoholowy roztwór NaOH, woda destylowana

Sprzęt laboratoryjny

moździerz porcelanowy, sączki z bibuły, lejek szklany, 3 probówki szklane z korkiem i podziałką, 5 probówek szklanych, drewniane uchwyty do probówek, pipety ($1-5\text{ cm}^3$), palnik, lampa UV, waga laboratoryjna

II.A. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU Z LIŚCI

Świeże, rozdrobnione liście (5 g) rozetrzeć w moździerzu porcelanowym. Do homogenizacji dodać niewielką ilość $CaCO_3$ oraz 3 cm^3 96% C_2H_5OH . Po ekstrakcji barwników do alkoholu mieszaninę homogenizacyjną przesączyć przez bibułę filtracyjną do suchej probówki z podziałką. Do tkanek pozostałych w moździerzu dodać następną porcję alkoholu (3 cm^3) i dalej homogenizować. Czynności te powtarzać, aż do uzyskania 10 cm^3 klarownego alkoholowego ekstraktu z liści.

II.B. ROZDZIAŁ BARWNIKÓW METODĄ KRAUSA

Zasada metody

Zawarte w liściach barwniki asymilacyjne różnią się polarnością. Podczas ekstrakcji barwniki niepolarne (chlorofile i karoteny) przemieszczają się z warstwy alkoholowej do warstwy niepolarniej, natomiast barwniki polarne (ksantofile) pozostają w warstwie alkoholowej.

Wykonanie doświadczenia

Do suchej probówki z podziałką przenieść 3 cm^3 ekstraktu alkoholowego, a następnie dodać $4,5\text{ cm}^3$ cykloheksanu i 2–3 krople wody destylowanej w celu zwiększenia polarności frakcji alkoholowej i lepszego rozdzielania warstw. Zamkniętą korkiem probówkę wytrząsać 0,5 minuty, a następnie wstawić do statywu w celu rozwarstwienia cieczy. Warstwa górna (cykloheksan) zabarwiona na zielono zawiera chlorofile oraz karoteny. Warstwa dolna (alkoholowa) zabarwiona na żółto zawiera ksantofile.

Opracowanie wyników

Przedstawić graficznie wygląd zawartości probówek przed i po ekstrakcji, zaznaczyć warstwy rozpuszczalników i zawarte w nich barwniki. Wyjaśnić obserwowany proces fizyczny.

II.C. BADANIE FIZYKOCHEMICZNYCH WŁAŚCIWOŚCI CHLOROFILU

1. Otrzymywanie feofityny

Zasada metody

W środowisku lekko kwasowym chlorofil traci atom magnezu, w wyniku czego powstaje oliwkowo-brunatna feofityna, natomiast w silnie kwasowym środowisku zostaje odszczepiony łańcuch fitolu i powstaje feoforbid.

Wykonanie doświadczenia

Do 3 cm³ alkoholowego ekstraktu barwników dodawać kroplami 20% HCl. Obserwować zmianę zabarwienia.

Opracowanie wyników

Zanotować obserwacje i podać wnioski z przeprowadzonego doświadczenia.

2. Odbudowa wiązania metaloorganicznego

Zasada metody

Charakterystyczną właściwością chlorofili jest możliwość łatwej wymiany jonów Mg²⁺ na jony innych metali dwuwartościowych. Efektem tych reakcji jest najczęściej zmiana barwy, np. wprowadzenie jonów Fe²⁺ daje pochodne chlorofilu o barwie szarobrunatnej, a wprowadzenie do cząsteczki chlorofilu jonów Cu²⁺ lub Zn²⁺ powoduje zwiększenie stabilności zielonej barwy.

Wykonanie doświadczenia

Do 2 cm³ feofityny otrzymanej w poprzednim zadaniu dodać kilka kryształków octanu miedzi i ostrożnie ogrzewać w płomieniu palnika. Brunatna barwa feofityny zmienia się na zieloną. Powstaje

wówczas porfiryne miedziowa. Kwas octowy jest katalizatorem reakcji. Porównać barwę roztworu otrzymanej porfiryny miedziowej z barwą alkoholowego ekstraktu barwników.

Opracowanie wyników

Zanotować obserwacje i podać wnioski z przeprowadzonego doświadczenia.

3. Zmydlanie chlorofilu

Zasada metody

W środowisku zasadowym następuje hydroliza – tzw. zmydlanie chlorofilu. Pod wpływem NaOH następuje odszczepienie od cząsteczki chlorofilu alkoholu metylowego i fitolu – powstaje szereg różnych chlorofilin. Ponieważ chlorofiliny zawierają w centrum układu porfiryнового atom magnezu, zachowują charakterystyczną dla chlorofilu zieloną barwę, a ich sole potasowe i sodowe są dobrze rozpuszczalne w wodzie.

Wykonanie doświadczenia

Do szklanej probówki z podziałką zawierającej 2 cm³ alkoholowego ekstraktu barwników dodawać kroplami 20% alkoholowy roztwór NaOH i dobrze wymieszać. Do roztworu zawierającego składniki powstałe po zmydleniu chlorofilu dodać 2 cm³ cykloheksanu i dokładnie wymieszać. Górna warstwa (cykloheksan) zabarwiona na żółto zawiera karoteny oraz powstały po zmydleniu fitol. Dolna warstwa (alkoholowa) ma zielone zabarwienie, ponieważ zawiera polarne chlorofiliny.

Opracowanie wyników

Zanotować obserwacje i porównać otrzymany wynik doświadczenia z doświadczeniem dotyczącym rozdziału barwników metodą Krausa.

4. Wytrącanie chlorofilu z roztworu

Zasada metody

Hydrofobowy charakter fitolu umożliwia lokalizację cząsteczek chlorofilu w lipidowych warstwach błon tylakoidów

i powoduje, że barwnik ten rozpuszcza się tylko w rozpuszczalnikach niepolarnych.

Wykonanie doświadczenia

Do alkoholowego ekstraktu barwników dodawać kroplami H_2O i obserwować wytrącanie się chlorofilu.

Opracowanie wyników

Zanotować obserwacje i podać wnioski z przeprowadzonego doświadczenia.

Doświadczenie III

Fluorescencja barwników

Zasada metody

Światło o określonej długości fali absorbowane przez chlorofil powoduje jego wzbudzenie. Powrotowi wzbudzonej cząsteczki do stanu podstawowego towarzyszy emisja promieniowania, czyli fluorescencja. Światło fluorescencji charakteryzuje się dłuższą falą w porównaniu ze światłem, które fluorescencję wywołało. Cząsteczki chlorofilu po zaabsorbowaniu światła UV (wysoka energia promieniowania) wykazują czerwoną fluorescencję (niska energia promieniowania).

Wykonanie doświadczenia

Alkoholowy ekstrakt z liści (por. II.A) obejrzyć w promieniach światła ultrafioletowego (UV). Obserwuje się czerwoną fluorescencję. Opisać i wyjaśnić zaobserwowane zjawisko. Sprawdzić zdolność do fluorescencji także dla feofityny, porfiryiny miedziowej oraz zmydlonego i wytrąconego z roztworu chlorofilu.

Opracowanie wyników

Zanotować obserwacje dotyczące wszystkich badanych barwników i podać wnioski z przeprowadzonego doświadczenia.

Literatura

Kłyszajko-Stefanowicz L. (red.), *Ćwiczenia z biochemii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.

Kopcewicz J., *Podstawy biologii roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.

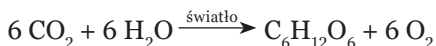
<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.07>

ROZDZIAŁ VII. **REAKCJA HILLA**

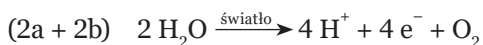
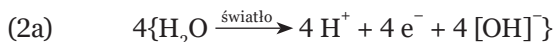
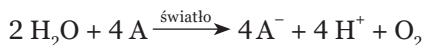
CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Fotosynteza polega na wytwarzaniu związków organicznych z CO_2 i wody kosztem energii świetlnej w obecności barwników fotosyntetycznych, co przedstawia ogólna reakcja fotosyntezy (1). Jest to bardzo uproszczona definicja, która nie oddaje złożoności całego procesu fotosyntezy. W 1937 roku Robert Hill wykazał, że oświetlane chloroplasty w obecności odpowiednich akceptorów (A), np. potasu heksacyjanożelazianu (III), powodują rozszczepienie wody przy nieobecności CO_2 , czemu towarzyszy wydzielenie tlenu (2a i 2b). Zredukowaniu czterech równoważników akceptora (A) odpowiada wydzielenie jednej cząsteczki tlenu (2). Zjawisko to, nazwane reakcją Hilla, przyczyniło się do wyjaśnienia roli wody jako źródła elektronów do redukcji CO_2 i ostatecznego potwierdzenia, że tlen wydzielający się w trakcie fotosyntezy pochodzi z wody. Pod wpływem światła następuje transport elektronów z ulegającej fotolizie cząsteczki wody na akceptory oraz wytwarzanie tlenu jako produktu ubocznego fotosyntezy. Reakcja Hilla wykazuje możliwość oddzielenia fotochemicznej reakcji wydzielania O_2 od fotosyntetycznej redukcji CO_2 (1 i 2).

(1) Ogólna reakcja fotosyntezy:



(2) W obecności akceptora (A) chloroplasty wydzielają O_2 na świetle:



CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Wykazanie, że znajdujące się w roztworze wodnym izolowane chloroplasty w obecności akceptora elektronów dokonują rozszczepienia wody i jest to proces zależny od światła.

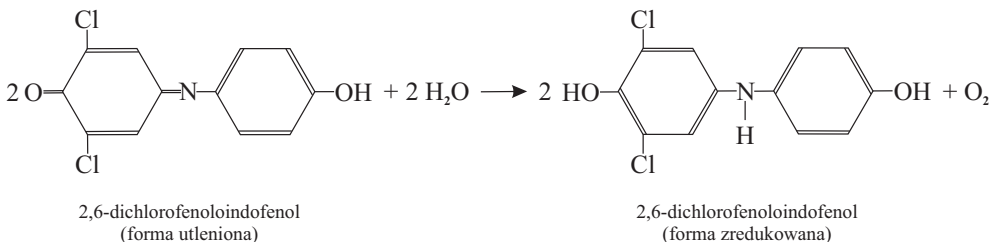
Doświadczenie I

Reakcja Hilla

Zasada metody

Przykładem reakcji Hilla jest redukcja 2,6-dichlorofenolindofenolu (2,6-DCIP) przez naświetlone chloroplasty. Naświetlenie zawiesiny chloroplastów w środowisku wodnym pozbawionym CO_2 i zawierającym 2,6-DCIP (akceptor elektronów) powoduje wydzielanie się tlenu, pomimo braku CO_2 , a 2,6-DCIP znajdujący się w roztworze ulega redukcji z formy utlenionej (barwa niebieska) do zredukowanej (bezbarwnej) (por. rysunek 7.1). W warunkach *in vivo* ostatecznym akceptorem elektronów jest NADP^+ , ale przeprowadzając reakcję *in vitro* z wykorzystaniem izolowanych chloroplastów, można go zastąpić innymi związkami, np. 2,6-DCIP. Szybkość redukcji 2,6-DCIP ocenia się kolorymetrycznie, dokonując pomiarów absorbancji roztworu przy długości fali 600 nm. Spadek absorbancji wynikający ze zmniejszenia stężenia utlenionej formy 2,6-DCIP na skutek jego redukcji jest skorelowany z intensywnością procesu rozszczepienia wody przez izolowane chloroplasty.

Rysunek 7.1. Redukcja 2,6-dichlorofenolindofenolu (2,6-DCIP)



Materiał

liście szpinaku lub fasoli

Odczynniki

0,5 M sacharoza, roztwór inkubacyjny zawierający 0,08 M KCl i 0,4 M KH_2PO_4 (pH 6,5), 0,05% 2,6-DCIP

Sprzęt laboratoryjny

moździerz, zlewka 100 cm³, cylinder miarowy 25 cm³, włóknina typu Miracloth, łaźnia wodna 25°C, lejek, skalpel, waga, 5 probówek, statyw na probówki, palnik, łapa drewniana, pipety (0,1–10 cm³), bagietka, folia aluminiowa, spektrofotometr, kuwety spektrofotometryczne, waga laboratoryjna

Wykonanie doświadczenia**1. Otrzymanie zawiesiny chloroplastów**

Liście szpinaku lub fasoli umyć pod bieżącą wodą, a następnie destylowaną. W celu zwiększenia turgoru można je umieścić na pewien czas w worku foliowym. Odważyć 3 g liści, pociąć drobno i umieścić w schłodzonym moździerzu. Homogenizować przez 5 minut z 18 cm³ schłodzonego 0,5 M roztworu sacharozy. Homogenat przesączyć przez podwójną warstwę Miracloth. Przesącz zawiera chloroplasty.

2. Reakcja Hilla

Umieścić w probówce 3 cm³ zawiesiny chloroplastów i poddać termicznej denaturacji, delikatnie ogrzewając nad palnikiem aż do wrzenia. Następnie ochłodzić probówkę pod bieżącą wodą i w razie potrzeby zawiesinę przesączyć przez włókninę. Przygotować 4 probówki: jedną dla próby kontrolnej i trzy dla badanych, z których jedną owinać dokładnie folią aluminiową. Do wszystkich probówek wlać po 9 cm³ roztworu inkubacyjnego. Następnie do pierwszej probówki (kontrola) dodać 0,5 cm³ 0,5 M sacharozy, do drugiej 0,5 cm³ zagotowanej zawiesiny chloroplastów, do trzeciej i czwartej (owiniętych folią aluminiową) po 0,5 cm³ zawiesiny świeżych chloroplastów. Do trzech prób badanych dodawać kolejno po 0,1 lub 0,5 cm³ 0,05% roztworu 2,6-DCIP, energicznie zamieszać i natychmiast

zmierzyć absorbancję przy 600 nm wobec kontroli (t_0). Drugą i trzecią probówkę wystawić na działanie żarówki 100 W (próbówki umieścić w łaźni wodnej w temperaturze 25°C w celu zabezpieczenia przed przegrzaniem od ciepła emitowanego przez żarówkę). Czwartą probówkę (owiniętą folią) umieścić w ciemności, zakrywając folią również od góry. Następnie wykonać dwa pomiary: po 10 i 20 minutach (odpowiednio t_{10} i t_{20}). Przed każdym pomiarem próbki wstrząsnąć.

Opracowanie wyników

Wyniki umieścić w tabeli 7.1 i wykonać wykres, odkładając na osi odciętych (x) czas w minutach [min], a na osi rzędnych (y) absorbancję A_{600} . Wyjaśnić, jaki jest związek zmian absorbancji z intensywnością procesu fotolizy wody.

Tabela 7.1. Redukcja 2,6-dichlorofenoloindofenolu przez wyizolowane chloroplasty na podstawie wartości absorbancji mierzonej przy długości fali 600 nm

Materiał	Naświetlanie	A_{600}				
		t_0	t_{10}	$t_0 - t_{10}$	t_{20}	$t_{10} - t_{20}$
Chloroplasty świeże	Światło					
	Ciemność					
Chloroplasty poddane termicznej denaturacji	Światło					

Literatura

- Hall D. O., Rao K. K., *Fotosynteza*, Wydawnictwo WNT, Warszawa 1999.
- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.08>

ROZDZIAŁ VIII. **ODDYCHANIE**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Oddychanie tlenowe – mitochondrialne – jest wielostopniowym procesem uwalniania, na drodze utleniania substratu, energii swobodnej zmagazynowanej w związkach organicznych i sprzęgania jej w formę energii użytecznej metabolicznie, w postaci wiązań wysokoenergetycznych w ATP. Sumarycznie oddychanie można zapisać jako reakcję **utleniania glukozy**:



U roślin źródłem zredukowanego węgla w procesach oddechowych mogą być też inne sacharydy, takie jak: sacharoza, skrobia, fruktozany, lipidy (głównie triacyloglicerole), kwasy organiczne i białka.

W przypadku glukozy, głównego substratu dla tego procesu, oddychanie obejmuje 3 etapy:

- 1) glikoliza przebiegająca w cytoplazmie:** w pierwszej fazie, zużywającej 2 cząsteczki ATP, następuje fosforylacja i izomeryzacja glukozy do fruktozo-1,6-bisfosforanu, który następnie ulega rozbiciu na cząsteczki aldehydu 3-fosfoglicerynowego, które ulegają konwersji do 2 cząsteczek pirogronianu, czemu towarzyszy wytworzenie 2 cząsteczek NADH oraz 4 cząsteczek ATP na drodze fosforylacji substratowej.
- 2) cykl kwasów trikarboksylowych (cykl kwasu cytrynowego, cykl Krebsa) przebiegający w matriks mitochondrialnej:** pirogronian zostaje oksydacyjnie dekarboksylowany do acetylo-CoA, który przez kondensację ze szczawiooctanem zostaje włączony do cyklu i wieloetapowo utleniony do CO_2 . Całkowita degradacja cząsteczki glukozy obejmuje dwa obroty cyklu z odtworzeniem

szczawiooctanu oraz wytworzeniem 6 cząsteczek CO_2 , 10 cząsteczek zredukowanych nukleotydów NADH (8) i FADH_2 (2), a także 2 cząsteczek ATP na drodze fosforylacji substratowej.

3) mitochondrialny łańcuch transportu elektronów (łańcuch oddechowy) i fosforylacja oksydacyjna:

łańcuch oddechowy w wewnętrznej błonie mitochondrialnej tworzy zespół wieloenzymatycznych układów oksydacyjno-redukcyjnych pośredniczących w przenoszeniu elektronów i protonów z NADH i FADH_2 na tlen cząsteczkowy O_2 . Łańcuch oddechowy składa się z: 4 kompleksów białkowych (I–IV), 2 niskocząsteczkowych przenośników elektronów (ubichinon i cytochrom c) i syntetazy ATP (tzw. kompleks V). W czasie transportu elektronów i protonów uwalniana jest energia, która w procesie fosforylacji oksydacyjnej magazynowana jest w 28 cząsteczkach ATP.

Mitochondria roślinne charakteryzują się obecnością w łańcuchu oddechowym dodatkowego kompleksu **oksydazy alternatywnej**, niewrażliwej na inhibitory oksydazy cytochromowej kompleksu IV, która przenosi elektrony ze zredukowanego ubichinonu bezpośrednio na tlen, czyli bez sprzężenia z fosforylacją oksydacyjną. Wyzwolona energia – zamiast służyć do syntezy ATP – ulega rozproszeniu w postaci ciepła (termogeneza), co umożliwia niektórym roślinom wzrost w temperaturze poniżej 0°C oraz odparowywanie lotnych atraktantów. Szlak alternatywny bierze udział w utlenianiu substratów oddechowych, gromadzących się w nadmiarze w stosunku do zapotrzebowania komórek na ATP lub gdy synteza ATP zostaje zahamowana na skutek zaburzenia działania szlaku cytochromowego (np. pod wpływem inhibitorów).

Łańcuch oddechowy, podobnie jak wszystkie procesy przebiegające w błonach, jest wrażliwy na podwyższenie i obniżenie temperatury do wartości wywołujących zmiany płynności błon oraz oddziaływania między lipidowymi i białkowymi składnikami błon.

W **warunkach beztlenowych** (np. w korzeniach zalanych wodą lub pokrytych lodem) – gdy brakuje tlenu cząsteczkowego, będącego końcowym akceptorem elektronów – metabolizm

komórek roślinnych zostaje tymczasowo przestawiony na **fermentację alkoholową**. Proces ten obejmuje 2 etapy:

- 1) wspólną z oddychaniem tlenowym glikolizę,
- 2) dekarboksylację pochodzącego z glikolizy pirogronianu do aldehydu octowego, redukowanego dalej do etanolu. Powstaje wówczas NAD^+ , niezbędny do podtrzymania glikolizy i produkcji ATP na drodze fosforylacji substratowej.

Sumarycznie oddychanie beztlenowe można zapisać:



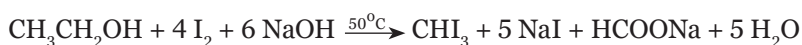
CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

1. Zbadanie wpływu temperatury na intensywność oddychania tlenowego kiełkujących nasion.
 2. Detekcja i oznaczenie stężenia etanolu jako produktu oddychania beztlenowego podczas kiełkowania.
-

Zasada metody

1. Ocena intensywności oddychania polega na pomiarze ilości CO_2 wydzielonego przez kiełkujące nasiona. Wydzielony CO_2 zostaje zaabsorbowany przez NaOH , a następnie wytrącony z roztworu za pomocą BaCl_2 . W kolejnym etapie roztwór NaOH miareczkuje się roztworem HCl w obecności fenoloftaleiny do trwałego odbarwienia. Różnica objętości HCl zużytego na zmiareczkowanie roztworu NaOH z wariantu kontrolnego (bez nasion) i wariantu hodowlanego (z nasionami) odpowiada liczbie moli HCl równoważnej liczbie moli wydzielonego CO_2 .
2. Detekcja etanolu: wydzielony w procesie fermentacji etanol w podwyższonej temperaturze wchodzi w reakcję z NaOH oraz jodem, powstaje jodoform, wytrącający się w postaci żółtych kryształów (pojawia się też charakterystyczny zapach jodoformu):



3. Zawartość wydzielonego etanolu oznacza się za pomocą komercyjnego testu enzymatycznego z dehydrogenazą alkoholową (ang. *alcohol dehydrogenase*, ADH). W obecności ADH i NAD etanol szybko utlenia się do aldehydu octowego i NADH, pomiar absorbancji wykonuje się przy długości fali 340 nm:



Doświadczenie I

Badanie wpływu temperatury na intensywność oddychania tlenowego

Materiał

nasiona grochu (60 g) podkiełkowane w temperaturze 24°C

Odczynniki

0,2 M NaOH, 2% BaCl₂, 1% fenoloftaleina w etanolu, 0,1 M HCl

Sprzęt laboratoryjny

pęsety, łopatkę, zlewka do kiełkowania nasion, 4 woreczki z gazy, 5 słoików 500 cm³ ze szczelnymi zakrętkami, pipety 5 i 10 cm³, pipety pasteurowskie, cylinder miarowy 50 cm³, 10 kolb Erlenmeyera 100 cm³, biureta, waga laboratoryjna, lodówka lub chłodnia (5°C), termostaty (20°C, 24°C, 35°C, 50°C), lignina, linijki, markery

Wykonanie doświadczenia

1. Przygotowanie hodowli

- a) Odważyć cztery porcje po 10 g podkiełkowanych nasion grochu, umieścić w woreczku z gazy i podwiesić bezpośrednio pod nakrętkami do 4 słoików.
- b) Słoiki na 500 cm³ opisać kolejno: Kontrola; Temp. 5°C; Temp. 20°C; Temp. 35°C; Temp. 50°C.
- c) Do każdego słoika wlać po 50 cm³ 0,2 M NaOH i natychmiast zakręcić przygotowanymi nakrętkami. Na słoik kontroli nałożyć nakrętkę bez podwieszonych nasion.
- d) Słoiki umieścić na 48 godzin w chłodni i w termostatach zgodnie z opisem temperatury, słoik kontroli pozostawić w 20°C.

2. Wykonanie oznaczenia zawartości CO₂ wydzielonego w procesie oddychania tlenowego
 - a) Z każdego słoika natychmiast po otwarciu pobrać pipetą po 10 cm³ roztworu NaOH i przelać do kolb Erlenmeyera na 100 cm³.
 - b) Wytrącić CO₂ zaabsorbowany przez NaOH, dodając po 5 cm³ 2% BaCl₂.
 - c) Dodać 3 krople fenoloftaleiny i miareczkować 0,1 M HCl do momentu trwałego odbarwienia roztworu. Procedurę miareczkowania dla każdego wariantu powtórzyć dwukrotnie, wyniki uśrednić.

Opracowanie wyników

1. Obliczyć różnicę objętości HCl zużytego na zmiareczkowanie roztworu ze słoika kontrolnego i roztworów z wariantów zawierających nasiona. Wyniki przeliczyć na mg wydzielonego CO₂ przez 1 g kiełkujących nasion, korzystając ze wzoru:

$$C_B = (V_K - V_B) \times 5 \times 4,4 \div 10$$

gdzie:

C_B – masa CO₂ [mg] wydzielona przez 1 g świeżej masy kiełkujących nasion [mg g⁻¹ ś. m.],

V_K – objętość HCl [cm³] zużyta na zmiareczkowanie roztworu NaOH z kontroli (bez nasion),

V_B – objętość HCl [cm³] zużyta na zmiareczkowanie roztworu NaOH z wariantów hodowlanych,

5 – rozcieńczenie wynikające z pobrania do miareczkowania 10 cm³ roztworów NaOH,

4,4 – współczynnik do przeliczenia objętości HCl zużytego na zmiareczkowanie na mg CO₂,

10 – masa nasion [g] w poszczególnych wariantach hodowlanych.

2. Wyniki przedstawić na wykresie, odkładając na osi odciętych (x) temperaturę [°C], a na osi rzędnych (y) ilość wydzielonego CO₂ [mg].
3. Wyciągnąć wnioski dotyczące wpływu temperatury na intensywność oddychania kiełkujących nasion.

Doświadczenie II

Detekcja i oznaczenie stężenia etanolu

Materiał

ziarniaki jęczmienia, żyta i kukurydzy (po 120 g) podkiełkowane w temperaturze 24°C

Odczynniki

20% NaOH, 5% I w KI, komercyjny zestaw testowy do wykrywania etanolu oparty na aktywności ADH, np. DRI® Ethyl Alcohol Assay (ThermoScientific), świeżo przegotowana i ostudzona woda destylowana pozbawiona tlenu

Sprzęt laboratoryjny

peśety, łopatkę, 3 zlewki do kiełkowania nasion, pipety (0,1–10 cm³), pipety pasteurowskie, 3 kolby Erlenmeyera 300 cm³ z dokładnie dopasowanym korkiem ze szklaną kapilarą, 20 szklanych probówek, kuweta kwarcowa 1 cm z przykrywką, spektrofotometr, waga laboratoryjna, termostaty (24°C, 30°C), blok grzejny (50°C), szczypeczki do probówek, lignina, linijki, markery

Wykonanie doświadczenia

1. Przygotowanie hodowli

- a) Odważyć porcje po 100 g podkiełkowanych ziarniaków jęczmienia, żyta oraz kukurydzy i umieścić w podpisanych kolbach Erlenmeyera o pojemności 300 cm³.
- b) Nasiona całkowicie zalać pozbawioną tlenu wodą destylowaną, kolby zakryć korkami ze szklaną kapilarą (umożliwia wydostawanie się CO₂ jako jednego z produktów oddychania beztlenowego), pozostawić na 48 godzin w termostacie w 30°C.

2. Wykrycie etanolu w płynach pohodowlanych

- a) Do szklanych probówek pobrać po 5 cm³ płynów pohodowlanych z poszczególnych kolb Erlenmeyera, dodać 3 cm³ I w KI oraz kilka kropli 20% NaOH do momentu odbarwienia roztworu.
- b) Probówki wstawić do bloku grzejnego umieszczonego pod dygestorium (!) i podgrzewać w temperaturze 50°C przez 5 minut.

- c) Obejmując próbki szczypcami, wydobyć je z bloku, wstawić do statywu i nie wynosząc poza dygestorium, obserwować wytrącanie się żółtych kryształów. Opisać wynik reakcji, podając, jaki związek chemiczny się wytrąca i o czym świadczy intensywność wytrącania się kryształów.
3. Oznaczenie zawartości etanolu w płynach pochodowlanych
- a) Do szklanych probówek pobrać płyny pochodowlane z poszczególnych kolb (do dwóch probówek z każdej hodowli), w objętości zgodnej z procedurą oznaczenia opisaną dla wybranego komercyjnego testu z ADH.
- b) Przeprowadzić oznaczenie zgodnie z daną procedurą i wykonać pomiar absorbancji przy 340 nm. Wyniki wpisać do tabeli 8.1.

Opracowanie wyników

Uzyskane wyniki uśrednić i przeliczyć na miligramy C_2H_5OH wydzielonego przez 1 g świeżej masy kielkujących ziarniaków [$mg\ g^{-1}\ \acute{s}.\ m.$] i przedstawić w tabeli 8.1.

Tabela 8.1. Ilość etanolu wydzielonego w procesie oddychania beztlenowego ziarniaków

Gatunki	A_{340}			Wydzielony C_2H_5OH [$mg\ g^{-1}\ \acute{s}.\ m.$]
	A_1	A_2	\bar{A}	
Jęczmień				
Żyto				
Kukurydza				

Literatura

- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.
- Szweykowska A., *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2002.

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.09>

ROZDZIAŁ IX. **AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA
REGULATORÓW WZROSTU ROŚLIN**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Regulatory wzrostu są to związki organiczne, zdolne do przemieszczania się w roślinie, które pobudzają, hamują lub w inny sposób wpływają na procesy wzrostu i rozwoju roślin. W obrębie regulatorów wzrostu wyróżniamy **hormony roślinne** (fitohormony) oraz pozostałe regulatory, nazywane substancjami wzrostowymi. Hormony powszechnie występują w roślinach i są aktywne w bardzo niskich stężeniach (rzędu 10^{-6} M). Zaliczamy do nich m.in. **auksyny, gibbereliny, cytokiny, etylen i kwas abscysynowy**. W przeciwieństwie do hormonów występowanie i aktywność biologiczna substancji wzrostowych jest często ograniczona do wąskiej grupy taksonomicznej. Ponadto wywołują one efekt fizjologiczny w stężeniach znacznie wyższych niż hormony roślinne (powyżej 10^{-4} M). Do substancji wzrostowych należą zarówno związki naturalne (np. poliaminy, związki aromatyczne), jak i syntetyczne (retardanty, morfaktyny, herbicydy). Poniżej podano najważniejsze efekty działania na rośliny podstawowych grup regulatorów wzrostu.

AUKSYNY

1. Stymulacja podziałów komórkowych, zwłaszcza kariokinezy.
2. Stymulacja wzrostu elongacyjnego komórek.
3. Wywoływanie zjawiska dominacji wierzchołkowej.
4. Indukcja wytwarzania korzeni przybyszowych.
5. Wywoływanie partenokarpii.
6. Zapobieganie opadaniu liści i owoców poprzez hamowanie powstawania warstwy odcinającej.
7. Wywoływanie tropizmów.

Przykłady auksyn:

- a)** auksyny naturalne: IAA (kwas indolilo-3-octowy), IBA (kwas indolilo-3-masłowy),
- b)** auksyny syntetyczne: NAA (kwas naftylo-1-octowy), 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy).

CYTOKININY

1. Stymulacja podziałów komórkowych, a zwłaszcza cytokinezy.
2. Zwiększanie rozmiarów i masy komórek.
3. Hamowanie procesów starzenia.
4. Stymulacja kiełkowania nasion.
5. Stymulacja rozwoju pąków bocznych poprzez znoszenie dominacji wierzchołkowej.
6. Pobudzanie różnicowania się komórek i organogenezy.

Przykłady cytokinin:

- a)** cytokininy naturalne: zeatyna (6-dimetyloalliloaminopuryna),
- b)** cytokininy syntetyczne: kinetyna (6-furfuryloaminopuryna), BAP (6-benzyloaminopuryna).

GIBERELINY

1. Stymulacja wydłużania pędów poprzez pobudzenie wydłużania międzywęźli.
2. Przywracanie normalnego wzrostu karłowatym mutantom.
3. Stymulacja kiełkowania poprzez indukcję aktywności enzymów hydrolizujących substancje zapasowe nasiona.
4. Stymulacja kwitnienia.
5. Wytwarzanie owoców partenokarpicznych.

Przykłady giberelin: GA₁, GA₃ (kwas giberelowy).

ETYLEN

1. Stymulacja starzenia się liści i kwiatów.
2. Indukowanie opadania liści.
3. Pobudzanie dojrzewania owoców klimakterycznych.

RETARDANTY

Są to związki syntetyczne, które powodują hamowanie wzrostu elongacyjnego pędów poprzez skracanie międzywęźli, bez powodowania innych deformacji (wywołują karłowacenie roślin).

Przykłady retardantów: CCC (chlorek chlorocholiny).

HERBICYDY

Są to związki syntetyczne, które służą do niszczenia chwastów. Dzieli się na herbicydy totalne (niszczą wszystkie rośliny na terenie, na którym zostały zastosowane) i selektywne (niszczą tylko określone grupy roślin). Ze względu na sposób działania na rośliny herbicydy możemy podzielić na kontaktowe (niszczą tylko tkanki, z którymi mają bezpośredni kontakt) i systemiczne (wnikają przez liście, a dzięki temu, że są łatwo transportowane, penetrują i niszczą całą roślinę).

Przykłady herbicydów:

- a)** herbicydy selektywne: Pielik (substancją aktywną jest 2,4-D),
- b)** herbicydy totalne: Roundup (substancją aktywną jest glifosat).

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Zapoznanie z właściwościami hormonów i substancji wzrostowych roślin oraz ich praktycznym zastosowaniem.

Doświadczenie I

Wpływ IAA na wzrost pędu grochu

Zasada metody

Auksyny stymulują wzrost wydłużeniowy komórek. Nierównomierne rozmieszczenie auksyn po obydwu stronach pędu powoduje jego wygięcie.

Materiał

siedmiodniowe siewki grochu uprawiane w doniczkach z podłożem ogrodniczym

Odczynniki

pasta lanolinowa zawierająca IAA (50 g lanoliny podgrzać w parownicze, dodać 50 mg IAA rozpuszczonego w małej ilości etanolu, ucierać 10 minut)

Sprzęt laboratoryjny

cienka bagietka, ciepłarka

Wykonanie doświadczenia

Siewki grochu znajdujące się w doniczce podzielić na 2 grupy:

- a) siewki kontrolne,
- b) siewki traktowane IAA – pędy siewek z jednej strony posmarować pastą lanolinową zawierającą IAA.

Rośliny wstawić do ciepłarki o temperaturze 25°C na 3 godziny.

Opracowanie wyników

Opisać wygląd siewek i wyjaśnić przyczyny zaobserwowanych zmian.

Doświadczenie II

Wpływ IAA na wzrost korzenia rzeżuchy

Zasada metody

Auksyny stymulują wzrost wydłużeniowy komórek. Korzenie są organami bardzo wrażliwymi na działanie auksyn. Ich wydłużanie jest stymulowane przez niskie stężenia auksyn, natomiast wysokie stężenia tych hormonów mogą hamować wzrost korzeni.

Materiał

nasiona rzeżuchy

Odczynniki

roztwór IAA o stężeniach: 0,002; 0,2 i 20 mg dm⁻³, roztwór penicyliny o stężeniu 5 mg cm⁻³

Sprzęt laboratoryjny

4 szalki Petriego o średnicy 9 cm, pipety (0,1–10 cm³), cieplarka

Wykonanie doświadczenia

Do 4 szalek Petriego włożyć po 2 krążki bibuły filtracyjnej i wlać po 8 cm³ odpowiednich roztworów:

- a) H₂O destylowana (kontrola),
- b) IAA 0,002 mg dm⁻³,
- c) IAA 0,2 mg dm⁻³,
- d) IAA 20 mg dm⁻³.

W każdej szalce ułożyć po kilkanaście nasion rzeżuchy i dodać po 0,1 cm³ roztworu penicyliny. Szalki umieścić w cieplarni o temperaturze 25°C.

Opracowanie wyników

Po 7 dniach hodowli zmierzyć długość korzeni 10 siewek z każdej szalki i obliczyć średnią dla każdego wariantu. Wyniki wpisać do tabeli 9.1. Obliczyć % kontroli, przyjmując długość korzenia siewek hodowanych na szalce z H₂O za 100%.

Tabela 9.1. Wpływ IAA na wzrost korzenia rzeżuchy

Lp.	Długość korzenia [mm]			
	H ₂ O	IAA 0,002 mg dm ⁻³	IAA 0,2 mg dm ⁻³	IAA 20 mg dm ⁻³
1.				
2.				
...				
...				
9.				
10.				
Średnia				
% kontroli	100			

Doświadczenie III

Wpływ NAA na ukorzenianie pędów

III.A. WPŁYW NAA NA UKORZENIANIE PĘDÓW FASOLI

Zasada metody

Auksyny inicjują tworzenie zawiązków korzeni przybyszowych.

Materiał

dwutygodniowe rośliny fasoli uprawiane w doniczkach z podłożem ogrodniczym

Odczynniki

roztwór NAA o stężeniu 20 mg dm^{-3}

Sprzęt laboratoryjny

nożyczki, 2 wąskie zlewki 250 cm^3 owinięte folią aluminiową

Wykonanie doświadczenia

Rośliny ściąć na wysokości około 1 cm powyżej szyjki korzeniowej.

Po 10 roślin umieścić na 4–6 godzin w zlewkach zawierających:

- a) H_2O destylowaną (kontrola),
- b) roztwór NAA o stężeniu 20 mg dm^{-3} .

Następnie wyjąć rośliny, ich pędy opłukać pod bieżącą wodą i ponownie wstawić do zlewek zawierających wodę wodociągową. Wodę w naczyniach wymieniać codziennie.

Opracowanie wyników

Po 7–10 dniach porównać rośliny z grupy kontrolnej i traktowanej NAA, zwracając uwagę na liczbę i długość korzeni oraz ich rozmieszczenie na pędzie.

III.B. WPŁYW IBA NA UKORZENIANIE PĘDÓW RÓŻY W HODOWLI *IN VITRO*

Zasada metody

Jak w punkcie III.A.

Materiał

sześcioletniowe pędy róży namnożone w hodowli *in vitro* (1 słoik)

Odczynniki

- a) podłoże kontrolne – sterylna pożywka agarowa MS (por. załącznik 2) bez dodatku IBA (4 słoiki, po 30 cm^3 pożywki)
- b) podłoże ukorzeniające – sterylna pożywka agarowa MS z dodatkiem IBA (por. załącznik 2) w stężeniu $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ (4 słoiki po 30 cm^3 pożywki)

Sprzęt laboratoryjny

komora z laminarnym przepływem powietrza, sterylne narzędzia do pracy w komorze: 2 podpórki metalowe, pęseta długa, pęseta stomatologiczna (krótka, zagięta), skalpel, podkładki papierowe w kopercie

Wykonanie doświadczenia

Wszystkie czynności wykonywać w warunkach sterylnych w komorze z laminarnym przepływem powietrza.

1. Posługując się długą pęsetą kępkę pędów róży namnożonych w warunkach *in vitro* wyciągnąć ze słoika i przenieść na papierowe podkładki. Następnie posługując się pęsetą stomatologiczną i skalpelem, kępkę rozciąć na pojedyncze pędy, z pędów obciąć dolne liście i ewentualne podeschnięte, pędy przenosić na oddzielną papierową podkładkę.
2. Uzyskane pędy przenieść długą pęsetą do słoików zawierających podłoże kontrolne oraz do słoików zawierających podłoże ukorzeniające. Pędy umieścić pionowo w podłożu – po 4 pędy w 1 słoiku.
3. Hodowle umieścić w fitotronie w temperaturze 24°C, przy fotoperiodzie 16 godzin/8 godzin (światło/ciemność) oraz oświetleniu 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Opracowanie wyników

Po 7–10 dniach porównać pędy z hodowli kontrolnej i z dodatkiem IBA, zwracając uwagę na liczbę i długość korzeni.

Doświadczenie IV

Dominacja wierzchołkowa

Zasada metody

Auksyny, których najwyższe stężenie występuje w części wierzchołkowej pędu głównego rośliny, hamują rozwój pąków bocznych. Zjawisko to nazywane jest dominacją wierzchołkową.

Materiał

trzytygodniowe rośliny fasoli uprawiane w doniczkach z podłożem ogrodniczym

Odczynniki

posta lanolinowa zawierająca IAA (opis przygotowania por. Doświadczenie I)

Sprzęt laboratoryjny

nożyczki, cienka bagietka

Wykonanie doświadczenia

Rośliny podzielić na 3 grupy:

- a) rośliny kontrolne,
- b) rośliny, u których ścina się pęd około 1,5 cm powyżej pierwszej pary liści,
- c) rośliny, u których ścina się pęd około 1,5 cm powyżej pierwszej pary liści, a powierzchnię ścięcia smaruje się pastą lanolinową zawierającą IAA. Po 3 dniach powtórnie nanieść pastę.

Opracowanie wyników

Po 7 dniach w poszczególnych wariantach ocenić rozwój pędów bocznych znajdujących się w kątach pierwszej pary liści.

Doświadczenie V

Wpływ GA_3 na wzrost siewek grochu karłowatego

Zasada metody

Gibereliny odpowiadają za wydłużanie się pędu poprzez stymulowanie aktywności mitotycznej komórek zlokalizowanych pod merystemem wierzchołkowym. Występowanie krótkiego pędu u karłowatych odmian roślin wiąże się z zablokowaniem syntezy giberelin albo wytwarzaniem inhibitorów giberelin i może być wynikiem mutacji pojedynczego genu.

Materiał

siedmiodniowe siewki grochu odmiany karłowatej (np. Cud Kelvedonu) uprawiane w doniczkach z podłożem ogrodniczym

Odczynniki

roztwór GA_3 o stężeniu 1 mg cm^{-3}

Sprzęt laboratoryjny

pipety (0,01–0,1 cm³)

Wykonanie doświadczenia

Znajdujące się w doniczce siewki podzielić na 2 grupy:

- a) rośliny kontrolne,
- b) rośliny traktowane GA₃ – używając pipety, na wierzchołki pędów nanieść po 0,01 cm³ roztworu GA₃.

Opracowanie wyników

Po 7 dniach zmierzyć długość pędów roślin z obu grup, zapisać wyniki i obliczyć wartości średnie. Zwrócić uwagę na długość i liczbę międzywęźli.

Doświadczenie VI**Wpływ GA₃ i CCC na wzrost hypokotyla sałaty****Zasada metody**

Retardanty, będące syntetycznymi inhibitorami wzrostu, hamują wydłużanie się pędów bez wywoływania innych deformacji. Działają antagonistycznie w stosunku do giberelin.

Materiał

nasiona sałaty

Odczynniki

roztwór GA₃ o stężeniu 7 mg dm⁻³, roztwór CCC o stężeniu 3,2 g dm⁻³, roztwór penicyliny o stężeniu 5 mg cm⁻³

Sprzęt laboratoryjny

4 szalki Petriego o średnicy 9 cm, pipety (0,1–10 cm³)

Wykonanie doświadczenia

Do 4 szalek Petriego włożyć po 2 krążki bibuły filtracyjnej i wlać odpowiednie roztwory:

- a) H₂O destylowana (8 cm³) – kontrola,
- b) GA₃ 7 mg dm⁻³ (4 cm³) + H₂O destylowana (4 cm³) [końcowe stężenie GA₃ – 3,5 mg dm⁻³],

c) CCC $3,2 \text{ g dm}^{-3}$ (4 cm^3) + H_2O destylowana (4 cm^3) [końcowe stężenie CCC – $1,6 \text{ g dm}^{-3}$],

d) GA_3 7 mg dm^{-3} (4 cm^3) + CCC $3,2 \text{ g/dm}^3$ (4 cm^3) [końcowe stężenie GA_3 – $3,5 \text{ mg dm}^{-3}$ + CCC – $1,6 \text{ g dm}^{-3}$].

W każdej szalce ułożyć po 20–30 nasion sałaty i dodać po $0,1 \text{ cm}^3$ roztworu penicyliny. Szalki umieścić na świetle, w temperaturze 24°C .

Opracowanie wyników

Po 7 dniach hodowli ocenić wygląd siewek, zmierzyć długość hypokotyli 10 siewek z każdej szalki i obliczyć średnią dla każdego wariantu. Wyniki wpisać do tabeli 9.2. Obliczyć % kontroli, przyjmując długość hypokotyli siewek hodowanych na szalce z H_2O za 100%.

Tabela 9.2. Wpływ GA_3 i CCC na wzrost hypokotyli sałaty

Lp.	Długość hypokotyli [mm]			
	H_2O	GA_3	CCC	$\text{GA}_3 + \text{CCC}$
1.				
2.				
...				
...				
9.				
10.				
Średnia				
% kontroli	100			

Doświadczenie VII

Wpływ kinetyny na masę liścieni rzodkiewki

Zasada metody

Cytokininy zwiększają masę roślin poprzez aktywację podziałów komórkowych oraz zwiększanie rozmiarów komórek.

Materiał

dwudniowe siewki rzodkiewki skiełkowane na szalce z bibułą

Odczynniki

roztwory kinetyny (KIN) o stężeniach: 0,1; 1 i 10 mg dm^{-3} , roztwór penicyliny o stężeniu 5 mg cm^{-3}

Sprzęt laboratoryjny

4 szalki Petriego o średnicy 9 cm, pipety (0,1–10 cm³), skalpel, pęseta, waga laboratoryjna

Wykonanie doświadczenia

Do 4 szalek Petriego włożyć po 2 krążki bibuły filtracyjnej i wlać po 10 cm³ odpowiednich roztworów:

- a) H₂O destylowana (kontrola),
- b) KIN 0,1 mg dm⁻³,
- c) KIN 1 mg dm⁻³,
- d) KIN 10 mg dm⁻³.

Do każdej szalki dodać po 0,1 cm³ roztworu penicyliny. Używając skalpela, odciąć liścienie od hypokotyli. Do doświadczenia wybrać 40 liścieni o podobnej wielkości. W każdej szalce umieścić po 10 uprzednio odważonych liścieni. Zanotować łączną masę 10 liścieni dla każdego wariantu doświadczenia. Szalki umieścić na świetle, w temperaturze 24°C.

Opracowanie wyników

Po 7 dniach hodowli wyjąć liścienie z szalek, osuszyć na bibule i ponownie zważyć. Wyniki wpisać do tabeli 9.3. Dla każdego wariantu obliczyć przyrost masy liścieni jako % wartości początkowej, dzieląc przyrost masy liścieni [mg] po 7 dniach przez początkową masę liścieni [mg].

Tabela 9.3. Wpływ kinetyny (KIN) na masę liścieni rzodkiewki

Stężenie KIN [mg cm ⁻³]	Masa 10 liścieni [mg]		Przyrost masy liścieni	
	Początkowa	Końcowa	[mg]	% wartości początkowej
0				
0,1				
1				
10				

Doświadczenie VIII

Wpływ kinetyny i etylenu na rozpad chlorofilu

Zasada metody

Cytokininy opóźniają procesy starzenia się roślin, m.in. powstrzymują rozkład chlorofilu. W aspekcie wpływu na starzenie się organów roślinnych etylen działa antagonistycznie w stosunku do cytokinin.

Materiał

dwutygodniowe rośliny jęczmienia uprawiane w doniczkach z podłożem ogrodniczym

Odczynniki

roztwór kinetyny (KIN) o stężeniu $2,2 \text{ mg dm}^{-3}$, Ethrel rozcieńczony 1:1000; Ethrel jest preparatem handlowym zawierającym kwas 2-chloroetylofosfonowy, który rozpada się z wydzieleniem etylenu

Sprzęt laboratoryjny

3 szalki Petriego o średnicy 9 cm, pipety ($0,1\text{--}10 \text{ cm}^3$), nożyczki

Wykonanie doświadczenia

Do 3 szalek Petriego wlać po 8 cm^3 odpowiednich roztworów:

- a) H_2O destylowana (kontrola),
- b) KIN $2,2 \text{ mg dm}^{-3}$,
- c) Ethrel.

Do każdej szalki dodać po $0,1 \text{ cm}^3$ roztworu penicyliny. W każdej szalce umieścić po 10 fragmentów liści jęczmienia o długości około 1 cm. Ułożyć je dolną fizjologicznie stroną na powierzchni roztworów. Fragmenty liści należy wycinać tak, aby wszystkie były pobrane w tej samej odległości od wierzchołka liścia. Szalki umieścić na świetle, w temperaturze 24°C .

Opracowanie wyników

Po 7 dniach ocenić wygląd fragmentów liści jęczmienia w poszczególnych wariantach doświadczenia, zwracając uwagę na zawartość chlorofilu.

Doświadczenie IX

Wpływ herbicydu Pielik na wzrost pszenicy i gorczycy

Zasada metody

Pielik jest systemicznym, selektywnym herbicydem stosowanym do zwalczania chwastów dwuliściennych w uprawach roślin jednoliściennych. Substancją czynną tego preparatu jest 2,4-D, będący syntetyczną auksyną. Jego negatywny wpływ na rośliny jest związany z zaburzeniem równowagi hormonalnej, wywołanym m.in. nadprodukcją etylenu i kwasu abscysynowego.

Materiał

dwutygodniowe rośliny pszenicy i gorczycy uprawiane w doniczkach z podłożem ogrodniczym

Odczynniki

preparat Pielik zawierający 2,4-D o stężeniu 1 g dm^{-3}

Sprzęt laboratoryjny

rozpylacz

Wykonanie doświadczenia

Rośliny podzielić na 2 grupy (osobne doniczki):

- a) rośliny kontrolne,
- b) rośliny traktowane Pielikiem (roztwór Pielika rozpylić na rośliny, używając rozpylacza).

Opracowanie wyników

Po 7 dniach ocenić wpływ zastosowanego herbicydu na rośliny pszenicy i gorczycy. Wyjaśnić odmienne działanie tego preparatu na rośliny jedno- i dwuliścienne, zwracając uwagę na różnice w budowie obu grup roślin.

Doświadczenie X

Wpływ 2,4-D na wzrost siewek ogórka

Zasada metody

Syntetyczne auksyny, takie jak 2,4-D, w wysokich stężeniach wpływają hamująco na wzrost wydłużeniowy roślin. Pędy i korzenie roślin charakteryzują się różną wrażliwością na działanie tych fitohormonów.

Materiał

nasiona ogórka

Odczynniki

roztwór 2,4-D o stężeniach: 0,1 i 1 mg dm⁻³, roztwór penicyliny o stężeniu 5 mg dm⁻³

Sprzęt laboratoryjny

3 szalki Petriego o średnicy 9 cm, pipety (0,1–10 cm³), cieplarka

Wykonanie doświadczenia

Do 3 szalek Petriego włożyć po 2 krążki bibuły filtracyjnej i wlać po 10 cm³ odpowiednich roztworów:

- a) H₂O destylowana,
- b) 2,4-D 0,1 mg dm⁻³,
- c) 2,4-D 1 mg dm⁻³.

W każdej szalce ułożyć po 15 nasion ogórka i dodać po 0,1 cm³ roztworu penicyliny. Szalki umieścić w cieplarni o temperaturze 25°C.

Opracowanie wyników

Po 7 dniach hodowli zmierzyć długość korzeni i hypokotyli 10 siewek z każdej szalki i obliczyć średnią dla każdego wariantu. Wyniki wpisać do tabeli 9.4. Obliczyć % kontroli, przyjmując długość korzenia/hypokotyli siewek hodowanych na szalce z H₂O za 100%.

Tabela 9.4. Wpływ 2,4-D na wzrost siewek ogórka

Lp.	H ₂ O		2,4-D 0,1 mg dm ⁻³		2,4-D 1 mg dm ⁻³	
	Długość korzenia [mm]	Długość hypokotyła [mm]	Długość korzenia [mm]	Długość hypokotyła [mm]	Długość korzenia [mm]	Długość hypokotyła [mm]
1.						
2.						
...						
9.						
10.						
Średnia						
% kontroli	100	100				

Literatura

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.

Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Szweykowska A., *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2002.

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.10>

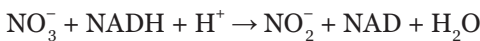
ROZDZIAŁ X. **METABOLIZM AZOTOWY ROŚLIN**
OZNACZANIE AKTYWNOŚCI
REDUKTAZY AZOTANOWEJ

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

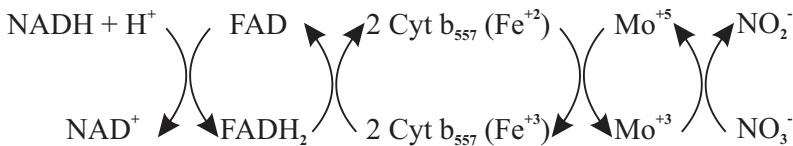
Głównym dostępnym **źródłem azotu dla roślin są azotany**. Jednak przyswajanie azotu w formie jonów azotanowych wymaga ze strony rośliny znacznego nakładu energii. Pierwiastek ten może być wykorzystany do budowy związków organicznych dopiero po **redukcji azotanów do amoniaku**, podczas której do atomu azotu zostaje przyłączone w sumie 8 elektronów.



Redukcja jonów azotanowych do amonowych przebiega dwustopniowo. Pierwszy etap to **redukcja azotanów do azotynów katalizowana przez reduktazę azotanową** (NR, oksydoreduktaza NADH: NO_3^- , EC 1.6.6.1), przebiegająca zgodnie z reakcją:



Reakcja ta zachodzi w cytoplazmie komórek, a dawcą elektronów do redukcji jonów NO_3^- jest NADH. Reduktaza azotanowa jest homotetramerem, który w każdej z 4 podjednostek zawiera FAD, cytochrom b_{557} oraz molibdenopterynę (rysunek 10.1).

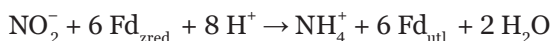


Reduktaza azotanowa jest enzymem indukowanym, tzn. jest syntetyzowana tylko w obecności substratu, czyli azotanów. Aktywność tego enzymu jest proporcjonalna do stężenia azotanów w komórce. Synteza reduktazy azotanowej jest regulowana przez azotan na poziomie ekspresji genu. Ponadto obecność azotanów jest niezbędna do utrzymania odpowiedniego poziomu

Rysunek 10.1.
Przenoszenie elektronów z NADH na NO_3^- przez kofaktory reduktazy azotanowej

białka reduktazy azotanowej, które pozbawione dostępu do substratu ulega degradacji. Synteza białka reduktazy azotanowej oraz aktywność tego enzymu są również kontrolowane przez światło. Czynnikiem warunkującym aktywność reduktazy azotanowej jest także obecność molibdenu.

Drugim etapem jest **redukcja azotynów do jonów amonowych katalizowana przez reduktazę azotynową** (NiR, oksydoreduktaza ferredoksyna: NO_2^- , EC 1.7.7.1), przebiegająca zgodnie z reakcją:



Reakcja ta zachodzi w chloroplastach, a w niefotosyntetyzujących częściach roślin (np. w korzeniach) – w innych plastydach. Dawcą elektronów do redukcji azotynów jest zredukowana ferredoksyna (Fd). W fotosyntetyzujących tkankach roślin redukcja ferredoksyny zachodzi w fazie jasnej fotosyntezy. Natomiast w tkankach niefotosyntetyzujących ferredoksyna jest redukowana przez NADPH_2 – pochodzący ze szlaku pentozofosforanowego. Powstające jony amonowe mogą być następnie wbudowywane w strukturę aminokwasów, co stanowi właściwą asymilację azotu.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Oznaczenie aktywności reduktazy azotanowej w liścieniach ogórka oraz wykazanie zależności między aktywnością tego enzymu w liścieniach a stężeniem azotanów w podłożu hodowlanym.

Doświadczenie I

Materiał

nasiona ogórka, bibuła filtracyjna, lignina, papier milimetrowy

Sprzęt laboratoryjny

plastikowy pojemnik o pojemności około 2 dm^3 do hodowli siewek, cieplarka, skalpel, pęseta, 3 szalki Petriego o średnicy 9 cm,

4 buteleczki 10 cm³ z korkami, sitko plastikowe, pipety (0,1–5 cm³), 20 probówek szklanych, kuwety spektrofotometryczne, spektrofotometr

I.A. HODOWLA ETIOLOWANYCH SIEWEK OGÓRKA

Nasiona ogórka wysiać do plastikowych pojemników na warstwę ligniny zwilżoną wodą destylowaną. Siewki hodować w ciemności, w temperaturze 25°C przez 5 dni.

I.B. HODOWLA LIŚCIENI

Odczynniki

roztwory KNO₃ o stężeniach: 0,01 i 0,1 M, roztwór penicyliny o stężeniu 5 mg cm⁻³

Przygotować 3 szalki Petriego o średnicy 9 cm. Do każdej włożyć 2 krążki bibuły filtracyjnej i wlać po 5 cm³ odpowiedniego roztworu KNO₃ do hodowli liścieni:

- a) H₂O destylowana (kontrola),
- b) 0,01 M KNO₃,
- c) 0,1 M KNO₃.

Do każdej szalki dodać po 0,1 cm³ roztworu penicyliny o stężeniu 5 mg cm⁻³.

Siewki ogórka wyjąć z pojemników do hodowli i ułożyć na bibule. Za pomocą skalpela odcinać liścienie od hypokotyli siewek. W każdej szalce Petriego umieścić 20 liścieni tak, aby były one skierowane wewnętrzną stroną do góry. Hodowlę liścieni prowadzić na świetle, w temperaturze 24–25°C przez 2 dni.

I.C. INKUBACJA LIŚCIENI W ROZTWORZE ZAWIERAJĄCYM AZOTAN

Odczynniki

0,1 M bufor fosforanowy pH 7,5 zawierający 0,02 M KNO₃ i 5% *n*-propanol

Wykonanie doświadczenia

Do 4 buteleczek o pojemności 10 cm³ wlać po 5 cm³ 0,1 M buforu fosforanowego pH 7,5 zawierającego 0,02 M KNO₃ i 5%

n-propanol. Z każdej szalki Petriego liścienie przenieść pęsetą na sitko, opłukać wodą destylowaną i delikatnie osuszyć na bibule. W 3 buteleczkach umieścić po 5 liścieni z poszczególnych wariantów hodowli. W każdym zestawie jedna buteleczka nie zawiera liścieni i stanowi kontrolę. Buteleczki pozamykać korkami i umieścić w cieplarni o temperaturze 27°C na 0,5 godziny.

I.D. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI REDUKTAZY AZOTANOWEJ

Zasada metody

Miarą aktywności reduktazy azotanowej w liścieniach ogórka jest ilość azotynów powstałych w czasie inkubacji liścieni w buforze zawierającym azotan. W metodzie tej oznacza się stężenie jonów NO_2^- w płynie poinkubacyjnym.

Odczynniki

0,02% chlorowoderek N-(1-naftylo)-etylenodiaminy (NEA), 1% sulfanilamid (SA) w 3M HCl, roztwór wzorcowy NaNO_2 o stężeniu 60 nmol cm^{-3}

Wykonanie doświadczenia

Po zakończeniu inkubacji dokładnie wymieszać zawartość buteleczek. Dla każdego wariantu (kontrola + 3 warianty hodowli) przygotować po 2 probówki, do których należy przenieść po 1 cm^3 inkubatu z odpowiednich buteleczek. Następnie do każdej probówki dodać 0,5 cm^3 1% SA i 0,5 cm^3 0,02% NEA. Zawartość probówek dokładnie wymieszać i umieścić je w ciemności na 10 minut. Po dodaniu 2 cm^3 wody destylowanej i wymieszaniu oznaczyć absorbancję roztworów w kuwetach spektrofotometrycznych przy długości fali 540 nm wobec kontroli.

Opracowanie wyników

Korzystając z krzywej wzorcowej (por. pkt I.E), odczytać zawartość jonów NO_2^- w badanych próbach i dla każdego wariantu hodowli obliczyć aktywność reduktazy azotanowej w liścieniach ogórka. Wyniki wpisać do tabeli 10.1.

Wariant hodowli liścieni	Objętość inkubatu [cm ³]	A ₅₄₀ po 0,5 godz. inkubacji	Zawartość NO ₂ ⁻ [nmol]	Aktywność reduktazy azotanowej [nmol liścieni ⁻¹ godz. ⁻¹]
H ₂ O				
0,01 M KNO ₃				
0,1 M KNO ₃				

I.E. WYKONANIE KRZYWEJ WZORCOWEJ DLA NO₂⁻

Korzystając z roztworu wzorcowego KNO₃ o stężeniu 60 nmol cm⁻³ i wody destylowanej, przygotować po 1 cm³ roztworów NO₂⁻ o stężeniach od 6 do 60 nmol cm⁻³, stosując gradację co 6 nmol cm⁻³. Do probówek wprowadzić odpowiednią objętość roztworu wzorcowego (wg tabeli 10.2) i uzupełnić wodą destylowaną do 1 cm³. Do pierwszej probówki dodać 1 cm³ wody destylowanej (próbna odczynnikowa).

Następnie do 1 cm³ wymieszanych dokładnie roztworów dodać po 0,5 cm³ 1% SA i 0,5 cm³ 0,02% NEA. Zawartość probówek dokładnie wymieszać i umieścić je w ciemności na 10 minut. Następnie do probówek dodać po 2 cm³ wody destylowanej i po wymieszaniu oznaczyć absorbancję roztworów w kuwetach spektrofotometrycznych przy długości fali 540 nm wobec próby odczynnikowej. Wyniki wpisać do tabeli 10.2, a na papierze milimetrycznym wykreślić krzywą wzorcową dla NO₂⁻, na osi odciętych (x) zaznaczając wartości stężenia NO₂⁻ w nmol cm⁻³, a na osi rzędnych (y) wartości absorbancji A₅₄₀.

Tabela 10.1. Aktywność reduktazy azotanowej w izolowanych liścieniach ogórka

Tabela 10.2. Zależność między stężeniem NO₂⁻ a absorbancją A₅₄₀

Stężenie NO ₂ ⁻ [nmol cm ⁻³]	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
Objętość roztworu wzorcowego [cm ³]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Objętość wody destylowanej [cm ³]	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
A ₅₄₀											

Literatura

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.

Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Szweykowska A., *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2002.

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.11>

ROZDZIAŁ XI. **WŁAŚCIWOŚCI GLEB**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Gleba jest zewnętrzną warstwą skorupy ziemskiej, która stanowi układ mineralnych i organicznych substancji, powietrza, wody oraz organizmów w niej bytujących. Źródłem substancji mineralnej jest skała macierzysta, a substancji organicznej – martwe szczątki roślin i zwierząt oraz mikroorganizmów. Martwa materia organiczna, która podlega rozkładowi, to **próchnica** (humus). Główne frakcje próchnicy stanowią **kwasy huminowe** (20–50%), odpowiadające za stabilizację składników pokarmowych w powierzchniowych warstwach gleby. W skład substancji mineralnej wchodzi cząstki o różnych wymiarach, takie jak: kamienie, żwir, piasek, il i glina. Oba te rodzaje substancji tworzą fazę stałą gleby. Faza stała gleby jest źródłem składników pokarmowych dla roślin. Między cząsteczkami fazy stałej gleby są wolne przestrzenie wypełnione wodą i powietrzem, które stanowią odpowiednio fazę ciekłą i gazową gleby. Woda wraz z rozpuszczonymi w niej substancjami mineralnymi i organicznymi tworzy **roztwór glebowy** i pośredniczy w transporcie składników pokarmowych do korzeni. Główną funkcją fazy gazowej gleby (mieszanina gazów i pary wodnej) jest dostarczanie tlenu organizmom glebowym.

Roślina pobiera tylko jony soli mineralnych rozpuszczalnych w wodzie, które są łatwo wymywane z fazy stałej gleby przez wodę grawitacyjną. Jony tych soli stają się niedostępne dla roślin, gdy wraz z wodą zostaną przeniesione w głębsze warstwy gleby. Temu niekorzystnemu zjawisku przeciwdziała obecność koloidowych cząstek glebowych. O żyzności gleby decyduje ilość cząstek koloidowych, które adsorbują na swojej powierzchni jony soli mineralnych. **Koloidy glebowe** to kompleksy pomiędzy ilem, gliną a substancją organiczną. Koloidy glebowe charakteryzują się dużą powierzchnią w stosunku do swojej masy i ładunkiem elektrycznym, najczęściej ujemnym. Wszystkie

koloidy glebowe tworzą system wiążący jony, zwany **kompleksem sorpcyjnym gleby**. Rośliny pobierają jony z powierzchni koloidów na zasadzie adsorpcji wymiennej. Korzenie wydzielają kationy wodoru, które wymieniają na kationy potrzebne roślinie, np.: wapniowe, potasowe, magnezowe, bądź wydzielają aniony HCO_3^- , które wymieniają na NO_3^- , H_2PO_4^- i inne.

W zależności od rodzaju kationów wysycających koloidy glebowe kształtuje się **odczyn gleby**, będący kolejnym wskaźnikiem żyzności gleby. Rozpuszczalność i dostępność dla roślin wielu związków mineralnych zależy od odczynu gleby (pH).

Poza solami mineralnymi gleba jest również źródłem wody dla roślin. Wyróżnia się kilka form wody w glebie: woda chemicznie związana, higroskopowa, kapilarna, grawitacyjna, gruntowa, w postaci pary wodnej. Dla roślin dostępna jest **woda kapilarna**, czyli ta, która wypełnia kapilary gleby i dzięki działaniu sił napięcia powierzchniowego podnosi się/podsiąka ponad zwierciadło wody gruntowej. Po obfitych opadach dostępna dla roślin jest również woda gruntowa.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Zapoznanie z trójfazową budową gleby, rodzajami wody występującej w glebie, udziałem organizmów w procesie tworzenia próchnicy, metodami oznaczania odczynu gleby, a także przyczynami naturalnego zakwaszania gleb oraz czynnikami decydującymi o żyzności gleby.

Doświadczenie I

Oznaczanie zawartości kwasu huminowego metodą Edena

Zasada metody

Kwasy huminowe, należące do głównej frakcji związków próchnicznych, są nierozpuszczalne w wodzie, natomiast tworzą rozpuszczalne sole z jonami jednowartościowymi. Dzięki temu ekstrahuje się je z próchnicy za pomocą alkalicznych rozpuszczalników, np. NaOH.

Materiał

3 rodzaje gleby – torf, piasek, ziemia ogrodowa

Odczynniki

0,2 M HCl, 12,5 M NaOH, woda destylowana

Sprzęt laboratoryjny

3 kolby Erlenmeyera 100 cm³, 3 zlewki 100 cm³, 3 cylindry 100 cm³, 3 lejki, 3 probówki, statyw na probówki, 3 sączki bibułowe, spektrofotometr, kuwety spektrofotometryczne, łopatką, waga laboratoryjna

Wykonanie doświadczenia

Odważyć po 1 g z każdego rodzaju gleby i przenieść (osobno) do zlewek, do każdej zlewiki dodać 20 cm³ 0,2 M HCl w celu pozbycia się zasad i uzyskania wolnych kwasów huminowych. Po 30 minutach glebę przesączyć i przemyć dwiema porcjami wody destylowanej (2 × 25 cm³), aby wypłukać kwas solny. Płyn nadosadowy odlać, a przemytą glebę przenieść łopatką do kolby Erlenmeyera. Dodać 6 cm³ 50% NaOH, wymieszać i uzupełnić wodą destylowaną do 25 cm³. Kolby z tak przygotowanymi różnymi rodzajami gleby wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 10 minut. Następnie schłodzić je pod bieżącą wodą, przesączyć roztwory i o ile będzie taka potrzeba, rozcieńczyć tak, aby w klarownym supernatancie oznaczyć wartość absorbancji w kuwetach spektrofotometrycznych przy długości fali 420 nm. Miarą zawartości kwasów huminowych dla każdej z badanych gleb będzie zmierzona wartość absorbancji.

Opracowanie wyników

Na podstawie wielkości absorbancji określić, która gleba charakteryzuje się dużą zawartością kwasów huminowych i dlaczego.

Doświadczenie II

Odczyn gleby

Zasada metody

Odczyn gleby stanowi informację o zakwaszeniu gleby i oznacza wzajemny stosunek jonów wodorowych do wodorotlenowych,

określany skrótem pH. Pomiar pH gleby polega na przeprowadzeniu jonów wodorowych z kompleksu sorpcyjnego do roztworu glebowego przy użyciu siarczanu baru. Kationy tej soli wypierają z kompleksu sorpcyjnego jony H^+ i Al^{3+} , dzięki czemu możliwe jest zmierzenie potencjalnej kwasowości gleby (istotnej do celów rolniczych).

Materiał

3 rodzaje gleby – torf, piasek, ziemia ogrodowa

Odczynniki

$BaSO_4$ w postaci proszku

Sprzęt laboratoryjny

statyw na próbówki, 3 próbówki, linijka, wskaźnik pH (papierki wskaźnikowe), łopátka

Wykonanie doświadczenia

Przygotować 3 suche próbówki i na dnie każdej umieścić warstwę $BaSO_4$ o grubości 1 cm. Następnie nanieść warstwę gleby (do każdej próbówki inny rodzaj gleby) o grubości 3 cm i dopełnić wodą destylowaną na wysokość 9 cm. Następnie zawartość próbówek dokładnie wymieszać i odstawić na 30 minut. Po tym czasie w płynie nadosadowym oznaczyć wartość pH za pomocą papierków wskaźnikowych. Na podstawie wartości pH określić odczyn gleby.

Doświadczenie III

Oznaczanie pojemności wodnej gleby

Zasada metody

Glebę można scharakteryzować poprzez określenie pojemności wodnej gleby, która stanowi informację o tym, jaką ilość wody gleba jest w stanie zatrzymać po maksymalnym nawodnieniu i spłynięciu wody grawitacyjnej.

Materiał

3 rodzaje gleby – torf, piasek, ziemia ogrodowa

Odczynniki

woda destylowana lub wodociągowa

Sprzęt laboratoryjny

3 cylindry miarowe 100 cm³, 3 lejki, 3 sączki bibułowe, łopatką, waga laboratoryjna

Wykonanie doświadczenia

Na lejki nałożyć sączki bibułowe i wsypać po 10 g gleby – do każdego lejka inny rodzaj gleby. Lejki ustawić na cylindrach miarowych i zalać 60 cm³ wody wodociągowej. Odczytać ze skali na cylindrze ilość wody, która wypłynęła z gleby. Obliczyć procentową pojemność wody dla każdego rodzaju gleby, korzystając ze wzoru:

$$P = \frac{W - G}{C} \times 100\%$$

gdzie:

C – sucha masa gleby,

W – objętość wody, którą zalano glebę,

G – objętość wody, która przesiąknęła przez glebę (woda grawitacyjna).

Opracowanie wyników

Porównać pojemność wodną różnych rodzajów gleby i podać, od czego ona zależy.

Doświadczenie IV***Właściwości sorpcyjne gleby*****Zasada metody**

Gleba ma właściwości sorpcyjne, które polegają na zatrzymywaniu i wiązaniu różnych składników. Istotą sorpcji jest wymiana wcześniej zaabsorbowanych jonów na te, które znajdują się w roztworze glebowym.

Materiał

3 rodzaje gleby – torf, piasek, ziemia ogrodowa

Odczynniki

0,06 M FeCl_3 , 0,054 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, NH_4OH (stężony), 0,06 M $\text{Na}_2\text{NH}_4\text{PO}_4$, 0,1 M CH_3COOH , 0,65 M HCl , 0,08 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$

Sprzęt laboratoryjny

7 kolb Erlenmeyera 100 cm^3 , 11 probówek, 5 lejków, 5 sączków bi-bułowanych, łopatką, 4 zlewki 50 cm^3 , waga laboratoryjna, 12 probówek, statyw na probówki

IV.A. WIĄZANIE JONÓW W GLEBIE**Wykonanie doświadczenia**

Do 3 kolb Erlenmeyera wsypać po 1 g każdego rodzaju gleby (do każdej kolby inny rodzaj gleby), następnie zalać je 10 cm^3 0,06 M roztworu FeCl_3 . Wytrząsać przez 5 minut i przesączyć, zbierając przesącz do 3 probówek (dla każdego rodzaju gleby 1 probówka). Do czwartej probówki dodać 5 cm^3 0,06 M roztworu FeCl_3 (kontrola). Do wszystkich probówek dodać 1 cm^3 0,054 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ i 2–3 krople 0,65 M HCl .

Opracowanie wyników

Różnica w intensywności zabarwienia roztworu kontrolnego i przesączy świadczy o wiązaniu jonów Fe^{+3} przez glebę. Na podstawie różnic w barwie określić, które rodzaje gleby mają właściwości sorpcyjne i jakie elementy gleby o nich decydują.

IV.B. WYMIANA JONÓW W KOLOIDACH GLEBOWYCH**Wykonanie doświadczenia**

Do 2 kolb Erlenmeyera wsypać po 3 g gleby ogrodniczej i piaszczystej (do 1 kolby jeden rodzaj gleby), zalać je 15 cm^3 0,1 M CH_3COOH . Takie same ilości gleby ogrodniczej i piaszczystej wsypać osobno do kolejnych 2 kolb Erlenmeyera i zalać 15 cm^3 wody destylowanej. Wszystkie próby mocno wytrząsać przez 5 minut i przesączyć do zlewki. Każdy przesącz rozlać do 2 probówek (w sumie 8 probówek). Dla każdego rodzaju gleby w 2 probówkach (jedna zawierająca roztwór wodny i druga zawierająca roztwór z kwasem octowym) doprowadzić pH do 7 za pomocą NH_4OH . Następnie dodać do tych probówek po 2 cm^3 0,06 M $\text{Na}_2\text{NH}_4\text{PO}_4$. Porównać ilości

wytrącającego się osadu, które świadczą o wymianie jonów żelaza i magnezu. Do pozostałych 4 probówek dodać po 2 cm³ 0,08 M roztworu (NH₄)₂C₂O₄. Wytrąca się osad szczawianu wapnia, co świadczy o wymianie jonów Ca²⁺.

Opracowanie wyników

Porównać ilość osadu w probówkach z przesączem wodnym i przesączem z kwasem octowym dla badanych rodzajów gleb i opisać, o czym świadczą zaobserwowane różnice.

Doświadczenie V

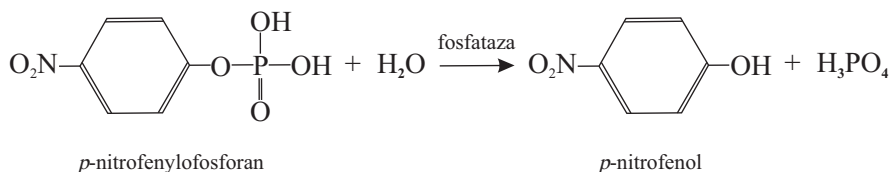
Oznaczanie aktywności kwaśnej fosfatazy w glebie

Kwaśne fosfatazy są enzymami należącymi do klasy hydrolaz. Enzymy te katalizują hydrolizę estrów i bezwodników kwasu ortofosforowego. Typowe dla roślin kwaśne fosfatazy wykazują optimum działania przy pH 4,0–6,0. Odgrywają istotną rolę w metabolizmie związków fosforanowych. Wydzielane do gleby przez komórki korzeni stymulują przemiany organicznych związków fosforanowych do bezpośrednio dostępnych dla roślin nieorganicznych fosforanów (HPO₄²⁻, H₂PO₄⁻).

Zasada metody

W ćwiczeniu źródłem enzymu jest gleba z ryzosfery, do której roślina wydziela kwaśną fosfatazę poprzez korzenie. Substratem dla tego enzymu jest egzogeny 4-nitrofenylofosforan. Powstający jako produkt reakcji 4-nitrofenol przyjmuje w środowisku zasadowym barwę żółtozieloną (por. rysunek 11.1).

Rysunek 11.1. Reakcja katalizowana przez kwaśną fosfatazę



Materiał

gleba ogrodowa pochodząca z ryzosfery (strefa wokół korzeni roślin)

Odczynniki

7,5 mM 4-nitrofenylofosforan, 0,1 M bufor octanowy pH 5,0, 0,94 M Na_2CO_3

Sprzęt laboratoryjny

zlewka 50 cm^3 , 3 pipety (2–5 cm^3), 3 probówki, lejek, sącdek bi-bułowy, waga laboratoryjna, mieszadło magnetyczne, cieplarka, spektrofotometr, kuwety spektrofotometryczne

Wykonanie doświadczenia

W zlewce umieścić 2 g gleby ogrodniczej, zalać 10 cm^3 wody destylowanej i ekstrahować 20 minut na mieszadle magnetycznym. Otrzymany ekstrakt przesączyć w celu uzyskania roztworu zawierającego enzym. Do dwóch probówek (próby badane) odmierzyć 0,5 cm^3 7,5 mM 4-nitrofenylofosforanu, 1,5 cm^3 0,1 M buforu octanowego pH 5,0 i 0,5 cm^3 roztworu zawierającego enzym. Próbę kontrolną stanowi 0,5 cm^3 7,5 mM 4-nitrofenylofosforanu, 1,5 cm^3 0,1 M buforu octanowego pH 5,0 i 2,5 cm^3 0,94 M Na_2CO_3 . Inkubację wszystkich prób prowadzić przez 60 minut w cieplarni o temperaturze 30°C. Po tym czasie do prób badanych dodać 2,5 cm^3 0,94 M Na_2CO_3 , a do kontroli 0,5 cm^3 roztworu enzymu. Zawartość probówek przesączyć i oznaczyć absorbancję przesączów w kuwetach spektrofotometrycznych przy długości fali 420 nm.

Opracowanie wyników

Obliczyć ilość mikrogramów 4-nitrofenolu uwolnionego w reakcji, dzieląc średnią wartość absorbancji prób badanych (pomniejszoną o wartość absorbancji próby kontrolnej) przez współczynnik absorpcji dla 1 μg nitrofenolu, wynoszący 0,002. Aktywność fosfatazy wyrazić w jednostkach [$U = \mu\text{mol}$ 4-nitrofenolu min^{-1}]. Masa molowa 4-nitrofenolu wynosi 139,1.

Literatura

Gorlach E., Mazur T., *Chemia rolna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.12>

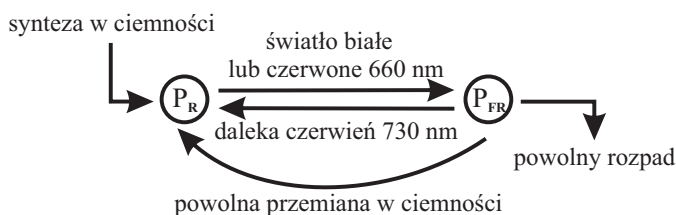
ROZDZIAŁ XII. **KIEŁKOWANIE NASION**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Kielkowanie nasion, czyli zespół procesów zachodzących w nasieniu, które przygotowują zarodek do normalnej wegetacji, jest uwarunkowane czynnikami wewnętrznymi i zewnętrznymi. Zdolne do kielkowania są tylko nasiona, których zarodki są żywe i odpowiednio dojrzałe. Żywotność nasion określa się na podstawie barwienia zarodków chlorkiem trifenylotetrazoliowym lub indygokarminem. Procent nasion danego zbioru zdolnych do kielkowania określany jest **zdolnością kielkowania**. **Szybkość kielkowania** (dawniej energia kielkowania), czyli % nasion normalnie skielkowanych w ciągu pewnego krótkiego okresu, określa stopień żywotności nasion. Na podstawie zdolności i szybkości kielkowania ocenia się **jakość materiału siewnego**.

W procesie kielkowania nasion wyróżnia się fazę fizyczną (pęcznienie nasion), biochemiczną i fizjologiczną. W fazie biochemicznej następuje aktywacja i synteza *de novo* enzymów uczestniczących w uruchamianiu materiałów zapasowych. W ziarniakach zbóż, których głównym materiałem zapasowym jest skrobia, w regulacji procesu uczestniczą hormony roślinne z grupy giberelin, wytwarzane przez rozwijający się zarodek.

Czynnikami środowiska zewnętrznego wpływającymi na kielkowanie nasion są: woda, tlen, temperatura i światło. Nasiona wielu gatunków roślin (np. sałata, tytoń) wykazują stymulację kielkowania pod wpływem światła. Najbardziej efektywne jest światło czerwone (660 nm). Efekt światła czerwonego jest odwracany przez daleką czerwień (730 nm). Receptorem światła w procesie kielkowania nasion jest **fitochrom**, który w roślinach występuje w dwóch formach: P_R o maksimum absorpcji światła przy długości fali 660 nm i P_{FR} o maksimum absorpcji światła przy długości fali 730 nm. Obie formy fitochromu mogą podlegać **fotokonwersji**, czyli przekształceniom pod wpływem światła (por. rysunek 12.1).



Rysunek 12.1.
Fotokonwersja
fitochromu

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

1. Ocena jakości siewnej nasion wybranych gatunków roślin użytkowych poprzez określenie ich żywotności oraz szybkości i zdolności kiełkowania.
2. Analiza uruchamiania związków zapasowych w katabolicznej fazie kiełkowania na przykładzie rozkładu skrobi w kiełkujących ziarniakach jęczmienia.
3. Wykazanie udziału fitochromu w procesie kiełkowania nasion.

Doświadczenie I

Szybkość i zdolność kiełkowania

Zasada metody

Na podstawie kinetyki kiełkowania nasion określa się szybkość i zdolność kiełkowania.

Materiał

ziarniaki żyta, nasiona gorczycy i grochu

Sprzęt laboratoryjny

3 szalki Petriego, bibuła, pęseta

Wykonanie doświadczenia

Szalki wyłożyć podwójną warstwą bibuły zwilżonej wodą tak, aby cienka warstwa wody była widoczna na powierzchni bibuły. Na szalkach umieścić po 25 ziarniaków/nasion wybranych gatunków roślin i wstawić je do termostatu na 25°C. Policzyc ziarniaki/nasiona, które wykiełkowały po 3 i 6 dniach.

Opracowanie wyników

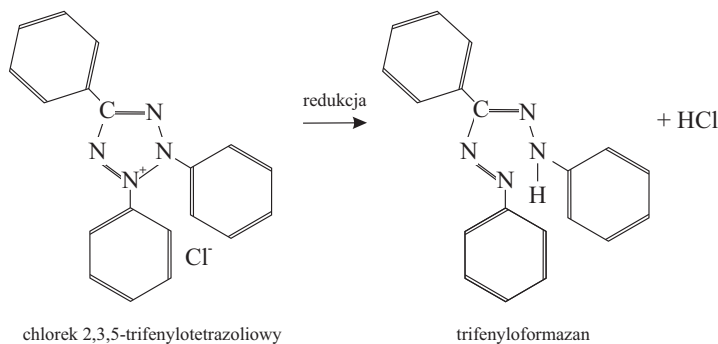
Oceń szybkość i zdolność kiełkowania ziarniaków/nasion, podając wyniki w procentach skiełkowanych.

Doświadczenie II

Ocena żywotności nasion metodą barwienia zarodków

Zasada metody

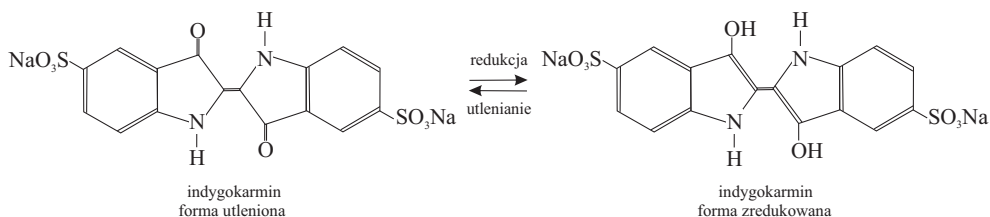
Żywe, aktywne metabolicznie zarodki nasion redukują bezbarwny chlorek 2,3,5-trifenyloitetrazoliowy (TTC) do trifenyloformazanu (TTC-H) i wybarwiają się na czerwono (por. rysunek 12.2).



Rysunek 12.2.

Redukcja chlorku 2,3,5-trifenyloitetrazoliowego (TTC)

Indygokarmin (forma utleniona) wybarwia martwe zarodki nasion na niebiesko. W formie zredukowanej jest bezbarwny (por. rysunek 12.3).



Rysunek 12.3. Reakcja

redukcji i utleniania indygokarminu – wykorzystywana do oceny żywotności nasion

Redukcja barwników w żywych komórkach zachodzi dzięki aktywności dehydrogenaz uczestniczących w procesach oddechowych.

Materiał

nasiona grochu i ziarniaki kukurydzy w stanie pełnej imbibicji

Odczynniki

1% roztwór TTC, 0,2% roztwór indygokarminu

Sprzęt laboratoryjny

2 zlewki 200 cm³, igła preparacyjna, skalpel, szalki Petriego, bagietka szklana

Wykonanie doświadczenia

Z 50 nasion fasoli wypreparować zarodki, opłukać je wodą destylowaną i umieścić w zlewce z roztworem TTC. Zlewkę pozostawić w ciemnym miejscu, w temperaturze pokojowej na 1–2 godziny. Po tym czasie zarodki przemyć wodą i na podstawie wybarwienia ocenić ich żywotność.

Ziarniaki kukurydzy w stanie pełnej imbibicji (50 sztuk) przeciąć wzdłuż i jedną połowę każdego z nasion, po uprzednim opłukaniu wodą destylowaną, umieścić w zlewce z roztworem indygokarminu. Zlewkę pozostawić na 30 minut w temperaturze 30°C. Następnie ziarniaki opłukać wodą i ocenić ich żywotność na podstawie wybarwienia.

Opracowanie wyników

Obliczyć % nasion grochu i ziarniaków kukurydzy zdolnych do kiełkowania.

Doświadczenie III

Wykazanie obecności amylazy w kiełkujących nasionach

Zasada metody

W napęczniałych ziarniakach zbóż pod wpływem działania giberelin następuje indukcja amylaz, które na drodze enzymatycznej prowadzą rozkład skrobi przez stadium dekstryn do maltozy. W miarę hydrolizy skrobi następuje zmniejszanie się niebieskiego zabarwienia z jodem w reakcji z odczynnikami Lugola (roztwór jodu w KI) i wzrost właściwości redukujących.

Materiał

skiełkowane nasiona pszenicy lub ziarniaki kukurydzy

Odczynniki

agar, 1% kleik skrobiowy, 10-krotnie rozcieńczony roztwór Lugola

Sprzęt laboratoryjny

3 szalki Petriego o średnicy 5 cm, zlewka 100 cm³, cylinder miarowy 25 cm³, 3 pipety (0,1–5 cm³), łaźnia wodna, skalpel, bagietka szklana

Wykonanie doświadczenia

W łaźni wodnej rozpuścić w zlewce 0,5 g agaru w 25 cm³ wody destylowanej. Dodać 2,5 cm³ 1% kleiku skrobiowego i wylać po 5–7 cm³ ciepłego agaru na szalki Petriego. Po zastygnięciu agaru powierzchnię szalek zwilżyć wodą destylowaną i wyłożyć po 5 nasion/ziarniaków przeciętych wzdłuż na pół, układając je powierzchnią cięcia na agarze. Po 2–3 godzinach inkubacji w termostacie w temperaturze 28°C nasiona/ziarniaki usunąć, a powierzchnię szalek zalać roztworem Lugola. Po kilku minutach zlać odczynnik.

Opracowanie wyników

Opisać uzyskany obraz i na tej podstawie wyciągnąć wnioski dotyczące uruchamiania substancji zapasowych w nasionach /ziarniakach.

Doświadczenie IV***Udział fitochromu w procesie kiełkowania nasion*****Zasada metody**

Monochromatyczne światło czerwone (660 nm) powoduje fotokonwersję $P_R \rightarrow P_{FR}$ w stopniu wystarczającym do stymulacji kiełkowania nasion wrażliwych na światło (dodatkowo fotoblastycznych). Efekt jest odwracany przez naświetlenie światłem dalekiej czerwieni (730 nm).

Materiał

nasiona sałaty (odmiana Grand Rapids) moczone 24 godziny w temperaturze 28°C, na bibule zwilżonej wodą destylowaną, w 4 szalkach Petriego owiniętych szczelnie folią aluminiową (dla zachowania całkowitej ciemności); każda szalka zawiera 25 nasion

Sprzęt laboratoryjny

źródło monochromatycznego światła czerwonego (660 nm) i dalekiej czerwieni (730 nm)

Wykonanie doświadczenia

Wykonać następujące warianty naświetlania szalek z napęczniałymi nasionami sałaty:

- a) 2–4 minuty oświetlenia monochromatycznym światłem czerwonym (660 nm),
- b) 2–4 minuty oświetlenia monochromatycznym światłem czerwonym (660 nm) i następnie 4–8 minut oświetlenia światłem dalekiej czerwieni (730 nm),
- c) 2–4 minuty oświetlenia monochromatycznym światłem czerwonym (660 nm), następnie 4–8 minut oświetlenia monochromatycznym światłem dalekiej czerwieni (730 nm) i 2–4 minuty oświetlenia światłem czerwonym (660 nm),
- d) brak oświetlenia (kontrola).

Naświetlanie przeprowadzić w ciemni. W czasie naświetlania szalki odwinąć z folii aluminiowej, odkryć i ustawiać skośnie w kierunku źródła światła o określonej długości fali na odpowiedni okres naświetlania. Wszystkie szalki pozostać w ciemności na 3 dni, a następnie policzyć nasiona, które wykiełkowały.

Opracowanie wyników

Na podstawie wyliczonego % nasion skielkowanych w poszczególnych wariantach doświadczenia ocenić wpływ światła czerwonego i dalekiej czerwieni na kiełkowanie nasion sałaty i scharakteryzować rolę fitochromu w tym procesie.

Literatura

- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.
- Lack A. J., Evans D. E., *Krótkie wykłady. Biologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Szweykowska A., *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2002.

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.13>

ROZDZIAŁ XIII. **ALLELOPATIA**
WPŁYW METABOLITÓW WTÓRNYCH
NA KIEŁKOWANIE NASION
I WZROST SIEWEK

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Rośliny wyższe konkurują w ekosystemie między sobą o wodę, światło i składniki pokarmowe. Zjawisko chemicznej rywalizacji między roślinami nosi nazwę **allelopatii**. Związki chemiczne uczestniczące w oddziaływaniu pomiędzy roślinami nazywane są związkami allelopatycznymi. **Związki allelopatyczne** to niskocząsteczkowe metabolity wtórne lub ich pochodne. Wydzielane przez **rośliny-donory** wpływają na **rośliny-akceptory**, modyfikując ich wzrost i rozwój. Przedostają się do środowiska na drodze:

- 1) przechodzenia do gleby związków powstających w procesie rozkładu tkanek roślinnych, np. kwasy kofeinowy i ferulowy, pochodzące z obumierających pędów orlicy pospolitej, izotiocyjaniany i nityle – produkty hydrolizy glukozynolanów;
- 2) ługowania z naziemnych części roślin przez deszcz i rosę, np. prekursor juglonu z liści orzecha włoskiego; związki fenolowe, takie jak hydrochinon, umbeliferon; kwasy hydroksycynamonowe, np. ferulowy, kumarowy; kwasy hydroksybenzoesowe, np. waniliowy, syringowy; kumaryny, garbniki i alkaloidy, np. absyntyna, charakterystyczna dla bylicy piołunu;
- 3) eksudacji przez system korzeniowy, np. produkty hydrolizy glukozynolanów, prekursor juglonu – kwas (*E*)-cynamonowy, wydzielany przez meksykański krzew gumodajny;
- 4) uwalniania w formie lotnej do atmosfery i przedostające się z niej na powierzchnię roślin i gleby, głównie lotne terpeny, np. 1,8-cyneol (eukaliptol), kamfora, α - i β -pinen, α -tujon, izotujon. Terpenoidy emitowane są szczególnie w okresie utrzymywania się wysokiej temperatury powietrza, następnie kondensują na powierzchni gleby, hamując wzrost roślin i kiełkowanie nasion w odległości nawet do 2 m od wydzielających je roślin.

Allelopatia ma duże znaczenie w formowaniu zbiorowisk roślinnych o określonym składzie florystycznym i tłumaczy inwazyjność niektórych gatunków roślin obcego pochodzenia. Związki allelopatyczne oraz tkanki roślin zawierające ich prekursory mają znaczenie w hodowli roślin. Szczególne zainteresowanie budzą w tzw. rolnictwie ekologicznym jako **bioherbicydy**. Oddziaływania allelopatyczne mogą również przybierać formę autotoksyczności, dotyczącej roślin tego samego gatunku wielopokoleniowo zasiedlających określony obszar lub też uprawianych bez płodozmianu.

Oddziaływanie związków allelopatycznych na rośliny ma charakter wielomiejscowy (por. tabela 13.1). Podstawowym wskaźnikiem działania związków allelopatycznych jest **zahamowanie kiełkowania nasion i wzrostu siewek**.

Tabela 13.1.

Wpływ związków allelopatycznych na rośliny

Efekty działania związków allelopatycznych	
Poziom molekularny i biochemiczny	<ul style="list-style-type: none"> – spadek syntezy DNA, RNA oraz białek strukturalnych, – spadek aktywności enzymów, – wzrost syntezy białek związanych z reakcją na stres, – akumulacja osmoprotektorów, np. proliny
Poziom strukturalny	<ul style="list-style-type: none"> – zmiany ultrastruktury komórkowej, – zahamowanie mitozy
Poziom fizjologiczny	<ul style="list-style-type: none"> – zaburzenia fotosyntezy i oddychania mitochondrialnego, – zaburzenia procesu pobierania jonów, – zaburzenia procesu wzrostu i rozwoju rośliny

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

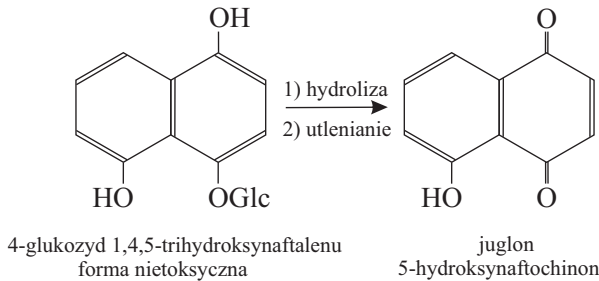
Cel ćwiczenia

Określenie wrażliwości wybranych gatunków roślin na związki allelopatyczne obecne w:

- a) wyciągach z liści orzecha włoskiego i słonecznika oraz pędów rzeżuchy,
- b) eksudatach z pęczniejących nasion pomidora, słonecznika, kozieradki i owsa,
- c) olejkach eterycznych naowocni pomarańczy słodkiej i szyszkojagód jałowca pospolitego.

Reakcja na związki allelopatyczne będzie oceniana na podstawie ich wpływu na kiełkowanie nasion i wzrost siewek roślin-akceptorów. Korzenie i liście orzecha włoskiego wydzielają

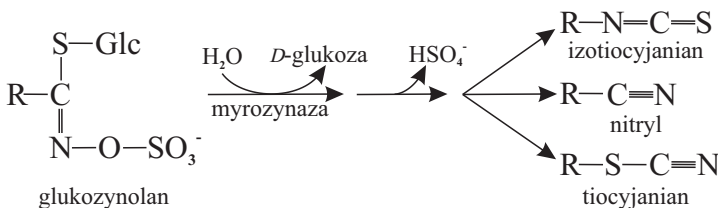
4-glukozyd 1,4,5-trihydroksynaftalenu, który na drodze hydrolizy i utlenienia przekształcany jest w glebie do wykazującego właściwości allelopatyczne 5-hydroksynaftochinonu (juglon) (por. rysunek 13.1).



Rysunek 13.1.
Powstawanie fitotoksycznego juglonu z nieaktywnego prekursora

Tkanki słonecznika zwyczajnego są źródłem kilkunastu związków o aktywności allelopatycznej, które należą do: laktonów seskwiterpenowych, bisnorseskwiterpenów i flawonoidów.

Rzeżucha należy do grupy roślin syntetyzujących **glukozy-nolany**. W tkankach produkujących je roślin glukozy-nolany zawsze współwystępują (w oddzielnych kompartmentach) z enzymem myrozynazą (tioglukozydo glukohydrolaza, EC 3.2.3.1), tworząc wielofunkcyjny **system obronny glukozy-nolan-myrozynaza**, uruchamiany w momencie uszkodzenia struktury komórkowej. Efektem działania tego systemu jest hydroliza glukozy-nolanów i powstanie bioaktywnych produktów, głównie izotiocyanianów (por. rysunek 13.2).



Rysunek 13.2.
Schemat hydrolizy glukozy-nolanów i formowanie bioaktywnych pochodnych w uszkodzonych i rozkładających się tkankach roślin zawierających system glukozy-nolan-myrozynaza

Okrywy nasienne i owocowo-nasienne ziarniaków zbóż są bogate w związki fenolowe i alkaloidy o właściwościach allelopatycznych, uaktywniające się podczas pęcznienia i kiełkowania. W eksudatach pęczniących nasion pojawiają

się kwasy organiczne, u niektórych gatunków roślin również śluzu i saponiny.

Naowocnia pomarańczy słodkiej zawiera 1–2,5% olejku lotnego, w którego skład wchodzi **terpeny cykliczne**, w tym limonen o zapachu pomarańczowym (90%), cytral i β -pinen.

Szyszkogody jałowca zawierają 0,5–2% olejku lotnego, którego głównym składnikiem są terpeny, w tym β -pinen, kamfenen i kadinen, oraz seskwiterpeny, wśród nich kamfora jałowcowa i juneol. Składnikami bioaktywnymi szyszkogodów są także diterpeny, garbniki i flawonoidy.

Zasada metody

Allelopatyczny efekt działania związków obecnych w wyciągach roślinnych, eksudatach kielkujących nasion i olejkach eterycznych na kiełkowanie nasion i wzrost siewek oceniany jest za pomocą biotestu (testu biologicznego z udziałem organizmów żywych) wykonanego w warunkach laboratoryjnych.

Doświadczenie I

Badanie allelopatycznego wpływu wyciągów z liści orzecha włoskiego i słonecznika oraz pędów rzeżuchy na kiełkowanie nasion i ziarniaków oraz wzrost siewek ogórka, rzodkiewki i pszenicy

Materiał

liście orzecha włoskiego, liście słonecznika, dwutygodniowe rośliny rzeżuchy siewnej, nasiona ogórka i rzodkiewki, ziarniaki pszenicy

Odczynniki

1,5% roztwór agaru (150 cm³), woda destylowana

Sprzęt laboratoryjny

12 szalek o średnicy 9 cm, 3 mieszadła magnetyczne, waga elektroniczna, nożyczki, 6 zlewek 250 cm³, cylinder miarowy 250 cm³, 4 cylindry miarowe 50 cm³, 3 sitka, 4 kolby Erlenmeyera wąskoszyjne 250 cm³, pęsety stomatologiczne, pęsety krótkie, łopatki, parafilm, tace, linijki 30 cm, cienkie rękawiczki gumowe, markery

Wykonanie doświadczenia

1. Przygotowanie wyciągów

Liście orzecha włoskiego i słonecznika oraz pędy rzeżuchy pociąć nożyczkami na bardzo drobne kawałki (założyć rękawiczki), z każdego materiału odważyć po 10 g, przenieść do opisanych zlewek na 250 cm³, zalać 150 cm³ wody destylowanej, zlewki umieścić na mieszadle magnetycznym na 24–48 godzin. Następnie tkanki roślinne odsączyć na sitku i odrzucić, a wodne wyciągi wykorzystać do przeprowadzenia biotestu.

2. Przeprowadzenie biotestu

a) Przygotować 12 szalek o średnicy 9 cm i opisać poszczególne warianty jako:

kontrola → ogórek; kontrola → rzodkiewka; kontrola → pszenica

orzech → ogórek; orzech → rzodkiewka; orzech → pszenica

słonecznik → ogórek; słonecznik → rzodkiewka; słonecznik → pszenica

rzeżucha → ogórek; rzeżucha → rzodkiewka; rzeżucha → pszenica

b) W kolbie Erlenmeyera na 250 cm³ zmieszać 35 cm³ wody destylowanej z 35 cm³ 1,5% agaru (~50°C). Otrzymany agarowy roztwór rozlać po 20 cm³ do 3 szalek opisanych jako „kontrola”.

W kolbie Erlenmeyera na 250 cm³ zmieszać 35 cm³ wyciągu z liści orzecha włoskiego z 35 cm³ 1,5% agaru (~50°C), otrzymany agarowy roztwór rozlać po 20 cm³ do 3 szalek opisanych jako „orzech”. Analogicznie przygotować szalki z wyciągiem z liści słonecznika („słonecznik”) i pędów rzeżuchy („rzeżucha”).

c) Odstawić szalki do zestalenia agaru.

d) Posługując się pęsetą, wysiać po 10 nasion ogórka i rzodkiewki oraz 10 ziarniaków pszenicy do szalek kontrolnych i zawierających badane wyciągi (zgodnie z opisem w pkt. 2a), szalki zakryć, zalepić parafilmem, odstawić do ciemnego pomieszczenia hodowlanego na 7 dni.

Opracowanie wyników

Po 7 dniach policzyć % skielkowanych nasion, zmierzyć i uśrednić długość korzeni i pędów siewek, opisać wygląd siewek, wyniki pomiarów przedstawić w tabelach 13.2a, 13.2b, 13.2c.

Tabela 13.2a. Wpływ wyciągu z liści orzecha na kiełkowanie nasion i ziarniaków oraz wzrost siewek ogórka, rzodkiewki i pszenicy

Gatunek	Kontrola			Nasiona kiełkujące w obecności wyciągu z liści orzecha		
	Skielkowane nasiona [% wysianych]	Wielkość siewek [cm]		Skielkowane nasiona [% wysianych]	Wielkość siewek [cm]	
		Korzeń	Pęd		Korzeń	Pęd
Ogórek						
Pszenica						
Rzodkiewka						

Tabela 13.2b. Wpływ wyciągu z liści słonecznika na kiełkowanie nasion i ziarniaków oraz wzrost siewek ogórka, rzodkiewki i pszenicy

Gatunek	Kontrola			Nasiona kiełkujące w obecności wyciągu z liści słonecznika		
	Skielkowane nasiona [% wysianych]	Wielkość siewek [cm]		Skielkowane nasiona [% wysianych]	Wielkość siewek [cm]	
		Korzeń	Pęd		Korzeń	Pęd
Ogórek						
Pszenica						
Rzodkiewka						

Tabela 13.2c. Wpływ wyciągu z nasion gorczycy na kiełkowanie nasion i ziarniaków oraz wzrost siewek ogórka, rzodkiewki i pszenicy

Gatunek	Kontrola			Nasiona kiełkujące w obecności wyciągu z pędów rzeżuchy		
	Skielkowane nasiona [% wysianych]	Wielkość siewek [cm]		Skielkowane nasiona [% wysianych]	Wielkość siewek [cm]	
		Korzeń	Pęd		Korzeń	Pęd
Ogórek						
Pszenica						
Rzodkiewka						

Doświadczenie II

Badanie allelopatycznego wpływu eksudatów z pęczniejących nasion pomidora, słonecznika i kozieradki oraz ziarniaków owsa na kiełkowanie nasion i ziarniaków oraz wzrost siewek ogórka, rzodkiewki i pszenicy

Materiał

nasiona ogórka, rzodkiewki, pomidorów, kozieradki, słonecznika, ziarniaki pszenicy i owsa

Odczynniki

1,5% roztwór agaru (200 cm³)

Sprzęt laboratoryjny

15 szalek o średnicy 9 cm, waga elektroniczna, 8 zlewek 100 cm³, 4 cylindry miarowe 50 cm³, 4 sitka, 5 kolb Erlenmeyera wąskoszyjnych 250 cm³, pęsety stomatologiczne, pęsety krótkie, łopatkę, parafilm, taca, linijki 30 cm, markery

Wykonanie doświadczenia

1. Przygotowanie eksudatów

Odważyć po 15 g nasion pomidora, słonecznika, kozieradki i ziarniaków owsa oraz pszenicy, przenieść do opisanych zlewek na 100 cm³, zalać 45 cm³ wody destylowanej, zlewki umieścić w ciemności na 24–48 godzin. Następnie nasiona i ziarniaki odsączyć na sitku i odrzucić, a wodne eksudaty wykorzystać do przeprowadzenia biotestu.

2. Wykonanie biotestu

- a)** Przygotować 15 szalek o średnicy 9 cm i odpowiednio opisać poszczególne warianty jako:
- kontrola → ogórek; kontrola → rzodkiewka; kontrola → pszenica
 - pomidor → ogórek; pomidor → rzodkiewka; pomidor → pszenica
 - słonecznik → ogórek; słonecznik → rzodkiewka; słonecznik → pszenica
 - kozieradka → ogórek; kozieradka → rzodkiewka; kozieradka → pszenica
 - owies → ogórek; owies → rzodkiewka; owies → pszenica

b) W kolbie Erlenmeyera na 250 cm³ zmieszać 35 cm³ wody destylowanej z 35 cm³ 1,5% agaru (~50°C), otrzymany agarowy roztwór rozlać po 20 cm³ do 3 szalek opisanych jako „kontrola”.

W kolbie Erlenmeyera na 250 cm³ zmieszać 35 cm³ eksudatu z nasion pomidora z 35 cm³ 1,5% agaru (~50°C), otrzymany agarowy roztwór rozlać po 20 cm³ do 3 szalek opisanych jako „pomidor”. Analogicznie przygotować szalki z eksudatem z nasion słonecznika („słonecznik”), kozieradki („kozieradka”) i ziarniaków owsa („owies”).

c) Odstawić szalki do zestalenia agaru.

d) Posługując się pęsetą, wysiać po 10 nasion ogórka, pszenicy i rzodkiewki do szalek kontrolnych i zawierających badane eksudaty (zgodnie z opisem w pkt. 2a), szalki zakryć, zalepić parafilmem, odstawić do ciemnego pomieszczenia hodowlanego na 7 dni.

Opracowanie wyników

Po 7 dniach policzyć % skielkowanych nasion, zmierzyć i uśrednić długość korzeni i pędów siewek, opisać wygląd siewek, wyniki pomiarów przedstawić w tabelach 13.3a, 13.3b, 13.3c, 13.3d.

Tabela 13.3a. Wpływ eksudatu z nasion pomidora na kiełkowanie nasion i ziarniaków oraz wzrost siewek ogórka, rzodkiewki i pszenicy

Gatunek	Kontrola			Nasiona kiełkujące w obecności eksudatu z nasion pomidora		
	Skielkowane nasiona [% wysianych]	Wielkość siewek [cm]		Skielkowane nasiona [% wysianych]	Wielkość siewek [cm]	
		Korzeń	Pęd		Korzeń	Pęd
Ogórek						
Pszenica						
Rzodkiewka						

Tabela 13.3b. Wpływ eksudatu z nasion słonecznika na kiełkowanie nasion i ziarniaków oraz wzrost siewek ogórka, rzodkiewki i pszenicy

Gatunek	Kontrola			Nasiona kiełkujące w obecności eksudatu z nasion słonecznika		
	Skiełkowane nasiona [% wysianych]	Wielkość siewek [cm]		Skiełkowane nasiona [% wysianych]	Wielkość siewek [cm]	
		Korzeń	Pęd		Korzeń	Pęd
Ogórek						
Pszenica						
Rzodkiewka						

Tabela 13.3c. Wpływ eksudatu z nasion kozieradki na kiełkowanie nasion i ziarniaków oraz wzrost siewek ogórka, rzodkiewki i pszenicy

Gatunek	Kontrola			Nasiona kiełkujące w obecności eksudatu z nasion kozieradki		
	Skiełkowane nasiona [% wysianych]	Wielkość siewek [cm]		Skiełkowane nasiona [% wysianych]	Wielkość siewek [cm]	
		Korzeń	Pęd		Korzeń	Pęd
Ogórek						
Pszenica						
Rzodkiewka						

Tabela 13.3d. Wpływ eksudatu z ziarniaków owsa na kiełkowanie nasion i ziarniaków oraz wzrost siewek ogórka, rzodkiewki i pszenicy

Gatunek	Kontrola			Nasiona kiełkujące w obecności eksudatu z ziarniaków owsa		
	Skiełkowane nasiona [% wysianych]	Wielkość siewek [cm]		Skiełkowane nasiona [% wysianych]	Wielkość siewek [cm]	
		Korzeń	Pęd		Korzeń	Pęd
Ogórek						
Pszenica						
Rzodkiewka						

Doświadczenie III

Badanie allelopacyjnego wpływu olejków eterycznych naowocni pomarańczy i szyszkojagód jałowca na kiełkowanie nasion i ziarniaków oraz wzrost korzeni siewek ogórka, rzodkiewki i pszenicy

Materiał

olejek eteryczny pomarańczowy i jałowcowy, nasiona ogórka i rzodkiewki, ziarniaki pszenicy

Sprzęt laboratoryjny

9 słoików o średnicy 9 cm, wełna mineralna (9 sześciątów o krawędzi 3 cm, wyciętych nożem z bloku wełny mineralnej), zlewka 1000 cm³, 9 krążków bibuły filtracyjnej o średnicy 7 cm, pęsety stomatologiczne, bandaż szerokości 10 cm, taca głęboka, linijki 30 cm, markery

Wykonanie doświadczenia

1. Sześciąny z wełny mineralnej włożyć do zlewki, zalać wodą destylowaną do momentu dokładnego nasączenia.
2. Przygotować 9 słoików o średnicy 9 cm, opisać poszczególne warianty jako:
kontrola → ogórek; kontrola → rzodkiewka; kontrola → pszenica
pomarańcza → ogórek; pomarańcza → rzodkiewka; pomarańcza → pszenica
jałowiec → ogórek; jałowiec → rzodkiewka; jałowiec → pszenica
3. Na spodniej stronie wieczka wszystkich słoików położyć sześciąt z wełny mineralnej dokładnie nasączony wodą destylowaną. Przygotować 9 kawałków bandaża z gazy o rozmiarze 10 × 30 cm.
4. Za pomocą pęsety stomatologicznej w położone na wieczkach sześciąny wełny mineralnej (zgodnie z opisem słoików w pkt. 1b) wbijać kolejno po 10 nasion ogórka, 10 nasion rzodkiewki i 10 ziarniaków pszenicy.
5. Na dnie każdego słoika położyć krążek bibuły filtracyjnej (zgodnie z opisem słoików w pkt. 1b), na każdy z krążków nanieść odpowiednio po 5 kropli olejku eterycznego

pomarańczowego lub jałowcowego, w wariacie kontrolnym nie nakrapiać.

6. Sześciany wełny mineralnej przykryć kawałkiem bandaża, unieść wieczko i zwisające końce bandaża naprężyć w taki sposób, aby bandaż docisnął sześcian wełny z nasionami do wieczka, następnie odwrócić i zakręcić wieczko.
7. Tak przygotowane słoiki umieścić na głębokiej tacy napełnionej wodą destylowaną, zwisające wzdłuż brzegów słoików końce bandaża zanurzyć w wodzie. Tacę ze słoikami odstawić na 7 dni do oświetlonego pokoju hodowlanego, codziennie kontrolować poziom wody na tacy. Nie dopuścić do wysuszenia bandaża.

Opracowanie wyników

Po 7 dniach policzyć % skielkowanych nasion, zmierzyć długość korzeni siewek, opisać wygląd siewek, wyniki pomiarów przedstawić w tabeli 13.4.

Wariant	Parametr	Ogórek	Pszenica	Rzodkiewka
Kontrola	Skielkowane nasiona [% wysianych]			
	Długość korzeni siewek [cm]			
Olejki eteryczne szyszkogagód jałowca	Skielkowane nasiona [% wysianych]			
	Długość korzeni siewek [cm]			
Olejki eteryczne naowocni pomarańczy	Skielkowane nasiona [% wysianych]			
	Długość korzeni siewek [cm]			

Zinterpretować wyniki przeprowadzonych doświadczeń.

Wyciągnąć wnioski dotyczące zróżnicowanego wpływu:

- a) ekstraktów z liści orzecha włoskiego i słonecznika zwyczajnego oraz pędów rzeżuchy,
- b) eksudatów z pęczniejących nasion pomidora, słonecznika, kozieradki i ziarniaków owsa,

Tabela 13.4. Wpływ olejków eterycznych szyszkogagód jałowca i naowocni pomarańczy na kiełkowanie nasion

- c) olejków eterycznych z naowocni pomarańczy i szyszko-
jagód jałowca na kiełkowanie nasion i ziarniaków oraz
wzrost siewek ogórka, pszenicy i rzodkiewki.

Zwrócić uwagę na różnice wrażliwości badanych gatunków
oraz organów (korzenie i pędy) na działanie analizowanych
związków allelopatycznych.

Literatura

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo
Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk sto-
sowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.

Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wpro-
wadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
2019.

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.14>

ROZDZIAŁ XIV. **AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW
AMYLOLITYCZNYCH
W PRZECHOWYWANYCH
ORGANACH SPICHRZOWYCH**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Ziemniak jest obok zbóż jedną z podstawowych roślin wykorzystywanych w żywieniu ludzi i zwierząt. Jest też ważnym produktem dla przemysłu spożywczego (frytki, chipsy, krochmal, alkohol etylowy itp.). Znaczenie spożywcze i paszowe ziemniaka wiąże się głównie z dużą zawartością skrobi, która w zależności od gatunku stanowi 15–30% w przeliczeniu na świeżą masę. Bulwy ziemniaka są też dobrym źródłem witaminy C oraz makro- i mikroelementów niezbędnych dla prawidłowego rozwoju organizmu człowieka. Popiół stanowi zwykle 3,8% suchej masy i w przeliczeniu na 100 części popiołu zawiera: K_2O – 60,1, Na_2O – 2,9, CaO – 2,6, MgO – 4,9, Fe_2O_3 – 1,1, P_2O_5 – 16,9, SO_2 – 6,5, SiO_2 – 2,0, Cl (w chlorkach nieorganicznych) – 3,0.

Ziarna skrobi w bulwach ziemniaka, tzw. skrobianki, zlokalizowane w amyloplastach są zwykle dużymi pojedynczymi tworami, z wewnętrznym układem warstw rozmieszczonych ekscentrycznie. Warstwy te powstają najprawdopodobniej w wyniku nierównomiernego uwodnienia skrobi w poszczególnych okresach tworzenia się skrobianki.

Skrobia jest homoglikanem $(C_6H_{10}O_5)_n$ zbudowanym z cząsteczek α -D-glukozy. W plastydach występuje w postaci amylozy, gdzie cząsteczki glukozy połączone są wiązaniem glikozydowym między atomami 1 i 4 sąsiadujących ze sobą cząsteczek i amylopektyny, w której średnio co 12–20 reszt glukozydowych występuje połączenie typu glikozydowego 1–6, w wyniku czego amylopektyna ma strukturę rozgałęzioną. Amyloza zbudowana jest z kilkuset lub kilku tysięcy reszt glukozydowych (najczęściej 300–2000), a amylopektyna z kilku–kilkunastu tysięcy reszt (najczęściej 1200–6000). Testem różnicującym formy skrobi jest test rozpuszczalności w wodzie w temperaturze 70–80°C, w takich warunkach rozpuszczeniu ulega tylko amyloza. W bulwach

ziemniaka około $\frac{3}{4}$ skrobi występuje w formie amylopektyny, a tylko $\frac{1}{4}$ w formie amylozy. Skrobia powstająca w tkankach fotosyntetyzujących rozkładana jest na drodze fosforolizy przy udziale fosforylasy α -glukanowej, β - i α -amylaz oraz cząsteczki wody. Kluczowym etapem fosforolizy jest reakcja katalizowana przez fosforylase α -glukanową, która odcina od łańcucha skrobiowego resztę glukozy i przyłącza do niej fosforan nieorganiczny. Reakcja prowadzi do utworzenia glukozy-1-fosforanu, który wchodzi w dalsze przemiany. Jednocześnie następuje skrócenie łańcucha skrobi o 1 cząsteczkę glukozy.

Wzrost stężenia cukrów redukujących w czasie przechowywania warzyw i owoców jest jednym z ważniejszych problemów przemysłu spożywczego. Obecna w tkankach roślinnych oksydaza polifenolowa katalizuje hydroksylację monofenoli do *o*-difenioli, które z kolei utlenia do *o*-chinonów. *o*-chinony spontanicznie kondensują z wieloma innymi związkami, w tym z cukrami redukującymi, w wyniku czego tworzą się wysokocząsteczkowe polimery, nadające tkankom charakterystyczne brązowe zabarwienie i powodujące obniżenie walorów wzrokowych oraz smakowych.

Ponieważ w przemianach skrobi w cukry niskocząsteczkowe uczestniczą enzymy zlokalizowane w błonach amyloplastów, wzrost stężenia cukrów redukujących jest wynikiem zaburzeń struktur komórkowych. Spadek temperatury, w której przechowywane są bulwy do 0–2°C, wywołuje wzrost przepuszczalności błon komórkowych, czego efektem jest przesunięcie równowagi w kierunku tworzenia się cukrów redukujących. Przyczynami szybkiego fizjologicznego starzenia się ziemniaka są też wysoka temperatura w czasie długotrwałego przechowywania i znaczna dojrzałość bulw, powodująca dużą intensywność ich kiełkowania. Wywołuje to nieodwracalne zmiany w składzie lipidowym błon komórkowych, w wyniku czego wzrasta ich przepuszczalność, powodując akumulację cukrów redukujących w organie. Jest to zjawisko tzw. słodkości starczej (ang. *senescent sweetening*).

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Zapoznanie ze zmianami metabolizmu cukrów i białek organów spichrzowych w zależności od warunków ich przechowywania oraz określenie ich przydatności użytkowej.

Materiał

bulwy ziemniaka jednego gatunku przechowywane w różnych warunkach temperaturowych (chłdnia, temperatura pokojowa, 37°C) i oświetlenia (ciemność, światło) przez okres jednego i trzech miesięcy

Doświadczenie I

Oznaczanie aktywności α -amylazy

Zasada metody

α -amylaza hydrolizuje skrobię do produktu niedającego reakcji barwnej z jodem. Skrobię, która uległa hydrolizie, oznacza się kolorymetrycznie za pomocą reakcji barwnej z jodem.

Odczynniki

- a) odczynnik skrobiowy: 0,5 g skrobi, 1g NaCl i 2 g cytrynianu sodu rozpuścić w 80 cm³ wody destylowanej i zagotować (2–3 minuty), po ostygnięciu uzupełnić do 100 cm³ wodą destylowaną
- b) odczynnik Gramma: 1,67 g KI rozpuścić w niewielkiej ilości wody destylowanej, dodać 0,83 g jodu metalicznego, następnie przenieść do kolby miarowej o pojemności 250 cm³ i uzupełnić do 250 cm³ wodą destylowaną

Sprzęt laboratoryjny

wirówka, spektrofotometr, kuwety spektrofotometryczne, cieplarnia 37°C, probówki szklane chemiczne, probówki wirownicze, pipety (0,1–10 cm³), gaza, szalki Petriego (duże), nóż, drobna tarka do warzyw

Wykonanie doświadczenia

1. Przygotowanie ekstraktu z bulw ziemniaka

Ziemniaki obrać (bardzo cienko), opłukać pod bieżącą wodą i zetrzeć na tarce. Uzyskaną w ten sposób pulpę przesączyć do probówek wirowniczych przez poczwórną warstwę gazy. Materiał odwirować ($5000 \times g$, 10 min) w celu usunięcia całych ziaren skrobi. Do dalszych badań używać supernatantu.

2. Oznaczanie aktywności α -amylazy

Oznaczenie przeprowadzić w probówkach chemicznych. Do $2,5 \text{ cm}^3$ odczynnika skrobiowego dodać $0,1 \text{ cm}^3$ próby badanej (supernatant) i mieszaninę inkubować 30 minut w temperaturze 37°C . Natychmiast po zakończeniu inkubacji przenieść po $0,25 \text{ cm}^3$ inkubatu do wcześniej przygotowanych probówek zawierających po $9,5 \text{ cm}^3$ wody destylowanej i $0,1 \text{ cm}^3$ odczynnika Gramma. Obydwa odczynniki przed dodaniem inkubatu dobrze wymieszać. Próbką odczynnikową (kontrola) jest inkubat odczynnika skrobiowego z wodą destylowaną zmieszane w identycznej proporcji jak próby badane i $0,1 \text{ cm}^3$ odczynnika Gramma. Pomiaru absorbancji dokonać w kuwetach spektrofotometrycznych przy długości fali 560 nm względem wody destylowanej w ciągu 5 minut.

Opracowanie wyników

Do obliczania aktywności α -amylazy w jednostkach Wohlgemutha [j. W.] zastosować wzór:

$$\text{Aktywność [j. W.]} = \frac{(Abs_{po} - Abs_{pb})}{Abs_{po}} \times 200$$

gdzie:

j. W. – jednostka Wohlgemutha, czyli ilość α -amylazy, która w czasie 30 minut w temperaturze 37°C hydrolizuje 1 mg skrobi,

Abs_{pb} – absorbancja próby badanej,

Abs_{po} – absorbancja próby odczynnikowej,

200 – stała Wohlgemutha, współczynnik przeliczeniowy do uzyskania [j. W.].

Doświadczenie II**Oznaczanie stężenia cukrów redukujących metodą Nelsona****Zasada metody**

Cukry redukujące zawarte w próbce badanej powodują w czasie gotowania wypadanie z roztworów zawierających miedź dwuwartościową ceglastego osadu Cu_2O . Tlenek miedzi (I) rozpuszcza się w odczynniku arseno-molibdenowym, dając niebieskie zabarwienie.

Odczynniki

- a) odczynnik miedziowy I: w 600 cm^3 wrzącej wody destylowanej rozpuścić 200 g Na_2SO_4 . Oddzielnie w 100 cm^3 wody destylowanej rozpuścić 25 g winianu sodowo-potasowego. Obydwa roztwory przenieść do litrowej kolby, dodać do nich 20 g NaHCO_3 , 25 g bezwodnego Na_2CO_3 i ostatecznie uzupełnić do 1 dm^3 wodą destylowaną. Jeśli uzyskany roztwór jest mętny, należy go przesączyć. Roztwór przechowywać w 37°C
- b) odczynnik miedziowy II: 15% roztwór $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ z dodatkiem 1–2 kropli stężonego H_2SO_4
- c) mieszanina odczynników miedziowych I i II w stosunku 25:1. Sporządzić bezpośrednio przed użyciem
- d) odczynnik arseno-molibdenowy: w 450 cm^3 wody destylowanej rozpuścić 25 g molibdenianu amonowego, dodać 31 cm^3 stężonego H_2SO_4 . W 25 cm^3 wody destylowanej rozpuścić 3 g arsenianu sodowego ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Obydwa roztwory zmieszać i inkubować 24–48 godzin w temperaturze 37°C (lub ogrzewać przez 25 minut w temperaturze 55°C). Roztwór o żółtym zabarwieniu przechowywać w ciemnej butelce – odczynnik trwały
- e) 500 mg% roztwór wzorcowy glukozy (wykonać przed rozpoczęciem oznaczeń)

Sprzęt laboratoryjny

próbówki szklane chemiczne, pipety (0,1–5 cm^3), spektrofotometr, kuwety spektrofotometryczne

Wykonanie doświadczenia

Do próbki dodać 0,1 cm^3 20-krotnie rozcieńczonej próby badanej, 0,4 cm^3 wody destylowanej i 0,4 cm^3 odczynnika c (mieszanina

odczynników miedziowych). Zawartość próbówki dokładnie wymieszać i gotować w łaźni wodnej przez 20 minut. Po tym czasie próbki schłodzić pod bieżącą wodą i dodać $0,4 \text{ cm}^3$ odczynnika arseno-molibdenowego oraz $2,8 \text{ cm}^3$ wody destylowanej. Wartość absorbancji zmierzyć w kuwetach spektrofotometrycznych przy długości fali 660 nm wobec próby kontrolnej wykonanej w ten sam sposób jak próba badana z użyciem $0,5 \text{ cm}^3$ wody destylowanej. Jednocześnie z próbą badaną wykonać krzywą kalibracyjną w zakresie 10–200 mg% (10, 50, 100, 150 i 200 mg%).

Opracowanie wyników

Stężenie cukrów redukujących odczytać z krzywej kalibracyjnej.

UWAGA: Do oznaczenia stężenia glukozy można wykorzystać powszechnie stosowane w laboratoriach analitycznych zestawy odczynnikowe (zgodnie z metodyką opisaną przez producenta).

Doświadczenie III

Oznaczanie stężenia białka metodą biuretową

Zasada metody

Zawarte w próbce badanej białko wchodzi w reakcję biuretową ze składnikami odczynnika. Odczynnik biuretowy reaguje z wiązaniami peptydowymi $-\text{CO}-\text{NH}-$, które łączą aminokwasy w łańcuchu polipeptydowym.

Odczynniki

- a) odczynnik biuretowy: $1,5 \text{ g CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ i 6 g winianu sodowo-potasowego rozpuścić w 300 cm^3 wody destylowanej, następnie dodać 300 cm^3 10% NaOH i 2 g KI. Po dokładnym rozpuszczeniu wszystkich składników uzupełnić roztwór wodą destylowaną do 1000 cm^3 . Odczynnik przechowywać w ciemnej butelce – odczynnik trwały
- b) roztwór wzorcowy albuminy o stężeniu 10 mg% (wykonać 24 godziny przed użyciem)

Sprzęt laboratoryjny

probówki szklane, pipety (0,1–5 cm³), spektrofotometr, kuwety spektrofotometryczne

Wykonanie doświadczenia

Do probówki dodać 0,5 cm³ próby badanej, 0,5 cm³ wody destylowanej i 5 cm³ odczynnika biuretowego. Po dokładnym wymieszaniu probówki odstawić do ciemnego miejsca na 30 minut. Dokładnie po tym czasie zmierzyć wartość absorbancji w kuwecie spektrofotometrycznej przy długości fali 530 nm wobec próby odczynnikowej (kontrola) wykonanej identycznie jak próby badane, ale zawierającej 1 cm³ wody destylowanej.

Opracowanie wyników

Wartość stężenia białka odczytać z krzywej wzorcowej wykonanej dla albuminy w zakresie 1–10 mg% (1, 2, 5, 7 i 10 mg%).

Zinterpretować wszystkie uzyskane wyniki dotyczące aktywności α -amylazy, stężenia cukrów redukujących i białka.

UWAGA: Do oznaczenia stężenia białka można wykorzystać również metodę Bradford.

Literatura

- Berg J. M., Stryer L., Tymoczko J. L., Gatto G. J., *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Kączkowski J., *Podstawy biochemii*, Wydawnictwo WNT, Warszawa 2019.
- Kłyszajko-Stefanowicz L. (red.), *Ćwiczenia z biochemii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.15>

ROZDZIAŁ XV. **TEST TOLERANCJI
KOMÓREK ROŚLINNYCH
NA ABIOTYCZNE CZYNNIKI
STRESOWE**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Rośliny w środowisku naturalnym nieustannie narażone są na działanie różnego typu stresów. Terminem **stres** określa się zarówno niekorzystny czynnik działający na organizm, jak i stan organizmu wywołany działaniem tego czynnika. **Czynnik stresowy** (stresor) oznacza każdy bodziec środowiska, który działając na organizm, może prowadzić do zaburzeń jego funkcji i struktury. **Reakcja stresowa** oznacza odpowiedź na ten bodziec oraz wynikający z niej stan dostosowania organizmu. Stresowe czynniki środowiska można podzielić na **abiotyczne** i **biotyczne**.

Odpowiedź organizmu na czynnik stresowy obejmuje kolejno **fazy: alarmu, restytucji i odporności**; po ustąpieniu czynnika stresowego następuje faza regeneracji. W przypadku zbyt wysokiej intensywności stresu pojawia się faza wyczerpania, dochodzi do nieodwracalnych uszkodzeń, prowadzących nawet do śmierci organizmu. Odpowiedź na czynnik stresowy może być **lokalna** (w miejscu działania stresora) lub **systemiczna**, gdy sygnał z miejsca działania stresora rozprzestrzenia się i prowadzi do zwiększenia odporności całego organizmu. Dostosowanie się roślin do stresowych czynników środowiska może zachodzić w wyniku **adaptacji**, czyli procesów odbywających się w toku ewolucji, zabiegów hodowlanych – powodujących trwałe zmiany w genomie, lub w wyniku **aklimatyzacji**, polegającej na niedziedzicznych zmianach struktury i funkcji, które ograniczają niekorzystne skutki działania stresu. Reakcja stresowa może być **specyficzna** dla stresora lub **niespecyficzna**, gdy odpowiedzi na różne stresory są podobne.

Na poziomie komórkowym większość czynników stresowych oddziałuje na wiele ważnych procesów metabolicznych roślin, takich jak fotosynteza i oddychanie mitochondrialne.

W konsekwencji może dojść do ograniczenia wzrostu i plonowania, a nawet do śmierci rośliny. Zaburzenie procesów oddechowych komórki prowadzi zarówno do obniżenia podaży energii, jak i wzmożonego generowania reaktywnych form tlenu i stresu oksydacyjnego. W efekcie tych zmian dochodzi do zaburzeń metabolizmu i uszkodzeń obniżających żywotność komórek. Zaburzenie procesów oddechowych komórki jest niespecyficzną reakcją na czynniki stresowe.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Zbadanie reakcji komórek roślinnych (korzeni siewek) na abiotyczne czynniki stresowe: zasolenie – NaCl, metal ciężki – Cd²⁺, chłód – temperatura 8°C, ksenobiotyk organiczny – fenol, przeprowadzone na podstawie testu żywotności komórek.

Zasada metody

W obecności żywych komórek bezbarwny w stanie utlenionym chlorek 2,3,5-trifenylo-tetrazoliowy (TTC) (por. rozdział XII) staje się akceptorem elektronów pochodzących z łańcucha transportu elektronów w mitochondriach (uwolnionych z NADP, głównie przez dehydrogenazy kompleksu I). Przyłączenie elektronów do TTC prowadzi do powstania inicjalnego produktu redukcji TTC, który jest niestabilny i może szybko ulec ponownemu utlenieniu przez tlen cząsteczkowy (O₂). Formowanie stabilnego produktu redukcji TTC, czyli nierozpuszczalnego, czerwonego trifenyloformazanu (TTC-H), uwarunkowane jest prawidłową aktywnością kompleksu IV łańcucha oddechowego, czyli oksydazy cytochromowej (tzw. oksydaza terminalna), która warunkuje środowisko anaerobowe dzięki czteroelektronowej redukcji O₂ do wody. Żywotność komórek poddanych działaniu stresu abiotycznego ocenia się w oparciu o formowanie barwnego TTC-H, które zależy od prawidłowego funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów.

Materiał

trzydniowe kultury hydroponiczne pszenicy zwyczajnej hodowane w 300 cm³ pożywki ¼ Hoagland (por. załącznik 3), na świetle, w temperaturze 24°C

Sposób wywołania stresu

1. Rośliny pszenicy przenieść do 300 cm³ świeżej pożywki ¼ Hoagland, zawierającej:
 - a) NaCl 100 mM – stres solny,
 - b) CdCl₂ 100 μM – stres wywołany przez metal ciężki,
 - c) Fenol 100 μM – stres wywołany przez ksenobiotyk organiczny.
2. Rośliny pszenicy przenieść do 300 cm³ świeżej pożywki ¼ Hoagland i umieścić kultury w chłodni w temperaturze 8°C (pozostawić zapalone światło!) – stres chłodu.

Kontrolę stanowią kultury hydroponiczne przeniesione do 300 cm³ świeżej pożywki ¼ Hoagland niepoddane działaniu powyższych stresorów.

Na każdy wariant przygotować dwie niezależne próby po 15 roślin, w czasie siedmiodniowej hodowli dwukrotnie wymienić pożywkę na świeżo przygotowane zgodnie z opisem powyżej.

Odczynniki

- a) pożywka ¼ Hoagland (por. załącznik 3)
- b) NaCl, CdCl₂, fenol
- c) bufor do płukania (P): 350 cm³ 50 mM buforu fosforanowego pH 7,4 z dodatkiem 12 kropli detergentu Tween 20
- d) bufor inkubacyjny (I): 150 cm³ 50 mM buforu fosforanowego pH 7,4 z dodatkiem 3 kropli detergentu Tween 20 i 10 mM chlorku 2,3,5-trifenyloitetrazoliowego (TTC)
- e) 96% C₂H₅OH

Sprzęt laboratoryjny

naczynia 500 cm³ do hydroponicznej hodowli pszenicy, skalpele, pęsety, gaza, bibuła, lignina, 10 schłodzonych móżdżerzy porcelanowych, bagietki, pipety (1–10 cm³), cylinder miarowy 25 cm³, 10 zlewek 50 cm³, 10 probówek szklanych, 10 lejków, waga laboratoryjna, minutnik, cieplarka (25°C), wirówka, spektrofotometr, kuwety spektrofotometryczne, 10 probówek z korkiem typu

Falcon (15–25 cm³), 10 probówek wirowniczych bez korka 10 cm³, statywy do probówek, markery

Wykonanie doświadczenia

I.A. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU

1. Wiązki korzeni z poszczególnych wariantów umieścić w zlewkach o pojemności 50 cm³ i dwukrotnie przepłukać buforem – korzenie zalać 15 cm³ buforu P, delikatnie kilkakrotnie przemieszczać bagietką, wylać bufor ze zlewki, czynność płukania powtórzyć. Przepłukane wiązki korzeni przenieść za pomocą pęsety na bibułę, delikatnie osuszyć.
2. Przygotować 5 par probówek z korkiem, pary probówek opisać odpowiednio nazwą czynnika stresowego (NaCl, CdCl₂, fenol, chłód) i „kontrola” (materiał niepoddany działaniu stresu).
3. Posługując się skalpelem i pęsetą, pobrać i odważyć dwie porcje po 200 mg korzeni z każdego wariantu. Materiał przenieść do odpowiednio opisanych probówek.

I.B. WYKONANIE OZNACZENIA

1. Nastawienie inkubacji: fragmenty korzeni zalać 10 cm³ buforu I, probówki zakręcić korkiem, przez chwilę wytrząsać, zapewniając dokładne zanurzenie materiału w buforze.
2. Inkubacja: probówki umieścić w cieplarni o temperaturze 25°C na 1 godzinę. W czasie inkubacji co 15 minut wytrząsnąć zawartość probówek.
3. Po upływie 1 godziny inkubacji dokładnie odsączyć bufor I od korzeni, posługując się lejkami z warstwą gazy.
4. Ekstrakcja barwnego formazanu (TTC-H) z korzeni:
 - a) odsączone korzenie przenieść pęsetą z gazy do schłodzonego moździerza i zalać 5 cm³ 96% C₂H₅OH;
 - b) korzenie dokładnie zhomogenizować, homogenaty przelać do opisanych probówek wirowniczych, moździerz dodatkowo przepłukać 2 cm³ 96% C₂H₅OH i dołączyć do głównej puli homogenatu;
 - c) homogenaty odwirować (20 000 × g, 10 min), supernatanty zlać do opisanych szklanych probówek;

- d) zmierzyć absorbancję etanolowych ekstraktów formazanu wszystkich prób w kuwetach spektrofotometrycznych na spektrofotometrze przy długości fali 485 nm względem 96% C₂H₅OH. Wyniki (średni pomiar z 2 prób z każdego wariantu) wpisać do tabeli 15.1.

Opracowanie wyników

Określić żywotność komórek poddanych działaniu abiotycznych czynników stresowych jako % kontroli, przyjmując za 100% wartość absorbancji A₄₈₅ korzeni kontrolnych. Wyniki zebrać w tabeli 15.1.

Wariant hodowli	A ₄₈₅	Żywotność [% kontroli]
Kontrola		100
NaCl		
CdCl ₂		
Fenol		
Chlód		

Tabela 15.1. Wpływ stresu abiotycznego na żywotność komórek roślinnych

Wyciągnąć wnioski dotyczące wpływu zastosowanych czynników stresowych na żywotność komórek roślinnych. W oparciu o dane literaturowe wyjaśnić negatywny skutek działania badanych czynników stresowych na procesy oddechowe i żywotność komórek.

Literatura

- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.
- Szweykowska A., *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2002.
- Woźny A., Przybył K. (red.), *Komórki roślinne w warunkach stresu*, t. 1: *Komórki in vivo*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2004.

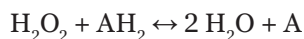
ROZDZIAŁ XVI. **REAKCJE ROŚLIN
NA STRES ABIOTYCZNY**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Stresy wywołane działaniem metali śladowych na rośliny i zasolenie gleb na obszarach rolniczych stanowią istotny problem w warunkach cywilizacji przemysłowej. W rezultacie działania stresów abiotycznych następują **zmiany w fizjologii i budowie komórek** roślinnych oraz **zahamowanie wzrostu**, a nawet śmierć roślin. **Toksyczne działanie metali śladowych** (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn, Co, Ni, Al) wiąże się z blokowaniem grup funkcyjnych w białkach i zastępowaniem przez metale śladowe właściwych metali w białkach i białkach enzymatycznych (np. kofaktorów w białkach enzymatycznych), co prowadzi do ich unieczynnienia. **Stres solny** ogranicza dostępność wody dla rośliny i zaburza gospodarkę jonową. Wspólnym efektem działania stresów abiotycznych na rośliny jest **stres oksydacyjny**, polegający na zachwianiu równowagi między powstawaniem **reaktywnych form tlenu**, do których należą m.in. anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) i nadtlenek wodoru (H_2O_2), a ich unieszkodliwianiem (por. rozdział XVII). W reakcjach obronnych roślin na zasolenie i toksyczne działanie metali śladowych uczestniczą **peroksydazy redukujące H_2O_2** .

Peroksydazy (EC 1.11.1.1-14) należą do oksydoreduktaz katalizujących utlenianie nadtlaniem wodoru substratów organicznych lub nieorganicznych. Występują we wszystkich organizmach żywych. Peroksydazy roślin wyższych są glikoproteinami, ich grupę prostetyczną stanowi kofaktor hemowy. Ze względu na pochodzenie i ułożenie aminokwasów w strukturze enzymu peroksydazy roślin wyższych są głównie klasyfikowane jako **peroksydazy klasy III**. Wśród roślin bogatym źródłem tych enzymów są chrzan i ziemniak. Peroksydaza wyizolowana z korzeni chrzanu jest powszechnie wykorzystywana do celów komercyjnych (np. w testach biomedycznych ELISA, w zestawach do oznaczania cholesterolu i glukozy).

Peroksydazy katalizują **utlenianie fenoli**, amin aromatycznych i indoli w obecności H_2O_2 według następującej reakcji:



gdzie AH_2 i A to odpowiednio substrat w stanie zredukowanym i utleniony produkt reakcji.

Produkty reakcji katalizowanej przez peroksydazy są barwne lub wykazują fluorescencję, co stanowi podstawę metod wykrywania aktywności tych enzymów.

Peroksydazy **odgrywają rolę w procesach wzrostu i rozwoju** roślin, np. w kiełkowaniu nasion, dojrzewaniu owoców, opadaniu liści, starzeniu, zabliznianiu ran. Biorą udział w biosyntezie etylenu, utlenianiu kwasu indolilo-3-octowego i lignifikacji ściany komórkowej. Ich aktywność szybko wzrasta u roślin narażonych na działanie stresu abiotycznego (np. zasolenie, zranienie, niska temperatura) oraz po ataku mikroorganizmów patogenicznych i owadów. Dlatego peroksydazy są uznawane za jeden z markerów stresu u roślin. Ich **udział w obronie roślin przed stresem** związany jest z **regulacją stężenia H_2O_2** , który generowany w nadmiarze w warunkach stresu może działać szkodliwie, ale w niższym stężeniu pełni funkcję sygnałową i jest mediatorem wielu reakcji obronnych i ekspresji genów odpowiedzi na stres. Ponadto peroksydazy **uczestniczą w przemianach związków fenolowych** i powstawaniu metabolitów biorących udział w obronie przed stresem.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

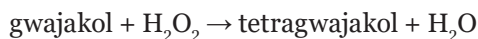
Cel ćwiczenia

Określenie aktywności peroksydazy w siewkach pszenicy poddanych działaniu stresu solnego (NaCl) i metali śladowych (Cu^{2+}).

Zasada metody

Oznaczenie aktywności peroksydazy polega na określeniu w mieszaninie inkubacyjnej zawartości tetragwajakolu powstałego

podczas utleniania gwajakolu (*o*-metoksyfenol) przez peroksydazę w obecności H_2O_2 według reakcji:



Tetragwajakol o czerwono-brunatnej barwie oznacza się przez pomiar absorbancji przy długości fali 470 nm, w temperaturze 25°C. Reakcję przeprowadza się przez 4 minuty ze względu na szybkie wyczerpywanie się H_2O_2 .

Materiał

dwutygodniowe siewki pszenicy uprawiane w warunkach optymalnej wilgotności, temperatury i oświetlenia w doniczkach z ziemią ogrodniczą, potraktowane doglebowo roztworem NaCl o stężeniu 50 mM lub CuSO_4 o stężeniu 500 μM ; do analizy pobierane są korzenie i liście siewek po 2 dniach od traktowania; materiał kontrolny stanowią te same części roślin uzyskane z roślin nietraktowanych

Odczynniki

50 mM bufor octanowy pH 5,6, 20 mM gwajakol, 60 mM H_2O_2 , 50 mM bufor fosforanowy pH 7,0, bufor do homogenizacji o składzie: 1 M NaCl w 50 mM buforze fosforanowym pH 7,0

Sprzęt laboratoryjny

30 probówek szklanych, pipety (0,1–10 cm^3), 6 schłodzonych moździerzy, probówki wirownicze 10 cm^3 , stoper, kuwety do spektrofotometru, wirówka z chłodzeniem, spektrofotometr, waga laboratoryjna

Doświadczenie I

Oznaczenie aktywności peroksydazy wobec gwajakolu

I.A. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU ENZYMATYCZNEGO

Zważyć po 1 g liści i po 1 g korzeni z roślin kontrolnych oraz traktowanych NaCl i CuSO_4 (6 \times 1 g). Korzenie przed ważeniem delikatnie opłukać wodą destylowaną i osuszyć za pomocą bibuły. Każdą próbę homogenizować osobno w schłodzonych moździerzach w 5 cm^3 buforu do homogenizacji. Próby odwirować (10 000 \times g, 15 min).

Otrzymany supernatant (ekstrakt enzymatyczny) zlać do 6 próbek umieszczonych w jednym rzędzie w statywie, osad odrzucić.

I.B. WYKONANIE OZNACZENIA AKTYWNOŚCI PEROKSYDAZY

W 6 próbkach umieszczonych w drugim rzędzie statywu z próbkami z ekstraktem przygotować 10-krotne rozcieńczenie wyjściowych ekstraktów enzymatycznych w 50 mM buforze fosforanowym pH 7,0 i wykorzystać je do oznaczenia aktywności peroksydazy. Przygotować 12 próbek, odpowiednio 6 do oznaczenia prób badanych i 6 do oznaczenia prób odnośnikowych. Oznaczenie przeprowadzić w sposób opisany w tabeli 16.1.

Tabela 16.1.

Oznaczenie aktywności peroksydazy wobec gwajakolu

Odczynnik	Dodawane objętości [cm ³]	
	Próba badana	Próba odnośnikowa
Ekstrakt enzymatyczny (10-krotnie rozcieńczony)	0,5	0,5
50 mM bufor octanowy pH 5,6	0,5	1,0
20 mM gwajakol	0,5	0,5
60 mM H ₂ O ₂	0,5	–

1. Próby zamieszać i natychmiast włączyć stoper (H₂O₂ inicjuje reakcję, dodawać na końcu).
2. Po 4 minutach oznaczyć absorbancję prób przy długości fali 470 nm względem 50 mM buforu octanowego pH 5,6.

Oznaczenie wykonać dwukrotnie dla każdego ekstraktu, a uśrednione wyniki wpisać do tabeli 16.2.

Tabela 16.2. Aktywność peroksydazy w siewkach pszenicy traktowanych NaCl i CuSO₄

Wariant		Wartość absorbancji próby badanej [A _{pb} min ⁻¹]	Wartość absorbancji próby odnośnikowej [A _{odn} min ⁻¹]	Aktywność obliczona ze wzoru [μmol min ⁻¹ cm ⁻³]	Aktywność peroksydazy [U g ⁻¹ ś. m.]
Kontrola	liść				
	korzeń				
NaCl	liść				
	korzeń				
CuSO ₄	liść				
	korzeń				

Opracowanie wyników

Aktywność peroksydazy określić w jednostkach [U] w przeliczeniu na 1 g świeżej masy liści lub korzeni. Za jednostkę aktywności peroksydazy przyjąć taką ilość katalityczną enzymu, która w ciągu 1 minuty (w powyżej opisanych warunkach oznaczenia) powoduje powstanie 1 μmola tetragwajakolu. Ilość tetragwajakolu można obliczyć na podstawie wartości milimolowego współczynnika absorpcji dla tetragwajakolu ($\varepsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Aktywność peroksydazy [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ cm}^{-3}$] obliczyć, korzystając ze wzoru:

$$\frac{(A_{pb} - A_{odn}) \times V \times R}{\varepsilon \times i \times V_s}$$

gdzie:

A_{pb} – absorbanca próby badanej [A min^{-1}],

A_{odn} – absorbanca próby odnośnikowej [A min^{-1}],

V – objętość całkowita (2 cm^3),

R – rozcieńczenie ($10\times$),

ε – milimolowy współczynnik absorpcji dla tetragwajakolu ($\varepsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),

i – grubość warstwy roztworu (1 cm),

V_s – objętość rozcieńczonego supernatantu do oznaczenia ($0,5 \text{ cm}^3$).

Aktywność peroksydazy podać w przeliczeniu na 1 g tkanki [$\text{U g}^{-1} \text{ ś. m.}$]

Zapisać wnioski dotyczące:

- 1) zmiany aktywności peroksydazy pod wpływem abiotycznych czynników stresowych,
- 2) porównania reakcji na stres abiotyczny w zależności od organu rośliny i czynnika stresowego.

Literatura

Bartosz G., *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.

Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.

Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.

Woźny A., Przybył K. (red.), *Komórki roślinne w warunkach stresu*, t. 1: *Komórki in vivo*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2004.

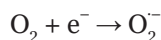
<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.17>

ROZDZIAŁ XVII. **CAŁKOWITA ZDOLNOŚĆ
ANTYOKSYDACYJNA
PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH
POCHODZENIA ROŚLINNEGO**

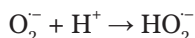
CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Reaktywne formy tlenu (RFT) powstają na skutek niecałkowitej, czyli jedno-, dwu- lub trójelektronowej redukcji cząsteczki tlenu, a także w wyniku wzbudzenia cząsteczki tlenu, prowadzącego do przegrupowania elektronów. Całkowita redukcja cząsteczki tlenu, prowadząca do powstania dwóch cząsteczek H_2O , wymaga przyłączenia czterech elektronów i czterech protonów. Do RFT należą:

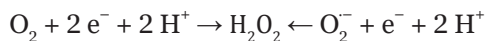
- 1) anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-) – produkt jednoelektronowej redukcji tlenu:



- 2) rodnik wodoronadtlenkowy (HO_2^-) – produkt przyłączenia w roztworze wodnym protonu przez anionorodnik ponadtlenkowy:



- 3) nadtlenuk wodoru (H_2O_2) – produkt przyłączenia kolejnego elektronu do anionorodnika ponadtlenkowego lub dwóch elektronów do cząsteczki tlenu:



- 4) rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$) – produkt przyłączenia trzech elektronów do cząsteczki tlenu:



Reakcja ta, katalizowana przez jony metali ziem przejściowych, określana jest jako reakcja Habera-Weissa.

- 5) tlen singletowy (${}^1\text{O}_2$), powstający w wyniku wzbudzenia cząsteczki tlenu, czyli dostarczenia energii umożliwiającej przegrupowanie i sparowanie elektronów w cząsteczce tlenu.

Głównym źródłem RFT w komórkach aerobowych jest transport elektronów w mitochondriach. U roślin ważnym źródłem RFT jest proces fotosyntezy, w którym podobnie jak w mitochondriach dochodzi do „przeciekania” elektronów z fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów, co prowadzi do powstania O_2^- . Nadtlenek wodoru (H_2O_2) powstaje głównie w peroksydomach w procesie fotooddychania i β -oksydacji kwasów tłuszczowych.

RFT są bardziej reaktywne niż cząsteczka tlenu w stanie podstawowym, czyli są zdolne do nieselektywnej reakcji z większą liczbą substancji znacznie szybciej niż tlen cząsteczkowy. RFT uważane są za czynniki powodujące uszkodzenia oksydacyjne białek, peroksydację lipidów i mutagenezę.

Powstawanie RFT jest zjawiskiem fizjologicznym związanym z metabolizmem tlenowym, ale w następstwie działania na komórki czynników stresowych dochodzi do wzmożonego generowania RFT, co może prowadzić do stresu oksydacyjnego. Powstawaniu i negatywnym skutkom stresu oksydacyjnego zapobiega **system antyoksydacyjny**, który tworzą współdziałające ze sobą **antyoksydanty enzymatyczne** i **nieenzymatyczne**. Antyoksydanty nieenzymatyczne to związki, które działając w małych stężeniach w porównaniu z substancją ulegającą utlenieniu, opóźniają bądź hamują utlenianie tej substancji. Efektywność działania systemu nieenzymatycznego można określić poprzez pomiar **całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (CZA)** materiału biologicznego. CZA jest to wypadkowa zdolność badanego materiału do przeciwdziałania określonej reakcji utleniania. Pomiar CZA nie dostarcza informacji, z jakimi antyoksydantami mamy do czynienia.

Rośliny użytkowe są ważnym źródłem antyoksydantów niskocząsteczkowych, do których należą:

- 1) związki fenolowe: witamina E (tokoferole, np. α -tokoferol i tokotrienole), flawonoidy (np. rutyna), antocyjany,

kwasy fenolowe (np. kwas kawowy), chalkony (np. floretyna);

2) związki zawierające azot: alkaloidy (np. kofeina), betalainy, pochodne chlorofilu, aminokwasy i aminy;

3) karotenoidy;

4) witamina C (kwas askorbinowy);

5) peptydy (np. glutation).

Badania epidemiologiczne wykazały, że dieta bogata w owoce i warzywa oraz w produkty pochodzenia roślinnego znacząco redukuje częstotliwość występowania chorób przewlekłych, takich jak: miażdżyca tętnic, zaćma, nowotwory, cukrzyca, reumatoidalne zapalenie stawów, choroby neurologiczne, autoimmunizacyjne, u których podłoża leży stres oksydacyjny.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Porównanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (CZA) produktów spożywczych pochodzenia roślinnego.

Zasada metody

Metoda oparta jest na pomiarze zdolności redukcyjnej antyoksydantów. Związek będący antyoksydantem, reagując z RFT, ulega utlenieniu, czyli jest reduktorem. W mieszaninie reakcyjnej obecny jest heksacyjanożelazian (III) potasu – $K_3[Fe(CN)_6]$ oraz $FeCl_3$. Dodanie do tej mieszaniny związku o właściwościach redukcyjnych powoduje redukcję $Fe(CN)_6^{3-}$ do $Fe(CN)_6^{4-}$. Powstały jon sześciocyjanożelazianowy tworzy z Fe^{3+} niebieski heksacyjanożelazian (II) żelaza (III) – $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$, tzw. błękit pruski, powodując wzrost absorbancji mierzonej przy długości fali 593 nm. Przyrost absorbancji jest proporcjonalny do zawartości antyoksydantów w próbce.



Materiał

- a) susz, np. herbata czarna, czerwona, zielona, biała, turkusowa, yerba mate (ostrokrzew paragwajski), rooibos (czerwonokrzew), susz owocowy, ziołowy
- b) soki z warzyw, np. z pomidorów, marchwi, buraków, w tym przygotowane metodą „domową”
- c) soki z owoców, np. z jabłek, pomarańczy, wiśni, porzeczek, w tym przygotowane metodą „domową”
- d) napoje alkoholowe, np. wino białe, czerwone, piwo jasne, ciemne, karmi, gin, nalewki lub wina owocowe przygotowane metodą „domową”
- e) kawa rozpuszczalna, naturalna zielona i palona, zbożowa

Odczynniki

1 mM Troloks (syntetyczny analog tokoferolu rozpuszczalny w wodzie) w etanolu, 96% C_2H_5OH , 1% żelazicyjanek potasu ($K_3[Fe(CN)_6]$), 2% $FeCl_3$, 0,2 M bufor octanowy pH 3,6

Sprzęt laboratoryjny

bagietki, pipety (0,01–5 cm^3), zlewki 100 cm^3 , cylinder miarowy 100 cm^3 , próbówki szklane krótkie, kuwety spektrofotometryczne 1 cm z przykrywką, spektrofotometr, waga laboratoryjna, minutnik, czajnik elektryczny, lignina, markery

Wykonanie doświadczenia

1. Przygotowanie ekstraktów z produktów suchych
Odważyć po 0,5 g suchego materiału roślinnego, przenieść do zlewki o pojemności 100 cm^3 i zalać 55 cm^3 wrzącej wody. Odstawić do oziębienia, w tym czasie kilkukrotnie zamieszać bagietką.
2. Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej CZA
 - a) W statywie przygotować zestaw par próbek w liczbie odpowiadającej liczbie badanych materiałów + 2 dla próby odczynnikowej + 2 dla próby wzorcowej + 1 dla próby odnośnikowej.
 - b) Do próbek dodać 2,5 cm^3 buforu octanowego, statyw przenieść na stanowisko pomiarowe przy spektrofotometrze.

- c) Przygotowywać próby w następującej kolejności: próba odnośnikowa, odczynnikowa, wzorcowa i badana bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia.

Próba odnośnikowa: do buforu octanowego dodać 0,02 cm³ 96% C₂H₅OH, wymieszać, przelać do kuwety pomiarowej, wyzerować spektrofotometr ($\lambda = 593$ nm).

Pozostałe próby przygotować kolejno według opisu w tabeli 17.1.

Tabela 17.1.
Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej CZA

Odczynnik	Dodawane objętości [cm ³]		
	Próba odczynnikowa	Próba wzorcowa	Próba badana
0,2 M bufor octanowy	2,5	2,5	2,5
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,25	0,25	0,25
FeCl ₃	0,25	0,25	0,25
1. Wymieszać, pobrać pipetą 0,75 cm ³ do kuwety spektrofotometrycznej, zmierzyć absorbancję A ₅₉₃ w czasie t ₀ , 2. Kuwetę wyjąć ze spektrofotometru i do mieszaniny odczynników dodać:			
96% C ₂ H ₅ OH	0,02	–	–
1 mM Troloks	–	0,02	–
Produkt lub ekstrakt	–	–	0,02
1. Natychmiast włączyć stoper – reakcja się rozpoczyna, 2. Kuwetę szybko zakryć i wymieszać zawartość, 3. Mierzyć absorbancję A ₅₉₃ co 15 sekund w czasie 3 minut.			
<i>Absorbancję wszystkich prób oznaczyć wobec próby odnośnikowej o składzie: 2,5 cm³ 0,2 M buforu octanowego pH 3,6 + 0,02 cm³ 96% C₂H₅OH</i>			

Pomiar dla wszystkich prób wykonać dwukrotnie, policzyć średnie wartości absorbancji w poszczególnych punktach pomiarowych.

Opracowanie wyników

1. Wykreślić krzywe $A = f(t)$ dla próby odczynnikowej, wzorcowego roztworu Troloksu i prób badanych.
2. Obliczyć wartości $\Delta A = A_{t_{180}} - A_{t_0}$ dla próby odczynnikowej (ΔA_o), wzorcowego roztworu Troloksu (ΔA_{Tr}) i prób

badanych (ΔA_B). W oparciu o uzyskane wartości obliczyć CZA badanych produktów w przeliczeniu na jednoelektronowe równoważniki Troloksu. Obliczyć, jakiemu stężeniu Troloksu [mg] odpowiada CZA 1 cm³ badanego produktu lub ekstraktu produktu spożywczego, korzystając ze wzoru:

$$CZA_B [\text{mg TrE cm}^{-3}] = 2 \times \frac{\Delta A_B - \Delta A_0}{\Delta A_{Tr} - \Delta A_0} \times C_{Tr} \times \frac{0,77}{0,02}$$

gdzie:

CZA_B – całkowita zdolność antyoksydacyjna 1 cm³ produktu lub ekstraktu z produktu spożywczego w przeliczeniu na 1 mg jednoelektronowych równoważników Troloksu (ang. *Trolox Equivalents*, TrE),

2 – współczynnik dla przeliczenia na jednoelektronowe równoważniki Troloksu,

0,77 – objętość mieszaniny reakcyjnej (0,75 + 0,02 cm³),

0,02 – objętość próby badanej w mieszaninie reakcyjnej [cm³],

C_{Tr} – masa Troloksu dodanego do mieszaniny reakcyjnej = 0,005 mg.

Wyniki przedstawić w tabeli 17.2.

Produkt spożywczy pochodzenia roślinnego	$\Delta A_B = At_{180} - At_0$	CZA [mg TrE cm ⁻³ produktu/ekstraktu]
Material 1		
Material 2		
Material ...		

3. Porównując wykresy i wartości CZA uzyskane dla poszczególnych produktów, wyciągnąć wnioski dotyczące całkowitej zdolności antyoksydacyjnej produktów spożywczych pochodzenia roślinnego. Na podstawie danych literaturowych zasugerować zależność pomiędzy potencjałem antyoksydacyjnym a typem metabolitów wtórnych obecnych lub dominujących w badanym produkcie roślinnym.

Tabela 17.2.

Całkowita zdolność antyoksydacyjna badanych produktów

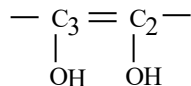
Literatura

- Bartosz G., *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2013.
- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Sikorski Z. E. (red.), *Chemia żywności, t. 3: Odżywcze i zdrowotne właściwości składników żywności*, Wydawnictwo WNT, Warszawa 2007.

ROZDZIAŁ XVIII. **ZAWARTOŚĆ KWASU
ASKORBINOWEGO (WITAMINY C)
W WARZYWACH I OWOCACH**

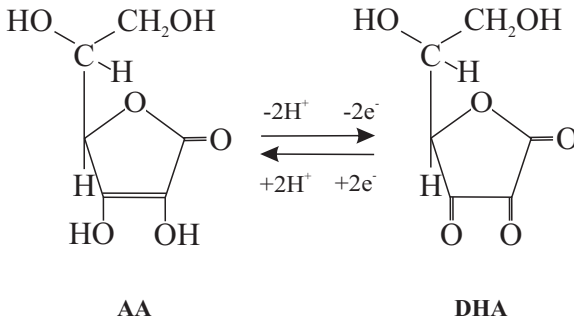
CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Kwas askorbinowy ($C_6H_8O_6$) pod względem chemicznym jest γ -laktonem kwasu 2,3-dehydro-*L*-gulonowego i powstaje w wyniku przemian związków cukrowych. U roślin istnieją dwie główne drogi biosyntezy kwasu askorbinowego: z glukozy i z galaktozy. Działanie fizjologiczne kwasu *L*-askorbinowego wiąże się z **ugrupowaniem endiolowym**, którego obecność warunkuje **właściwości redukujące** tego związku i jego charakter kwasowy:



Kwas *L*-askorbinowy ma zdolność do odwracalnego utleniania i redukcji (por. rysunek 18.1). Dzięki temu kwas *L*-askorbinowy to **główny antyoksydant nieenzymatyczny** środowiska wodnego komórki, chroniący je przed skutkami stresu oksydacyjnego. Współdziała także z antyoksydantami lipofilowymi komórek, w tym tokoferolami i karotenoidami.

Formy zredukowana – kwas ***L*-askorbinowy (AA)**, i utleniona – **kwas *L*-dehydroaskorbinowy (DHA)** ($C_6H_6O_6$), tworzą **układ oksydoredukcyjny**, w którym kwas *L*-askorbinowy jest utleniany (nieenzymatycznie lub enzymatycznie) do anionorodnika askorbylowego i dalej do monodehydro- i dehydroaskorbinianu, a ten jest regenerowany do formy zredukowanej na drodze enzymatycznej przy udziale zależnej od glutationu reduktazy dehydroaskorbinianowej.



Rysunek 18.1. Kwas *L*-askorbinowy (AA) i *L*-dehydroaskorbinowy (DHA) jako formy zredukowana i utleniona witaminy C

Kwas askorbinowy odgrywa rolę regulacyjną w procesach wzrostu, różnicowania i w metabolizmie komórek roślinnych. Pełni również funkcję kofaktora enzymów uczestniczących np. w cyklu ksantofilowym, biosyntezie giberelin, katabolizmie glukozynolanów (hydroliza do bioaktywnych pochodnych), biosyntezie etylenu, biosyntezie ekstensyny, metabolizmie tyrozyny, syntezie NAD(P)H i ATP.

Kwas askorbinowy jako związek chemiczny występuje w formie bezbarwnych kryształów o temperaturze topnienia 190–192°C, kwaśnym smaku, bez zapachu. W postaci krystalicznej jest stosunkowo trwały, natomiast w roztworach wodnych łatwo ulega oksydatywnej degradacji pod wpływem szeregu czynników, takich jak: wysoka temperatura, $\text{pH} > 6$, obecność tlenu i jonów metali ziem przejściowych (np. miedź, żelazo), światło, UV. Pod wpływem wymienionych czynników AA utlenia się do DHA, a ten dalej ulega nieodwracalnej hydrolizie do kwasu 2,3-diokso-*L*-gulonowego, który nie wykazuje aktywności biologicznej. Kolejne etapy katabolizmu to przekształcenie kwasu 2,3-diokso-*L*-gulonowego do kwasu szczawowego i treonowego.

Dla ludzi i niektórych zwierząt, takich jak małpy, owocożerne nietoperze, kawia domowa, które nie mają zdolności do biosyntezy tego związku, AA i DHA jest witaminą C i musi być przyjmowany z pożywieniem. Źródłem witaminy C są głównie produkty roślinne.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

1. Analiza wpływu procesów przetwarzania żywności na zawartość formy zredukowanej (kwas L-askorbinowy, AA) i utlenionej (kwas L-dehydroaskorbinowy, DHA) witaminy C w wybranych produktach pochodzenia roślinnego.

2. Porównanie całkowitej zawartości kwasu L-askorbinowego (AA) w wybranych świeżych i przetworzonych produktach pochodzenia roślinnego.

Doświadczenie I

Analiza jakościowa kwasu askorbinowego i dehydroaskorbinowego metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Zasada metody

Analiza jakościowa form kwasu askorbinowego za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC): identyfikacja AA i DHA obecnych w badanych ekstraktach na podstawie porównania zabarwienia w świetle UV (254 nm) i współczynników przesunięcia (R_f) ich plam na chromatogramie względem wzorców.

Materiał

owoce i warzywa, w zależności od sezonu i dostępności, w formie surowej oraz poddane procesom przetwarzania w celu przygotowania do spożycia (np. gotowanie) lub po okresie przechowywania (np. zamrażanie, pasteryzacja, inna konserwacja):

- a) warzywa, np. ziemniak gotowany, natka pietruszki, liście kopru, brokuł i brukselka – świeże i zamrożone, papryka czerwona i zielona, ogórek świeży, kiszony, konserwowy, cebula i szczypior, groch mrożony i konserwowy, bulwy i kiełki rzodkiewki
- b) owoce, np. jabłko, gruszka – surowe i przechowywane w formie kompotu, truskawka, maliny świeże i zamrożone, owoce cytrusowe, owoce dzikiej róży

Odczynniki

3% kwas szczawiowy (lub 2–5% kwas metafosforowy lub 1% HCl), roztwory wzorcowe AA i DHA o stężeniu $0,05 \text{ mg cm}^{-3}$, mieszanina butanol–pirydyna–woda (4:6:3; v/v/v)

Sprzęt laboratoryjny

nóż, deseczka do krojenia, tarka, sączi z miękkiej bibuły, mrożone moździerze porcelanowe, pipety ($0,01\text{--}5 \text{ cm}^3$), cylindry miarowe 25 i 50 cm^3 (w liczbie zależnej od ilości materiału do badań), bagietki, lejek Büchnera + kolba ssawkowa, zlewki 100 cm^3 , waga laboratoryjna, pompa, markery

Do analizy TLC: komora chromatograficzna, minutnik, lampy UV, suszarka, płytka chromatograficzna pokryta żelem krzemionkowym ze znacznikiem fluorescencyjnym (Merck 60 F₂₅₄), pipety kapilarne do nanoszenia próbek na płytki chromatograficzne, linijki, ołówki

Wykonanie doświadczenia

1. Przygotowanie ekstraktów

Ekstrakcja kwasu askorbinowego z badanych prób 3% roztworem kwasu szczawiowego (lub 2–5% kwasem metafosforowym lub 1% HCl) ma na celu stabilizację AA i przeciwdziałanie jego utlenianiu i dalszej degradacji.

a) Odważyć 5 g materiału roślinnego.

b) Tkanki rozdrobnić i dokładnie zhomogenizować w moździerzu porcelanowym z dodatkiem 25 cm^3 3% kwasu szczawiowego. Kwas szczawiowy dodawać porcjami po około 5 cm^3 . Roztarty materiał przenieść ilościowo do cylindra miarowego o objętości 50 cm^3 i uzupełnić kwasem szczawiowym do 50 cm^3 . Delikatnie i dokładnie wymieszać bagietką, pozostawić na 5 minut.

c) Homogenat przesączyć przez sącze z bibuły przy użyciu lejka Büchnera podłączonego do pompy (lejek Büchnera wsunąć w szyjkę kolby ssawkowej, dokładnie docisnąć gumową uszczelkę, zapewniając szczelne połączenie, kolbę ssawkową podłączyć do pompy, na lejku Büchnera umieścić zwilżony wodą destylowaną krążek bibuły filtracyjnej, włączyć pompę, upewnić

się, że filtr całkowicie zakrywa wszystkie otwory lejka, przesączyć ekstrakty), przelać do opisanych zlewek na 100 cm³.

2. Analiza TLC

UWAGA: Wszystkie czynności wykonać pod pracującym dygestorium.

Przygotowanie chromatogramu i nanoszenie substancji jak w rozdziale VI (pkt I.B):

- a) Na płytce chromatograficznej zaznaczyć odpowiednio dwa punkty startowe dla wzorców AA i DHA, pozostałe dla badanych ekstraktów.
- b) Wybrać pary ekstraktów badanych materiałów roślinnych w taki sposób, aby w każdej parze jeden ekstrakt pochodził z materiału surowego, a drugi – z odpowiadającego mu materiału przetworzonego.
- c) Na punkty startowe kolejno nakropić pipetą kapilarną porcjami łącznie po 0,05 cm³ ekstraktów oraz po 0,025 cm³ roztworów wzorcowych AA i DHA.
- d) Płytkę umieścić w komorze chromatograficznej wysyczonej fazą ruchomą o składzie butanol–pirydyna–woda (4:6:3; v/v/v), chromatogram rozwijać około 60 minut.
- e) Po wyjęciu chromatogramu z komory natychmiast zaznaczyć ołówkiem czoło rozpuszczalnika, płytkę wysuszyć.

Opracowanie wyników

1. Oglądać chromatogram w świetle UV, przy długości fali 254 nm, na ścieżkach wzorców i ekstraktów obrysować ołówkiem plamy odpowiadające AA i DHA.
2. Obliczyć współczynnik przesunięcia (R_f) dla obu związków, dzieląc odległość środka plamy od linii startu [cm] przez odległość czoła fazy ruchomej od linii startu [cm].
3. Zidentyfikować AA i DHA w ekstraktach badanych materiałów w oparciu o porównanie współczynników R_f plam prób badanych i wzorców.

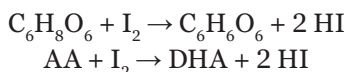
4. Wykonać rysunek chromatogramu, uwzględniając wielkość plam (por. rozdział XXI, rysunek 21.1).
5. W oparciu o uzyskane wyniki ocenić wpływ procedur przetwarzania żywności na zawartość kwasu askorbinowego i dehydroaskorbinowego.

Doświadczenie II

Jodometryczne oznaczenie zawartości kwasu askorbinowego

Zasada metody

Przygotowane ekstrakty miareczkowane są roztworem I w KI w obecności roztworu skrobi. Obecny w próbach AA ulega utlenieniu do DHA, po zakończeniu reakcji nadmiar jodu wybarwia skrobię na niebiesko:



Odczynniki

1% kleik skrobiowy, 0,001 M roztwór I w KI, roztwór wzorcowy AA o stężeniu 0,05 mg cm⁻³

Sprzęt laboratoryjny

zlewki (25–50 cm³), pipeta 5 cm³, biureta, lejek z cienką nóżką

Wykonanie doświadczenia

1. Miareczkowanie roztworu wzorcowego: do 3 zlewek (25–50 cm³) wlać po 5 cm³ wzorcowego roztworu AA, dodać 3–4 krople 1% kleiku skrobiowego. Biuretę napełnić 0,001 M roztworem I w KI. Roztwory wzorcowe AA miareczkować roztworem I w KI do momentu pojawienia się trwałego niebieskiego zabarwienia. Zapisać, jaką objętość I w KI zużyto do zmiareczkowania wzorca, uzyskane wyniki uśrednić.
2. Miareczkowanie badanych ekstraktów (por. Doświadczenie I): do 3 zlewek (25 cm³) wlać po 5 cm³ ekstraktu badanego materiału, dodać 3–4 krople 1% kleiku skrobiowego. Dalej postępować tak jak przy miareczkowaniu wzorca.

UWAGA: Jeżeli pierwsze miareczkowanie wykaże, że badany materiał ma niską zawartość AA, do ponownego miareczkowania należy wziąć 10 cm³ ekstraktu.

Opracowanie wyników

1. Obliczyć zawartości AA w miligramach w przeliczeniu na 100 g ś. m. materiału roślinnego [mg 100 g⁻¹ ś. m.], korzystając z przykładu obliczenia podanego w załączniku 4. Wyniki przedstawić w tabeli 18.1.

Tabela 18.1. Zawartość kwasu askorbinowego (AA) w badanych owocach i warzywach

Badany materiał	Objętość [cm ³] I w KI zużytego na zmiareczkowanie 5 cm ³ ekstraktu	Zawartość AA [mg 100 g ⁻¹ ś. m.]

2. W oparciu o uzyskane wyniki ocenić różnice w zawartości AA w badanych materiałach oraz wpływ procedur przetwarzania żywności na jego utlenianie i degradację. Porównać z danymi w załączniku 4.

Literatura

- Bartosz G., *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2013.
- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Lewak S., Kopcewicz J., Jaworski K., *Fizjologia roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Moszczyński P., Pyć R., *Biochemia witamin, cz. 2: Witaminy lipofilne i kwas askorbinowy*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.
- Sikorski Z. E. (red.), *Chemia żywności, t. 3: Odżywcze i zdrowotne właściwości składników żywności*, Wydawnictwo WNT, Warszawa 2007.

ROZDZIAŁ XIX. **INDUKCJA TKANKI KALUSOWEJ
I PĘDÓW PRZYBYSZOWYCH
W KULTURZE *IN VITRO* FIOŁKA
AFRYKAŃSKIEGO**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Roślinne kultury *in vitro* oznaczają hodowle protoplastów, komórek, tkanek, organów i ich części wyizolowanych z roślin macierzystych prowadzone *in vitro* (z łac. „w szkłe”), na sztucznych podłożach, w sterylnych, ściśle określonych pod względem fizycznym i chemicznym warunkach. Podstawy rozwoju roślinnych kultur *in vitro* stworzyła ogłoszona przez Gottlieba Haberlanda w 1902 r. **teoria totipotencji komórek roślinnych**, zgodnie z którą każda żywa komórka somatyczna (lub protoplast) w odpowiednich warunkach jest zdolna do odtworzenia (regeneracji) całej rośliny.

Kultury muszą być inicjowane i prowadzone w warunkach sterylnych. Pożywki stosowane w hodowlach *in vitro* zawierają źródło węgla i energii (sacharydy), makro- i mikroelementy, witaminy, regulatory wzrostu i rozwoju, dodatkowe składniki organiczne. Pożywki mogą być płynne (składniki rozpuszczone w wodzie) lub stałe (roztwór wodny zestalony agarą), powinny mieć odpowiednie pH i ciśnienie osmotyczne. W roślinnych kulturach *in vitro* najczęściej stosowane są pożywki: MS (Murashige i Skoog), SH (Schenk i Hildebrandt), B5 (Gamborg), NN (Nitsch i Nitsch).

W celu zainicjowania kultury komórek lub tkanek wyizolowany z rośliny fragment (**eksplantat**) poddaje się procedurze odkażania, a następnie umieszcza się go na odpowiedniej pożywce agarowej. W ciągu 2–3 tygodni na eksplantacie wytwarzana jest słabo zróżnicowana **tkanka kalusowa**. Po uformowaniu na eksplantacie kalus odcina się i przenosi na nowe podłoże (**passuje się**) celem dalszego namnożenia komórek.

Kultury zawieszinowe (komórkowe) inicjuje się przez przeniesienie kalusa na pożywkę płynną. Hodowle prowadzi się w odpowiednich naczyniach (np. kolbach stożkowych) umieszczonych na wytrząsarkach. Zawieszina komórkowa składa się

z agregatów i pojedynczych komórek. Pasażowanie polega na rozcieńczeniu zawiesiny świeżym podłożem.

Kultury komórek i tkanek roślinnych mogą być wykorzystywane jako źródło wartościowych produktów roślinnych (np. metabolitów wtórnych), które są stosowane jako leki, naturalne barwniki, środki zapachowe w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i kosmetycznym.

Eksplantaty, kalus lub komórki z hodowli zawiesinowej mogą w odpowiednich warunkach wykazywać zdolność do **somatycznej embriogenezy** i tworzenia **zarodków somatycznych** lub **organogenezy** (powstawanie organów przybyszowych: pąków, pędów, korzeni). Różnicowanie organów zależy od odpowiedniej proporcji auksyn do cytokinin w podłożu.

Mikrorozmnażanie (rozmnażanie klonalne) polega na wykorzystaniu techniki kultur *in vitro* do regeneracji z eksplantatu dużej liczby roślin genetycznie identycznych z tą, z której pochodzi eksplantat. Metoda ta jest powszechnie stosowana do produkcji roślin, które trudno rozmnażają się wegetatywnie metodami tradycyjnymi i roślin „elitarnych” o dużej wartości jednostkowej. Pozwala także na produkcję roślin wolnych od chorób (np. wirusowych) oraz stanowi etap eksperymentów prowadzących do otrzymania **roślin modyfikowanych genetycznie**. Zarodki somatyczne kapsułkowane w odpowiednich otoczkach (np. alginianu sodu) służą do produkcji tzw. **sztucznych nasion**.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

1. Zapoznanie z podstawami teoretycznymi i zasadami pracy obowiązującymi przy inicjowaniu i prowadzeniu roślinnych kultur *in vitro*.
 2. Zbadanie wpływu regulatorów wzrostu na indukcję tkanki kalusowej i mikrorozmnażanie fiołka afrykańskiego.
-

Materiał

rośliny fiołka afrykańskiego hodowane *in vivo* lub *in vitro*

Odczynniki

70% C_2H_5OH , 50% (v/v) wodny roztwór preparatu handlowego zawierającego podchloryn sodu (np. Ace, Domestos) z kilkoma kroplami detergentu, agarowa pożywka MS (por. załącznik 5, tabela 1) w następujących wariantach różniących się stężeniem [$mg\ dm^{-3}$] regulatorów wzrostu: kwasu α -naftalenooctowego (NAA) i kinetyny (KIN) (por. załącznik 5, tabela 2):

- a) wariant I – $MS_{1,0\ NAA + 0,2\ KIN}$
- b) wariant II – $MS_{2,0\ NAA + 0,2\ KIN}$
- c) wariant III – $MS_{0,4\ NAA + 0,8\ KIN}$
- d) wariant IV – $MS_{0,2\ NAA + 0,5\ KIN}$

Sprzęt laboratoryjny

komora z laminarnym przepływem powietrza

Sterylny sprzęt laboratoryjny

szerokoszyjna kolba Erlenmeyera (200–300 cm^3), kolby ze sterylną wodą, pęsety, skalpele, szalki Petriego z bibułą, szalki Petriego (puste)

Wykonanie doświadczenia

1. Sterylizacja materiału roślinnego

Zdrowe, w pełni rozwinięte liście odciąć od roślin hodowanych *in vivo* i przemyć pod bieżącą wodą. Ogonki liściowe z fragmentem blaszki liściowej umieścić w sterylnej kolbie, zalać 70% C_2H_5OH na 1 minutę. Po usunięciu etanolu ogonki liściowe zalać roztworem podchlorynu sodu z detergentem, sterylizować 10 minut. Po zlaniu podchlorynu sodu materiał płukać pięciokrotnie sterylną wodą.

2. Założenie kultury *in vitro*

Wysterylizowane ogonki liściowe z fragmentem blaszki liściowej lub liście odcięte z roślin hodowanych *in vitro* przenieść na sterylną szalkę z bibułą, osuszyć, odciąć brzeżne końce, przenosić pojedynczo do kolejnych szalek, ciąć na odcinki (eksplantaty) długości około 3 mm. Eksplantaty umieszczać na przygotowanej pożywce w kolbach Erlenmeyera zgodnie z kierunkiem wzrostu (po 3 eksplantaty w kolbie). Hodowle umieścić w pokoju hodowlanym w temperaturze 23–25°C, w stałym oświetleniu około 130 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$.

Opracowanie wyników

Prowadzić obserwacje hodowli w odstępach dwutygodniowych. Po około 60 dniach od założenia kultury określić świeżą masę tkanek kalusowych i liczbę pędów powstałych na eksplantatach w zależności od zawartości auksyny (NAA) i cytokininy (KIN) w pożywce.

Literatura

Malepszy S. (red.), *Biotechnologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009.

Woźny A., Przybył K. (red.), *Komórki roślinne w warunkach stresu*, t. 2: *Komórki in vitro*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2004.

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.20>

ROZDZIAŁ XX. **METABOLITY WTÓRNE**
O ZNACZENIU PROZDROWOTNYM
ANTRAZWIĄZKI LIŚCI
I KULTUR *IN VITRO* ALOESU

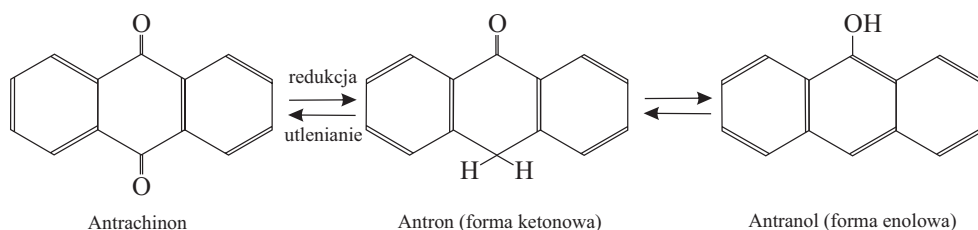
CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Roślinne metabolity wtórne stanowią bardzo zróżnicowaną grupę związków chemicznych o aktywności biologicznej. Obecnie ponad 25% wszystkich środków leczniczych to związki pochodzące z roślin, w tym trudno rozmnażających się, rzadko występujących lub zagrożonych wyginięciem. Do pozyskiwania terapeutycznie ważnych związków wykorzystuje się roślinne kultury *in vitro* (por. rozdział XIX), techniki inżynierii genetycznej i transformacji roślin oraz procesy biotransformacji związków chemicznych pochodzenia egzogenne-go. Podstawą hodowli *in vitro* jest morfologiczna i chemiczna totipotencja komórek roślinnych. **Totipotencja chemiczna** oznacza zdolność komórek odizolowanych od organizmu macierzystego do wytwarzania i/lub akumulacji metabolitów wtórnych. Roślinne kultury *in vitro* umożliwiają pozyskiwanie biologicznie aktywnych związków na dużą skalę, w ściśle kontrolowanych warunkach, uniezależnionych od czynników środowiskowych i klimatycznych. W kulturach *in vitro* mogą również powstawać nowe związki, których nie zidentyfikowano w roślinach *in vivo*.

Antrazwiązki są pochodnymi antracenu. W zależności od stopnia utlenienia podstawowego układu dzielą się na antrachinony, antrony oraz izomeryczne z nimi antranole (por. rysunek 20.1). W tkankach roślin antrazwiązki występują przeważnie w postaci glikozydów, najczęściej są to *o*-glikozydy oraz *c*-glikozydy, np. **aloina** (10-glukozyloaloeemodynoantron) (por. rysunek 20.2). Składnikami cukrowymi tych glikozydów (zwykle 1–3 cząsteczki cukru) są zazwyczaj *D*-glukoza, *L*-ramnoza i *L*-apioza. Część aglikonowa (emodyny) to hydroksylowe, metylowe lub karboksylowe pochodne 1,8-dihydroksyantrachinonu lub jego zredukowanej formy. Antrazwiązki mogą występować w postaci monomerów oraz dimerów jako izoantrony

(2 cząsteczki jednakowych antronów) lub heterodimery. Przykładem antrazwiązków monomerycznych są obecne w liściach aloesu: aloina, aloemodyna, aloinozydy A i B, glikozydy franguloemodyny w korze kruszyny oraz chryzofanolu i reiny w kłączu i korzeniu rzewienia. Diantrony występują np. w liściach senesu (sennozydy A, B, C, D) i kwiatach dziurawca (hiperycy-na) (por. rysunek 20.2).

Rysunek 20.1.
Stopnie utlenienia podstawowego układu antrazwiązków

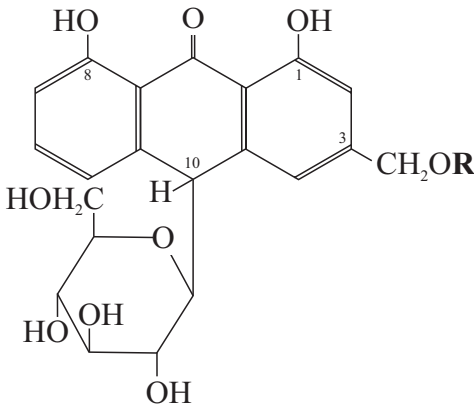


Antraglikozydy są krystalicznymi substancjami rozpuszczalnymi w wodzie i polarnych rozpuszczalnikach organicznych. Pod wpływem kwasów oraz obecnych w tkankach enzymów ulegają utlenieniu i hydrolizie. Aglikony tych antraglikozydów nie rozpuszczają się w wodzie. Antrachinony mają żółte, pomarańczowe lub czerwone zabarwienie, łatwo rozpuszczają się w roztworach zasad, dając czerwono zabarwione sole (**reakcja Bornträgera**). Bezbarwne antrony i antranole nie dają barwnej reakcji, ale w środowisku alkalicznym pod wpływem powietrza ulegają utlenieniu do antrachinonów i wówczas pojawia się czerwona barwa. Szczególnie bogate w antrazwiązki są rośliny z rodzin: rdestowatych, szakłakowatych, bobowatych, marzanowatych, złotogłowowatych.

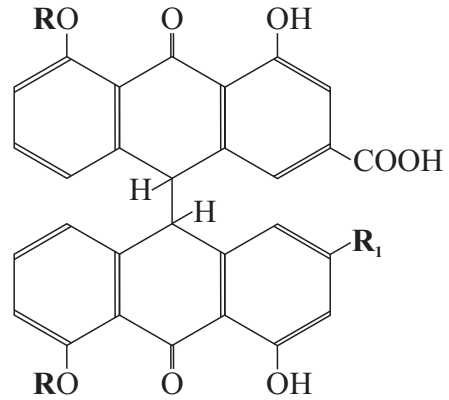
W lecznictwie antrazwiązki zawierające grupy hydroksylowe w pozycji 1 i 8 stosowane są przede wszystkim jako środki regulujące pracę przewodu pokarmowego. Najwyższą aktywność wykazują glikozydy antronów, diantronów i antranoli. Glikozydy w stanie niezmienionym przechodzą do jelita grubego, gdzie pod wpływem flory bakteryjnej ulegają hydrolizie i redukcji do antronów i diantronów, podrażniających śluzówkę jelita grubego, wzmagających jego perystaltykę i sekrecję oraz zmniejszających resorpcję wody. Część antrazwiązków wchłoniętych w jelicie cienkim dociera z krwioobiegiem do wątroby

i wzмага wydzielanie żółci (działanie żółciopędne i żółciotwórcze). Antrazwiązki wykazują także aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą. Niektóre, np. aloina, hiperycyna, wykazują działanie przeciwzapalne, przyspieszają gojenie się ran. Hiperycyna (por. rysunek 20.2), występująca w zbiornikach hiperycynowych dziurawca zwyczajnego, jest inhibitorem monoaminooksydaz (MAO) i wykazuje działanie przeciwdepresyjne oraz przeciwlękowe.

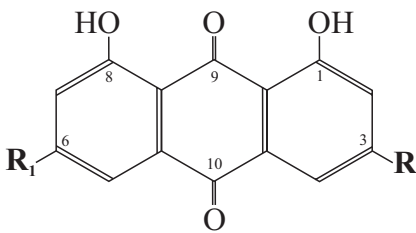
Rysunek 20.2.
Wzory strukturalne przykładowych antrazwiązków



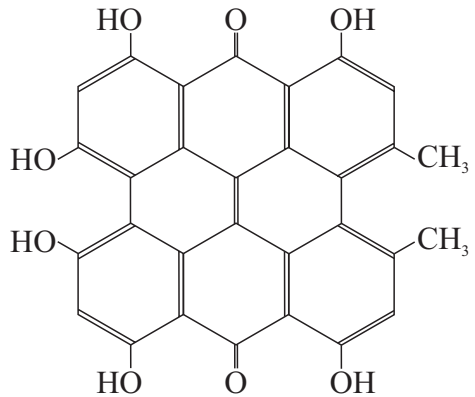
	R
Aloina A i B (stereoizomery)	H
Aloinozyd A i B (stereoizomery)	ramnoza



	R	R ₁
Sennozyd A i B (stereoizomery)	glukoza	COOH
Sennozyd C i D (stereoizomery)	glukoza	CH ₂ OH



	R	R ₁
Aloemodyna	CH ₂ OH	H
Chryzofanol	CH ₃	H
Franguloemodyna	CH ₃	OH
Reina	COOH	H



Hiperycyna

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

1. Analiza jakościowa za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) antrazwiązków występujących w liściach roślin oraz kulturach kalusowych i/lub zawiesinowych aloesu.
 2. Porównanie całkowitej zawartości antrazwiązków w liściach oraz kulturach kalusowych i/lub zawiesinowych aloesu.
-

Doświadczenie I

Analiza jakościowa antrazwiązków metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Zasada metody

Analiza jakościowa antrazwiązków za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC): identyfikacja antrazwiązków obecnych w badanych ekstraktach na podstawie porównania zabarwienia w świetle UV (365 nm) i współczynników przesunięcia (R_f) ich plam na chromatogramie względem wzorców oraz charakterystycznej dla nich reakcji Bornträgera w obecności KOH.

Materiał

liście kilkuletniej rośliny aloesu zwyczajnego hodowanego w ziemi ogrodniczej, czterotygodniowe kultury kalusowe i/lub dwutygodniowe kultury zawiesinowe aloesu hodowane na podłożu MS (por. załącznik 6), w ciemności i na świetle, w temperaturze 24°C

Odczynniki

70% CH_3OH , mieszanina octan etylu–99,9% metanol–woda (100:13,5:10; v/v/v), roztwory wzorcowe antrazwiązków: aloiny, aloemodyny, emodyny, aloinozydów A i B (stereoizomery) w proporcji 1 mg w 5 cm^3 70% CH_3OH , 10% KOH w $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

Sprzęt laboratoryjny

skalpele, pęsety, bagietki, lejek Büchnera + kolba ssawkowa, sączki z bibuły filtracyjnej, bibuła, 5 moździerzy porcelanowych, pipety (1–10 cm^3), 5 plastikowych próbek typu Falcon 50 cm^3 ,

6 probówek wirowniczych (20–30 cm³), 5 lejków z cienką nóżką, 5 kolb miarowych 25 cm³, 5 zlewek 50 cm³, waga laboratoryjna, pompa, łaźnia wodna, wirówka, plastikowe pipety pasteurowskie, markery

Do analizy TLC: komora chromatograficzna, spryskiwacz, minutnik, lampa UV, suszarka, płytka chromatograficzna pokryta żelem krzemionkowym ze znacznikiem fluorescencyjnym (Merck 60 F₂₅₄), pipety kapilarne do nanoszenia próbek na płytki chromatograficzne, linijki, ołówki

I.A. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTÓW

1. Liście aloesu naciąć podłużnie skalpelem, wydobyć miąższ. Kalus z kultur hodowanych na świetle i w ciemności oczyścić z agarowego podłoża, osuszyć na bibule. Zawiesiny komórkowe z kultur hodowanych na świetle i w ciemności odsączyć na lejku Büchnera (lejek Büchnera wsunąć w szyjkę kolby ssawkowej, dokładnie docisnąć gumową uszczelkę, zapewniając szczelne połączenie, kolbę ssawkową podłączyć do pompy, na lejku Büchnera umieścić zwilżony wodą destylowaną sączek z bibuły filtracyjnej, włączyć pompę, upewnić się, że filtr całkowicie zakrywa wszystkie otwory lejka, odsączyć komórki od pożywki).
2. Odważyć po 2,5 g każdego z badanych materiałów.
3. Porcje badanych materiałów homogenizować w moździerzu z dodatkiem 10 cm³ 70% CH₃OH. Dokładnie zhomogenizowany materiał przenieść ilościowo do opisanych plastikowych probówek typu Falcon, moździerz dodatkowo przepłukać 5 cm³ 70% CH₃OH i dołączyć do głównej puli homogenatu.
4. Probówki zakryć korkiem (nie dokręcając dokładnie!) i umieścić na 10 minut w łaźni wodnej o temperaturze 80°C.
5. Probówki ostudzić w strumieniu bieżącej wody, zawartość przelać do probówek wirowniczych i następnie odwirować (20 000 × g, 15 min).
6. Supernatanty zlać do kolb miarowych o objętości 25 cm³, uzupełnić 70% CH₃OH do 25 cm³, a następnie przelać do opisanych zlewek o objętości 50 cm³.

I.B. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA

Wykonanie doświadczenia

UWAGA: Wszystkie czynności wykonać pod pracującym dygestorium.

Przygotowanie chromatogramu i nanoszenie substancji jak w rozdziale VI (pkt I.B):

1. Na płytce chromatograficznej pokrytej żelem krzemionkowym ze znacznikiem fluorescencyjnym przygotować i zaznaczyć sześć punktów startowych.
2. Na punkty startowe kolejno nakropić pipetą kapilarną porcjami łącznie po 0,05 cm³ ekstraktów oraz po 0,025 cm³ mieszaniny roztworów wzorcowych antrazwiązków.
3. Płytkę umieścić w komorze chromatograficznej wysyczonej fazą ruchomą o składzie: octan etylu–99,9% metanol–woda (100:13,5:10; v/v/v) i rozwijać chromatogram około 60 minut.
4. Po wyjęciu chromatogramu z komory natychmiast zaznaczyć ołówkiem czoło rozpuszczalnika, płytkę wysuszyć.

Opracowanie wyników

1. Oglądać chromatogram w świetle UV, przy długości fali 365 nm. Na ścieżkach mieszaniny wzorców oraz ekstraktów obrysować ołówkiem plamy odpowiadające antrazwiązkom.
2. Obliczyć współczynnik przesunięcia (R_f) dla antrazwiązków, dzieląc odległość środka plamy od linii startu [cm] przez odległość czoła fazy ruchomej od linii startu [cm].
3. Zidentyfikować antrazwiązki w ekstraktach badanych materiałów w oparciu o porównanie współczynników R_f oraz charakterystyczne zabarwienie plam w świetle UV-365 nm:
 - a) aloina oraz aloinozydy A i B – typowa żółto-pomarańczowa fluorescencja antronów,
 - b) aloemodyna i emodyna – czerwona fluorescencja,
 - c) aloezyny A i B – pochodne chromonu wykazujące silną jasnoniebieską fluorescencję.

4. Płytkę spryskać 10% etanolem, a następnie rozpuścić w roztworze KOH, zaobserwować zmiany kolorów niektórych plam w wyniku reakcji Bornträgera:
- a) antrachinony – czerwona barwa w świetle widzialnym i czerwona fluorescencja w świetle UV,
 - b) antrony i antranole – żółta barwa w świetle widzialnym i żółta fluorescencja w świetle UV.

Wykonać rysunek chromatogramu, uwzględniając wielkość i zabarwienie plam (por. rozdział XXI, rysunek 21.1) W oparciu o uzyskane wyniki analizy jakościowej ocenić różnice między antrazwiązkami występującymi w tkankach liści roślin a kulturami *in vitro* aloesu.

Doświadczenie II

Oznaczenie całkowitej zawartości antrachinonów metodą kolorymetryczną

Zasada metody

Badane ekstrakty zawierają antrazwiązki w postaci mieszaniny antrachinonów, antranoli i antronów oraz ich glikozydów. W celu oznaczenia całkowitej zawartości antrazwiązków przeprowadza się w temperaturze pokojowej za pomocą nadjodanu sodu „hydrolizę utleniającą” antrony i antranole do postaci 1,8-dihydroksyantrachinonów. W środowisku alkalicznym antrachinony ulegają reakcji Bornträgera, tworząc czerwono zabarwione fenolany. Pomiar absorbancji fenolanów wykonuje się przy długości fali światła 510 nm.

Odczynniki

70% CH₃OH, 25% NH₃, 5% nadjodan sodu, roztwór wzorcowy aloiny w 70% CH₃OH o stężeniu 0,6 mg cm⁻³

Sprzęt laboratoryjny

pipety (0,1–10 cm³ i 25 cm³), 14 probówek szklanych, kuwety do spektrofotometru, spektrofotometr, minutnik, markery

Wykonanie doświadczenia

W statywie przygotować 14 odpowiednio opisanych probówek: 2 dla próby odnośnikowej, 2 dla wzorca aloiny i 10 dla badanych ekstraktów (por. Doświadczenie I). Oznaczyć całkowitą zawartość antrachinonów według opisu w tabeli 20.1, zachowując kolejność dodawania odczynników.

Tabela 20.1. Oznaczanie całkowitej zawartości antrachinonów

Odczynnik	Dodawane objętości [cm ³]		
	Próba odnośnikowa	Próba wzorcowa	Próba badana
Ekstrakt	–	–	1,0
Wzorzec aloiny	–	1,0	–
70% CH ₃ OH	1,0	–	–
5% nadjodan sodu	0,1	0,1	0,1
25% NH ₃	0,5	0,5	0,5

1. Zawartość probówek wytrząsnąć, odstawić na 60 minut w ciemne miejsce.
 2. Dodać 5 cm³ wody destylowanej, zamieszać, odstawić w ciemne miejsce na 15 minut.
 3. Zmierzyć absorbancję wszystkich prób w kuwecie spektrofotometrycznej przy długości fali 510 nm względem próby odnośnikowej.

Opracowanie wyników

Obliczyć zawartość antrachinonów [mg] w badanych ekstraktach w przeliczeniu na 1 g ś. m. materiału:

$$C_x = \frac{A_b}{A_w} \times C_w \times 25 \div 2,5$$

gdzie:

C_x – zawartość antrazwiązków [mg] w 1 g ś. m. materiału badanego [mg g⁻¹ ś. m.],

A_b – absorbancja roztworu badanego,

A_w – absorbancja wzorca,

C_w – stężenie wzorca (0,6 mg cm⁻³),

25 – ostateczna objętość ekstraktów [cm³],

2,5 – masa tkanek poddanych ekstrakcji [g].

Wyniki dotyczące zawartości antrachinonów w badanych próbach zebrać w tabeli 20.2.

Materiał	A ₅₁₀	Zawartość antrazwiązków [mg g ⁻¹ ś. m.]
Liście		
Kalus		
Zawiesina komórkowa		

W oparciu o uzyskane wyniki analizy ilościowej ocenić różnice między zawartością antrazwiązków w tkankach liści roślin a kulturami *in vitro* aloesu.

Tabela 20.2.
Całkowita zawartość antrazwiązków w liściach i kulturach *in vitro* aloesu

Literatura

Kączkowski J., *Podstawy biochemii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.

Kohlmünzer S., *Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji*, PZWL, Warszawa 2003.

Małepszy S. (red.), *Biotechnologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009.

Strzelecka H., Kamińska J., Kowalski J., Walewska E., *Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych*, PZWL, Warszawa 1982.

Wagner H., Blatt S., *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag, Berlin 1996.

ROZDZIAŁ XXI. **ANALIZA JAKOŚCIOWA
I ILOŚCIOWA WYBRANYCH
METABOLITÓW WTÓRNYCH
W ROŚLINNYCH SUROWCACH
LECZNICZYCH**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Rośliny wytwarzają szeroką i różnorodną grupę związków organicznych określanych jako **metabolity wtórne (substancje swoiste)**, z których większość nie bierze bezpośredniego udziału we wzroście i rozwoju. Do najlepiej poznanych grup metabolitów wtórnych należą **alkaloidy, związki fenolowe i terpenoidy**. Synteza i gromadzenie metabolitów wtórnych są często ograniczone do wybranych komórek lub organów – procesy te następują w określonej fazie cyklu życiowego roślin. Wiele z tych związków ma znaczenie adaptacyjne w ochronie roślin przed patogenami, pełni funkcję atraktantów dla zapylaczy i zwierząt rozsiewających nasiona, a także czynników allelopatycznych, które wpływają na konkurencję między gatunkami roślin. Zainteresowanie metabolitami wtórnymi podyktowane jest głównie ich szerokim wykorzystaniem praktycznym. Związki te są stosowane jako barwniki, oleje, woski, środki aromatyzujące, perfumy i narkotyki. Intensywne badania metabolitów wtórnych wytwarzanych przez rośliny związane są z poszukiwaniem w tej grupie związków nowych leków roślinnych, antybiotyków, insektycydów i herbicydów. Często wykorzystuje się do tego celu metody biotechnologiczne i roślinne kultury *in vitro*.

Leki roślinne definiuje się jako użyteczne w medycynie wyroby, które zawierają jako składniki czynne wyłącznie rośliny, części roślin, substancje roślinne lub ich kombinacje w postaci przerobionej lub nieprzerobionej. Do produkcji leków roślinnych wykorzystuje się **roślinne surowce farmaceutyczne**, czyli substancje lub mieszaniny substancji pochodzenia roślinnego. Roślinne surowce lecznicze charakteryzują się złożonym składem chemicznym i tylko niektóre związki (substancje czynne surowca) wykazują wyraźne działanie biologiczne. Substancje te mogą mieć różną naturę chemiczną i aktywność biologiczną oraz wykazywać względem siebie działanie synergistyczne

(np. alkaloidy z liści pokrzyki wilcza jagoda, korzeni rauwolfii żmijowej) lub antagonistyczne. Otrzymywanie czystych i jednorodnych chemicznie substancji biologicznie czynnych z surowców roślinnych możliwe jest dzięki zastosowaniu złożonych procesów technologicznych i biotechnologicznych.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Doświadczenie I

Wykrywanie garbników w wybranych surowcach roślinnych według Farmakopei polskiej VI

Garbniki roślinne to związki polifenolowe o masie cząsteczkowej 500–3000, mające zdolność tworzenia trwałych połączeń z białkami i innymi makrocząsteczkami. Garbniki w kontakcie z białkami koagulują je, stąd wynikają ich właściwości przeciwzapalne oraz zastosowanie zewnętrzne w stanach zapalnych błon śluzowych skóry, obrzmieniach i drobnych krwawieniach, a także wykorzystanie w procesie garbowania skór. Z uwagi na zdolność tworzenia połączenia kompleksowego z alkaloidami stanowią odtrutkę przy zatruciach tymi związkami.

Garbniki można podzielić na 2 grupy:

- 1) garbniki ulegające hydrolizie – tanoidy (**garbniki pirogalolowe**). Podczas hydrolizy następuje uwolnienie cukrów prostych i wielowodorotlenowych fenolokwasów. Do tej grupy garbników zaliczamy estry lub glikozydy kwasu galusowego i jego pochodne (galotaniny) oraz kwasu elagowego (elagotaniny).
- 2) garbniki nie ulegające hydrolizie (**garbniki pirokatechinowe**, skondensowane, katechinowe). Czynniki hydrolizujące przekształcają je w nierozpuszczalne w wodzie flobafeny (czerwienie garbnikowe). W ich cząsteczce występuje układ katechiny lub ketonu aromatycznego, a podczas suchej destylacji dają pirokatechinę.

Cel ćwiczenia

Wykrywanie garbników w korze roślin.

Zasada metody

Garbniki w alkoholowych lub wodnych wyciągach roślinnych można odróżnić na podstawie poniższych reakcji:

- 1) reakcja z solami żelazowymi – garbniki pirogalolowe dają zabarwienie niebieskie, zaś garbniki pirokatechinowe – zielone. Obecność obu typów garbników w tej reakcji daje zabarwienie granatowe, niewielka ilość garbników pirogalolowych maskuje zieloną barwę barwników pirokatechinowych.
- 2) reakcja z waniliną w kwasie siarkowym – garbniki pirokatechinowe dają zabarwienie czerwone. Obecność tylko garbników pirogalolowych nie daje zabarwienia.
- 3) reakcja z formaldehydem i kwasem solnym – podczas gotowania powstaje osad garbników pirokatechinowych.

Materiał

kora dębu, kasztanowca, brzozy, wierzby, kruszyny. Surowce powinny odpowiadać wymaganiom monografii farmakopealnej (np. kora młodych pni i gałęzi dębu szypułkowego lub dębu bezszypułkowego zebrana na wiosnę przed rozwojem liści i wysuszana w cieniu, w temperaturze nie wyższej niż 35°C; surowiec nie powinien zawierać mniej niż 4% garbników w przeliczeniu na pirogalol)

Odczynniki

50% wodny roztwór CH_3OH (do przygotowania wyciągu), mieszanina octan etylu–dichlorometan–99,9% CH_3OH –woda (60:40:17:5; v/v/v/v), 1% wodny roztwór FeCl_3 , metanolowy wzorcowy roztwór katechiny (1 mg cm^{-3}), wanilina w kwasie siarkowym (5,0 g waniliny rozpuścić w 100 cm^3 98% H_2SO_4)

Sprzęt laboratoryjny

płytki chromatograficzne pokryte żelazem krzemionkowym, lejek szklany, sączi z bibuły filtracyjnej, polipropylenowe probówki typu Falcon 50 cm^3 , probówki szklane, pipety (5 mm^3 –5 cm^3), komora chromatograficzna, waga laboratoryjna, łaźnia wodna, plastikowe pipety pasteurowskie, bibuła filtracyjna, rozpylacz, cylinder miarowy 50 cm^3 , suszarka

I.A. PRZYGOTOWANIE WYCIĄGU Z SUROWCÓW ZAWIERAJĄCYCH GARBNIKI

Surowiec (2 g) umieścić w probówkach typu Falcon i zalać (przy użyciu cylindra miarowego) 40 cm³ 50% CH₃OH, umieścić w łaźni wodnej i ogrzewać do wrzenia przez 2 minuty. Zawartość probówek ostudzić pod zimną bieżącą wodą, a następnie przesączyć do suchych probówek przy użyciu sączka z bibuły filtracyjnej.

I.B. WYKRYWANIE GARBNIKÓW

1. Wykrywanie garbników pirogalolowych

Do suchych szklanych probówek odmierzyć 2 cm³ każdego z wyciągów (por. pkt I.A), a następnie dodawać stopniowo przy użyciu plastikowej pipety pasteurowskiej 10 kropli 1% FeCl₃.

2. Wykrywanie garbników pirokatechinowych

UWAGA: *Reakcję wyrywania wykonać pod pracującym dygestorium.*

Do suchych szklanych probówek odmierzyć 2 cm³ każdego z wyciągów (por. pkt I.A), a następnie dodawać stopniowo 5 cm³ roztworu waniliny w kwasie siarkowym.

Opracowanie wyników

Zanotować wyniki reakcji wykrywania garbników dla poszczególnych surowców roślinnych. Porównać otrzymane wyniki.

I.C. BADANIE GARBNIKÓW METODĄ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ (TLC)

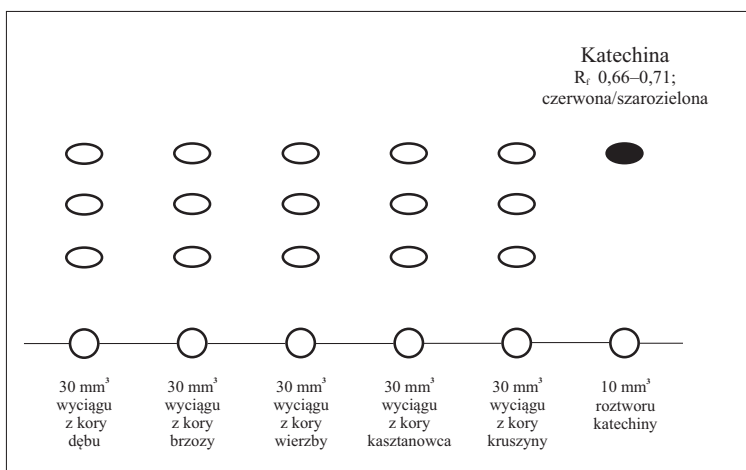
Wykonanie doświadczenia

UWAGA: *Wszystkie czynności wykonać pod pracującym dygestorium.*

Przygotowanie chromatogramu i nanoszenie substancji jak w rozdziale VI (pkt I.B).

1. Wykonać dwa identyczne chromatogramy (2 płytki), nanosząc na punkty startowe 30 μl wyciągu z odpowiedniego surowca (kroplami po 5 mm^3) oraz 10 mm^3 metanolowego roztworu porównawczego katechiny (por. rysunek 21.1).
2. Płytki umieścić w komorze chromatograficznej z fazą ruchomą o składzie: octan etylu–dichlorometan–99,9% CH_3OH –woda (60:40:17:5; v/v/v/v). Chromatogramy rozwijać przez 30 minut.
3. Po wyjęciu chromatogramów zaznaczyć czoło eluentu, a następnie wysuszyć w temperaturze pokojowej.
4. Jeden chromatogram spryskać 1% FeCl_3 , a drugi roztworem waniliny w kwasie siarkowym. Detekcję przeprowadzać poprzez ułożenie płytki na arkuszu bibuły filtracyjnej i spryskanie jej odpowiednim odczynnikiem do detekcji za pomocą rozpylacza, w odległości minimum 20–30 cm od płytki.

Przeprowadzenie detekcji z waniliną i FeCl_3 pozwala na identyfikację na chromatogramie odpowiednio garbników pirokatechinowych i garbników pirogalolowych (rysunek 21.1).



Rysunek 21.1.

Schematyczny chromatogram wyciągów z badanych surowców roślinnych. Na schemacie zaznaczono R_f dla substancji porównawczej – katechiny (kolor katechiny zależy od wywoływacza użytego do detekcji)

Opracowanie wyników

Wyznaczyć współczynnik przesunięcia (R_f) dla katechiny. Porównać otrzymane wyniki pod względem obecności garbników w poszczególnych surowcach roślinnych.

Doświadczenie II

Identyfikacja wybranych alkaloidów glistnika jaskółcze ziele

Alkaloidy to duża grupa (ok. 15 000) zasadowych związków organicznych zawierających atom(y) azotu, głównie w pierścieniu heterocyklicznym. Alkaloidy wykazują bardzo silne działanie fizjologiczne o dużym spektrum zastosowania, np. cucące – analeptyczne (kofeina), rozkurczające mięśnie gładkie (papaweryna, chelidonina), rozszerzające źrenicę (atropina), miejscowo znieczulające (kokaina), obniżające ciśnienie (rezerpina), moczopędne (teobromina), przeciwastmatyczne (teofilina), przeciwbólowe (morfina), przeciwkaszlowe (kodeina), przeciwnowotworowe (winblastyna, winkrystyna, taksol), przeciwreumatyczne (kapsaicyna), żółciopędne i żółciotwórcze (boldyna). Systematyka alkaloidów oparta jest na budowie szkieletu, w którym wyróżnić można określony układ heterocykliczny, np. pirol, imidazol, indol, (izo)chinolinę, pirydynę i purynę.

Glistnik jaskółcze ziele jest gatunkiem powszechnie występującym w Polsce oraz innych krajach strefy umiarkowanej, wytwarza **alkaloidy izochinolinowe**. Sok mleczny glistnika był wykorzystywany do niszczenia brodawek z uwagi na obecność chelidoniny, działającej antymitotycznie. Wyciągi z tego surowca pobudzają skurcze macicy, podnoszą ciśnienie krwi, rozszerzają naczynia wieńcowe oraz wchodzi w skład preparatów przeciwkaszlowych.

Głównymi alkaloidami glistnika jaskółcze ziele są:

- 1) berberyna – wykazuje działanie żółciopędne i przeciwbakteryjne, stosowana w lekach przeciwbiegunkowych (rozkurcza mięśnie gładkie jelit);
- 2) chelidonina – działa na ośrodkowy układ nerwowy, podobnie jak morfina, ale słabiej;
- 3) chelerytryna – działa drażniąco na skórę i błonę śluzową, miejscowo działa znieczulająco;
- 4) sangwinaryna – jest inhibitorem esterazy acetylocholinowej, wykazuje słabe działanie narkotyczne.

Cel ćwiczenia

Identyfikacja wybranych alkaloidów glistnika jaskółcze ziele w surowcu farmaceutycznym „Ziele glistnika” (*Chelidonii herba*) oraz w materiale świeżym.

Zasada metody

Identyfikacja alkaloidów izochinolinowych glistnika jaskółcze ziele za pomocą analizy TLC, na podstawie fluorescencji i współczynników R_f w odniesieniu do substancji porównawczych alkaloidów.

Materiał

korzeń, łodyga i liście glistnika jaskółcze ziele (materiał świeży) oraz surowiec farmaceutyczny „Ziele glistnika” (materiał suszony); surowiec farmaceutyczny powinien odpowiadać wymaganiom monografii farmakopealnej (np. ziele glistnika jaskółcze ziele zebrane w okresie kwitnienia i wysuszone; surowiec nie powinien zawierać mniej niż 0,4% alkaloidów w przeliczeniu na chelidoninę)

Odczynniki

substancje porównawcze: chelerytryna, berberyna, chelidoni-na, sangwinaryna (2 mg w 10 cm³ C₂H₅OH), mieszanina 1-propanol–98% HCOOH–woda (90:1:9; v/v/v), 96% C₂H₅OH

Sprzęt laboratoryjny

lejek szklany, sączki z bibuły, polipropylenowe probówki typu Falcon 15 cm³, pipety (5 mm³–5 cm³), komora chromatograficzna, waga laboratoryjna, łaźnia wodna, moździerz, płytki chromatograficzne pokryte żelazem krzemionkowym ze znacznikiem fluorescencyjnym (Merck 60 F₂₅₄), lampa UV

II.A. PRZYGOTOWANIE WYCIĄGU Z SUROWCÓW

Homogenizować 1 g świeżego (0,5 g suchego) surowca w 5 cm³ alkoholu etylowego. Zawartość moździerza przenieść do probówki typu Falcon i ogrzewać w łaźni wodnej w temperaturze 40°C przez 15 minut. Następnie zawartość przesączyć do suchych probówek.

II.B. BADANIE AKALOIDÓW METODĄ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

Wykonanie doświadczenia

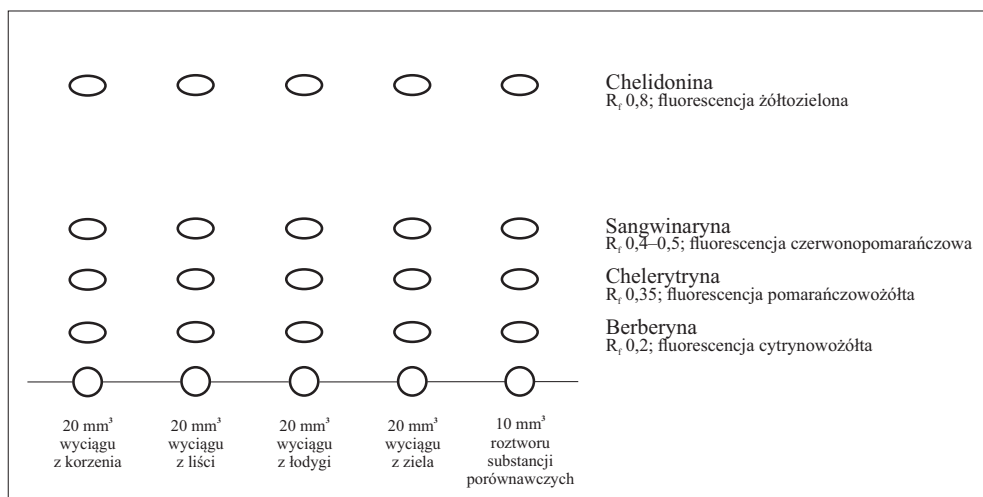
UWAGA: Wszystkie czynności wykonać pod pracującym dygestorium.

Przygotowanie chromatogramu i nanoszenie substancji jak w rozdziale VI (pkt I.B).

1. Na punkty startowe nanieść 20 mm³ wyciągu z surowców i 10 mm³ substancji porównawczych – etanolowe roztwory chelerytryny, berberyny, chelidoniny, sangwinaryny (por. rysunek 21.2).
2. Chromatogram rozwijać w fazie ruchomej o składzie: 1-propanol–98% HCOOH–woda (90:1:9; v/v/v) przez 30 minut.
3. Po wyjęciu chromatogramu zaznaczyć czoło eluentu, a następnie wysuszyć w temperaturze pokojowej.
4. Suchy chromatogram oglądać pod lampą UV w nadfiolecie (365 nm) – plamy alkaloidów wykazują żółtą, żółtozieloną, czerwonopomarańczową fluorescencję (por. rysunek 21.2).

Rysunek 21.2.

Schematyczny chromatogram wyciągów z glistnika jaskółcze ziele. Na schemacie zaznaczono R_f dla substancji porównawczych wraz z kolorem fluorescencji obserwowanym w nadfiolecie



Opracowanie wyników

Wyznaczyć współczynnik przesunięcia (R_f) dla chelidoniny, berberyny, sangwinaryny i chelerytryny. Porównać otrzymane wyniki pod względem obecności badanych alkaloidów w poszczególnych organach i ziele glistnika.

Literatura

- Kohlmunzer S., *Farmakognozja*, PZWL, Warszawa 2019.
- Kołodziejczyk A., *Naturalne związki organiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2020.
- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Lamer-Zarawska E., Kowalska-Gierczak B., Niedworok J., *Fitoterapia i leki roślinne*, PZWL, Warszawa 2019.
- Wagner H., Bladt S., *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag, Berlin 1996.

ZAŁĄCZNIKI DO ĆWICZEŃ

ZAŁĄCZNIK 1. MINERALNE ODŻYWIANIE ROŚLIN

Aby przeprowadzić doświadczenie, należy dysponować wystarczającą ilością roślin spirodeli wielokorzeniowej. W tym celu trzeba przygotować 2000 cm³ pożywki pełnej namnażającej, czyli zawierającej wszystkie wymagane do prawidłowego rozwoju rośliny pierwiastki (makro- i mikroelementy – por. tabele 1 i 2). Doprowadzić pH pożywki do wartości 6,4 i rozlać po 100 cm³ do kolb Erlenmeyera o pojemności 300 cm³. Następnie wysterylizować pożywkę w autoklawie. Po schłodzeniu, pracując w warunkach sterylnych (komora z laminarnym przepływem powietrza), wprowadzić za pomocą ezy 10–12 członów pędowych spirodeli wielokorzeniowej do każdej kolby z pożywką. Hodowle prowadzić w pokoju hodowlanym przez 1–2 tygodnie, w temperaturze 23°C ± 2°C, przy fotoperiodzie 16 godzin/8 godzin (światło/ciemność) i natężeniu światła 350 μmol m⁻² s⁻¹. Po uzyskaniu odpowiedniej ilości materiału roślinnego, czyli namnożeniu spirodeli wielokorzeniowej, przygotować pożywkę pełną oraz pożywki niezawierające jednego z pierwiastków, w tym azotu, fosforu, potasu, wapnia, magnezu i żelaza według tabeli 1 i 2. Do kolb Erlenmeyera o pojemności 100 cm³ wlać po 30 cm³ odpowiedniego rodzaju pożywki. Kolby zamknąć folią aluminiową i wysterylizować.

Tabela 1. Skład chemiczny pożywek do hodowli spirodeli wielokorzeniowej

SKŁADNIK [g dm ⁻³] lub [cm ³ dm ⁻³]	POŻYWKA						
	Pełna	– N	– P	– K	– Ca	– Mg	– Fe
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,264	–	0,264	0,264	0,264	0,264	0,264
K ₂ HPO ₄	0,174	0,174	–	–	0,174	0,174	0,174
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,492	0,492	0,492	0,492	0,492	–	0,492
CaSO ₄ × 2H ₂ O	0,273	0,273	0,273	0,273	–	0,273	0,273
FeNaEDTA	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	–
Mikroelementy*	1 cm ³						
Głukoza	10						
pH	6,4						
* Skład roztworu mikroelementów podano w tabeli 2.							

Składnik	Stężenie [mg dm^{-3}]
H_3BO_3	2,86
$\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	2,19
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2,2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,13
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,079

Tabela 2.

Skład roztworu mikroelementów wg Hoagland i Arnon (1950)

Literatura

Hoagland D. R., Arnon D. I., *The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil*, College of Agriculture, University of California, Berkeley, CA 1950.

ZAŁĄCZNIK 2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA REGULATORÓW WZROSTU ROŚLIN

Tabela 1. Skład pożywki wg Murashige i Skoog (1962) w modyfikacji dla mikrorozmnażania róży

Składniki pożywki [mg dm ⁻³]			
Składnik	K Podłoże kontrolne	U Podłoże ukorzeniające	N Podłoże namnażające
Makroelementy			
NH ₄ NO ₃	825	825	1650
KNO ₃	950	950	1900
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	370	370	740
KH ₂ PO ₄	85	85	170
CaCl ₂ bezwodny	330	330	660
FeNa EDTA	21,5	21,5	43
Sacharoza			
	20 000	20 000	30 000
Regulatory wzrostu			
BAP	–	–	1
IAA	–	–	0,35
GA ₃	–	–	0,5
IBA	–	0,5	–
Mikroelementy			
MnSO ₄ × 4 H ₂ O		22,3	
H ₃ BO ₃		6,2	
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O		8,6	
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O		0,25	
CuSO ₄ × 5 H ₂ O		0,025	
CoCl ₂ × H ₂ O		0,025	
KI		0,75	
Witaminy			
Tiamina (B ₁)		0,5	
Pirydoksyna (B ₆)		0,5	
Kwas nikotynowy		0,5	
Inozytol		100	
Agar		7000	
pH 5,9			

Roztwory regulatorów wzrostu:

- a)** BAP: w małej zlewce 10 mg BAP rozpuścić dokładnie w kilku kroplach 1 M NaOH, dodać nieco wody i przenieść ilościowo do kolby miarowej na 10 cm³, dopełnić wodą do 10 cm³. Stężenie BAP w roztworze = 1 mg cm⁻³;
- b)** IAA: przygotować jak wyżej. Stężenie IAA w roztworze = 1 mg cm⁻³;
- c)** IBA: przygotować jak wyżej. Stężenie IBA w roztworze = 1 mg cm⁻³;
- d)** GA₃: w małej zlewce 10 mg GA₃ rozpuścić dokładnie w kilku kroplach 96% etanolu, dalej postępować jak wyżej. Stężenie GA₃ w roztworze = 1 mg cm⁻³.

Literatura

Murashige T., Skoog F., *A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures*, „Physiologia Plantarum” 1962, vol. 15, s. 473–479.

ZAŁĄCZNIK 3. TEST TOLERANCJI KOMÓREK ROŚLINNYCH NA ABIOTYCZNE CZYNNIKI STRESOWE

Składniki pożywki [mg dm ⁻³]	
Makroelementy	
KNO ₃	126
MgSO ₄ × 7H ₂ O	123
KH ₂ PO ₄	34
Ca(NO ₃) ₂ × 4H ₂ O	295
FeNa-EDTA	10
Mikroelementy	
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,079
H ₃ BO ₄	2,86
MnSO ₄ × 5H ₂ O	2,19
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,13
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	2,2
pH 5,8	

Tabela 1. Skład pożywki wg Hoagland i Arnon (1950) w modyfikacji dla hodowli hydroponicznej pszenicy

Literatura

Hoagland D. R., Arnon D. I., *The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil*, College of Agriculture, University of California, Berkeley, CA 1950.

ZAŁĄCZNIK 4. ZAWARTOŚĆ KWASU ASKORBINOWEGO (WITAMINY C) W WARZYWACH I OWOCACH

Przykład obliczenia zawartości kwasu askorbinowego [mg] w przeliczeniu na 100 g ś. m. materiału roślinnego [mg 100 g⁻¹ ś. m.]:

Stężenie wzorcowego roztworu kwasu askorbinowego wynosi 0,05 mg cm⁻³. Do miareczkowania pobrano 5 cm³ tego roztworu, tj. $5 \times 0,05 \text{ mg} = 0,25 \text{ mg}$.

Na zmiareczkowanie 0,25 mg wzorca kwasu askorbinowego zużyto średnio np. 5,1 cm³ 0,001 M roztworu I w KI:

5,1 cm³ I w KI → 0,25 mg kwasu askorbinowego

1 cm³ I w KI → 0,049 mg kwasu askorbinowego

Na zmiareczkowanie 5 cm³ ekstraktu zużyto średnio np. 12,4 cm³ 0,001 M I w KI:

1 cm³ I w KI → 0,049 mg kwasu askorbinowego

12,4 cm³ I w KI → x₁

x₁ = 0,608 mg kwasu askorbinowego 5 cm⁻³ ekstraktu

Ponieważ 5 cm³ badanego ekstraktu pobranego do miareczkowania odpowiada 0,5 g ś. m. materiału roślinnego:

50 cm³ ekstraktu → 5 g świeżej masy

5 cm³ ekstraktu → 0,5 g świeżej masy

dlatego:

0,5 g świeżej masy zawiera x₁ = 0,608 mg kwasu askorbinowego

czyli:

0,5 g świeżej masy → 0,608 mg kwasu askorbinowego

100 g świeżej masy → x₂ mg kwasu askorbinowego

x₂ = 121,6 mg kwasu askorbinowego 100 g⁻¹ ś. m.

Produkty spożywcze	Zawartość witaminy C [mg 100 g ⁻¹ ś. m.]
OWOCE	
agrest	30
ananas	20
banan	10
brzoskwinia	10
cytryna	40
czereśnia	15
dzika róża	250–1000
głóg	160–800
grapefruit	45
gruszka	5
jabłko	10
jarzębina	100
kiwi	100
malina	25
mandarynka	38
melon	20
morela	10
pomarańcza	60
porzeczka biała	40
porzeczka czarna	200
porzeczka czerwona	25
śliwka	10
truskawka	60
winogrono	6
wiśnia	15
żurawina	15
WARZYWA	
brokuł	120
brukselka	120
burak	10
cebula	10
czosnek	16
chrzan	120
dynia	8
fasola	20
groszek zielony	25
groszek zielony konserwowy	10

Tabela 1. Zawartość kwasu askorbinowego w wybranych produktach wg Moszczyński, Pyć (1999)

jarmuż	150
kalafior	70
kapusta	45
marchew	5
ogórek	10
papryka zielona	175
pietruska korzeń	100
pietruska nać	150
pomidor	25
por	35
rabarbar	10
rzeżucha	79
rzodkiewka	25
sałata	15
seler	10
szpinak	55
ziemniak	20
INNE PRODUKTY	
igliwie sosny i świerka	150–250
lucerna	200
orzechy włoskie (nie dojrzale)	3000
pokrzywa	100

Literatura

Moszczyński P., Pyć R., *Biochemia witamin, cz. 2: Witaminy lipofilne i kwas askorbinowy*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.

ZAŁĄCZNIK 5. INDUKCJA TKANKI KALUSOWEJ I PĘDÓW PRZYBYSZOWYCH W KULTURZE IN VITRO FIOŁKA AFRYKAŃSKIEGO

Składniki pożywki [mg dm ⁻³]	
Makroelementy	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂	332
FeNaEDTA	43
Mikroelementy	
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,025
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	6,2
MgSO ₄ × 7H ₂ O	370
MnSO ₄ × 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	8,6
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,025
KI	0,83
Witaminy	
Tiamina (B ₁)	0,4
Pirydoksyna (B ₆)	0,5
Kwas nikotynowy	0,5
Inozytol	100
Inne	
Sacharoza	30 000
Agar	7000
pH 5,7	

Tabela 1. Pożywka wg Murashige i Skoog (1962), zmodyfikowana

Przygotować roztwory wyjściowe witamin o stężeniu 10 mg 100 cm⁻³ i odmierzyć odpowiednią objętość na 1 dm⁻³ pożywki (por. tabela 1).

Przygotować roztwory wyjściowe regulatorów wzrostu: kwasu α -naftalenoctowego (NAA) i kinetyny (KIN) o stężeniu

0,1 mg cm⁻³. KIN rozpuścić w kropli 1 M HCl, NAA – w kropli 1 M NaOH i dopełnić wodą do określonej objętości. Przygotować 4 warianty agarowej pożywki MS (po 500 cm³), różniące się między sobą zawartością regulatorów wzrostu (por. tabela 2), odmierzając odpowiednią objętość roztworów wyjściowych.

Wariant pożywki	Stężenie regulatorów wzrostu [mg dm ⁻³]	
	NAA	KIN
MS _{1,0 NAA + 0,2 KIN}	1,0	0,2
MS _{2,0 NAA + 0,2 KIN}	2,0	0,2
MS _{0,4 NAA + 0,8 KIN}	0,4	0,8
MS _{0,2 NAA + 0,5 KIN}	0,2	0,5

Tabela 2. Stężenie regulatorów wzrostu – kwasu α -naftalenoocetowego (NAA) i kinetyny (KIN) w pożywce MS

Doprowadzić wartość pH pożywek do 5,7. Pożywki rozlewać po 40 cm³ do szerokoszyjnych kolb Erlenmeyera o objętości 100 cm³, zakryć kolby kapslami foliowymi z płatkami ligniny i wysterylizować.

Literatura

Murashige T., Skoog F., *A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures*, „Physiologia Plantarum” 1962, vol. 15, s. 473–479.

ZAŁĄCZNIK 6. METABOLITY WTÓRNE O ZNACZENIU PROZDROWOTNYM. ANTRAZWIAZKI LIŚCI I KULTUR *IN VITRO* ALOESU

Składniki pożywki [mg dm ⁻³]	
Makroelementy	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ bezwodny	330
FeNa EDTA	43
Mikroelementy	
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	22,3
H ₃ BO ₃	6,2
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ × H ₂ O	0,025
KI	0,75
Witaminy wg Gamborg i in. (1968)	
<i>mio</i> -inozytol	100
kwask nikotynowy	1
pantotenian wapnia	0,874
pirydoksyna-HCl	1
ryboflawina	0,015
tiamina	10
Regulatory wzrostu	
IAA	1,5
BAP	0,3
Sacharoza	30 000
Agar (dla hodowli kalusa)	7000
pH 5,8	

Tabela 1. Skład pożywki MS wg Murashige i Skoog (1962) w modyfikacji dla hodowli kultur kalusowych i zawieszinowych aloesu

Roztwory regulatorów wzrostu BAP i IAA o stężeniu 1 mg cm⁻³ przygotować tak jak opisano w załączniku 2.

Literatura

Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., *Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells*, „Experimental Cell Research” 1968, vol. 50, s. 151–158.

Murashige T., Skoog F., *A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures*, „Physiologia Plantarum” 1962, vol. 15, s. 473–479.

PYTANIA POMOCNICZE DO POWTÓRKI MATERIAŁU

1. SKŁAD CHEMICZNY ROŚLIN. WYKRYWANIE SKŁADNIKÓW MINERALNYCH W ROŚLINACH

1. Wyjaśnij pojęcia: świeża masa roślinna, sucha masa roślinna, popiół roślinny, reakcje histochemiczne.
2. Jakie reakcje chemiczne służą do wykrywania chloru, fosforu, magnezu, potasu, siarki, wapnia i żelaza w popiele roślinnym?
3. Wymień i krótko scharakteryzuj kryteria podziału składników mineralnych w odniesieniu do ich funkcji pełnionych w organizmach roślinnych.

2. MINERALNE ODŻYWIANIE ROŚLIN

1. Podaj ogólne i specyficzne dla danego pierwiastka objawy jego niedoboru.
2. Opisz podstawowe zasady metod badania gospodarki mineralnej.
3. Opisz znaczenie dla rozwoju organizmu roślinnego makro- i mikroelementów.

3. KOMÓRKA ROŚLINNA JAKO UKŁAD OSMOTYCZNY

1. Wyjaśnij, co to jest plazmoliza graniczna.
2. W jaki sposób można wyznaczyć potencjał wody soku komórkowego?
3. Jakie metody stosuje się do wyznaczania potencjału wody komórki?
4. Jaki będzie kierunek przepływu wody między komórką A i komórką B, jeśli:
 - a) w komórce A: $\Psi_t = 0,4 \text{ MPa}$ i $\Psi_s = -0,5 \text{ MPa}$
 - b) w komórce B: $\Psi_t = 0,2 \text{ MPa}$ i $\Psi_s = -0,5 \text{ MPa}$

5. Opisz zależności między objętością komórki, Ψ_p , Ψ_s i Ψ_k , gdy komórka roślinna znajduje się w stanie maksymalnego turgoru.
6. Dlaczego na glebach zasolonych rośliny wykazują często objawy więdnienia?

4. PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON PLAZMATYCZNYCH

1. Opisz budowę błony plazmatycznej.
2. Dlaczego błona plazmatyczna jest nazywana strukturą dynamiczną?
3. Wymień i scharakteryzuj rodzaje transportu przez błony plazmatyczne.
4. W jaki sposób temperatura wpływa na przepuszczalność błon plazmatycznych?
5. Jak można ocenić wpływ temperatury na przepuszczalność błon, stosując pomiary kolorymetryczne i konduktometryczne?
6. Jaki jest związek między zdolnością zasad do dysocjacji w roztworach wodnych a szybkością ich transportu przez błony plazmatyczne?

5. DALEKI TRANSPORT WODY, TRANSPIRACJA

1. Opisz zasadę działania potometru.
2. Jak wykazać eksperymentalnie działanie siły ssącej transpiracji?
3. Na czym polega pomiar intensywności transpiracji metodą wagową?
4. Scharakteryzuj wpływ zmiennych warunków środowiska, tj. temperatury, wilgotności powietrza oraz nasłonecznienia na intensywność transpiracji.

6. BARWNIKI ASYMILACYJNE I ICH WŁAŚCIWOŚCI

1. Scharakteryzuj elementy budowy chlorofili i karotenoidów związane z ich właściwością pochłaniania światła widzialnego.
2. Wyjaśnij związek budowy barwników asymilacyjnych z ich rozpuszczalnością.
3. Na czym polega rozdział barwników metodą Krausa?

4. W jaki sposób można otrzymać feofitynę i feoforbid? Czym różnią się te związki?
5. Jednym ze sposobów zwiększenia trwałości zielonej barwy chlorofilu jest otrzymywanie pochodnych o budowie porfirynowej. W jakiej reakcji można otrzymać te związki?
6. Na czym polega zjawisko zmydlania chlorofilu?
7. Podaj przykłady barwników karotenoidowych. Wyjaśnij ich związek z witaminą A.
8. Wyjaśnij zasadę metody chromatografii cienkowarstwowej na przykładzie rozdzielania barwników asymilacyjnych z tkanek liści roślin.
9. Co to jest widmo czynnościowe fotosyntezy?

7. REAKCJA HILLA

1. Podaj zasadę reakcji opisanej przez Hilla.
2. Co można udowodnić, przeprowadzając reakcję opisaną przez Hilla?
3. Jakie warunki muszą być spełnione, aby nastąpiła fotoliza wody?

8. ODDYCHANIE

1. Na czym polega proces oddychania tlenowego roślin? Wymień etapy tego procesu, gdy substratem jest glukoza.
2. Kiedy przebiega i na czym polega proces oddychania beztlenowego roślin? Wymień etapy tego procesu, gdy substratem jest glukoza.
3. Wymień zysk energetyczny procesu oddychania tlenowego i beztlenowego roślin, gdy substratem jest glukoza.
4. Na jakim etapie oddychania tlenowego i beztlenowego roślin powstaje CO_2 i w jakiej ilości?
5. Zdefiniuj pojęcia: glikoliza, cykl kwasów trikarboksylowych, łańcuch oddechowy.
6. Jaką funkcję pełni u roślin oksydaza alternatywna?
7. Opisz metodę badania wpływu temperatury na proces oddychania tlenowego roślin.
8. Opisz metodę detekcji i oznaczania ilości wydzielonego etanolu jako produktu oddychania beztlenowego komórek roślin.

9. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA REGULATORÓW WZROSTU ROŚLIN

1. Wymień podstawowe grupy regulatorów wzrostu roślin i podaj ich przykłady.
2. Opisz wpływ auksyn, giberelin i cytokinin na rośliny.
3. Na czym polega zjawisko dominacji wierzchołkowej?
4. Jaki jest wpływ etylenu na rośliny?
5. Do jakiej grupy regulatorów wzrostu należy chlorek chlorocholiny i jak wpływa on na morfologię roślin?
6. Podaj przykłady praktycznego zastosowania regulatorów wzrostu roślin.
7. Czym różnią się herbicydy totalne od selektywnych?

10. METABOLIZM AZOTOWY ROŚLIN. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI REDUKTAZY AZOTANOWEJ

1. Jaką reakcję katalizuje reduktaza azotanowa?
2. Jaką reakcję katalizuje reduktaza azotynowa?
3. Jaka jest subkomórkowa lokalizacja reakcji katalizowanych przez reduktazę azotanową i reduktazę azotynową?
4. Jak doświadczalnie udowodnić, że reduktaza azotanowa jest enzymem indukowanym przez substrat?
5. W jaki sposób można oznaczyć aktywność reduktazy azotanowej w materiale roślinnym?

11. WŁAŚCIWOŚCI GLEB

1. Wymień i omów poszczególne fazy gleb.
2. Co to są koloidy glebowe?
3. Na czym polega wymienna sorpcja gleby?
4. Jakie czynniki decydują o żyzności gleby?
5. Od czego zależy odczyn gleby i jakie w związku z tym wyróżniamy rodzaje gleb?
6. Scharakteryzuj frakcję próchniczą gleby.

12. KIEŁKOWANIE NASION

1. Przedstaw zasady metod oceny żywotności nasion.
2. Jak przebiega indukcja α -amylazy w kiełkujących ziarniakach zbóż?
3. Omów rolę fitochromu w procesie kiełkowania nasion.
4. Scharakteryzuj fazę fizyczną, biochemiczną i fizjologiczną w procesie kiełkowania nasion.

13. ALLELOPATIA. WPŁYW METABOLITÓW WTÓRNYCH NA KIEŁKOWANIE NASION I WZROST SIEWEK

1. Zdefiniuj pojęcia: allelopatia, związki allelopatyczne, autotoksyczność, bioherbicyd.
2. Opisz sposoby przedostawania się związków allelopatycznych do środowiska (podaj przykłady związków).
3. Przedstaw skutki oddziaływania związków allelopatycznych na rośliny.
4. Na przykładzie wybranego związku opisz wpływ związków allelopatycznych na procesy w populacjach roślin.
5. Wymień związki o charakterze allelopatycznym obecne w liściach orzecha włoskiego i słonecznika, pędach rzeżuchy, eksudatach nasion pomidora, słonecznika, kozieradki i owsa, a także szyszkogodach jałowca oraz naowocni pomarańczy.
6. Opisz sposób przeprowadzenia biotestu oceniającego allelopatyczny wpływ metabolitów z określonej rośliny-donora na kiełkowanie i wzrost innych gatunków roślin (tzw. akceptorów).

14. AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW AMYLOLITYCZNYCH W PRZECHOWYWANYCH ORGANACH SPICHRZOWYCH

1. Jak zbudowana jest cząsteczka skrobi i czym różni się amyloza od amylopektyny?
2. Przedstaw, jak warunki przechowywania wpływają na wartości odżywcze ziemniaka.
3. Opisz przemiany, w jakich uczestniczy oksydaza polifenolowa.
4. Jaką reakcję katalizuje α -amylaza?

15. TEST TOLERANCJI KOMÓREK ROŚLINNYCH NA ABIOTYCZNE CZYNNIKI STRESOWE

1. Zdefiniuj pojęcia: stres, czynnik stresowy, reakcja stresowa, stres biotyczny i abiotyczny, odporność, adaptacja, aklimatyzacja, odpowiedź lokalna i systemiczna, reakcja stresowa specyficzna i niespecyficzna.
2. Wymień i krótko scharakteryzuj fazy odpowiedzi organizmu roślinnego na czynnik stresowy.

3. Opisz wpływ stresu zasolenia (NaCl) na oddychanie mitochondrialne.
4. Opisz wpływ stresu chłodu na oddychanie mitochondrialne.
5. Opisz wpływ stresu wywołanego przez metale ciężkie (np. Cd^{2+}) na oddychanie mitochondrialne.
6. Opisz sposób oceny reakcji komórek roślin na działanie abiotycznego czynnika stresowego w oparciu o analizę żywotności komórek.

16. REAKCJE ROŚLIN NA STRES ABIOTYCZNY

1. Jaką funkcję pełnią peroksydazy u roślin?
2. Jaką reakcję katalizują peroksydazy?
3. Wymień abiotyczne czynniki środowiskowe wywołujące stres u roślin.
4. Opisz zasadę metody oznaczenia aktywności peroksydazy wobec gwajakolu.

17. CAŁKOWITA ZDOLNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH POCHODZENIA ROŚLINNEGO

1. Wymień reaktywne formy tlenu (RFT) będące główną przyczyną toksyczności tlenu w komórkach. Wyjaśnij, dlaczego powstawanie RFT związane jest z metabolizmem tlenowym.
2. Przedstaw równania reakcji prowadzących do powstawania w komórce RFT ($O_2^{\cdot-}$, $HO_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, 1O_2).
3. Wyjaśnij, kiedy dochodzi do generowania RFT w komórkach roślin.
4. Wyjaśnij, na czym polega szkodliwość RFT dla organizmu.
5. Zdefiniuj pojęcia: stres oksydacyjny, antyoksydant, system antyoksydacyjny, całkowita zdolność antyoksydacyjna.
6. Jak można określić efektywność działania nieenzymatycznego systemu obrony antyoksydacyjnej?
7. Wymień grupy metabolitów wtórnych (podaj przykłady) biorących udział w nieenzymatycznej obronie antyoksydacyjnej roślin.
8. Opisz metodę oznaczania CZA w oparciu o pomiar zdolności redukcyjnej antyoksydantów.
9. Podaj przykłady produktów spożywczych pochodzenia roślinnego bogatych w antyoksydanty nieenzymatyczne.

18. ZAWARTOŚĆ KWASU ASKORBINOWEGO (WITAMINY C) W WARZYWACH I OWOCACH

1. Opisz właściwości fizykochemiczne kwasu askorbinowego.
2. Wyjaśnij, dlaczego kwas askorbinowy jest jednym z głównych nieenzymatycznych antyoksydantów środowiska wodnego komórki.
3. Opisz rolę kwasu askorbinowego u roślin.
4. Podaj wzór kwasu askorbinowego i dehydroaskorbinowego.
5. Opisz zasadę jodometrycznego oznaczania zawartości kwasu askorbinowego w materiale roślinnym.
6. Podaj przykłady produktów spożywczych pochodzenia roślinnego bogatych w witaminę C.

19. INDUKCJA TKANKI KALUSOWEJ I PĘDÓW PRZYBYSZOWYCH W KULTURZE *IN VITRO* FIOŁKA AFRYKAŃSKIEGO

1. Co oznacza pojęcie totipotencja komórki roślinnej?
2. W jaki sposób zapewnia się sterylność roślinnych kultur *in vitro*?
3. Jakie są główne grupy składników w pożywkach do hodowli roślin *in vitro*?
4. Wyjaśnij rolę regulatorów wzrostu w kulturze kalusa i w procesie organogenezy.
5. Wymień główne etapy mikrorozmnazania roślin.
6. Jakie są zalety i potencjalne możliwości wykorzystania mikrorozmnazania roślin?

20. METABOLITY WTÓRNE O ZNACZENIU PROZDROWOTNYM. ANTRAZWIĄZKI LIŚCI I KULTUR *IN VITRO* ALOESU

1. Opisz budowę antrazwiązków występujących w tkankach roślin.
2. Krótko scharakteryzuj aktywność biologiczną antrazwiązków.
3. Wymień antrazwiązki występujące w liściach aloesu, korce kruszyny, kłączu i korzeniu rzewienia, liściach senesu i kwiatach dziurawca.
4. Jaki proces opisuje reakcja Bornträgera i jak można ją wykorzystać do jakościowej analizy antrazwiązków metodą TLC?
5. Opisz metodę jakościowego oznaczania antrachinonów w materiale roślinnym.

21. ANALIZA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA WYBRANYCH METABOLITÓW WTÓRNYCH W ROŚLINNYCH SUROWCACH LECZNICZYCH

- 1.** Wyjaśnij pojęcia: roślinne surowce lecznicze, metabolity wtórne.
- 2.** Opisz zasadę wykrywania garbników pirokatechinowych i pirogalolowych.
- 3.** Wyjaśnij znaczenie garbników.
- 4.** Scharakteryzuj alkaloidy: budowę, działanie i zastosowanie.
- 5.** Podaj przykłady alkaloidów wraz z roślinami, z których są pozyskiwane.