



# **SKRYPT DO ĆWICZEŃ Z BIOINDYKACYJNYCH METOD OCENY ŚRODOWISKA**

**Zakład Molekularnej Fizjologii Roślin  
Uniwersytet Warszawski**



**Warszawa 2013**

## SPIS TREŚCI

	str.
Roztwory.....	3
Kolorymetria.....	4
Żywienie mineralne roślin.....	5
Stresy.....	12
Wpływ zanieczyszczenia środowiska na wybrane procesy fizjologiczne roślin.....	17
Barwniki asymilacyjne.....	20
Fluorescencja chlorofilu <i>a</i> jako miara aktywności fotosyntetycznej liści.....	25
Fotosynteza.....	29
Oddychanie.....	31

## ROZTWORY

### 1. Sporządzanie roztworów

W celu sporządzenia roztworu o określonym stężeniu molowym lub procentowym należy wyliczoną ilość danej substancji **rozpuścić w mniejszej ilości wody** (lub innego rozpuszczalnika) **niż żądana objętość końcowa**, a następnie uzupełnić w kolbie miarowej lub cylindrze do żądanej objętości.

**Stężenie molowe - określa liczbę moli substancji w 1000 ml roztworu**

**Przykład:** Sporządzić 500 ml, 100 mM roztworu sacharozy, masa molowa sacharozy wynosi 342,30 g

342,30g rozpuszczone w 1000ml = roztwór 1 M

34,23 g rozpuszczone w 1000 ml = roztwór 100 mM

34,23 g  $\rightarrow$  1000 ml

x  $\rightarrow$  500 ml

x = 17,11 g

Do sporządzenia 500 ml, 100 mM roztworu sacharozy należy odważyć 17,11 g sacharozy, rozpuścić ją w ok. 350 ml wody po czym uzupełnić objętość do 500 ml.

**Stężenie procentowe – jest to liczba gramów substancji** (w przypadku procentu masowo-objętościowego – % m/v) **lub liczba mililitrów substancji** (w przypadku procentu objętościowego % – v/v) **rozpuszczona w 100 ml roztworu.**

**Przykład:** Sporządzić 500 ml 1% (m/v) roztworu sacharozy

1 g sacharozy rozpuszczony w 100 ml = roztwór 1%

1g  $\rightarrow$  100 ml

x  $\rightarrow$  500 ml

x = 5 g

Do sporządzenia 500 ml, 1% (m/v) roztworu sacharozy należy odważyć 5 g sacharozy, rozpuścić ją w ok. 350 ml wody po czym uzupełnić objętość do 500 ml.

**Przykład:** Ile mililitrów 27% (m/v) roztworu NaCl potrzeba do sporządzenia 3000 ml 0,9% roztworu NaCl?

$$x \text{ ml} \cdot 27\% = 3000 \text{ ml} \cdot 0,9\%$$

$$x = 100 \text{ ml}$$

Należy 100 ml roztworu 27% uzupełnić do 3000 ml wodą.

## KOLORYMETRIA

Kolorymetria jest metodą analizy chemicznej, w której podstawę ilościowego oznaczania substancji w roztworze stanowi zależność pomiędzy intensywnością zabarwienia roztworu (absorpcją światła o określonej długości fali) a stężeniem zawartej w niej substancji.

**Prawo Lamberta-Beera:** absorbancja światła monochromatycznego jest wprost proporcjonalna do grubości warstwy roztworu i stężenia roztworu

Molowy współczynnik absorpcji ( $\epsilon$ ) każdej substancji ma charakterystyczną wartość, stałą dla danej długości fali świetlnej. Z wartości  $\epsilon$  można obliczyć stężenie substancji w mol/l ze wzoru:

$$C = A / (\epsilon \cdot l)$$

Gdzie:  $l$  – grubość warstwy roztworu,  $C$  – stężenie,  $A$  – odczytana absorbancja

**UWAGA!**

Aby wyliczyć **ilość moli substancji** na podstawie reakcji kolorymetrycznej należy znać wartość  $\epsilon$ , jak również objętość badanej próby

## ŻYWIENIE MINERALNE ROŚLIN

Tkanki roślinne składają się z substancji organicznej, wody (od 95% w soczystych owocach i świeżych liściach do ok. 7% w niektórych nasionach), oraz składników mineralnych tzn. popielnych (ok. 6%). Mimo, że składniki mineralne stanowią niewielką część suchej masy są one niezmiernie ważne, ponieważ umożliwiają roślinie wytwarzanie materii organicznej.

Na podstawie zawartości pierwiastków w materiale roślinnym można je podzielić na **makroelementy** (C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg) i **mikroelementy** (Fe, Na, Si, Cu, Zn, Mo, Mn, B, Cl). Pierwiastki występujące w roślinach można również podzielić opierając się na ich właściwościach biochemicznych i pełnionych funkcjach fizjologicznych:

1. pierwiastki tworzące roślinną materię organiczną (C, H, O, N, S, P).
2. pierwiastki o podobnych właściwościach biochemicznych, w komórkach związane z grupami hydroksylowymi cukrów tworzą odpowiednie estry (P, B, Si).
3. Pierwiastki regulujące potencjały osmotyczne, pełniące również funkcje regulatorowe i sygnałowe (K, Na, Mg, Ca, Cl).
4. pierwiastki obecne głównie w formie chelatów w grupach prostetycznych, umożliwiające transport elektronów na skutek zmiany wartościowości (Fe, Cu, Zn, Mo, Mn).

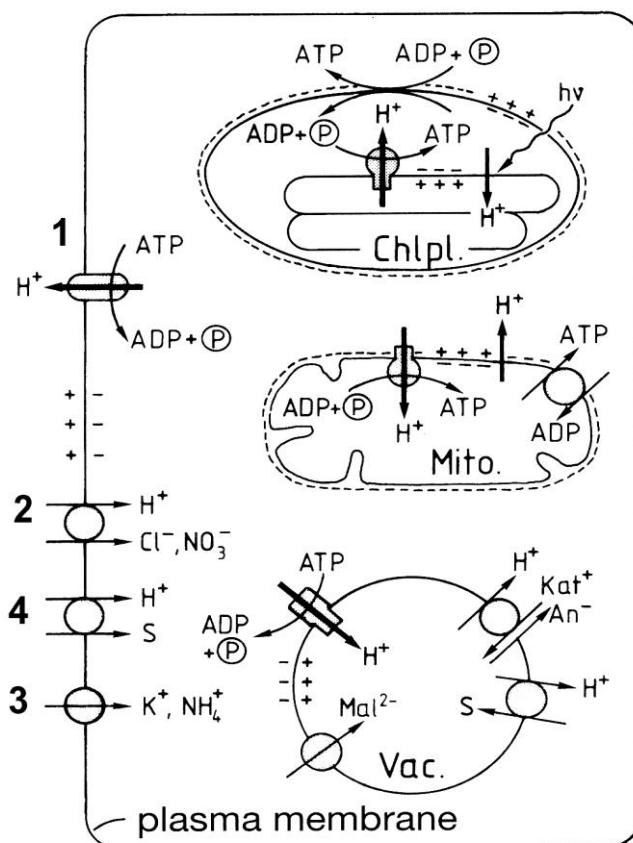
Składniki pokarmowe znajdujące się w glebie stają się przyswajalne dla roślin w wyniku procesów wietrzenia minerałów i mineralizacji substancji organicznej. W wielu glebach „odpływ” składników pokarmowych w wyniku pobierania ich przez rośliny, wymywania oraz denitryfikacji znacznie przewyższa ich dopływ. Równowagę w takim wypadku przywraca się poprzez stosowanie odpowiednich nawozów sztucznych lub organicznych. Rośliny muszą być zaopatrywane w wystarczającą ilość składników mineralnych w ciągu całego okresu wzrostu i rozwoju. Niedobór w roztworze glebowym któregoś z makro lub mikroelementów (oczywiście z wyjątkiem C, H, O) odbija się na wyglądzie rośliny, jej stanie fizjologicznym i produktywności.

### **Pobieranie substancji mineralnych**

Substancje mineralne pobierane są przez roślinę z roztworu glebowego lub pożywki w postaci jonów, na drodze **transportu biernego** (zgodnie z gradientem elektrochemicznym), lub **aktywnego** (wbrew gradientowi elektrochemicznemu). Do zrozumienia mechanizmu transportu jonów konieczna jest znajomość struktury i właściwości błon plazmatycznych. Zaproponowana przez Singera i Nicolsona w 1972 roku hipoteza mozaikowa, najdokładniej opisuje budowę błony biologicznej. W płynnej dwuwarstwie fosfolipidowej znajdują się białka integralne, częściowo lub całkowicie przenikające obie warstwy lipidów. Na powierzchni błony mogą znajdować się białka powierzchniowe (związane z błoną lub z białkami integralnymi). Błony biologiczne nie tylko oddzielają wnętrze komórki od jej otoczenia ale

również otaczają organelle komórkowe, utrzymują różnice w pH i składzie jonowym w różnych częściach komórki oraz pozwalają na przestrzenny rozdział dróg metabolicznych. Zjawiska osmotyczne w żywych tkankach także uwarunkowane są selektywną przepuszczalnością membran cytoplazmatycznych oraz występowaniem w soku komórkowym związków osmotycznie czynnych.

Dla przebiegu procesów metabolicznych konieczna jest jednak wymiana wielu związków, wymaga to transportu – mechanizmu ułatwiającego dużym i/lub naładowanym cząsteczkom „przechodzenie” przez błony biologiczne. W procesie transportu związek przenoszony przez błonę nie podlega przemianie chemicznej. W transporcie jonów przez błony biologiczne biorą udział integralne białka błonowe: **przenośniki** (translokatory), **pompy jonowe** i **kanały jonowe**. Transport jonów w poprzek plazmalemmy w komórce roślinnej jest schematycznie przedstawiony na rysunku (Rys. 1). Nośnikami jonów mogą być związki o charakterze lipidowym, pochodne kwasów fosfatydowych czy lipoproteidów. Pewne specyficzne związki kompleksujące, zarówno syntetyczne jak i naturalne (o charakterze antybiotyków), ułatwiają przenoszenie jonów. Związki te można podzielić na dwie grupy 1.) działające jako nośnik, 2.) tworzące kanały przepuszczalne dla jonów.



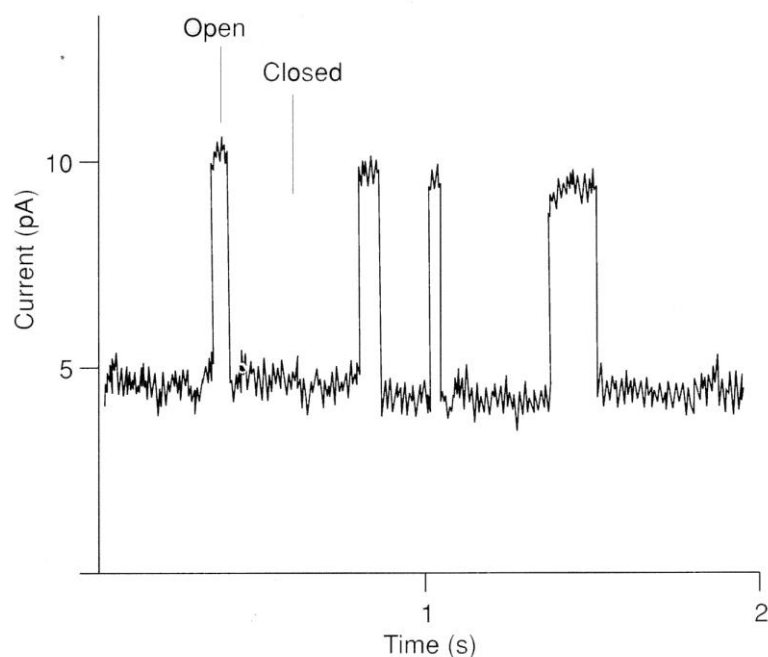
**Rys. 1** Model transportu jonów przez plazmalemę komórki roślinnej.

Gradient  $H^+$  w poprzek plazmalemmy powstaje dzięki działaniu ATP –azy, enzymu, który zużywając ATP przenosi jony wodorowe wbrew potencjałowi elektrochemicznemu (transport aktywny pierwotny) [1]. Aniony często transportowane są do komórki roślinnej na zasadzie **symportu** z jonem  $H^+$  (transport aktywny wtórny) [2]. Pozbawione ładunku cząsteczki (np. cukry) również transportowane są poprzez symport z  $H^+$  [4]. Niektóre jony wnikają do komórki i wydostają się z niej przez kanały jonowe i

przenośniki na zasadzie **uniportu** [3]. Jeżeli jon jest przenoszony na zasadzie wymiany z innym jonem (najczęściej z jonem  $H^+$ ) mówimy wtedy o transporcie na zasadzie **antyportu**.

Antybiotyki jonoforowe funkcjonujące jako nośnik (walinomycyna, enniatyna, moezyna) są cząsteczkami makrocyklicznymi zbudowanymi w taki sposób, że atomy tlenu wiążą koordynacyjnie centralnie umiejscowiony atom metalu, zewnętrzna zaś część nośnika jest hydrofobowa. Przykładem antybiotyku tworzącego kanał jest gramicydyna przenosząca metale alkaliczne lub protony.

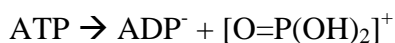
Najistotniejszą rolę w przenoszeniu substancji przez błony biologiczne odgrywają białka charakteryzujące się specyficnością do określonych substratów. Białka te przenikają dwuwarstwę lipidową, przy czym część zanurzona w błonie charakteryzuje się strukturą  $\alpha$ -heliksu oraz hydrofobowym składem aminokwasów. Transport poprzez kanały jonowe jest przykładem sprzężenia przepływu jonów i zmian konformacyjnych białka tworzącego kanał. W najprostszym wypadku może on podlegać fluktuacjom między dwoma stanami – otwartym i zamkniętym (Rys.2).



**Rys. 2** Pomiary przewodności kanału z protoplastów komórek parenchymy w obecności jonów  $Ca^{2+}$ .

W przypadku przenośników substancja jest związana ze specyficznym miejscem białka przenośnika, a następnie transportowana poprzez membranę i uwolniona. Właściwości przenośników można opisać takimi stałymi jak  $V_{max}$  (prędkość maksymalna) czy  $K_m$  (stała Michaelisa) analogicznie do reakcji enzymatycznych. Funkcjonalna różnica pomiędzy kanałem jonowym i przenośnikiem jest taka, że przenośnik dostępny jest dla substratu jedynie po jednej stronie membrany w danym momencie i przeniesienie danej substancji wymaga zmian konformacyjnych białka, natomiast kanał otwarty jest na obie strony (zmian konformacyjnych wymaga otwarcie kanału).

Inny mechanizm funkcjonuje w przypadku tzw. pompy protonowej i jest on w istocie odwróceniem chemiczno-osmotycznego mechanizmu procesu syntezy ATP. Rozszczepienie ATP przez ATP-azę związaną z błonami prowadzi do wytworzenia gradientu  $H^+$  zgodnie z równaniem:



Kation fosforylowy



Proton przechodzi do środowiska zewnętrznego (pompa protonowa), dzięki czemu w poprzek błony, powstaje gradient pH. Równoważnik anionowy pozostaje w cytoplazmie podwyższając ujemny potencjał elektryczny komórki w stosunku do roztworu zewnętrznego. Ponieważ wewnątrz komórki naładowane jest ujemnie „chętniej” pobierane są kationy przy jednoczesnej wymianie na jony  $H^+$ . Ten rodzaj dyfuzji nosi nazwę elektroosmozy. Elektroosmotyczny mechanizm pobierania kationów przy udziale ATP-azy nie zapewnia selektywności pobierania jonów.

Na szybkość i selektywność pobierania jonów przez roślinę wpływa szereg czynników zewnętrznych takich jak: stężenie i skład chemiczny soli mineralnych w roztworze glebowym lub w pożywce, struktura gleby, pH roztworu glebowego lub pożywki, dostęp systemu korzeniowego do tlenu, warunki świetlne podczas wzrostu, natężenie procesów metabolicznych w roślinie.

**Celem ćwiczenia** jest zapoznanie się z niektórymi aspektami żywienia mineralnego roślin: charakterystyka roślin wykazujących objawy niedoboru poszczególnych pierwiastków, zakładanie kultur wodnych i piaskowych, badanie wpływu pH na selektywne pobieranie kationów i anionów z pożywki.

**Przygotowując się do ćwiczeń należy zwrócić uwagę na następujące zagadnienia:** skład chemiczny roślin, funkcje biochemiczne i fizjologiczne poszczególnych pierwiastków, wybiórczy charakter pobierania jonów, antagonizm, synergizm i akumulacja jonów, mechanizm pobierania jonów, budowa błon cytoplazmatycznych, wpływ czynników zewnętrznych na pobieranie kationów i anionów, zjawisko osmozy, czynniki wpływające na wartość potencjału osmotycznego.

### **Zadanie 1. Wpływ pH na szybkość pobierania anionów i kationów.**

Do trzech kolejno ponumerowanych zlewek wlać po 30 ml pożywki Knopa (10-krotnie rozcieńczonej), a następnie doprowadzić pH do następujących wartości (używając buforu fosforanowego i 1 M roztworów HCl lub NaOH).

**Nr 1** pH 4.0

**Nr 2** pH 6.2

**Nr 3** pH 8.0



W każdej zlewce umieścić po 4 siewki kukurydzy w ten sposób aby system korzeniowy był maksymalnie zanurzony w roztworze pożywki oraz zmierzyć wartości pH poszczególnych pożywek. Pomiar pH powtórzyć po 30, 60, 90 i 120 minutach od chwili umieszczenia roślin w pożywkach.

Zmiany wartości pH pożywek przedstawić graficznie, z uzyskanych wyników wyciągnąć wnioski.

### **Zadanie 2. Pobieranie jonów $\text{NH}_4^+$ , wpływ pH i światła.**

Do czterech zlewek wlać po 30 ml roztworu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zawierającego 40  $\mu\text{g}$  jonów  $\text{NH}_4^+$  w 1 ml. Doprowadzić pH w zlewkach wg schematu, używając 1 M roztworów HCl i NaOH

#### **Grupa A - światło**

1

pH 4.0

2

pH 8.0

#### **Grupa B - ciemność**

1

pH 4.0

2

pH 8.0

W każdej zlewce umieścić po 4 siewki kukurydzy i pozostawić hodowlę do następnego dnia. Po 24 godzinach oznaczyć wartości pH oraz oznaczyć stężenie jonów  $\text{NH}_4^+$ .

### **Wykonanie oznaczenia**

Badany roztwór  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  przesączyć na lejku do czystej podpisanej zlewki, odpipetować 1 ml przesączu do probówki, dodać 9 ml wody destylowanej oraz 0,5 ml odczynnika Nesslera. Sporządzić próbę odczynnikową, kontrolną zawierającą 1 ml roztworu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (40  $\mu\text{g}$  jonów  $\text{NH}_4^+$ ), 9 ml wody i 0,5 ml odczynnika Nesslera oraz próbę ślepa (10 ml wody, 0,5 ml odczynnika Nesslera). Po wymieszaniu wszystkich prób odczytać wartość absorbancji przy długości fali 430 nm wobec próby ślepej. Ilość  $\mu\text{g}$   $\text{NH}_4^+$  odczytać z krzywej wzorcowej.

Zestawić zmiany pH oraz stężenia jonów  $\text{NH}_4^+$  w zależności od warunków naświetlenia. Wyciągnąć wnioski.

### **Zadanie 3. Wpływ poszczególnych pierwiastków na wzrost roślin.**

Rośliny kontrolne hodowano na pełnej pożywce Knopa o składzie (w 1000 ml):

0.4 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0.1 g KCl

0.25 g  $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

0.25 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

0.002 g Fe- EDTA

oraz 1 ml roztworu mikroelementów A-Z wg Hoaglanda w modyfikacji prof. dr K. Bassalika. W skład roztworu mikroelementów wchodzi sole manganu, litu, miedzi, cynku, aluminium, boru, kobaltu, molibdenu, bromu, jodu.

Doświadczenie przeprowadzono wg schematu w kolejno oznaczonych wazonach:

- I – hodowla na pożywkę pełnej + A-Z
- II – pożywka bez P, 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  zastąpiono 0,13 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$
- III – pożywka bez S, 0,25 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  zastąpiono 0,2 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
- IV – pożywka bez K, 0,1 g  $\text{KCl}$  zastąpiono 0,1 g  $\text{NaCl}$
- V – pożywka bez Mg, 0,25 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  zastąpiono 0,32 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10 \text{H}_2\text{O}$
- VI – pożywka bez Ca, 0,25 g  $\text{CaCl}_2 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  zastąpiono 0,4 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
- VII – pożywka bez N
- VIII – pożywka bez Fe

Pożywka jest tak przygotowana, że stężenie pozostałych pierwiastków, prócz wyłączonych wg przepisu, jest zachowane, a jej pH jest doprowadzone roztworem  $\text{HCl}$  i  $\text{NaOH}$  do około 5.

W czasie wegetacji należy:

1. uzupełniać pożywkę do stałej objętości
2. przewietrzać pożywkę
3. utrzymywać pH na możliwie stałym poziomie

Wyhodowane rośliny należy obejrzyć i opisać objawy spowodowane niedoborem poszczególnych pierwiastków oraz ich znaczenie dla roślin.

#### **Zadanie 4. Regulacja aktywności reduktazy azotanowej**

Materiał do doświadczenia stanowią koleoptyle jęczmienia, uzyskane po 4 dobach kiełkowania ziarniaków w ciemności, w temperaturze 21 – 23°C.

#### **Przebieg doświadczenia**

Pracując w ciemności, przenieść odpowiednią ilość siewek do 4 zlewek, w których znajdują się następujące roztwory:

Zlewki 1 i 2 – 30 ml  $\text{H}_2\text{O}$

Zlewki 3 i 4 – 30 ml 10 mM  $\text{KNO}_3$

Zlewki 1 i 3 wystawić na 24 godziny na światło, natomiast 2 i 4 umieścić na 24 godziny w ciemności.

### **Oznaczanie aktywności reduktazy azotanowej.**

Po 24 godzinach wzrostu siewek, ściąć po 1000 mg koleoptyli (odcinając je tuż przy ziarniakach) i umieścić w probówkach w roztworze inkubacyjnym o składzie:

2 ml 0,1 M  $\text{KNO}_3$

5 ml 0,2 M buforu fosforanowego o pH 7,5

2 ml 5 % roztworu detergentu Triton X-100

1 ml 0,5 mM roztworu CCCP (karbonylocyjanek 3-chlorofenylohydrazonu) – inhibitor reduktazy azotynowej, zapobiega zużyciu  $\text{NO}_2$  przez reduktazę azotynową

Próby inkubować 60 minut w temperaturze  $30^\circ\text{C}$ . Równolegle inkubować próbę ślepą, zawierającą roztwór inkubacyjny bez materiału roślinnego.

Wszystkie próby wstawić na 10 minut do wrzącej łaźni wodnej. Po wystudzeniu oznaczyć zawartość azotynów w każdym wariancie w 2 powtórzeniach.

### **Oznaczanie azotynów.**

Do 2 ml inkubatu (lub próby ślepej) dodać odczynniki w następującej kolejności:

1,5 ml 1 roztworu sulfonilamidu w 3 M HCl

1,5 ml 0,02% roztworu N-naftyloetylodwuaminy

Zawartość probówek wymieszać i po 15 minutach zmierzyć absorbancję przy  $\lambda = 530 \text{ nm}$  wobec próby ślepej.

Obliczyć ilość uwolnionych jonów  $\text{NO}_2$  w poszczególnych wariantach doświadczenia. Aktywność reduktazy azotanowej wyrazić w  $\mu\text{g NO}_2 \times \text{g}^{-1}$  tkanki. W celu przeliczenia otrzymanych wartości ekstynkcji na  $\mu\text{g}$  azotynów zastosować mnożnik  $k = 5,4$ , który wyznaczono z krzywej wzorcowej dla różnych stężeń  $\text{NO}_2$ .

Opisać doświadczenie, omówić wyniki, wyciągnąć wnioski.

## STRESY

### **Stres oksydacyjny**

Tlen, obok swej życiodajnej funkcji, może być również toksyczny dla organizmów żywych. Reaktywne formy tlenu (RTF), takie jak anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ), tlen singletowy ( $O_2^{\cdot}$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) i rodnik hydroksylowy ( $OH^{\cdot}$ ) są charakterystyczne dla normalnego metabolizmu roślin, a ich wzmożone generowanie następuje w wyniku działania wielu czynników stresowych między innymi takich jak susza, zasolenie, nadmierne lub zbyt niskie naświetlenie, zanieczyszczenia atmosferyczne (ozon,  $SO_2$ , fluorowodór) czy też działanie herbicydów. Stan, w którym występuje nadprodukcja wolnych rodników, nazywamy stresem oksydacyjnym. Najgroźniejszym dla komórki jest rodnik hydroksylowy. Obrona przed prekursorami rodnika hydroksylowego – anionorodnikiem ponadtlenkowym i nadtlenkiem wodoru polega na przyśpieszeniu ich dysproporcjonacji. Proces ten katalizują enzymy antyoksydacyjne: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), usuwająca anionorodnik ponadtlenkowy, katalaza i peroksydaza, które efektywnie usuwają nadtlenek wodoru oraz enzymy szlaku glutationowo-askorbinianowego, (reduktaza glutationowa, reduktaza askorbinianowa, dehydrogenaza askorbinianowa) oraz szereg związków niskocząsteczkowych np.: kwas askorbinowy, glutation,  $\alpha$ -tokoferol, cysteina i karotenoidy.

Kluczowym enzymem systemu antyoksydacyjnego jest SOD. Enzym ten katalizuje reakcję dysmutacji (dysproporcjonacji) anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru i  $O_2$ .



SOD występuje u roślin w postaci kilku izoform, które klasyfikuje się w zależności od zawartego w nich kofaktora (jon metalu) na izoformę miedziowo-cynkową (Cu/ZnSOD), manganową (MnSOD) i żelazową (FeSOD). Poszczególne izoformy wykazują odmienną wrażliwość na cyjanki i nadtlenek wodoru, różnią się także lokalizacją w komórce. Izoforma Cu/ZnSOD, wrażliwa na cyjanki i nadtlenek wodoru, występuje w chloroplastach i cytozolu, MnSOD zlokalizowana w mitochondriach i peroksysomach – nie wykazuje wrażliwości na cyjanki i nadtlenek wodoru, FeSOD – najprymitywniejszy typ dysmutazy (forma archaiczna) występuje w komórkach *Prokaryota* oraz w stromie chloroplastów u *Eukaryota* i jest inaktywowana przez nadtlenek wodoru.

W usuwaniu RTF z komórki uczestniczy również katalaza. Enzym ten jest odpowiedzialny za przeprowadzanie reakcji dysmutacji  $H_2O_2$  do  $H_2O$  i  $O_2$ . Katalaza charakteryzuje się dużą szybkością reakcji i małą specyficznością względem substratu (szybkie usunięcie  $H_2O_2$  z komórki zapobiega powstaniu bardzo reaktywnego rodnika hydroksylowego tworzonego w obecności jonów metali np.  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ). Katalaza występuje w peroksysomach, mitochondriach i glioksysomach. Znanych jest kilka izoform tego enzymu. W usuwaniu  $H_2O_2$  z komórki, z katalazami współdziałają peroksydazy. Enzymy te usuwają resztę nadtlenku wodoru, która nie przereagowała z katalazami. U roślin wyższych peroksydazy

występują w postaci kilku izoform np. peroksydaza askorbinianowa (APX) zlokalizowana w chloroplastach jest odpowiedzialna za usuwanie nadtlenu wodoru powstającego w chloroplastach, natomiast peroksydaza cytochromowa pełni tę funkcję w mitochondriach.

Reaktywne formy tlenu powodują uszkodzenia białek, lipidów i nukleotydów. Do reakcji o znacznych skutkach biologicznych należy peroksydacja lipidów. Reakcję tę inicjuje rodnik hydroksylowy, który odrywa atom wodoru z nienasyconego kwasu tłuszczowego np. malonowego. W wyniku tej reakcji powstaje produkt, który łatwo reaguje z tlenem cząsteczkowym, co prowadzi do powstania kolejnej RFT tj. rodnika ponadtlenkowego. Rodnik ten z kolei odrywa atom wodoru z następnej cząsteczki kwasu tłuszczowego, prowadząc do wytworzenia hydroksynadtlenku lipidu (ROOH), tym samym rodnik hydroksylowy zapoczątkowuje „reakcję łańcuchową” w wytwarzaniu reaktywnych form tlenu w komórce, w następstwie czego następuje uszkodzenie błon biologicznych.

### **Zadanie 1. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) metodą spektrofotometryczną**

Spektrofotometryczna metoda oznaczania aktywności SOD polega na oznaczeniu stopnia redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) przez anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ), powstający w wyniku fotochemicznej redukcji ryboflawiny na świetle. Forma utleniona NBT (barwa żółta) ulega redukcji przez  $O_2^{\cdot-}$  do formy diformazanowej (barwa fioletowa). Reakcja redukcji NBT hamowana jest przez SOD. Aktywność SOD wyrażamy w jednostkach aktywności [U] na mg białka. 1[U] - jednostka aktywności, określa taką ilość enzymu która powoduje 50% inhibicję reakcji redukcji NBT.

#### **Przygotowanie ekstraktu**

Odważyć po 1,5 g liści kukurydzy z roślin wyhodowanych przy wysokim i niskim natężeniu światła i utrzyć je w 2,5 ml mieszaniny izolacyjnej zawierającej 0,1 M bufor fosforanowy, 3 mM  $MgSO_4$ , 1 mM ditiotreitol (DTT), i 3 mM EDTA w temp. 4°C. Homogenat wirować przez 10 min. przy 12000 x g w temp. 4°C. Supernatant zebrać pipetą znad osadu, oznaczyć zawartość białka i aktywność SOD.

#### **Oznaczanie białka metodą Bradford**

Oznaczenie należy wykonać w dwóch powtórzeniach dla każdego wariantu doświadczalnego. Do probówki o objętości 5 ml odpipetować po 25  $\mu$ l ekstraktu białkowego (supernatantu), a następnie dodać 0,475 ml wody destylowanej (końcowa objętość powinna wynosić 0,5 ml). Przygotować również próbę zerową (ślepa), w której znajdować się będzie tylko 0,5 ml wody (bez ekstraktu białkowego). Następnie

do wszystkich probówek dodać 2,5 ml odczynnika Bradford (tak, aby cała objętość mieszaniny wynosiła 3 ml). Probówki należy dokładnie wymieszać i inkubować przez ok 15 min w temperaturze pokojowej. Odczytać absorbancję badanych roztworów przy długości fali 595 nm wobec próby zerowej. Ilość białka całkowitego należy odczytać z krzywej wzorcowej.

### **Oznaczanie aktywności SOD**

Przygotować mieszaninę reakcyjną o składzie:

- |                                  |                  |
|----------------------------------|------------------|
| – 0,1 M bufor fosforanowy pH-7,8 | 2,2 ml           |
| – 0,015 mM ryboflawina           | 0,25 ml          |
| – 0,156 M metioniny              | 0,25 ml          |
| – 0,756 mM NBT                   | 0,25 ml          |
| – ekstrakt roślinny              | 80 µg białka     |
| – woda                           | dopełnić do 3 ml |

Próba kontrolna zawiera zamiast ekstraktu roślinnego 50 µl H<sub>2</sub>O, pozostałe składniki są takie same jak w mieszaninie reakcyjnej.

Przygotować do inkubacji:

#### 1. Próby z H<sub>2</sub>O (bez ekstraktu) – 100% reakcji redukcji NBT

próba ślepa – 1 powtórzenie, inkubować 20 min w ciemności w temp. 25°C

próby badane – 3 powtórzenia, inkubować 20 min na świetle w temp. 25°C

#### 2. Próby z ekstraktem – hamowanie reakcji redukcji NBT

próba ślepa - 1 powtórzenie, inkubować 20 min w ciemności w temp. 25°C

próby badane – 3 powtórzenia, inkubować 20 min na świetle w temp. 25°C

Po okresie inkubacji zmierzyć absorbancję przy długości fali  $\lambda = 560$  nm. W badanych próbach wyliczyć aktywność SOD.

Przykład wyliczenia aktywności SOD:

1 [U] = 50% hamowania reakcji redukcji NBT

100% reakcji = 0,395 (E<sub>560</sub> prób z H<sub>2</sub>O)

x% reakcji = 0,227 (E<sub>560</sub> prób z ekstraktem)

$$x = 57,5\%$$

% inhibicji = 100% - x% reakcji

% inhibicji = 100% - 57,7% = 42,3%

42,3% : 50% = 0,85 [U] (w 50  $\mu$ l ekstraktu) – 80  $\mu$ g białka

x [U] – 1000  $\mu$ g białka

$$x = 10,6 [U]$$

## Stres solny

Rośliny w różnym stopniu są wrażliwe na obecność soli w podłożu i z tego względu dzieli się je na glikofity – takie, które nie tolerują wysokiego stężenia soli (np. kukurydza, cebula, ryż, sałata, fasola) oraz halofity (rośliny słonolubne) bardziej odporne na zasolenie (np. sodówka nadmorska – *Suaeda maritima*, *Atriplex nummularia*, burak zwyczajny – *Beta vulgaris*). Duże stężenie soli (nie tylko NaCl) powoduje obniżenie potencjału wodnego gleby i w związku z tym, mimo obecności wody w podłożu, nie jest ona dostępna dla roślin. W takich warunkach, rośliny wykazują podobne reakcje na stres, jakie obserwuje się w przypadku suszy. U roślin wrażliwych na zasolenie obserwuje się zahamowanie wzrostu oraz obniżenie wydajności fotosyntezy. Duże stężenie jonów w komórce (szczególnie jonów  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), wpływa na aktywność szeregu enzymów, uczestniczących np. w procesie fotosyntezy czy syntezy białek; może także zmieniać przepuszczalność błony komórkowej i powodować wypływ jonów  $\text{K}^+$  z komórki.

Rośliny wykształciły szereg mechanizmów pozwalających im na funkcjonowanie w warunkach dużego zasolenia. Halofity, na powierzchni liścia, posiadają gruczoły, do których transportowany jest nadmiar jonów i krystalizująca się tam sól nie jest więcej szkodliwa dla organizmu. Rośliny mogą również obniżyć potencjał wody w komórce, po to, by zwiększyć różnicę potencjałów między środowiskiem zewnętrznym a jej wnętrzem. Dwa procesy wpływają na obniżenie potencjału, jednym z nich jest magazynowanie nadmiaru jonów w wakuoli, a drugim synteza substancji osmotycznie czynnych takich jak betaina glicyny, prolina, sorbitol, mannitol. Ponadto, podobnie jak w przypadku suszy, obserwowane jest zmniejszenie powierzchni liści czy ich opadanie, pozwala to na obniżenie transpiracji (utrąty wody z organizmu). Rośliny wrażliwe na zasolenie, mogą tolerować umiarkowane stężenia soli dzięki mechanizmowi redukującemu transport jonów z korzenia do pędu, natomiast u halofitów dobrze rozwinięte są mechanizmy pozwalające na akumulację nadmiaru jonów w pędach.

### Zadanie 1. Wpływ stresu solnego na zawartość proliny w liściach.

#### Wykonanie ćwiczenia

0,5 g liści kukurydzy rosnącej na pożywce pełnej oraz na pożywce pełnej z dodatkiem NaCl w stężeniu 0.1 M i 0,2 M utrzeć w 10 ml 3% kwasu sulfosalicylowego. Homogenat przesączyć. Do czystej probówki odpipetować 2 ml odpowiedniego ekstraktu, 2 ml kwasu octowego oraz 2 ml roztworu ninhydryny. Probówki dobrze wytrząsnąć, zatkać watą i umieścić na 1 godz. we wrzącej łaźni wodnej. Reakcję przerwać umieszczając próby na 5 min w lodzie. Próby ogrzać do temperatury pokojowej i następnie dodać 2 ml toluenu i dobrze wytrząsnąć. Po rozdzieleniu się warstw, zmierzyć absorbancję warstwy górnej (toluenu) przy długości fali 520 nm, wobec toluenu jako próby ślepej. Stężenie proliny odczytać z krzywej wzorcowej. Obliczyć zawartość proliny w badanych próbach, wyciągnąć wnioski.



## WPLYW ZANIECZYSZCZENIA ŚRODOWISKA NA WYBRANE PROCESY FIZJOLOGICZNE ROŚLIN

**Zapoznanie z wybranymi metodami monitorowania kondycji fizjologicznej roślin na przykładzie wpływu herbicydu Roundup na wzrost i rozwój rośliny.**

Herbicydy to związki stosowane do zwalczania chwastów oraz innej niepożądananej roślinności. Herbicyd zawiera jedną lub kilka substancji aktywnych, które powodują np. zablokowanie ważnego szlaku metabolicznego. Efektem jest zahamowanie wzrostu i rozwoju rośliny, a w dalszej konsekwencji jej obumarciu. Herbicydy dzielą się na selektywne (zwalczające tylko określone gatunki lub grupy roślin) oraz nieselektywne (działające na wszystkie rośliny). Te ostatnie mogą być zagrożeniem dla roślin uprawnych (pomijając fakt, że większość herbicydów jest toksyczna dla pszczół i ryb), gdy niewielka nawet ilość herbicydu przedostanie się do gleby z obszaru, na którym zastosowano ten środek.

Oczywistym jest, że spadek kondycji fizjologicznej rośliny ma wpływ na plon czy tempo wzrostu. Celem ćwiczenia jest pokazanie, jak wykorzystując metody fizjologii roślin można określić kondycję fizjologiczną roślin, na którą składa się funkcjonowanie najważniejszych procesów fizjologicznych oraz zawartość ważnych dla rozwoju rośliny substancji. Do zadania wykorzystany zostanie Roundup – powszechnie stosowany herbicyd nieselektywny. Substancją aktywną jest tu glifosat – związek hamujący syntezę aminokwasów aromatycznych i porfiryn.

***PYTANIE: Jak objawi się zahamowanie syntezy aminokwasów aromatycznych i porfiryn? Na zawartość jakich związków i na jakie procesy fizjologiczne będzie to miało wpływ? Spróbuj przewidzieć wynik doświadczenia.***

## **Kompleksowa ocena stanu fizjologicznego roślin grochu/kukurydzy potraktowanych różnymi stężeniami herbicydu Roundup**

### **Zadanie 1. Biometria** (5 roślin z każdego wariantu).

Należy dokonać pomiarów długości części nadziemnych i podziemnych roślin, a następnie zważyć masę korzeni i pędów. Należy pamiętać o osuszeniu na bibule korzeni! Wyniki należy zestawić w tabeli:

<b>Stężenie herbicydu [mg/l substancji aktywnej]</b>	<b>0 (kontrola)</b>	<b>30</b>	<b>60</b>
Długość pędu [cm]			
Długość korzenia [cm]			
Procent zahamowania wzrostu pędu, w stosunku do kontroli	0		
Procent zahamowania wzrostu korzenia, w stosunku do kontroli	0		
Masa części nadziemnych [g]			
Masa części podziemnych [g]			
Procent zahamowania przyrostu masy części nadziemnych, w stosunku do kontroli	0		
Procent zahamowania przyrostu masy części podziemnych, w stosunku do kontroli	0		

### **Zadanie 2. Oznaczanie zawartości białek rozpuszczalnych.**

#### **Ekstrakcja białek z materiału roślinnego**

Odważyć próbki po 0,1 g materiału roślinnego (korzenie wypłukać w wodzie bieżącej, a następnie w wodzie destylowanej i dokładnie osuszyć na bibule). Tkanę roślinną przenieść do schłodzonego moździerza i rozetrzeć z dodatkiem 0,5 ml buforu do otrzymywania białek (np. 50mM Tris- HCl, pH 7.5). Utartą próbę przenieść za pomocą pipety do probówki typu Eppendorf o poj. 2 ml. Następnie wymyć moździerz trzykrotnie, odmierzonymi porcjami buforu (3 x 0,5 ml), uzupełniając tym samym probówkę do 2 ml. Próby wirować przez 10 min. przy 18000 g. Zebrać dokładnie supernatant, przenieść do czystej probówki Eppendorf i zmierzyć jego objętość. W otrzymanym supernatancie oznaczyć białko metodą Bradford.

**UWAGA!!!** Należy dokładnie zanotować masę próby oraz ilość uzyskanego po wirowaniu supernatantu, gdyż są to wartości niezbędne do obliczenia całkowitej zawartości białka i wyrażenia jej np. na gram świeżej masy.

### **Oznaczenie zawartości białka metodą Bradford**

Oznaczenie wykonać w taki sposób jak opisano w rozdziale „Stres oksydacyjny”. Zawartość białka w próbach przeliczyć na 1 g świeżej masy badanych organów.

### **Zadanie 3. Oznaczanie barwników asymilacyjnych w liściach.**

Oznaczenie zawartości barwników asymilacyjnych w liściach grochu kontrolnych i poddanych działaniu herbicydu wykonać tak jak opisano w rozdziale „Barwniki asymilacyjne”.

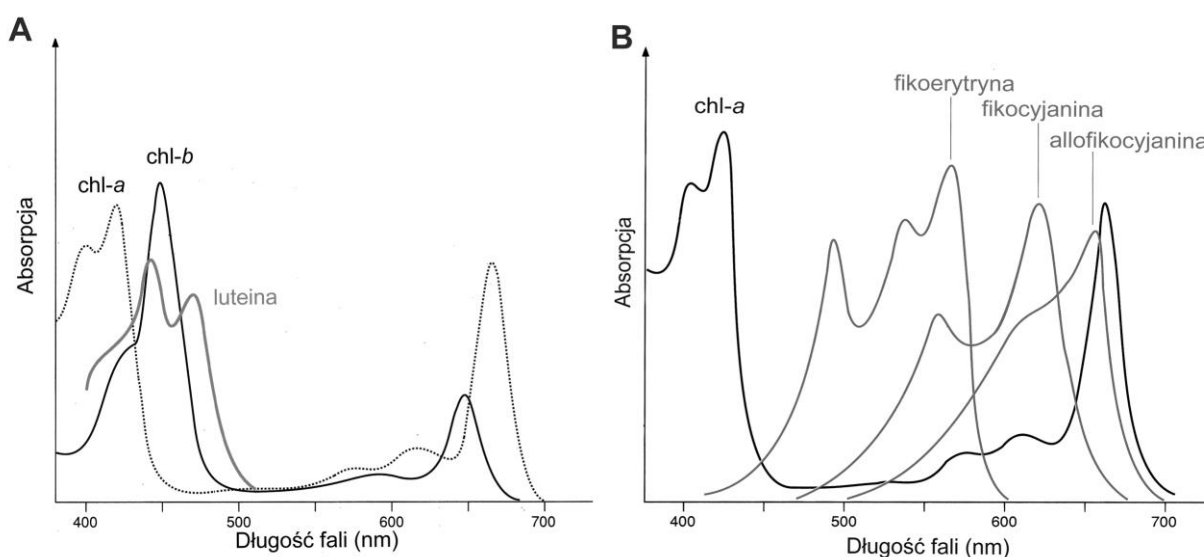
### **Zadanie 4. Pomiary fluorescencji chlorofilu *a* w warunkach *in vivo*.**

Pomiary wykonać tak jak jest to opisane w rozdziale „Fluorescencja chlorofilu *a* jako miara aktywności fotosyntetycznej liści”.

## BARWNIKI ASYMLACYJNE

Wszystkie organizmy fotosyntetyzujące posiadają barwniki odpowiedzialne za absorpcję światła (reakcja fotofizyczna) i uwalnianie elektronów (reakcja fotochemiczna). Barwniki są związkami niskocząsteczkowymi i w błonach tylakoidów występują najczęściej w formie powiązanej (w sposób niekowalencyjny lub kowalencyjny) z polipeptydami tworząc kompleksy białkowo – barwnikowe.

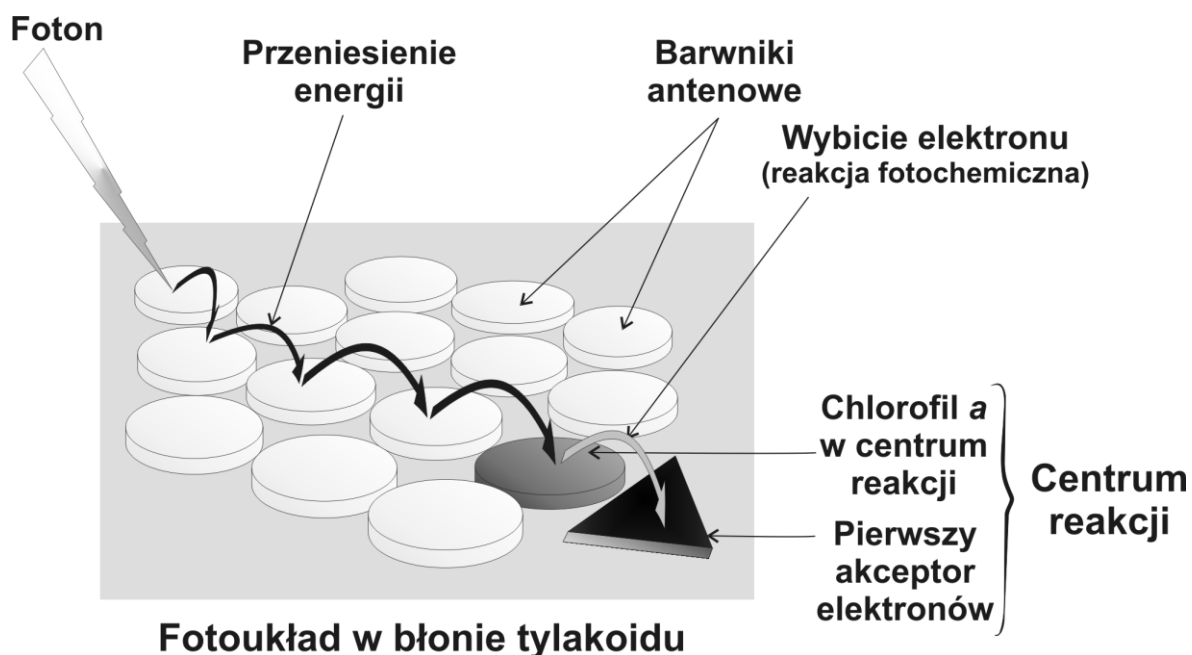
Wyróżniamy trzy grupy barwników asymilacyjnych: chlorofile, karotenoidy i fikobiliny. Różnią się one budową, zakresami światła widzialnego, które mogą pochłaniać (Rys. 1), właściwościami, a także pełnionymi funkcjami. Wspólną cechą tych związków, pozwalającą im absorbować promieniowanie świetlne, jest obecność w ich budowie układu wiązań sprzężonych.



**Rys. 1** Widma absorpcyjne barwników asymilacyjnych roślin wyższych (A) oraz sinic i krasnorostów (B).

Barwnikiem zdolnym do przeprowadzania reakcji fotochemicznej jest chlorofil *a* i to tylko te cząsteczki znajdujące się w centrach reakcji fotoukładu II (P680) i fotoukładu I (P700). Występuje on u wszystkich organizmów fotosyntetyzujących (u bakterii jest to bakteriochlorofil *a*). Pozostałe cząsteczki chlorofilu *a* oraz inne typy barwników (chlorofile *b*, *c*, *d*, karotenoidy, fikobiliny) określane są jako barwniki pomocnicze lub antenowe, ponieważ ich rolą jest wychwytywanie energii świetlnej i przekazywanie jej, na drodze rezonansu, do centrów reakcji (Rys. 2). U różnych grup organizmów mogą występować różne barwniki pomocnicze: chlorofil *b* występuje u roślin wyższych, paprotników, mszaków i zielenic; chlorofile *c* i *d* są to barwniki charakterystyczne dla tych grup glonów, u których nie ma chlorofilu *b*. Fikobiliny występują u sinic i u krasnorostów, a zakres światła jaki absorbują pozwala tym organizmom rosnąć w środowisku wodnym na dużych głębokościach, gdzie dociera głównie światło o barwie zielono-żółtej. Barwniki z grupy karotenoidów (karoteny i ksantofile) pełnią nie tylko funkcję pomocniczą w wychwytywaniu energii świetlnej ale ich zadaniem jest także ochrona aparatu

fotosyntetycznego przed uszkodzeniami spowodowanymi nadmiarem energii wzbudzenia docierającym do centrów reakcji i rozpraszanie jej w postaci ciepła (cykl ksantofilowy).



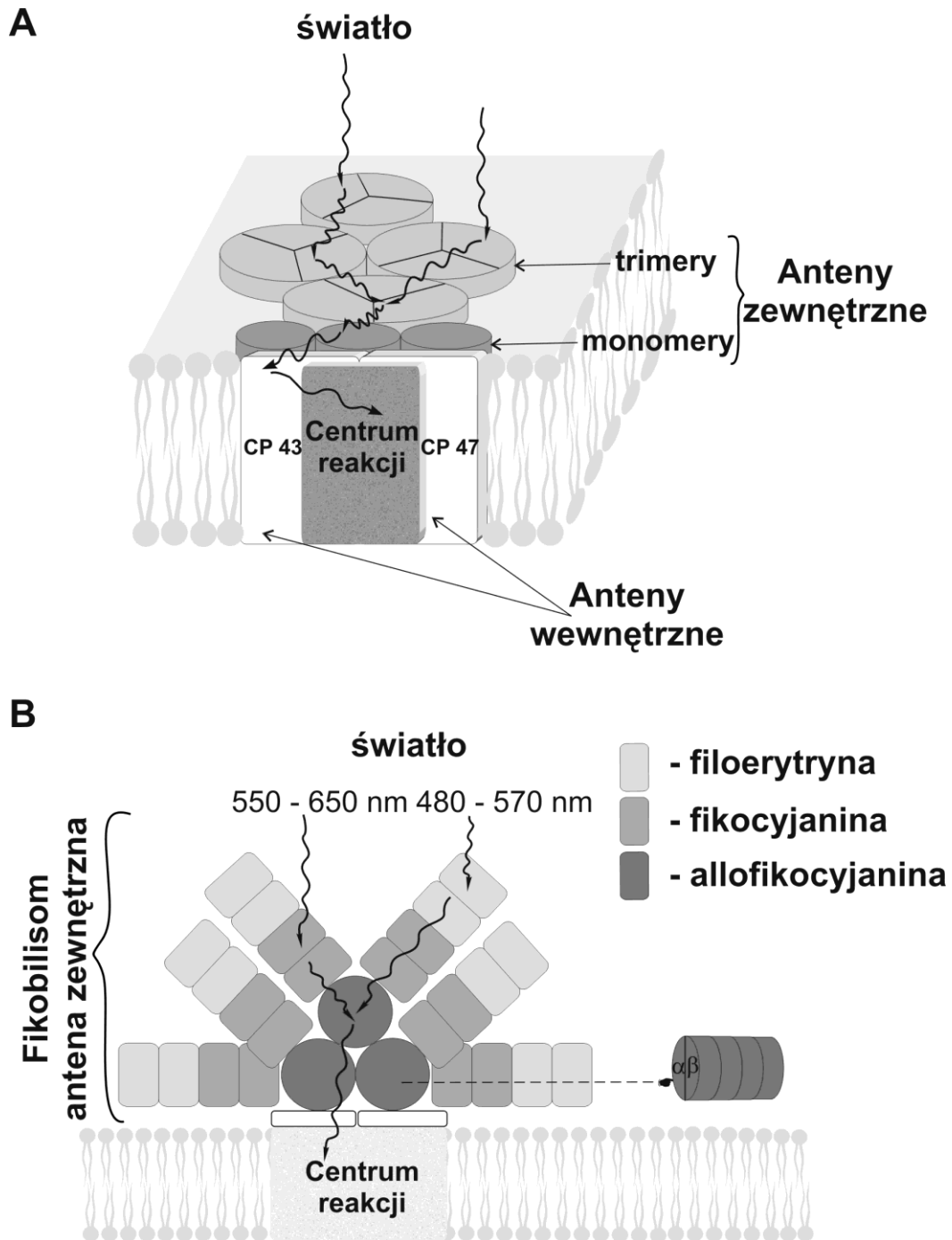
**Rys. 2** Schemat przenoszenia energii z barwników antenowych do centrum reakcji.

Organizacja barwników asymilacyjnych *in vivo* polega na skompleksowaniu ich z białkami w płynną mozaikę, wiązania te nie mają charakteru wiązań kowalencyjnych (wiązania labilne). Jedynie w przypadku występujących u sinic i krasnorostów fikobilisomów, fikobiliny łączą się z białkami wiązaniami kowalencyjnymi.

Fotoukłady, zarówno te występujące u bakterii i sinic jak i te u glonów i roślin wyższych, mają podobny schemat budowy i składają się z trzech głównych komponentów:

- Centrum reakcji – kompleks białkowy gdzie znajdują się dimery chlorofilu *a* (u roślin wyższych P680 i P700), odpowiedzialne za przeprowadzenie reakcji fotochemicznej.
- Anteny wewnętrzne – kompleksy białkowo–barwnikowe, tworzące razem z centrum reakcji część rdzeniową fotoukładów. Barwnikami wchodzącymi w skład tego kompleksu, u roślin wyższych, są: chlorofil *a* i  $\beta$ -karoten.
- Anteny zewnętrzne lub peryferyczne – również kompleksy białkowo–barwnikowe. W błonach tylakoidów, u roślin wyższych, tworzą złożone struktury i mogą występować w postaci dimerów (LHCI – anteny zewnętrzne fotoukładu I), monomerów (anteny zewnętrzne tylko fotoukładu II, nazywane również mniejszym kompleksem antenowym) jak również trimerów (kompleks LHCII, nazywany również dużym kompleksem antenowym, zwykle związany z fotoukładem II ale w określonych warunkach może przyłączać się do fotoukładu I) (Rys. 3A). Kompleksy te wiążą chlorofile *a* i *b* (charakteryzują się niskim stosunkiem chlorofilu *a/b* ok. 1,4) oraz ksantofile – głównie luteinę i neoksantynę. U sinic i krasnorostów funkcję anten zewnętrznych pełni struktura

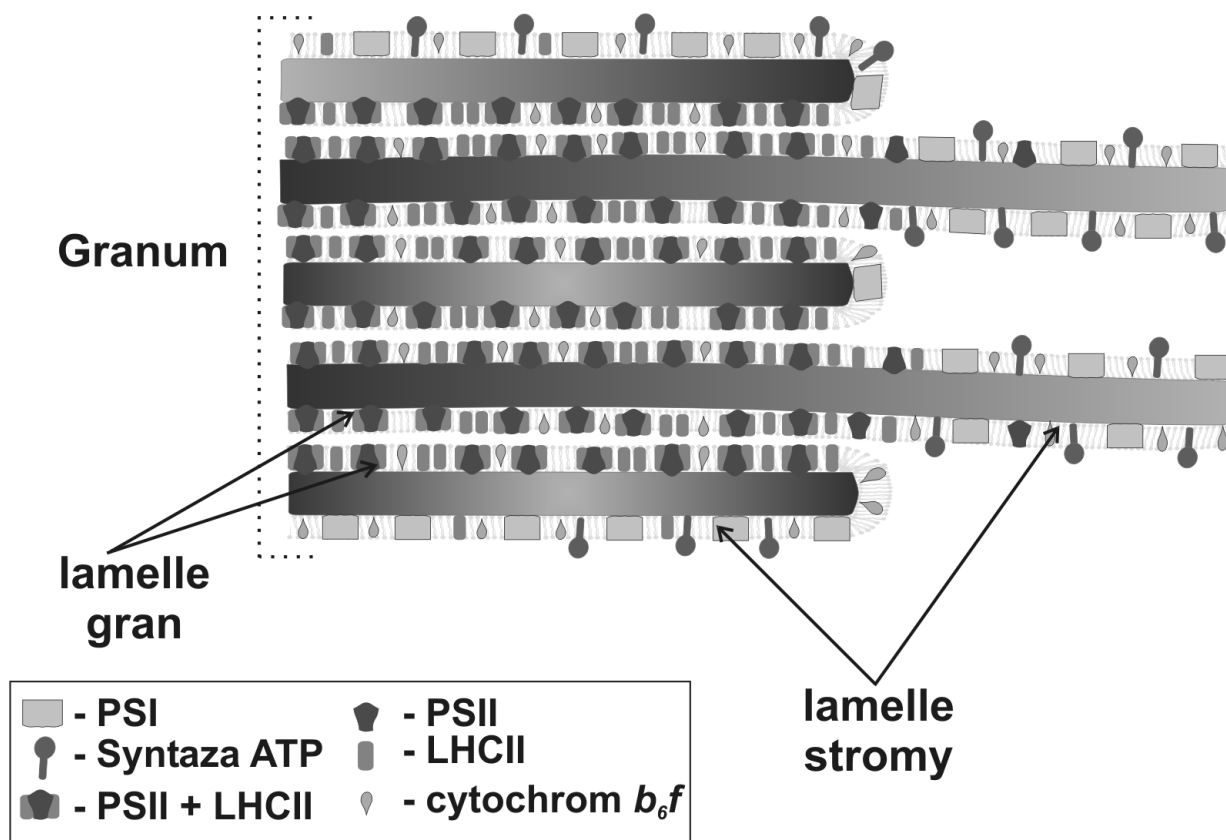
zwana fikobilisomem (Rys. 3B), zlokalizowana na zewnątrz błony od strony stromy. Struktura ta zbudowana jest z białek – fikobiliprotein, do których dołączone są cząsteczki barwników z grupy fikobilin – fikoerytryna, fikocyjanina, allofikocyjanina.



**Rys. 3** Schemat budowy i przenoszenia energii w obrębie fotoukładu II u roślin wyższych (**A**) oraz sinic i krasnorostów (**B**).

Kompleksy odpowiedzialne za przeprowadzanie fazy jasnej fotosyntezy rozmieszczone są nierównomiernie w błonach tylakoidów roślin wyższych (Rys. 4). Taki układ pozwala na ściślejsze upakowanie kompleksów barwnikowych, efektywniejsze wykorzystanie energii świetlnej a także

zapobiega niekontrolowanemu odpływowi energii z anten fotoukładu II (obecny głównie w granach) na fotoukład I (zlokalizowany w lamellach stromy), który charakteryzuje się większą aktywnością niż fotoukład II.



**Rys. 4** Schemat rozmieszczenia w błonach tylakoidów roślin wyższych, kompleksów odpowiedzialnych za przeprowadzanie fazy jasnej fotosyntezy.

**Celem ćwiczenia** jest zapoznanie się z metodą ilościowego oznaczania barwników asymilacyjnych oraz ich składem ilościowym i jakościowym w dojrzałych i starzejących się liściach roślin wyższych.

**Przygotowując się do ćwiczeń należy zwrócić uwagę na następujące zagadnienia:** budowę i właściwości barwników asymilacyjnych; biosyntezę chlorofili, karotenoidów i fikobilin; rolę barwników w procesie fotosyntezy.

**Uwaga!** Ze względu na pracę z rozpuszczalnikami organicznymi podczas wykonywania ćwiczeń należy zachować szczególną ostrożność.

### Zadanie 1. Otrzymywanie barwników asymilacyjnych.

Do 0,5 g liści dodać 0,5 ml 100% acetonu, szczyptę  $\text{CaCO}_3$  i odrobinę piasku, wszystko rozetrzeć dokładnie w moździerzu, następnie przenieść ilościowo na lejek Schotta i przesączyć pod obniżonym ciśnieniem. Moździerz i pozostałość na filtrze dokładnie przemywać małymi porcjami acetonu – roztwór 80% i sączyć. Końcową objętość przesączu ustalić 80% roztworem acetonu w kolbie miarowej na 25 ml.

### Zadanie 2. Ilościowe oznaczanie chlorofili i karotenoidów.

Otrzymany ekstrakt barwników rozcieńczyć 80% acetonem według wskazań prowadzącego, tak aby wartości absorpcji mieściły się w zakresie 0,1 – 0,6. Zmierzyć absorpcję przy długościach fal: 646,8; 663,2 i 470 nm, stosując 80% roztwór acetonu jako próbę odniesienia. Wyliczyć:

- zawartość chlorofili *a* i *b* oraz karotenoidów na 1 g świeżej masy liści pamiętając o dokonanych rozcieńczeniach,
- stosunek chlorofilu *a/b*
- stosunek chlorofili do karotenoidów.

### Wzory do wyliczania stężeń (w $\mu\text{g/ml}$ ) barwników:

$$\text{Chl } a = 12,25A_{663,2} - 2,79A_{646,8}$$

$$\text{Chl } b = 21,50A_{646,8} - 5,10A_{663,2}$$

$$\text{Kar} = \frac{1000A_{470} - 1,82C_{\text{chl } a} - 85,02C_{\text{chl } b}}{198}$$

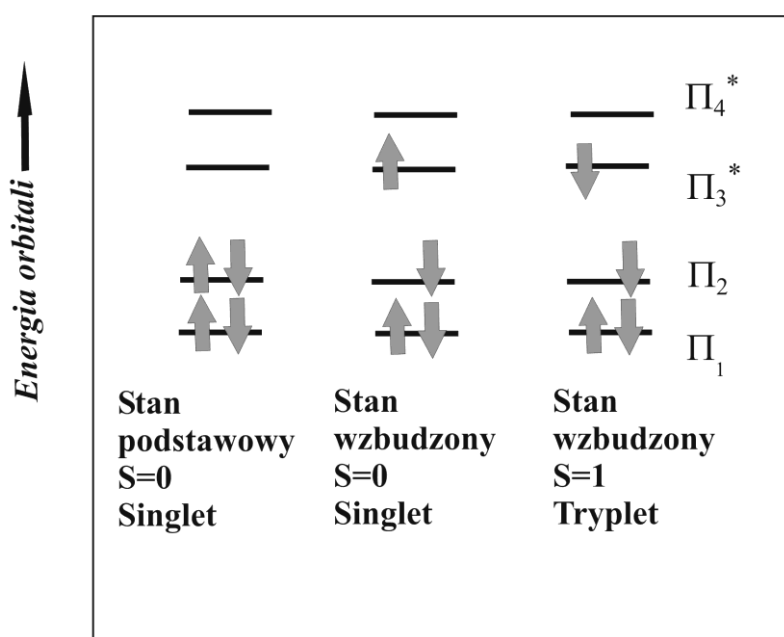
gdzie  $C_{\text{chl } a}$  i  $C_{\text{chl } b}$  – stężenie odpowiednio chlorofilu *a* i chlorofilu *b* ( $\mu\text{g/ml}$ ).



# FLUORESCENCJA CHLOROFILU *a* JAKO MIARA AKTYWNOŚCI FOTOSYNTETYCZNEJ

## LIŚCI

Światło absorbowane przez cząsteczkę chlorofilu wprowadza ją w stan wzbudzenia, poprzez przeniesienie elektronu ze stanu podstawowego na orbital o wyższej energii. Chlorofil (Chl) absorbuje światło niebieskie i czerwone, przy czym kwanty światła niebieskiego (o wyższej energii niż światła czerwonego) powodują przejście elektronu na wyższy poziom energetyczny, zwany drugim singletowym stanem wzbudzenia (S2). Stan S2 jest nietrwały i niemal natychmiast ( $10^{-13}$  s) następuje nieradiacyjny (z emisją ciepła) powrót na poziom energetyczny zwany pierwszym stanem singletowym (S1), odpowiadający energii dla kwantów światła czerwonego. Stan S1 jest na tyle trwały ( $10^{-8}$  s), że pozwala na uruchomienie fotosyntetycznego transportu elektronów. Jednak nie wszystkie elektrony z tego stanu wzbudzenia są wykorzystane do procesów fotochemicznych i część z nich powraca do stanu podstawowego, w czasie 1 ns, oddając energię w formie promieniowania świetlnego (fluorescencja) i/lub termicznego. Ponieważ powrót ten następuje z poziomu pierwszego stanu wzbudzenia, to emitowany kwant światła ma energię odpowiadającą barwie czerwonej. Emisji fluorescencji zawsze towarzyszy emisja ciepła, więc emitowany kwant ma mniejszą energię, a zatem większą długość fali niż światło absorbowane.



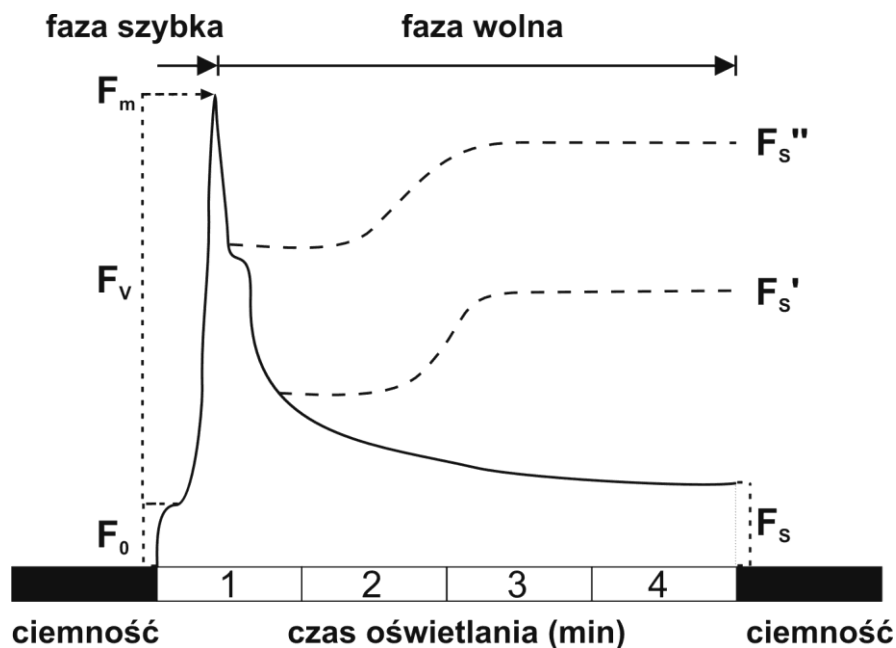
**Rys.1.** Stany wzbudzone elektronów.

Intensywność fluorescencji zależy od ilości cząsteczek chlorofilu znajdujących się aktualnie w stanie wzbudzonym (o tzw. zamkniętych pułapkach energetycznych, niezdolne do przyjmowania elektronów). Im jest ich więcej tym intensywniejsza fluorescencja, osiągająca maksymalnie 3-5% pochłoniętego światła. W liściach zaadaptowanych do ciemności, pułapki energetyczne są otwarte i fluorescencja stanowi ok. 0.6% pochłoniętego światła. Fluorescencja Chl *a* odzwierciedla aktywność

aparatu fotosyntetycznego i jest miarą aktywności fotosyntetycznej liścia. Fluorescencja mierzona w temperaturze pokojowej pochodzi głównie z anten energetycznych fotoukładu II (PSII), natomiast w temperaturze ciekłego azotu (77 K, tzn. -196°C) można dokonać pomiaru fluorescencji pochodzącej z anten PSI oraz części rdzeniowej centrum reakcji PSII.

Analiza parametrów fluorescencji Chl *a* pozwala oceniać aktywność fotosyntetyczną *in vivo* co jest szczególnie przydatne w sytuacjach oddziaływania na rośliny różnorodnych stresów środowiskowych, które powodują uszkodzenia w obrębie PSII.

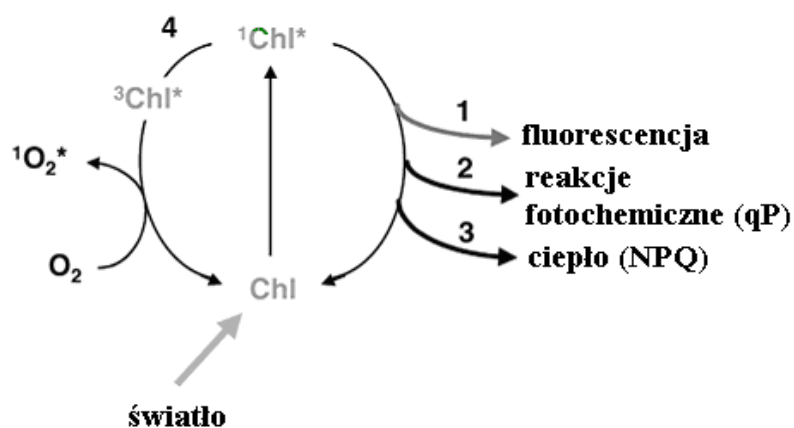
Pomiary fluorescencji Chl *a* rozpoczyna się od oświetlenia liści zaadaptowanych (15 – 20 minut) do ciemności, światłem o takiej intensywności, aby możliwie wszystkie pułapki energetyczne były otwarte. Następuje wówczas emisja fluorescencji o słabym natężeniu zwana fluorescencją podstawową ( $F_0$ ) (Rys. 2). Następnie fluorescencja narasta do momentu aż wszystkie pułapki energetyczne PSII ulegają zamknięciu i natężenie fluorescencji jest wówczas maksymalne ( $F_m$ ). Różnica między fluorescencją maksymalną ( $F_m$ ) a podstawową ( $F_0$ ) nosi nazwę fluorescencji zmiennej ( $F_v$ ). Wydajność fluorescencji ( $F_v$ ) może spadać pod wpływem stresowych czynników środowiska, uszkadzających błony tylakoidów. Czas, w którym fluorescencja osiąga połowę wartości  $F_m$  określamy jako  $t_{1/2}$ . Parametr ten określa wielkość systemów antenowych i ilość puli plastochinonowej, jest niższy np. u roślin przystosowanych do niskich natężeń światła (z uwagi na obecność większych anten i niższą pulę plastochinonu) w porównaniu z roślinami rosnącymi w wysokich natężeniach światła. Po osiągnięciu fluorescencji maksymalnej następuje utlenianie puli plastochinonu i fluorescencja ulega obniżeniu. Po wzbudzeniu światłem aktywnym (rozproszonym) można mierzyć parametry fluorescencji w tkankach zaadaptowanych do światła. Osiągają one niższe wartości, niż w tkankach zaadaptowanych do ciemności, gdyż powracając do stanu oznaczanego  $F_0'$  gdzie pula plastochinonu nie zostaje całkowicie zredukowana, część centrów reakcji pozostaje zamknięta. Stosowanie okresowych błysków światła pozwala na szybsze osiągnięcie stanu równowagi oraz na pomiar składowych obniżania się natężenia fluorescencji, co nazywane jest wygaszaniem fotochemicznym (qP, zależnym od sprawności fotosyntetycznej liścia) i niefotochemicznym (NPQ, związanym z rozpraszaniem energii w postaci ciepła). Analiza parametrów fluorescencyjnych pozwala więc na określenie stanu fizjologicznego rośliny.



**Rys. 2** Kinetyka fluorescencji chlorofilu *a*.  $F_s$  – fluorescencja stała;  $F_s'$  i  $F_s''$  – fluorescencja stała podczas zwiększającego się stresu.

Podsumowując, utrata energii przez wzbudzone cząsteczki chlorofilu może być realizowana na kilka sposobów:

1. fluorescencja
2. wykorzystanie energii do przeprowadzenia reakcji chemicznych
3. wydzielenie energii w postaci ciepła
4. przejście do stanu tripletowego ( $^3\text{Cl}^*$ ) i powstanie reaktywnych form tlenu (wolnych rodników tlenowych)



**Rys. 3** Drogi powrotu wzbudzonego chlorofilu ( $^1\text{Chl}^*$ ) do stanu podstawowego.

**Celem doświadczenia** jest określenie, na podstawie oceny parametrów fluorescencyjnych Chl *a*, stanu aparatu fotosyntetycznego w liściach roślin poddanych działaniu czynników stresowych.

### **Zadanie 1. Pomiar fluorescencji Chl *a* *in vivo***

Wybrać po 2 – 3 rośliny kontrolne oraz zanieczyszczone herbicydem. Wskazane przez prowadzącego liście (w kontroli preferowane liście w najlepszej kondycji, w roślinach zanieczyszczonych liście z najlepiej widoczną zaburzoną syntezą chlorofilu) zacienić przy pomocy klipsów stanowiących element wyposażenia fluorymetru Hansatech FMS-1` na okres 20 minut. Następnie należy podłączyć liść do światłowodu i rozpocząć pomiar parametrów fluorescencji.

1.  $F_0$  fluorescencja podstawowa próbki adaptowanej do ciemności
2.  $F_m$  fluorescencja maksymalna próbki adaptowanej do ciemności
3.  $F_v$  fluorescencja zmienna ( $F_m - F_0 = F_v$ )
4.  $t_{1/2}$   $\frac{1}{2}$  czasu potrzebnego do osiągnięcia  $F_m$
5.  $F_v/F_m$  maksymalna wydajność kwantowa PSII próbki adaptowanej do ciemności

Uzyskane wyniki zestawiamy w tabeli, dyskutujemy i zapisujemy wnioski. Wyniki przedstawiające  $F_v/F_m$  ilustrujemy w postaci rysunku.

## FOTOSYNTENZA

Podczas fotosyntezy roślin oraz glonów światło powoduje przepływ elektronów od  $H_2O$  do  $NADP^+$  z wytworzeniem  $O_2$  i  $NADPH$ . Biorą w tym udział barwniki chloroplastów, głównie chlorofile, zorganizowane w dwóch fotosystemach (PSI i PSII), które łączy łańcuch przenośników elektronów i protonów. W czasie przepływu elektronów, protony są przenoszone w poprzek błony tylakoidowej do lumen, co wytwarza gradient potencjału elektrochemicznego. Kiedy protony przemieszczają się z powrotem, poprzez kompleks syntazy ATP, powstaje ATP. Szereg związków (tzw. rozpręgaczy) niweluje ten gradient i synteza ATP nie zachodzi. Produkty reakcji świetlnych ( $NADPH$  i ATP) zużywane są w reakcjach ciemniowych (do wiązania  $CO_2$  w cyklu Calvina).

### **Zadanie 1. Reakcja Hilla**

Ćwiczenie zapoznaje z metodą oznaczenia aktywności fotochemicznej izolowanych chloroplastów.

Reakcja fotochemiczna, czyli uwolnienie elektronu z centrum reakcji PSI i PSII, zachodzi wtedy, kiedy dostępny jest zarówno akceptor, jak i donor elektronu. W badaniach na izolowanych chloroplastach (lub tylakoidach), a zwłaszcza przy pomiarze aktywności PSI lub PSII, stosowane są sztuczne donory i akceptory elektronów (np. askorbinian, benzochinon, metyl viologen).

Zastosowanie żelazicyjanku jako akceptora elektronów pozwala na oznaczenie łącznej aktywności PSI i PSII, gdyż, ze względu na jego właściwości (nieprzenikalność przez błonę tylakoidu, wysoki potencjał oksydoredukcyjny  $E_{m7} = 430$  mV), przejmuje on elektrony z obu fotosystemów (reakcja Hilla). W obecności żelazicyjanku izolowane chloroplasty wydzielają  $O_2$  na świetle, a elektrony powstałe z rozszczepienia  $H_2O$  redukują żelazicyjanek do żelazocyjanku.

### **Izolowanie chloroplastów**

Przygotować mieszaninę do izolacji chloroplastów w następujący sposób: odważyć 13.6 g sacharozy w zlewce, dodać 50 ml buforu fosforanowego (0.05 M, pH 7.8) i 10 ml 0.1 M roztworu NaCl, i rozpuścić. Następnie, przelać do cylindra i uzupełnić wodą do objętości 100 ml. Celem wymieszania roztworu przelewać kilkakrotnie z cylindra do zlewki i pozostawić w cylindrze.

Odważyć 15 – 18 g fragmentów z liści sałaty i homogenizować w 90 ml przygotowanej mieszaniny; 10 ml pozostawić. Homogenat przesączyć przez odpowiedni materiał do sączenia chloroplastów np. fizelinę, przesącz przenieść do 2 probówek wirówkowych i wirować w  $4^{\circ}C$  przez 10 min. przy 3000 obr./min (ok. 2000 x g) w wirówce MPW 370. Supernatant odrzucić, a do osadu zawierającego chloroplasty dodać niewielką ilość mieszaniny izolacyjnej (3 – 4 ml) i wymieszać bagietką. Chloroplasty zebrane z obu probówek przenieść do homogenizatora Pottera. Jednorodną zawiesinę chloroplastów przenieść do małej zlewki i umieścić w lodzie.

## Redukcja żelazicyjanku przez chloroplasty

Przygotować mieszaninę reakcyjną z następujących składników:

0.10 M bufor fosforanowy, pH 8.0	- 20 ml
0.25 M chlorek magnezowy (Mg Cl <sub>2</sub> )	- 5 ml
0.25 M chlorek potasowy (KCl)	- 5 ml
0.01 M żelazicyjanek potasowy (K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> )	- 5 ml

Roztwory w/w ilościach przenieść do 50 ml kolby miarowej i uzupełnić wodą. Następnie, do 10 probówek odpipetować po 3 ml tej mieszaniny.

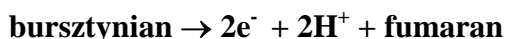
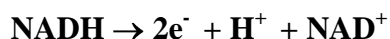
Do probówek z mieszaniną reakcyjną dodać po 0,2 ml zawiesiny chloroplastów i wymieszać. Dwie probówki przenieść do ciemności, a pozostałe na światło. Po 2, 4, 6 oraz 8 lub 10 min oświetlania dodawać do kolejnych par probówek po 0,5 ml 25% kwasu trójchlorooctowego (TCA), w celu przerwania reakcji. Probówki wymieszać. Po zakończeniu oświetlania, do probówek z ciemności również dodać TCA. Zawartość poszczególnych probówek przesączyć do probówek suchych. Zmierzyć absorbancję roztworów przy długości fali 420 nm.

Zależność absorbancji od czasu oświetlania chloroplastów przedstawić na wykresie. Zapisać równanie reakcji redukcji żelazicyjanku. Opisać i przedyskutować wyniki. Zapisać wnioski.

## ODDYCHANIE

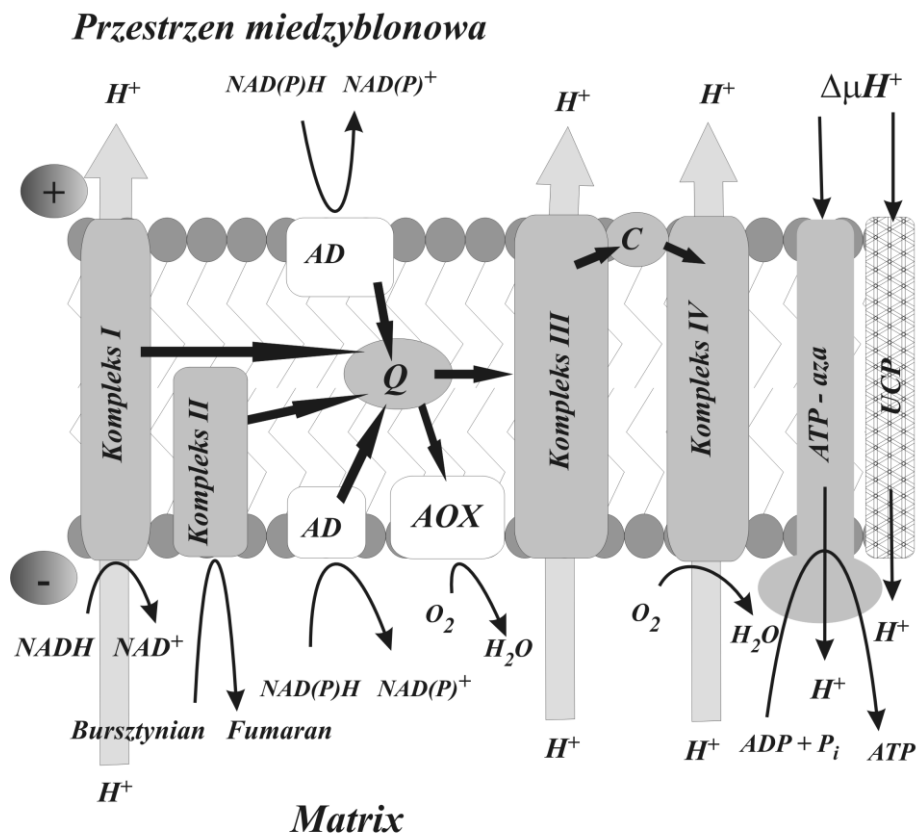
Oddychanie to proces utleniania związków organicznych. W oddychaniu tlenowym, gdzie czynnikiem utleniającym jest O<sub>2</sub>, produktami są woda, dwutlenek węgla oraz dodatkowo energia, z której część zamieniana jest na wysokoenergetyczne wiązanie w cząsteczce ATP, reszta zaś rozprasza się w postaci ciepła.

Oddychanie zachodzi w mitochondriach – organellach komórkowych otoczonych podwójną błoną. Powierzchnię błony wewnętrznej powiększają liczne uwypuklenia, zwane grzebieniami. Błona ta charakteryzuje się stosunkowo niską przepuszczalnością. Znajdują się w niej kompleksy białkowe, stanowiące składniki łańcucha oddechowego. Wewnętrzna część mitochondrium nosi nazwę matriks – tu z kolei zlokalizowane są enzymy cyklu Krebsa (cyklu kwasów trójkarboksylowych). W cyklu tym następuje utlenienie pirogronianu, powstającego w cytoplazmie w wyniku glikolizy, do dwutlenku węgla. Jednocześnie elektrony odrywane z utlenianego związku organicznego przekazywane są na NAD<sup>+</sup> i bursztynylo-koenzym A, które przekształcają się odpowiednio w NADH i bursztynian. Związki te następnie przekazują elektrony na łańcuch oddechowy.



Podstawowym celem oddychania zachodzącego w mitochondriach jest produkcja ATP. Powstaje ono w procesie zwanym fosforylacją oksydacyjną – fosforylacja ADP do ATP jest tu sprzężona z redukcją O<sub>2</sub> do H<sub>2</sub>O. Tlen redukowany jest przy użyciu elektronów pochodzących z NADH i bursztynianu. Przeniesienie elektronów na tlen następuje stopniowo, przy udziale przenośników elektronów – związków ulegających procesom utleniania i redukcji. Schematyczną budowę roślinnego łańcucha oddechowego przedstawia Rys. 1. Należy pamiętać o tym, iż działanie niektórych przenośników elektronów nie jest sprzężone z produkcją ATP. Związek ten powstaje tylko wówczas, gdy elektrony z NADH lub bursztynianu zostaną przeniesione na drogę cytochromową (jej nazwa pochodzi stąd, iż większość jej komponentów stanowią białka zwane cytochromami). W skład drogi cytochromowej wchodzi cztery kompleksy białkowe oraz cytochrom c, pula ubichinonu i syntaza ATP.

Do ustalenia sekwencji przenośników elektronów w łańcuchu oddechowym przyczyniło się zastosowanie rozmaitych inhibitorów oddychania – związków blokujących działanie poszczególnych kompleksów białkowych. To z kolei umożliwiło badanie jego fragmentów przy użyciu sztucznych akceptorów elektronów.



**Rys. 1.** Budowa łańcucha oddechowego w mitochondrium roślinnym. Kolor szary – kompleksy białkowe związane z drogą cytochromową, kolor biały – alternatywne białka przenoszące elektrony; C – cytochrom c, Q – puła ubichinonu, AD – alternatywne dehydrogenazy NAD(P)H, AOX – oksydaza alternatywna, UCP – białko rozprzęgające,  $\Delta\mu H^+$  - elektrochemiczny gradient protonowy. Zwróć uwagę na centralną pozycję ubichinonu oraz na ładunki po obu stronach błony.

- **Kompleks I** – dehydrogenaza NADH - zawiera FMN (mononukleotyd flawinowy) i białka Fe-S; odpowiada za transport elektronów z NADH na ubichinon, redukując go do ubichinolu. Na każde dwa elektrony przetransportowane przez kompleks I do przestrzeni międzybłonowej są pompowane dwa protony; inhibitor – rotenon.
- **Kompleks II** – dehydrogenaza bursztynianowa – zawiera FAD, białka z Fe związanym niehemowo, białka Fe-S; odpowiada za przenoszenie elektronów z bursztynianu na ubichinon (elektrony z NADH nie przechodzą przez ten kompleks!). Jego działanie nie jest sprzężone z transportem protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej.
- **Kompleks III** – zawiera cytochromy b, cytochrom  $c_1$  oraz białko Rieskie (białko Fe-S); odpowiada za przenoszenie elektronów z ubichinolu na cytochrom c. Transportowi elektronów przez ten kompleks towarzyszy pompowanie protonów do przestrzeni międzybłonowej; inhibitor – antymycyna A, myksotiazol.
- **Kompleks IV** – oksydaza cytochromowa - zawiera cytochromy a i  $a_3$  oraz dwa atomy Cu; odpowiada za przenoszenie elektronów z cytochromu c na tlen. Jej działanie jest sprzężone z transportem protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrium; inhibitor – cyjanek.

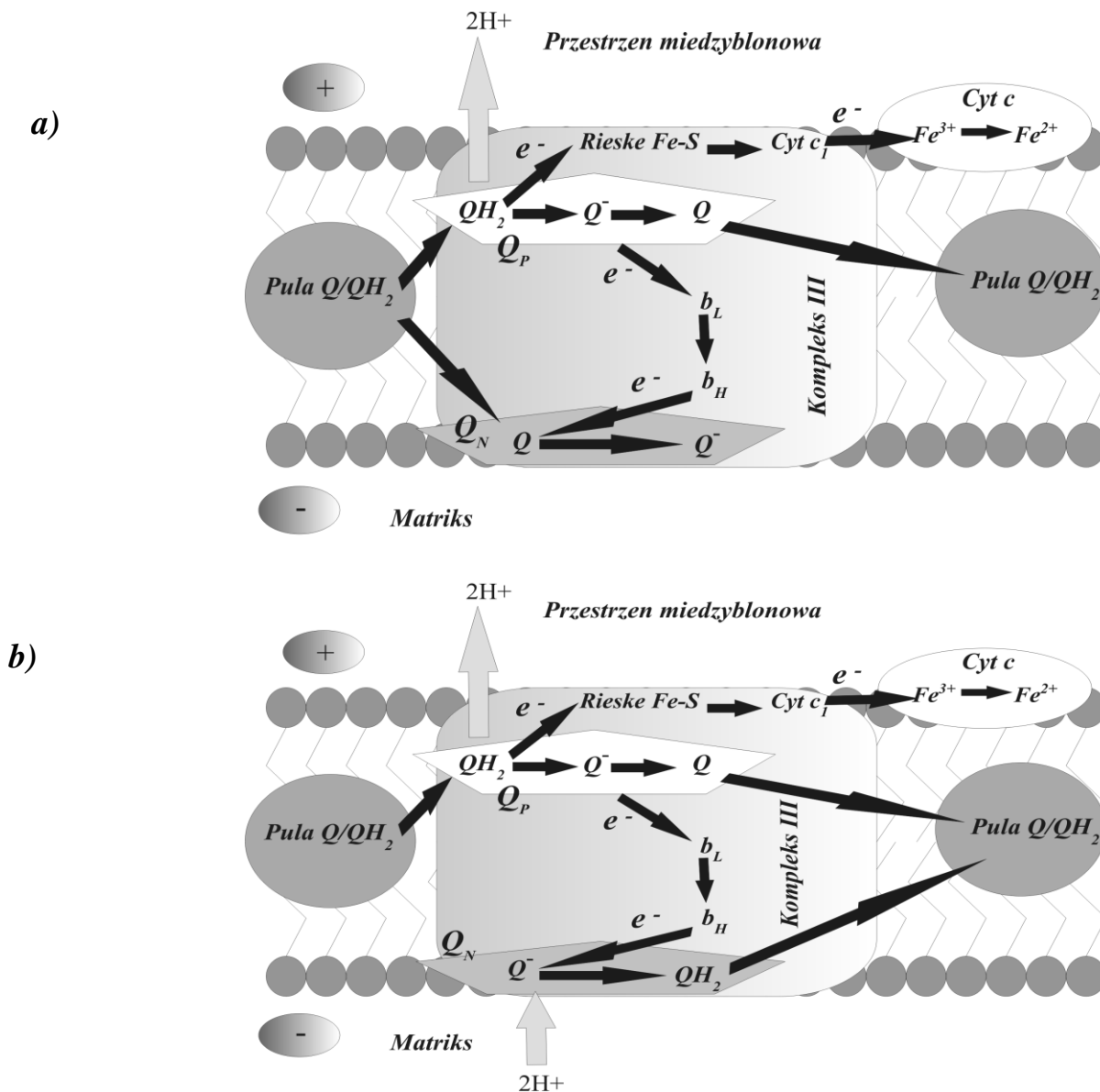


- **Syntaza ATP (kompleks V)** - wykorzystując elektrochemiczny gradient protonowy, przyczynia się do generowania ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego; inhibitor – oligomycyna.

Na Rys. 1 szczególną uwagę zwraca centralne położenie puli ubichinonu. Jest to związek rozpuszczalny w lipidach (może się swobodnie przemieszczać w obrębie błony), występujący w dwóch formach: utlenionej (ubichinon – Q) i zredukowanej (ubichinol – QH<sub>2</sub>), dzięki czemu może służyć jako przenośnik elektronów. Pula ubichinonu stanowi swego rodzaju „węzeł komunikacyjny” w obrębie łańcucha oddechowego: może przyjmować elektrony z kilku różnych przenośników (kompleks I, kompleks II, alternatywne dehydrogenazy NAD(P)H), po czym kieruje je albo na drogę cytochromową (kompleks III), albo na oksydazę alternatywną. Stosunek ilości ubichinonu do ubichinolu (Q/QH<sub>2</sub>) decyduje z kolei o stanie oksydoredukcyjnym mitochondrium.

Ważnym przełomem w historii badań nad działaniem łańcucha oddechowego było odkrycie mechanizmu przenoszenia elektronów z ubichinolu na kompleks cytochromowy b-c<sub>1</sub> (kompleks III). Model tego procesu opracował w latach 70-tych ubiegłego stulecia Mitchell i nazwał go Q-cykiem. Zakłada on istnienie w kompleksie III dwóch miejsc wiążących ubichinon, zlokalizowanych na przeciwległych stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej: Q<sub>p</sub> – miejsce utleniające ubichinol, leżące od strony przestrzeni międzybłonowej i Q<sub>n</sub> – miejsce redukujące ubichinon, zlokalizowane od strony matriks. Litery p i n to skróty odpowiednio od dodatnio i ujemnie naładowanej strony wewnętrznej błony mitochondrialnej.

Ubichinol związany w miejscu Q<sub>p</sub> jest utleniany dwustopniowo. Pierwszy uwalniany elektron transportowany jest do wysokopotencjałowej żelazo-sulfoproteiny – białko Rieske (E<sub>m</sub> = 280mV). Ubichinol przekształca się w anion ubisemichinonowy (Q<sup>-</sup>), który dostarcza drugi elektron do niskopotencjałowego hemu typu b (E<sub>m</sub> = -60mV) w cytochromie b<sub>566</sub>. Ten z kolei oddaje elektron na hem cytochromu b<sub>562</sub> (E<sub>m</sub> = 60mV), tzw. wysokopotencjałowy. Protony powstające podczas utleniania QH<sub>2</sub> w Q<sub>p</sub> uwalniane są do przestrzeni międzybłonowej. Cytochrom b<sub>562</sub> oddaje elektron na ubichinon związany w Q<sub>n</sub>, a ten zostaje zredukowany do anionu ubisemichinonowego (**Rys. 2a**). Aby ubichinon w Q<sub>n</sub> mógł zostać zredukowany do ubichinolu, w miejscu Q<sub>p</sub> musi zostać przyłączona kolejna cząsteczka QH<sub>2</sub>, ulegająca utlenieniu w identyczny sposób jak poprzednia – pierwszy elektron trafia poprzez białko Rieske na cytochrom c, zaś drugi redukuje Q<sup>-</sup> w miejscu Q<sub>n</sub> do QH<sub>2</sub> (aby zredukować ubichinon, dodatkowo muszą być pobrane z matriks dwa protony). W sumie więc na dwa przetransportowane na cytochrom c elektrony dochodzi do pobrania z matriks dwóch protonów, zaś do kompartmentu wewnętrznego trafiają cztery protony (**Rys. 2b**). Antymycyna hamuje powstawanie QH<sub>2</sub> z Q w miejscu Q<sub>n</sub>, zaś myksotiazol blokuje transport elektronów w Q<sub>p</sub>.



**Rys. 2.** Q-cykl, opisujący mechanizm transportu elektronów i protonów przez kompleks cytochromowy b-c<sub>1</sub>. b<sub>L</sub> - niskopotencjałowy hem typu b w cytochromie b<sub>566</sub>, b<sub>H</sub> - wysokopotencjałowy hem typu b w cytochromie b<sub>562</sub>.

Innym komponentem łańcucha oddechowego, nie związanym na stałe z żadnym z kompleksów, jest cytochrom c – białko w którego centrum aktywnym znajduje się atom żelaza, przenoszące elektrony pomiędzy kompleksem III i IV. Cytochrom c podawany jest często za przykład jednego z najbardziej konserwowanych białek występujących w przyrodzie. Istotnie, jego sekwencja jest bardzo podobna u wszystkich organizmów oddychających tlenowo.

Transportowi elektronów na drodze cytochromowej towarzyszy przemieszczanie się protonów w poprzek błony (z matriks do kompartmentu wewnętrznego, czyli przestrzeni pomiędzy obiema błonami mitochondrialnymi). Translokacja protonów wiąże się z powstaniem różnicy potencjałów po obu stronach błony (ładunek dodatni przeważa po stronie przestrzeni międzybłonowej, zaś ujemny po stronie matriks) oraz gradientu stężenia protonów (różnica pH po obu stronach błony może sięgać nawet 1,5). Różnica

potencjałów i gradient stężenia  $H^+$  składają się na elektrochemiczny gradient protonowy ( $\Delta\mu H^+$ ). To właśnie on napędza syntezę ATP (wykorzystywana jest do tego energia protonów powracających do matriks poprzez syntezę ATP).

Od początku badań nad mitochondrialnym łańcuchem oddechowym sporną kwestią była liczba protonów transportowanych w poprzek błony wewnętrznej i liczba powstających przy tym cząsteczek ATP. Według najnowszych szacunków transport dwóch elektronów z NADH poprzez kompleksy I, III i IV (czyli drogą cytochromową) prowadzi do translokacji 10 protonów do kompartmentu wewnętrznego. Na wytworzenie jednej cząsteczki ATP wykorzystywana jest energia czterech protonów (powrót do matriks trzech protonów napędza samą syntezę ATP, czwarty zaś jest niezbędny do przetransportowania fosforanu nieorganicznego z przestrzeni międzybłonowej), co daje 2,5 cząsteczki ATP. Transport elektronów z bursztynianu, bądź z NADH (lub NADPH) poprzez dehydrogenazy alternatywne na drogę cytochromową (kompleksy III i IV) daje 1,5 cząsteczki ATP na każde dwa przetransportowane elektrony.

Specyficzną cechą mitochondriów roślinnych, nie występującą w ich zwierzęcych odpowiednikach, jest obecność alternatywnych białek przenoszących elektrony (**Rys. 1**) i związanych z nimi niefosforylacyjnych (tj. nie przyczyniających się do powstawania ATP) dróg transportu elektronów. Jako pierwsze, należy wymienić alternatywne dehydrogenazy NADH i NADPH. Są one odporne na działanie rotenonu – inhibitora kompleksu I, a ich działanie nie jest sprzężone z transportem protonów w poprzek błony wewnętrznej. Mogą one utleniać NAD(P)H pochodzący zarówno z matriks (dehydrogenazy wewnętrzne NAD(P)H), jak i z przestrzeni międzybłonowej (dehydrogenazy zewnętrzne NAD(P)H).

Oksydaza alternatywna (AOX) to białko mające zdolność redukcji  $O_2$  do  $H_2O$ , jednak procesowi temu nie towarzyszy (jak w przypadku oksydazy cytochromowej) powstawanie elektrochemicznego gradientu protonowego i synteza ATP. Działanie oksydazy alternatywnej hamują kwasy hydroksamowe – m.in. kwas salicylohydroksamowy (SHAM) a nie jest ona hamowana przez cyjanek (inhibitor kompleksu IV). AOX jest najprawdopodobniej dimerem, posiadającym w swym centrum aktywnym atomy żelaza, które odpowiadają za przenoszenie elektronów na tlen.

Znaczenie i funkcja alternatywnych białek przenoszących elektrony jest dyskusyjna. Ich działanie nie jest związane z produkcją ATP, wydawałoby się więc, iż marnują one energię transportowanych elektronów (jeśli nie powstaje ATP, całość energii rozprasza się pod postacią ciepła). Udział transportu elektronów drogami alternatywnymi w żywej roślinie jest niewielki (sięga co najwyżej kilku procent), co więcej, wydaje się, że białka te nie są aktywne u wszystkich gatunków roślin, działają jedynie w niektórych typach tkanek lub w określonych stadiach rozwojowych organizmu. Mogą one działać jako swego rodzaju wentyl bezpieczeństwa – „rozładowują” transport elektronów, gdy droga cytochromowa jest przeładowana. Świadczy o tym np. fakt, że alternatywna dehydrogenaza NADH ma o wiele niższe powinowactwo do swego substratu niż kompleks I, co sugeruje, że alternatywna dehydrogenaza będzie wiązała NADH tylko wtedy, gdy pula kompleksu I jest wysyciona. AOX pomaga pozbyć się szkodliwych

wolnych rodników tlenowych (produktu pośredniego redukcji tlenu do wody) w sytuacji, gdy oksydaza cytochromowa nie nadaje z przenoszeniem elektronów na tlen. Dodatkowo działanie alternatywnych dróg transportu elektronów pozwala pozbyć się nadmiaru NADH wytworzonego podczas cyklu Krebsa, dostarczając  $\text{NAD}^+$ . Dzięki temu cykl Krebsa działa wydajniej, a jest to szlak metaboliczny o kluczowym znaczeniu – związki biorące w nim udział są jednocześnie wykorzystywane w licznych szlakach biosyntezy – np. aminokwasów.

Innym białkiem występującym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej niektórych gatunków roślin, jest białko rozprzegające (UCP), przypominające budową występującą w mitochondriach ssaczyh termogeninę. Funkcją tych białek w mitochondriach jest przepompowywanie protonów z powrotem na stronę matriks, przy czym cała energia protonów rozprasza się wtedy w postaci ciepła.

Białko rozprzegające i alternatywne komponenty łańcucha oddechowego mają szczególne znaczenie u tzw. roślin termogennych (czyli potrafiących samodzielnie utrzymywać określoną temperaturę niektórych organów). Zjawisko to zaobserwował już w XVIII wieku Lamarck, jednak dopiero niedawno udało się wyjaśnić mechanizm jego działania. Doskonałym przykładem tego typu roślin są liczne gatunki z rodziny obrazkowatych (*Araceae*) – utrzymują one dość wysoką temperaturę (nawet do  $32^\circ\text{C}$ ) w swoich kwiatostanach. Kwiatostany obrazkowatych, to wyspecjalizowane twory, przywabiające owady (głównie muchy i chrząszcze) intensywnymi zapachami przypominającymi woń rozkładającego się mięsa. Podwyższona temperatura ma za zadanie umożliwić łatwiejsze rozprzestrzenianie się lotnych związków zapachowych (poza tym samo ciepło również przyciąga owady, zwłaszcza o świcie). W kwiatostanach obrazkowatych stwierdzono podwyższoną aktywność oksydazy alternatywnej (a także alternatywnych dehydrogenaz i białka rozprzegającego). Sygnałem do produkcji ciepła jest w kwiatostanach obrazkowatych wzrost stężenia kwasu salicylowego.

Zewnętrznym wyrazem procesu oddychania jest wymiana gazowa pomiędzy organizmem a środowiskiem zewnętrznym. U organizmów oddychających tlenowo sprowadza się ona do pobierania  $\text{O}_2$  i wydzielania  $\text{CO}_2$ . Oznaczając ilościowo wymieniane na drodze oddychania gazy, można wyznaczyć współczynnik oddechowy (RQ), wyrażony jako stosunek liczby cząsteczek wydzielonego dwutlenku węgla do liczby cząsteczek pobranego tlenu. O wartości RQ decyduje rodzaj utlenianego substratu: im bardziej zredukowany jest substrat, tym więcej potrzeba cząsteczek  $\text{O}_2$  aby go utlenić, a to wpływa na wzrost RQ. Na natężenie oddychania z kolei ma wpływ szereg czynników zewnętrznych, jak stężenie tlenu i dwutlenku węgla, wilgotność, temperatura, światło, zawartość soli mineralnych.

### **Zadanie 1. Pobieranie tlenu podczas oddychania.**

**Celem ćwiczenia** jest zapoznanie ze sposobem oznaczania oddychania w środowisku wodnym przy pomocy elektrody tlenowej.

## Zasada działania

Elektroda tlenowa Clarka zbudowana jest ze złotej katody połączonej mostkiem KCl z elektrodą Ag/AgCl służącą jako anoda odnośnikowa. Cały zestaw oprawiony jest w masę plastikową, elektrody zaś oddzielone są od roztworu (cały czas mieszanego podczas pomiaru, aby zapewnić stałą i równomierną dyfuzję O<sub>2</sub>) cienką teflonową błoną przepuszczalną dla gazów, ale nieprzepuszczalną dla innych rozpuszczalnych związków mogących uszkodzić katodę. Gdy do elektrod przyłożyc napięcie (0,5 – 0,8 V), tlen reagując na katodzie powoduje przepływ prądu. Natężenie prądu jest proporcjonalne do stężenia tlenu. Zachodzące reakcje chemiczne można przedstawić następująco:



## Wykonanie ćwiczenia

- Połączyć elektrodę z miernikiem. W celu kalibracji miernika na badany zakres stężenia tlenu włożyć elektrodę do wody o znanej zawartości tlenu (napowietrzanej max. w danej temperaturze).
- Odcięte korzenie badanej rośliny umieścić w termostatyzonej kamerze (25°C). Na dnie kamery położyć mieszadło.
- Do kamery wlać ok. 10 ml wody napowietrzanej i umieścić czujnik elektrody.
- Tak przygotowany zestaw umieścić na mieszadle magnetycznym. Włączyć mieszadło oraz rejestrator.
- Rejestrować na taśmie zapis stężenia tlenu przez 15 – 20 minut. Powinno zachodzić wyraźne pobieranie tlenu.
- Przy pomocy igły i strzykawki wprowadzić do kamery 10 µl azydku sodowego (NaN<sub>3</sub>). Rejestrować na taśmie zmiany stężenia tlenu.
- Po pomiarze zmierzyć objętość wody w kamerze i zważyć korzenie.

## Opracowanie wyników

Na podstawie zarejestrowanego na taśmie zapisu zmiany stężenia tlenu i objętości kamery, uwzględniając rozpuszczalność tlenu w wodzie w temperaturze 25°C, obliczyć natężenie oddychania korzeni w mg O<sub>2</sub>/g świeżej masy/godz lub w nmol O<sub>2</sub>/g świeżej masy/godz.

### **Zadanie 3. Oddychanie w warunkach beztlenowych.**

**Celem ćwiczenia** jest zapoznanie z metodą oznaczania etanolu – jednego z produktów oddychania beztlenowego.

#### **Przebieg doświadczenia**

Po około 20 siewek grochu umieszczono:

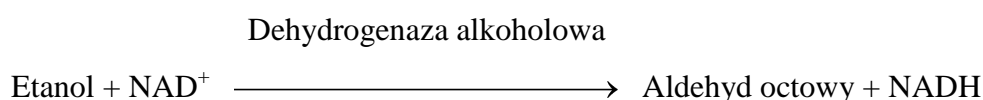
1. w kolbie na 50 ml, zalano wodą przedmuchiwaną azotem i zamknięto szczelnie korkiem z kapilarą – warunki beztlenowe,
2. na szalce Petriego w 50 ml wody, uważając aby nie były całkowicie zanurzone w wodzie – warunki tlenowe.

Oba warianty zostawiono na 24 h w temperaturze 25°C.

Zadanie polega na oznaczeniu stężenia etanolu w wodzie, w której umieszczone były siewki.

#### **Oznaczanie etanolu**

Do oznaczenia etanolu należy wykorzystać reakcję katalizowaną przez dehydrogenazę alkoholową polegającą na utlenieniu etanolu do aldehydu octowego z jednoczesną redukcją NAD<sup>+</sup> do NADH.



Wzrost absorbancji przy długości fali 340 nm (maksimum absorpcji dla NADH) jest wprost proporcjonalny do stężenia etanolu w próbce.

#### **Przeprowadzenie oznaczenia**

Do kuwety na 1,5 ml odpipetować 900 µl buforu glicynowego o pH 9,0, 100 µl 12 mM NAD oraz od 5 do 100 µl próby (zgodnie ze wskazówkami prowadzącego) i zanotować objętość. Jako próbę ślepą zastosować bufor glicynowy. Wstawić kuwety do spektrofotometru i rozpocząć pomiar przy długości fali 340 nm. Reakcję rozpocząć dodaniem 3 µl enzymu dehydrogenazy alkoholowej. Pomiar prowadzić do momentu aż absorbancja przestanie ulegać zmianom. Zanotować maksymalną wartość i wyliczyć

procentowe stężenie etanolu wiedząc, że milimolowy współczynnik absorpcji dla NADH wynosi 6,22, a masa molowa etanolu to 46 g/mol.