



SKRYPT DO ĆWICZEŃ Z FIZJOLOGII ROŚLIN

SPIS TREŚCI

	str.
Roztwory.....	3
Kolorymetria.....	4
Kiełkowanie nasion.....	5
Żywienie mineralne roślin i gospodarka wodna.....	8
Transport dalekodystansowy w roślinach.....	17
Hormony roślinne.....	23
Stres.....	27
Barwniki asymilacyjne.....	33
Fluorescencja chlorofilu <i>a</i> jako miara aktywności fotosyntetycznej liści.....	39
Fotosynteza.....	44
Oddychanie.....	49

ROZTWORY

1. Sporządzanie roztworów

W celu przyrządzenia 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 → 1000 ml

x → 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 → 100 ml

x → 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 (ϵ) każdej substancji ma charakterystyczną wartość, stałą dla danej długości fali świetlnej. Z wartości ϵ 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 ϵ , jak i również objętość badanej próby

KIEŁKOWANIE NASION

Kiełkowanie to zespół procesów zachodzących w nasieniu przygotowujących zarodek do rozpoczęcia wzrostu i rozwoju siewki.

Kiełkowanie rozpoczyna się, gdy nasienie znajdzie się w warunkach umożliwiających pęcznienie. Polega ono w pierwszej kolejności na imbibicyjnym pobieraniu wody przez koloidy nasienia, co prowadzi do zwiększenia świeżej masy i objętości nasion. Zdolne do kiełkowania są tylko nasiona, których zarodki są żywe i odpowiednio dojrzałe. Procent żywych, zdolnych do kiełkowania nasion danego zbioru nazywamy zdolnością do kiełkowania. Wskaźnikiem stopnia żywotności nasion jest energia kiełkowania – tj. procent nasion kiełkujących w odpowiednio krótkim czasie. Określenie obu tych wielkości jest istotne dla oceny nasion jako materiału siewnego.

Kiełkowanie jest uwarunkowane czynnikami środowiska zewnętrznego przede wszystkim dostępnością wody, temperaturą, światłem. W zależności od reakcji na światło nasiona dzielimy na: fotowrażliwe dodatnio lub ujemnie lub też nie wykazujące fotowrażliwości. Przykładem nasion praktycznie niewrażliwych na światło są nasiona rzepaku, natomiast dodatnia fotowrażliwością charakteryzują się nasiona sałaty odmiany Grand Rapids.

Regulacja kiełkowania przez środowisko odbywa się za pośrednictwem systemu fitochromowego. W regulacji kiełkowania nasion uczestniczą hormony takie jak gibereliny, cytokininy czy kwas abscysynowy.

Podczas kiełkowania zachodzą w nasionach głębokie zmiany biochemiczne i fizjologiczne. Uwodnienie nasion wzmacnia natężenie oddychania i aktywność enzymów zwłaszcza hydrolitycznych, które ulegają aktywacji lub są syntetyzowane *de novo*.

Stwierdzono, że w regulacji syntezy α -amylazy – enzymu hydrolizującego skrobię w bielmie ziarniaków zbóż uczestniczy giberelina.

Celem ćwiczenia jest obserwacja zmian aktywności α -amylazy i zawartości skrobi podczas kiełkowania ziarniaków jęczmienia oraz pęcznienia i hydrolizy skrobi w bulwach ziemniaka.

Zadanie 1. Zmiany aktywności α -amylazy i zawartości skrobi podczas kiełkowania ziarniaków jęczmienia.

Materiał doświadczalny stanowią ziarniaki jęczmienia suche i kiełkujące 2 i 4 dni.

Wykonanie

1. Do moździerza przenieść po 2 ziarniaki: suche lub kiełkujące 2 lub 4 dni (po uprzednim usunięciu korzeni i koleoptili). Rozetrzeć je w moździerzu z 1 ml 0,1 M buforu octanowego (pH 4,8) zawierającego 20 μ M CaCl_2 , następnie homogenat przenieść ilościowo do probówek wirówkowych, przepłukując moździerz 2 x 1 ml buforu. Ekstrakty wirować przy 3000 x g przez 10 minut.
2. Oznaczyć aktywność α -amylazy w supernatancie (w 2 powtórzeniach). W tym celu pobrać 0,1 ml supernatantu, przenieść do probówki i dodać 1 ml roztworu skrobi. Hydrolizę prowadzić w temperaturze 37°C przez 10 minut. Reakcję przerwać dodając 1 ml płynu Lugola w 0,05 M NaCl, następnie dodać 5 ml H_2O , wymieszać i oznaczyć absorpcję próby przy $\lambda = 620$ nm wobec rozcieńczonego (5x) płynu Lugola jako próby ślepej. Równolegle odczytać absorpcję próby, w której reakcję przerwano w czasie „0” (pipetujemy najpierw 1 ml płynu Lugola, potem 0,1 ml ekstraktu, 1 ml skrobi i 5 ml H_2O). Aktywność enzymu jest wyrażona ubytkiem skrobi – jest to różnica pomiędzy absorbancją w czasie „0”, a absorbancją mierzoną po 10 minutach inkubacji.
3. Aktywność α -amylazy wyrazić w:
jednostkach aktywności = $\Delta A/\text{ziarniak}/\text{minutę}$.
4. Równolegle oznaczyć w badanym materiale (ziarniaki suche, oraz po 2 i 4 dniach kiełkowania na świetle) zawartość skrobi rozpuszczalnej. W tym celu rozetrzeć w moździerzu po 5 ziarniaków, a następnie zawartość moździerza przenieść ilościowo do probówek przepłukując 3 ml wody. Próby wymieszać i umieścić we wrzącej łaźni wodnej na 20 minut. Następnie ochłodzić i odwirować przy 3000 x g przez 10 minut.
5. W uzyskanym supernatancie oznaczyć zawartość skrobi rozpuszczalnej (w 2 powtórzeniach). Z każdej próby pobrać po 0,1 ml supernatantu, przenieść do probówki, dodać 1 ml płynu Lugola i 5 ml wody destylowanej. Odczytać absorbancję prób przy $\lambda=620$ nm wobec rozcieńczonego (5x) płynu Lugola jako próby ślepej.

Zadanie 2. Pęcznienie i hydroliza skrobi w bulwach ziemniaka.

Przygotować preparat z miazgi ziemniaka na szkiełku podstawowym, obserwacja. Dodać (pod szkiełko nakrywkowe) kroplę płynu Lugola, obserwować zmianę zabarwienia ziaren skrobi. Następnie dodać kroplę 10% roztworu KOH i prowadzić dalej obserwację zmian zachodzących w ziarnach skrobi.

ŻYWIENIE MINERALNE ROŚLIN I GOSPODARKA WODNA

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).

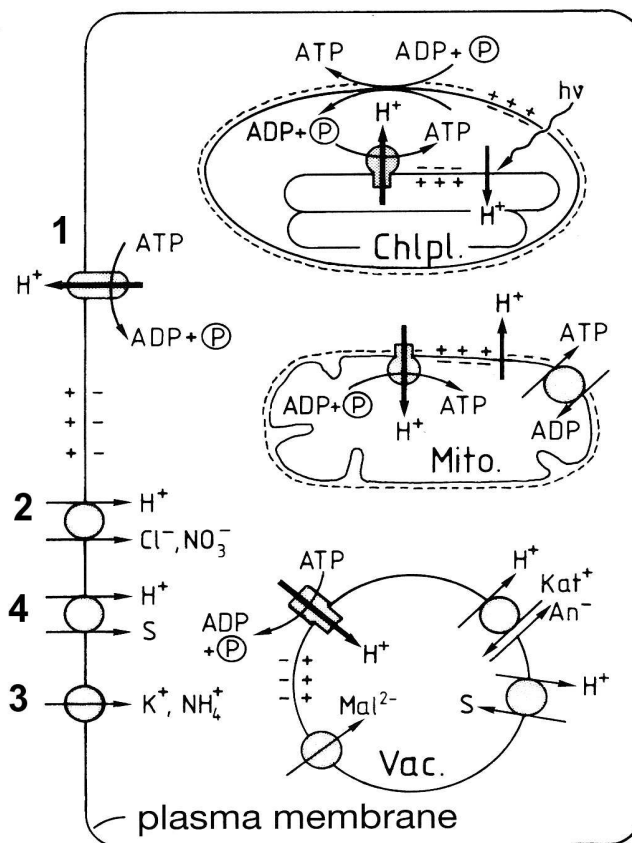
Błony biologiczne nie tylko oddzielają wnętrze komórki od jej otoczenia ale również otaczają organelle komórkowe, utrzymują różnice pH i składu jonowego w różnych częściach komórki oraz pozwalają na przestrzenny rozdział dróg metabolicznych. Zjawiska osmotyczne w żywych tkankach także uwarunkowane są 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 plazmalemy 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.

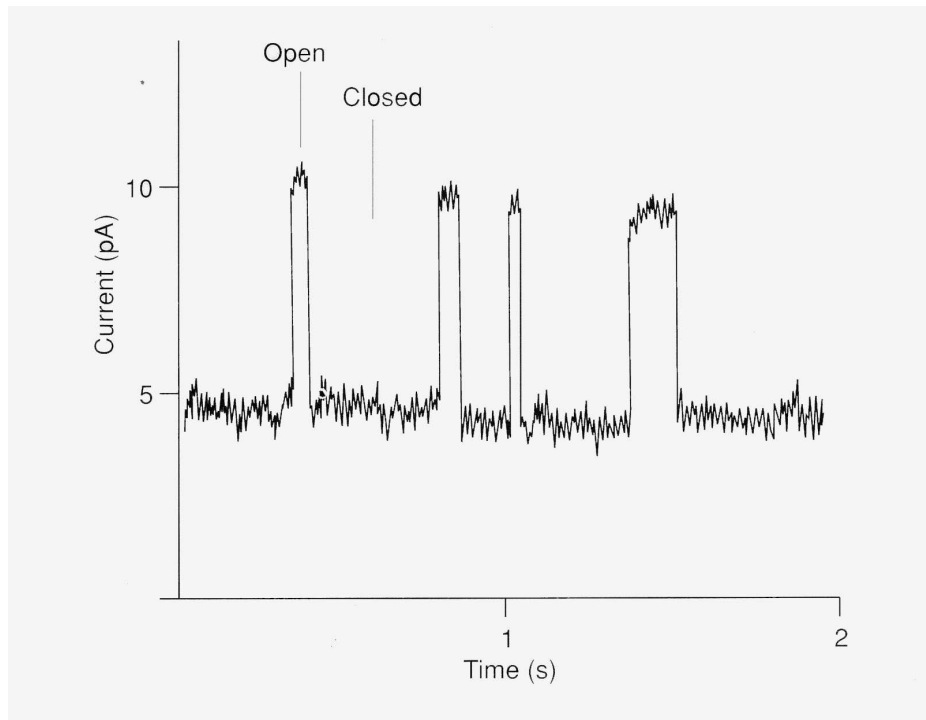


Rys. 1 Model transportu jonów przez plazmalemę komórki roślinnej. Gradient H^+ w poprzek plasmalemy powstaje dzięki działaniu ATP –azy, enzymu, który zużywając ATP przenosi jony wodorowe wbrew potencjałowi elektrochemicznemu (transport aktywny pierwotny) [1]. Aniony często transportowane są do komórki 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 o przeciwnym ładunku mówimy wtedy o transporcie na zasadzie **antiportu**.

Antybiotyki jonoforowe funkcjonujące jako nośnik (walinomycyna, enniatyna, moezyna) są cząsteczkami makrocyclicznymi 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 przeniesieniu 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 α -heliksu oraz hydrofobowym składem aminokwasów.

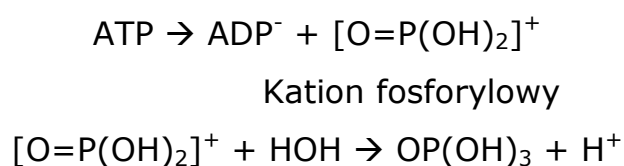
Transport poprzez kanały jonowe jest przykładem sprzężenia przepływu jonów i zmian konformacyjnych białka tworzącego kanał. W najprostszym wypadku może on podlegać fluktuacjom między dwoma stanami – otwartym i zamkniętym (Rys.2).



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:



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 tlenu do systemu korzeniowego; warunki świetlne podczas wzrostu; natężenie procesów metabolicznych w roślinie.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z niektórymi aspektami żywienia mineralnego roślin: wykrywanie makroelementów w popiele 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 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 na papierze milimetrowym. Z uzyskanych wyników wyciągnąć wnioski.

Zadanie 2. Pobieranie jonów NH_4^+ , wpływ pH i światła

Do czterech zlewek wlać po 30 ml roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zawierającego 40 μg jonów NH_4^+ w 1 ml. Doprowadzić pH w zlewkach wg schematu, używając roztworu 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 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 μg jonów NH_4^+) oraz próbę ślepa (10 ml wody, 0.5 ml odczynnika Nesslera). Po wymieszaniu wszystkich prób odczytać wartość ekstynkcji przy długości fali 430 nm wobec próby ślepej. Ilość μg NH_4^+ odczytać z krzywej wzorcowej.

Zestawić zmiany pH oraz stężenia jonów NH_4^+ w zależności od warunków naświetlenia. Wyciągnąć wnioski.

Zadanie 3. Makroelementy w popiele roślin

a.) otrzymywanie popiołu

Okolo 50 g świeżej masy roślin umieszczamy w kopercie w suszarce w temperaturze 100-105°C na 24 godziny. Ważymy suchą masę i po rozdrobnieniu roślin w moździerzu spopielamy w piecu w temp. 550°C przez 2 godziny. Ważymy masę popiołu. Obliczamy: 1.) zawartość suchej masy w świeżej masie roślin, 2.) procentową zawartość popiołu w stosunku do świeżej i suchej masy roślin.

b.) Wykrywanie makroelementów w popiele roślin

Popiół rozpuścić w 4 ml wody dejonizowanej, dodać 2-3 krople HCl i używać tego roztworu do następujących oznaczeń. Jako kontroli używać 5% roztworów soli poszczególnych pierwiastków.

1.) Fosfor: do kropli 5% roztworu KH_2PO_4 na szkiełku podstawowym dodać kroplę odczynnika molibdenianu amonu, przykryć szkiełkiem przykrywkowym i po kilku minutach obserwować pod mikroskopem kolor i kształt pojawiających się kryształów.

2.) Potas: do kropli 5% K_2HPO_4 na szkiełku podstawowym dodać kroplę 15% HClO_4 (ostrożnie!), obserwować pod mikroskopem kryształy.

3.) Magnez: do kropli 5% MgSO_4 dodać kroplę odczynnika magnezowego i obserwować kryształy amonowo-magnezo-fosforowe

4.) Siarka: do kropli 5% K_2SO_4 na szkiełku podstawowym dodać kroplę 10% BaCl_2 . Obserwować bezpostaciowy osad BaSO_4

5.) Wapń: do kropli 5% roztworu CaCl_2 dodać kroplę 50% H_2SO_4 (ostrożnie!), obserwować pojawiające się kryształy.

UWAGA: przy wykonywaniu ćwiczenia zachować ostrożność. Niektóre odczynniki są silnie żrące.

Wyniki opracować rysując kryształy charakterystyczne dla każdego makroelementu oraz napisać równania reakcji chemicznych dla przeprowadzonych oznaczeń.

Zadanie 4. Wpływ poszczególnych pierwiastków na wzrost roślin

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

- 0.4 g NH_4NO_3
- 0.2 g KH_2PO_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 pożywce pełnej + A-Z

II- pożywka bez P, 0.2 g KH_2PO_4 zastąpiono 0.13 g K_2SO_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 KCl zastąpiono 0.1 g 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 HCl i 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.

Własności osmotyczne komórki

Zadanie 5. Oznaczanie potencjału osmotycznego tkanek roślinnych metodą plazmolizy granicznej (kątovej)

Przyrządzić z 1 M roztworu sacharozy przez rozcieńczenie wodą dejonizowaną roztwory: 0.3 , 0.4 , 0.5 , 0.6 i 1 M (np. 3 ml roztworu 1 M + 7 ml H₂O = roztwór 0.3 M).

Przygotowane roztwory, po dobrym wymieszaniu, wylać na szkiełka zegarkowe i w każdym zanurzyć po kilka skrawków z górnej epidermy cebuli. Po 30 min obejrzyć skrawki pod mikroskopem w kropli odpowiedniego roztworu sacharozy. Znaleźć taki roztwór, w którym 50% komórek widocznych w polu widzenia mikroskopu jest w stadium plazmolizy granicznej. Potencjał osmotyczny tego roztworu odpowiada średniemu potencjałowi osmotycznemu komórki badanej tkanki. Wyniki podać w paskalach.

Roztwór sacharozy	Potencjał osmotyczny
1 M	26.45 x 10 ⁵ Pa
0.6 M	15.39 x 10 ⁵ Pa
0.5 M	12.65 x 10 ⁵ Pa
0.4 M	10.08 x 10 ⁵ Pa
0.3 M	7.54 x 10 ⁵ Pa
0.2 M	5.06 x 10 ⁵ Pa

Narysować schematycznie wygląd kilku komórek cebuli w roztworze izotonicznym, hipotonicznym i hipertonicznym. Podać potencjały osmotyczne tych roztworów.

Literatura

1. Kopcewicz J., Lewak S. Fizjologia Roślin, PWN 2002 Warszawa
2. Heldt H-W. Plant biochemistry and molecular biology, Oxford University Press 1997 New York
3. Mengel K., Kirkby E.A. Podstawy żywienia roślin, PWRiL 1981

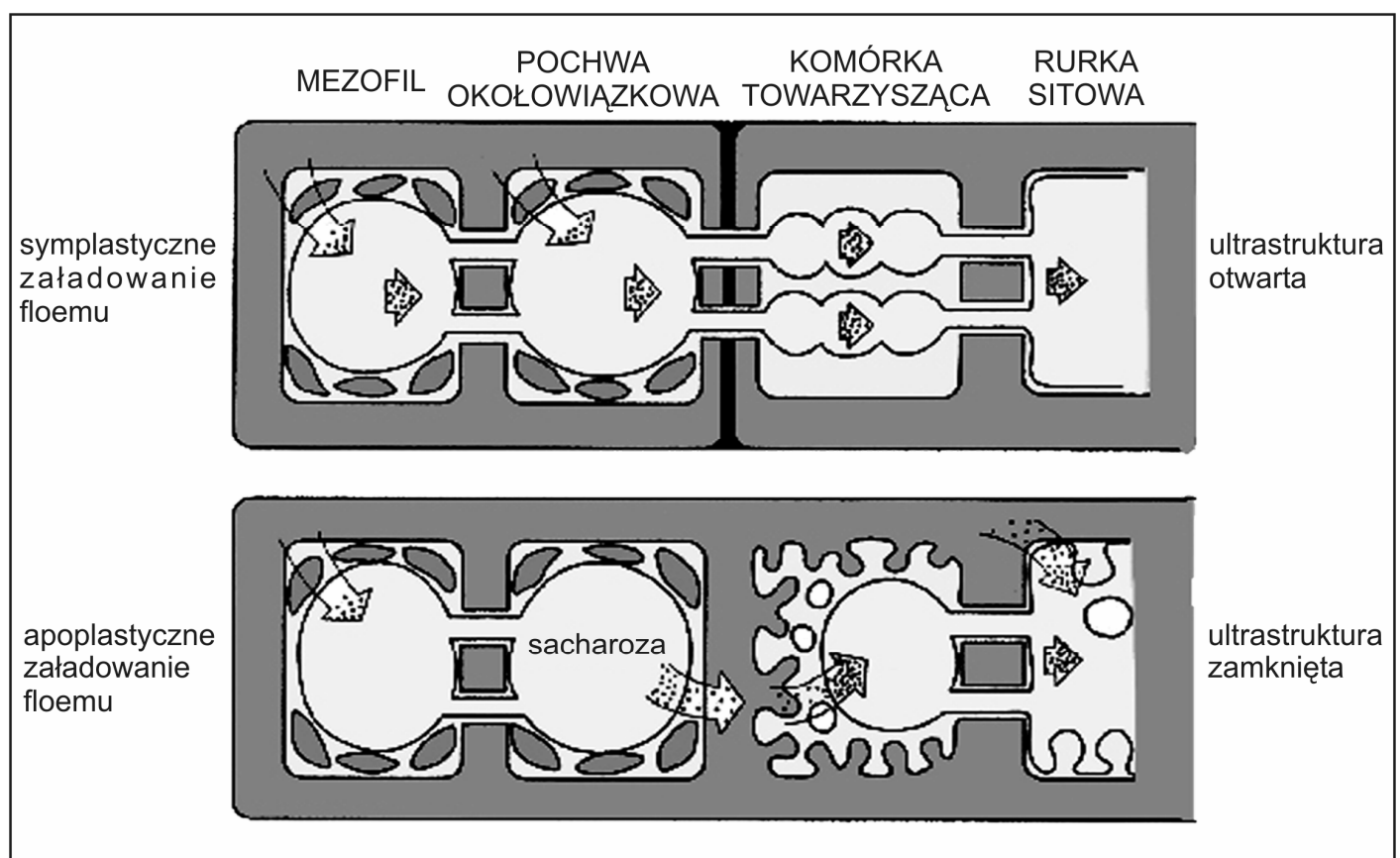
TRANSPORT DALEKODYSTANSOWY W ROŚLINACH

Transport międzykomórkowy u roślin odbywa się dwiema drogami: przez błony komórkowe lub przez plazmodesmy, liczne kanały cytoplazmatyczne łączące sąsiednie protoplasty. W drugim przypadku, transportowane związki nie opuszczają protoplastów komórek tworzących symplast zanurzony w apoplaście tworzonym przez ściany komórkowe i przestrzenie międzykomórkowe. Transport przez plazmodesmy jest około 100 razy sprawniejszy niż przez błony. Przez plazmodesmy, w stanie podstawowym, dyfundują związki niskocząsteczkowe, o masie poniżej 1 kDa. W stanie rozszerzonym, plazmodesmy mogą transportować związki wielkocząsteczkowe, takie jak białka i RNA, w tym czynniki transkrypcyjne. W pewnych sytuacjach (inicjacja niektórych procesów rozwojowych, działanie stresów), plazmodesmy mogą ulegać całkowitemu zamknięciu. Dzięki zdolności do regulacji przepływu związków nisko- i wielkocząsteczkowych plazmodesmy pełnią ważną rolę nie tylko w wymianie metabolitów między komórkami, ale również w regulacji procesów rozwojowych rośliny i w reakcjach na różne stresy biotyczne i abiotyczne.

Transport dalekodystansowy u roślin odbywa się wewnątrz wyspecjalizowanych komórek: żywych członów rurek sitowych w przypadku nisko- i wysokocząsteczkowych związków organicznych transportowanych z liści oraz wewnątrz członów martwych naczyń w przypadku transportu wody z korzeni. Ruch soku floemowego odbywający się na zasadzie przepływu masowego w rurkach sitowych jest wynikiem istnienia różnicy ciśnienia hydrostatycznego wzdłuż szlaku transportowego. Gradient ten jest wytwarzany dzięki dwóm procesom – załadowaniu floemu, w którym asymilaty bądź inne związki przemieszczane są do wnętrza rurek sitowych i przebiegającego w odwrotnym kierunku rozładowania floemu.

Załadowanie floemu może się odbywać dwiema drogami: symplastyczną i apoplastyczną (Rys. 1). W pierwszym przypadku, cukry dyfundują przez plazmodesmy łączące sąsiadujące ze sobą komórki. W drugim, sacharoza jest wydzielana z komórek mezofilu do apoplastu, skąd jest pobierana aktywnie przez komórki towarzyszące i/lub rurki sitowe. Mechanizm pozwalający asymilatom przemieszczać się do floemu przez plazmodesmy przeciwko gradientowi stężenia polega na tym, że jedno- i dwucukry są przekształcane w większe polimery w komórkach towarzyszących. Rozmiary tych cząstek nie pozwalają na dyfuzję w odwrotnym kierunku. Polimerami tymi mogą być wielocukry: rafinoza, stachioza i inne, a także poliole: mannitol, dulcytol i sorbitol. Opisany mechanizm załadowania

floemu określane jest terminem „pułapka polimerowa” (ang. polymer trapping). Rośliny z symplastycznym załadowaniem floemu charakteryzują się obecnością licznych plazmodesm między komórkami towarzyszącymi a sąsiadującymi z nimi komórkami miękiszu ($n > 10$, n – liczba plazmodesm w przeliczeniu na $1 \mu\text{m}^2$ styku). Jest to ultrastruktura otwarta, typ 1. U wielu z tych roślin występują specyficzne komórki towarzyszące, charakteryzujące się długimi cylindrycznymi wiązkami retikulum endoplazmatycznego położonymi równoległe do osi łączącej komórki donorowe z rurkami sitowymi i gęstą cytoplazmą zawierającą liczne, rurkowate mitochondria. Brak jest tu chloroplastów. Komórki takie nazywane są pośredniczącymi (ang. intermediary cells)



Rys. 1 Mechanizmy załadowania floemu u roślin wyższych (za Gamalei i Pakhomova, 2000)

W przypadku załadowania apoplastycznego sacharoza wydzielona do apoplastu jest aktywnie transportowana do wnętrza kompleksu rurki sitowe/komórki towarzyszące, co odbywa się dzięki istnieniu gradientu protonowego w poprzek błony. Gradient ten jest związany z funkcjonowaniem pompy protonowej i powstaje z wykorzystaniem energii związanej w postaci adenozynotrójfosforanu (ATP). Transport sacharozy przez błony komórkowe odbywa się przy współdziałaniu przenośnika białkowego

specyficznego dla tego dwucukru. Lokalizacja przENOŚNIKÓW sacharozy związanych z załadowaniem floemu może być gatunkowo i komórkowo specyficzna. Rośliny z apoplastycznym załadowaniem floemu charakteryzują się ultrastrukturą typu zamkniętego. U roślin tych kompleks komórki towarzyszące/rurki sitowe jest mniej lub bardziej izolowany symplastycznie od komórek donorowych ($n < 1$). Komórki towarzyszące u tych roślin są małe. Zawierają one liczne małe wakuole poprzedzielane wyjątkowo gęstą cytoplazmą z licznymi mitochondriami. W jednej z podgrup, w typie 2b ($n < 0.1$), ściany komórek towarzyszących tworzą wpuklenia. Komórki takie nazywane są komórkami transferowymi (ang. transfer cells).

Cukry, a także inne związki są przemieszczane w rurek sitowych dzięki mechanizmowi przepływu masowego. Jak wspomniano wyżej, dzieje się tak w wyniku istnienia różnicy ciśnienia hydrostatycznego w rurek sitowych między strefą załadowania floemu w donorze asymilatów, a strefą rozładowania floemu w akceptorze asymilatów. W rurek, w strefie załadowania floemu, rośnie potencjał osmotyczny soku, gdyż zwiększa się tam stężenie cukrów, które są osmotycznie czynne. Powoduje to przepływ wody do wnętrza rurek sitowych, a co za tym idzie wzrost ciśnienia hydrostatycznego. W strefie rozładowania floemu następuje z kolei proces odwrotny, w którym cukry, wraz z wodą są usuwane z rurek sitowych. Istniejąca w rurek różnica ciśnienia hydrostatycznego napędza przepływ masy soku floemowego o szybkości dochodzącej do 1 m/h, zazwyczaj jest jednak dużo mniejsza.

Rozładowanie floemu, a także transport post-floemowy odbywają się z reguły drogą symplastyczną, tzn. przez plazmodesmy. Jednak podczas rozwoju danego organu może być uzupełniana bądź zamieniana drogą apoplastyczną. W młodych liściach istnieje silnie rozwinięta sieć symplastyczna. Gdy liść staje się donorem asymilatów, sieć ta ulega znacznemu rozbudowaniu bądź przerwaniu, odpowiednio u roślin z symplastycznym lub apoplastycznym załadowaniem floemu. W dojrzałych łodygach, a być może też w korzeniach, rozładowanie floemu może odbywać się zarówno drogą symplastyczną jak i apoplastyczną. Wegetatywne wierzchołki wzrostu korzenia i pędu są zaopatrywane w związki pochodzące z floemu drogą symplastyczną. W przypadku końcowych wegetatywnych organów reproduktywnych, takich np. jak bulwy ziemniaka czy owoce, droga symplastyczna jest funkcjonalna, jest jednak często wspomagana mechanizmem apoplastycznym, z udziałem symportu sacharozy z apoplastu do komórek parenchymy. Ciągłość symplastyczna jest zazwyczaj przerywana między tkankami o różnym genomie, np. w rozwijających się nasionach

czy ziarniakach oraz w przypadku interakcji gospodarz pasożyt. W rozwijających się nasionach i ziarniakach istnieje bardzo intensywny transport symplastyczny między floemem a tkankami parenchymatycznymi sąsiadującymi z ziarnakiem oraz w obrębie ziarniaka. Związki docierające do ziarniaka są jednak zazwyczaj wydzielane do apoplastu, który stanowi tu rodzaj magazynu, z którego ziarniak pobiera to, co jest mu aktualnie potrzebne.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się studentów z różnymi typami załadowania floemu (apoplastyczny, symplastyczny), transportem dalekodystansowym oraz symplastycznym mechanizmem rozładowania floemu w młodych liściach, a także z nowoczesnymi metodami stosowanymi przy badaniach procesów transportowych.

W ćwiczeniach będą wykorzystane barwniki fluorescencyjne, karboksyluoresceina (znacznik ciągłości symplastycznej między komórkami) i fluoresceina (barwnik przemieszczający się wyłącznie drogą apoplastyczną).

Realizowane będą następujące zadania:

- I. Identyfikacja liści donorowych i akceptorowych
- II. Identyfikacja typu załadowania floemu u roślin

Wykonanie ćwiczeń

W eksperymentach zostaną wykorzystane barwniki fluorescencyjne: fluoresceina i karboksyluoresceina (światło wzbudzenia, $E_x = 485 \text{ nm}$; światło emisji, $E_m = 525 \text{ nm}$). Pierwszy z nich nie dyfunduje przez błony komórkowe, wprowadzony więc do rośliny drogą transpiracyjną pozostaje w apoplaście. Drugi dyfunduje do wnętrza komórek, tam jest rozkładany przez niespecyficzne esterazy, a następnie przemieszcza się międzykomórkowo przez plazmodesmy. Brak plazmodesm lub ich zamknięcie powoduje zahamowanie dyfuzji karboksyluoresceiny. Z tego względu jest stosowana jako znacznik ciągłości symplastu.

1. Przygotowanie roztworu karboksyluoresceiny

- a. Odważyć 1200 μg karboksyluoresceiny (CFDA),
- b. Rozetrzeć CFDA zwilżoną szklaną bagietką na szkiełku zegarkowym,
- c. Rozpuścić CFDA w 19 ml wody redestylowanej

- d. Bardzo powoli doprowadzić pH roztworu CFDA do wartości 6,3 dodając po 50 μ l przygotowanego wcześniej 0,0001 M NaOH (do 100 ml wody redst. dodać 100 μ l 0,1 M NaOH)

UWAGA: Nawet chwilowe przekroczenie pH 7 spowoduje nieodwracalny rozkład CFDA, o czym świadczy żółta barwa roztworu

- e. Uzupełnić roztwór do 20 ml
- f. Trzymać w ciemnym naczyniu, używać na świeżo, roztwór powinien być bezbarwny.

2. Przygotowanie roztworu fluoresceiny

- a. Rozcieńczyć roztwór bazowy fluoresceiny (94 mg fluoresceiny, 3 ml EtOH 96 %, dopełnić wodą do 10 ml) 200 razy,
- b. przechowywać w ciemnym naczyniu, nie wystawiać na silne światło, używać na świeżo.

Zadanie 1. Identyfikacja liści donorowych i akceptorowych

Zadanie polega na określeniu zdolności do rozładowania floemu rośliny dwuliściennej (grochu), w liściach pochodzących z różnych pięter. Barwniki zostaną podane do roślin drogą transpiracyjną.

1. Odciąć pod wodą pęd rośliny przy nasadzie.
2. Szybko przenieść odcięty pęd do naczynia z roztworem barwnika fluorescencyjnego.

warianty eksperymentalne: - woda, - fluoresceina, - CFDA.

3. Następnie pędy oświetlamy przez 30 minut (pobieranie badanych roztworów).
4. Odciąć 4 –5 liści z różnych pięter i ułożyć je na płytce pomiarowej, przykryć szklaną szybką, zanotować sposób ułożenia (liście młode, liście dojrzałe, liście stare).
5. Zmapować poziom fluorescencji liści przy użyciu Fluoroscenu ASCENT przy świetle wzbudzenia 485 nm i świetle emisji 538 nm, zapisać wyniki w formacie Excell.
6. Powtórzyć pomiar fluorescencji przy świetle wzbudzenia 444 nm i świetle emisji 612 nm (fluorescencja chlorofilu).
7. Policzyc średnią fluorescencję dla badanych liści.

Intensywna fluorescencja liścia w zakresie 538 nm świadczy o przemieszczaniu się barwnika w obrębie symplastu (stan charakterystyczny dla młodego, nierozwiniętego liścia, będącego akceptorem asymilatów), brak lub słaba fluorescencja świadczy o izolacji symplastycznej floemu od reszty liścia (stan charakterystyczny dla dojrzałego liścia rośliny o apoplastycznym typie załadowania floemu, będącego donorem asymilatów).

Zadanie 2. Identyfikacja typu załadowania floemu u roślin

Zadanie obejmuje śledzenie przemieszczania karboksyfluoresceiny w liściach roślin z symplastycznym (dynia olbrzymia) i apoplastycznym (fasola) typem załadowania floemu i obliczenie szybkości przemieszczania się karboksyfluoresceiny w liściach dyni olbrzymiej.

W eksperymencie zostanie wykorzystana karboksyfluoresceina podana bezpośrednio do liścia.

1. Do małego naczynka wagowego wlać ok. 2 ml roztworu karboksyfluoresceiny.
2. Umieścić w nim mały (0,5 cm x 0,5 cm) skrawek papieru ryżowego, zostawić na 20 min.
3. Niewielki obszar liścia dyni lub fasoli przetrzeć drobnym papierem ściernym, unikając uszkodzenia tkanki.
4. Na oczyszczonym miejscu umieścić skrawek papieru ryżowego nasączonego karboksyfluoresceiną.
5. Po 30 minutach liść odciąć, skrawek papieru ryżowego przykryć fragmentem folii aluminiowej i ułożyć je na płytce pomiarowej, przykryć szklaną szybką.
6. Zmapować poziom fluorescencji liści przy użyciu Fluoroscenu ASCENT przy świetle wzbudzenia 485 nm i świetle emisji 538 nm, zapisać wyniki w formacie Excell.

Intensywna fluorescencja w zakresie 538 nm poza miejscem podania barwnika świadczy o symplastycznym typie załadowania floemu, brak fluorescencji o apoplastycznym typie załadowania floemu.

Jako poziom tła przyjąć wartość 1 JU (jednostki umowne fluorescencji). Policzyc szybkość przemieszczenia się barwnika przyjmując, że rozdzielczość skanowania powierzchni liścia wynosi 6 mm.

HORMONY ROŚLINNE

Hormony roślinne są to naturalnie występujące substancje organiczne, które w niskich (mikromolarnych) stężeniach wpływają na procesy wzrostu, różnicowania się i rozwoju komórek i organów roślinnych. W przeciwieństwie do hormonów zwierzęcych, miejsce syntezy tych substancji w roślinach nie jest w przypadku niektórych hormonów ściśle zdefiniowane. Inną cechą charakterystyczną tych substancji jest fakt, że każda z grup hormonów może wpływać na szeroką gamę procesów rozwojowych ponadto większość tych procesów zachodzi pod wpływem działania więcej niż jednej grupy hormonów.

Obecnie wyróżnia się sześć grup hormonów roślinnych: auksyny, gibereliny, cytokininy, kwas abscysynowy, etylen i brassinosteroidy. Niektórzy do hormonów zaliczają jeszcze kwas jasmonowy i salicylowy, gdyż mogą one wpływać na wzrost roślin, jednakże pojawianie się tych związków i ich funkcje związane są głównie z mechanizmami obronnymi roślin w warunkach stresowych. Efektywność działania hormonów zależy od utrzymania równowagi między ich biosyntezą, przekształcaniem w nieaktywne koniugaty np. z glukozą czy aminokwasami, oraz degradacją.

Auksyny. Znanych jest wiele syntetycznych substancji, które wykazują działanie auksyn, jednakże za naturalnie występującą auksynę uważa się kwas indolilo-3-octowy (IAA). W większości roślin substancja ta syntetyzowana jest z tryptofanu, jednakże badania nad mutantami wykazały możliwość syntezy auksyn, przynajmniej u niektórych roślin np. u *Arabidopsis*, na drodze od tryptofanu niezależnej. Auksyny mogą występować w postaci nieaktywnych koniugatów np. z glukozą, a ich uwalnianie następuje na drodze enzymatycznej hydrolizy. Takie związki są ważnym źródłem auksyn np. w kiełkujących nasionach. Natomiast tworzenie nieodwracalnych połączeń z aminokwasami jest, oprócz peroksydacji, głównym sposobem usuwania auksyn.

Auksyny syntetyzowane są w merystemach wierzchołkowych pędu i korzenia i są odpowiedzialne za wzrost wydłużeniowy komórek położonych niżej. Mechanizm tego procesu wyjaśnia hipoteza kwasowego wzrostu. Jednocześnie spolaryzowany transport auksyn z wierzchołka pędu powoduje hamowanie rozwoju pędów bocznych, zjawisko to określane jest jako dominacja wierzchołkowa. Obserwuje się również wpływ auksyn na: rozwój systemu korzeniowego (hamowanie wzrostu wydłużeniowego korzenia i formowanie się korzeni bocznych), rozwój kwiatów żeńskich, a także na formowanie się owoców partenokarpicznych.

Cytokininy są to związki pochodne adeniny, które mogą tworzyć nieaktywne koniugaty z cukrami, a ich usuwanie następuje na drodze utlenienia, katalizowanego przez oksydazę cytokinin. Pierwszą odkrytą cytokininą, wyizolowaną z autoklawowanego DNA była kinetyna, która jest substancją nie występującą naturalnie w roślinach. Najbardziej rozpowszechnioną, naturalnie występującą cytokininą jest natomiast zeatyna.

Cytokininy są głównym czynnikiem regulującym podziały komórek, kontrolują cykl komórkowy w dwóch punktach: przejścia z fazy G2 cyklu do mitozy poprzez aktywację kinazy zależnej od cykliny B oraz przejścia z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego przez indukcję syntezy cykliny D. Hormony te syntetyzowane są w korzeniach a następnie transportowane do liści gdzie wpływają na metabolizm i opóźniają procesy starzenia się. Działają także antagonistycznie do auksyn, znosząc dominację wierzchołkową.

Gibereliny są to diterpeny o budowie opartej na 20 węglowym szkielecie giberelanu. Pierwszą wyizolowaną i opisaną gibereliną był kwas giberelinowy – GA₃, występujący w grzybach, natomiast w roślinach występują: GA₁, GA₂₀, C₁₉-GA_n. Związki te mogą być dezaktywowane poprzez hydroksylację lub przez tworzenie koniugatów z glukozą.

Gibereliny odpowiedzialne są za wzrost elongacyjny pędu, przełamywanie karłowatości, mogą również przełamywać spoczynek zastępując np. działanie chłodu w roślinach dwu- i wieloletnich. W procesie kiełkowania stymulują syntezę α -amylazy (w ziarniakach zbóż) lub innych enzymów odpowiedzialnych za uwalnianie substancji odżywczych z materiałów zapasowych. Stymulują również proces kwitnienia, promują rozwój kwiatów męskich i podobnie jak auksyny mogą indukować tworzenie się partenokarpicznych owoców.

Kwas abscysynowy jest 15-węglową pochodną terpenów. Jest on syntetyzowany głównie w dojrzałych, zielonych liściach. Jego podstawową funkcją jest zamykanie aparatów szparkowych w odpowiedzi na niedobór wody, oraz indukcja syntezy materiałów zapasowych (białek) podczas rozwoju nasion. W procesie kiełkowania ziarniaków działa on antagonistycznie w stosunku do giberelin hamując syntezę α -amylazy.

Etylen jest węglowodorem syntetyzowanym z metioniny, a jego biosynteza jest regulowana na poziomie transkrypcji enzymu syntetyzującego prekursor etylenu – syntazy ACC (syntaza kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego). Jest on łatwo usuwany do atmosfery, chociaż może być również dezaktywowany przez utlenienie. Hormon ten pojawia się głównie w odpowiedzi na stres i produkowany jest w dużych ilościach w tkankach starzejących się i w organach przygotowujących się do opadania np.: liściach, kwiatach, owocach. Może również hamować wzrost korzeni u roślin lądowych, a także stymulować rozwój organów wegetatywnych i kwiatów w roślinach wodnych.

Brassinosteroidy pochodne triterpenów o budowie podobnej do zwierzęcych hormonów sterydowych. Najmniej poznana grupa hormonów gdyż pierwsze badania nad ich działaniem rozpoczęły się dopiero w latach 70-tych. Stymulują one wzrost wydłużeniowy pędu i produkcję etylenu, hamują natomiast wzrost i rozwój korzeni.

Poziom i aktywność różnych grup hormonów zmienia się w zależności od fazy rozwoju rośliny. Poziom cytokinin jest wysoki, a auksyn i giberelin niski, podczas wczesnych etapów rozwoju, kiedy zachodzą podziały komórek. Poziom auksyn i giberelin wzrasta w fazie wzrostu elongacyjnego komórek, natomiast ilość kwasu abscysynowego jest wysoka w czasie rozwoju nasion, chroniąc przed przedwczesnym kiełkowaniem.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z efektami działania niektórych hormonów roślinnych na procesy fizjologiczne.

Przygotowując się do ćwiczenia należy zwrócić uwagę na to jaki wpływ wywierają poszczególne grupy hormonów na procesy wzrostu i rozwoju roślin.

Zadanie 1. Wpływ kinetyny na tkanki roślinne – efekt Richmonda-Langa

a) Przygotowanie ćwiczenia:

Po 20 krążków wyciętych z liści grochu umieszczono na szalkach Petriego w wodzie destylowanej (kontrola) lub w roztworach kinetyny o stężeniach: 0,5 i 1 mg/l (ppm). Szalki pozostawiono w ciemności przez 4 doby.

b) Wykonanie ćwiczenia:

Po tym czasie w badanych krążkach oznaczamy zawartość chlorofili *a* i *b*, tak jak w ćwiczeniu „Barwniki asymilacyjne”. Ilość chlorofilu wyrazić w $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ powierzchni liścia.

W raporcie do ćwiczenia przedstawić wyniki obrazujące zależność między stężeniem kinetyny a zawartością chlorofili w krążkach liściowych grochu. Wyciągnąć wnioski dotyczące działania hormonu.

Zadanie 2. Wpływ kwasu giberelinowego (GA_3) i abscysynowego (ABA) na wzrost roślin grochu karłowatego

a) Przygotowanie ćwiczenia:

Ziarna grochu moczone przez 24 h w wodzie destylowanej – kontrola lub w roztworach: kwasu giberelinowego (o stężeniu 100 mg/l) i kwasu abscysynowego (o stężeniu 10 mg/l). Ziarna kiełkowały przez 4 doby na szalkach Petriego, a po skiełkowaniu przenoszono je na pełną pożywkę Knoppa i hodowano przez 9 dni w fitotronie.

b) Wykonanie ćwiczenia:

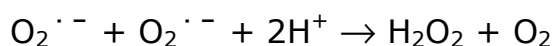
Z każdego wariantu doświadczalnego pobrać losowo 10 roślin, zmierzyć długość pędu i korzenia każdej z nich a następnie zwarzyć osobno liście, łodygi, korzenie i ziarniaki. Wyliczyć średnie długości i masy poszczególnych części roślin.

W opisie do ćwiczenia zamieścić zestawienie średnich długości i mas poszczególnych części roślin dla poszczególnych wariantów doświadczalnych. Przedstawić wnioski dotyczące działania hormonów na procesy wzrostu i rozwoju.

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, α -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 peroksosomach – 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 peroksyzomach, mitochondriach i glioksyzomach. Znanych jest kilka izoform tego enzymu. W usuwaniu H_2O_2 z komórki, z katalazami współdziałają peroksydazy. Enzymy te usuwają resztę nadtlenu 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 doniosłych 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 zawartości H_2O_2 i dialdehydu malonowego (MDA)

Przygotowanie ekstraktów

Odważyć po 1,5 g liści kukurydzy z roślin hodowanych przy wysokim i niskim natężeniu światła i utrzyć je w moździerzu z 3 ml 0,1 % kwasu trójchlorooctowego (TCA) w temp. 4°C. Homogenat wirować przez 15 min. przy 12000 x g. Supernatant zebrać pipetą znad osadu i oznaczyć jego objętość.

Oznaczanie zawartości H₂O₂

Przygotować roztwory:

a. mieszaninę reakcyjną:

- 500 µl supernatantu
- 500 µl 0,1 M buforu fosforanowego pH 7,6
- 1000 µl 1 M KJ

b. próbę kontrolną (ślepa):

- 500 µl 0,1 % TCA
- 500 µl 0,1 M buforu fosforanowego pH 7,6
- 1000 µl 1 M KJ

Próby dokładnie wymieszać i pozostawić w ciemności na 1 godz. w temp. pokojowej a następnie zmierzyć ekstynkcję mieszaniny reakcyjnej przy $\lambda = 390$ nm wobec próby ślepej. Ilość nmoli H₂O₂ odczytać z krzywej wzorcowej.

Ilość nmoli H₂O₂ w próbce badanej obliczyć z wzoru:

$$C = \frac{C_{st} \times V_0}{V \times g}$$

C_{st} – ilość nmoli H₂O₂ - odczyt z krzywej wzorcowej

V₀ – objętość całkowita supernatantu

V – objętość supernatantu dodana do mieszaniny reakcyjnej

g – świeża masa liści

Oznaczanie zawartości MDA

Przygotować w szklanych probówkach następujące roztwory:

a. mieszaninę reakcyjną:

- 500 µl supernatantu
- 500 µl 0,1 M buforu fosforanowego pH 7,6
- 1000 µl 0,5 % kwasu tiobarbiturowego (TBA) w 20% TCA

b. próbę kontrolną (ślepa):

- 500 µl 0,1 % TCA
- 500 µl 0,1 M buforu fosforanowego pH 7,6
- 1000 µl 0,5 % kwasu tiobarbiturowego (TBA) w 20% TCA

Probówki osłonić aluminiową folią i inkubować w łaźni wodnej przez 30 min. w temp. 95° C. Reakcję zakończyć wkładając probówki do lodu. Jeśli wytrąci się osad, próby odwirować przez 15 min. przy 12000 x g. Ekstynkcję supernatantu mierzyć przy $\lambda = 532 \text{ nm}$ i $\lambda = 600 \text{ nm}$. Stężenie MDA obliczyć z wzoru:

$$C_{\text{MDA}} = \frac{\Delta E \times V_0}{\epsilon \times V \times g}$$

ΔE – $E_{532} - E_{600}$

V_0 – całkowita objętość supernatantu

ϵ – molowy współczynnik absorpcji - 155 mM/cm

V – objętość supernatantu dodana do mieszaniny reakcyjnej

g – świeża masa liści

Zadanie 2. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) metodą spektrofotometryczną

Spektrofotometryczna metoda oznaczania aktywności SOD polega na oznaczeniu stopnia redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) przez anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot -}$), powstający w wyniku fotochemicznej redukcji ryboflawiny na świetle. Forma utleniona NBT (barwa żółta) ulega redukcji przez O_2 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 MgSO₄, 1 mM ditiotretitol (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 z nad osadu i stosować do oznaczeń.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

- | | |
|--|---------|
| – 0,1 bufor fosforanowy pH-7,8 | 2,2 ml |
| – 0,156 mM ryboflawiny (rozcieńczonej 10 razy) | 0,25 ml |
| – 0,156 M metioniny | 0,25 ml |
| – 0,756 mM NBT | 0,25 ml |
| – ekstrakt roślinny | 50 µl |

Próba kontrolna zawiera zamiast ekstraktu roślinnego 50 µl H₂O, pozostałe składniki są takie same jak w mieszaninie reakcyjnej.

Przygotować do inkubacji:

1. Próby z H₂O (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 ekstynkcję przy długości fali $\lambda = 560 \text{ nm}$.

Przykład wyliczenia aktywności SOD:

1 [U] = 50 % hamowania reakcji redukcji NBT

100 % reakcji = 0,395 (E_{560} prób z H_2O)

x % reakcji = 0,227 (E_{560} prób z ekstraktem)

x = 57,5 %

% inhibicji = 100 % - x % reakcji

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

42,3 % : 50 % = 0,85 [U] (w 50 μ l ekstraktu) – 70 μ g białka

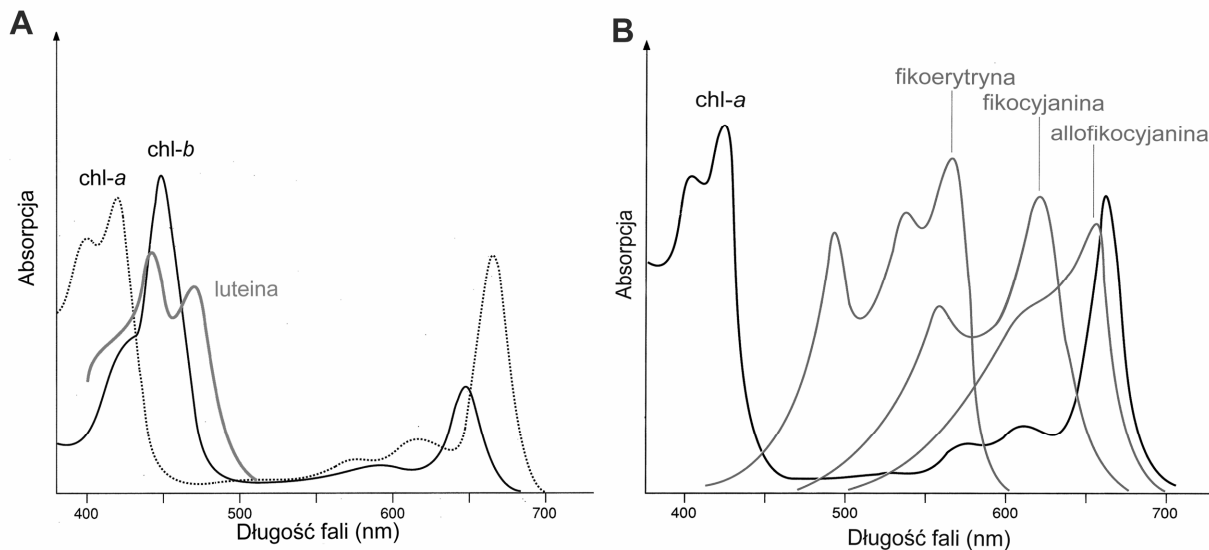
x [U] – 1000 μ g białka

x = 12,1 [U]

BARWNIKI ASYMLACYJNE

Wszystkie organizmy fotosyntezujące 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.

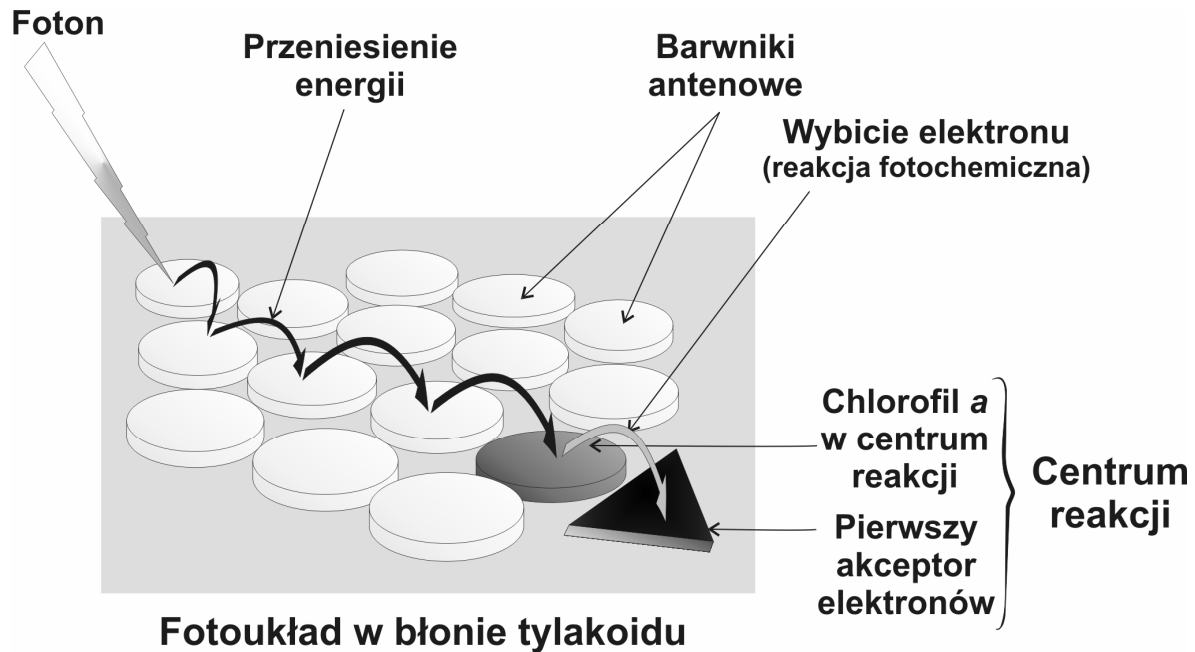
Wyróżniamy trzy grupy barwników asymilacyjnych: chlorofile, karotenoidy i fikobiliny. Różnią się one budową, zakresami światła widzialnego, które mogą pochłaniać (Rys. 1), właściwościami, a także pełnionymi funkcjami. Wspólną cechą tych związków, pozwalającą im absorbować promieniowanie świetlne, jest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



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

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 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 rosnać 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).

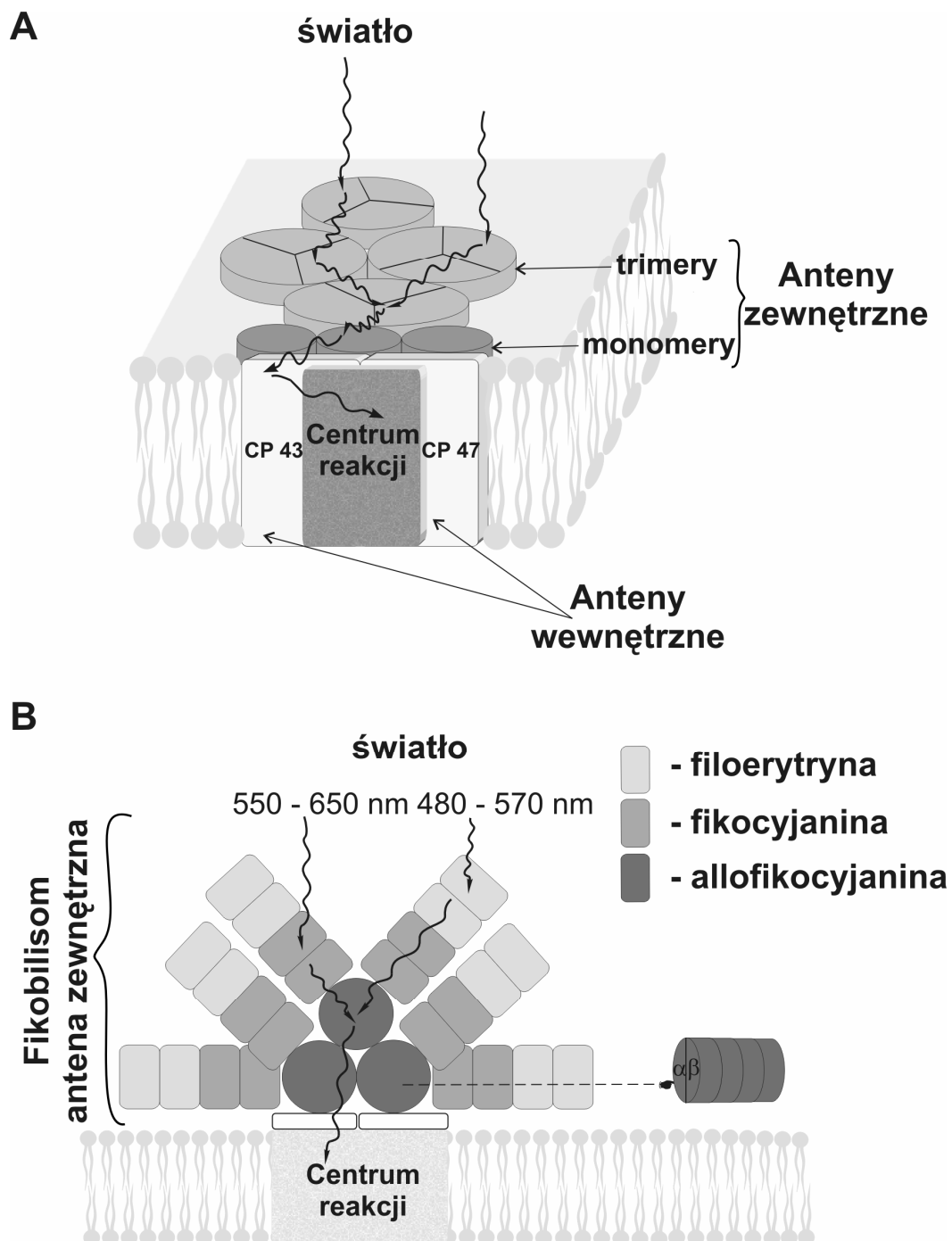


Rys. 2 Schemat przenoszenia energii z barwników antenowych do centrum reakcji.

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 β -karoten.

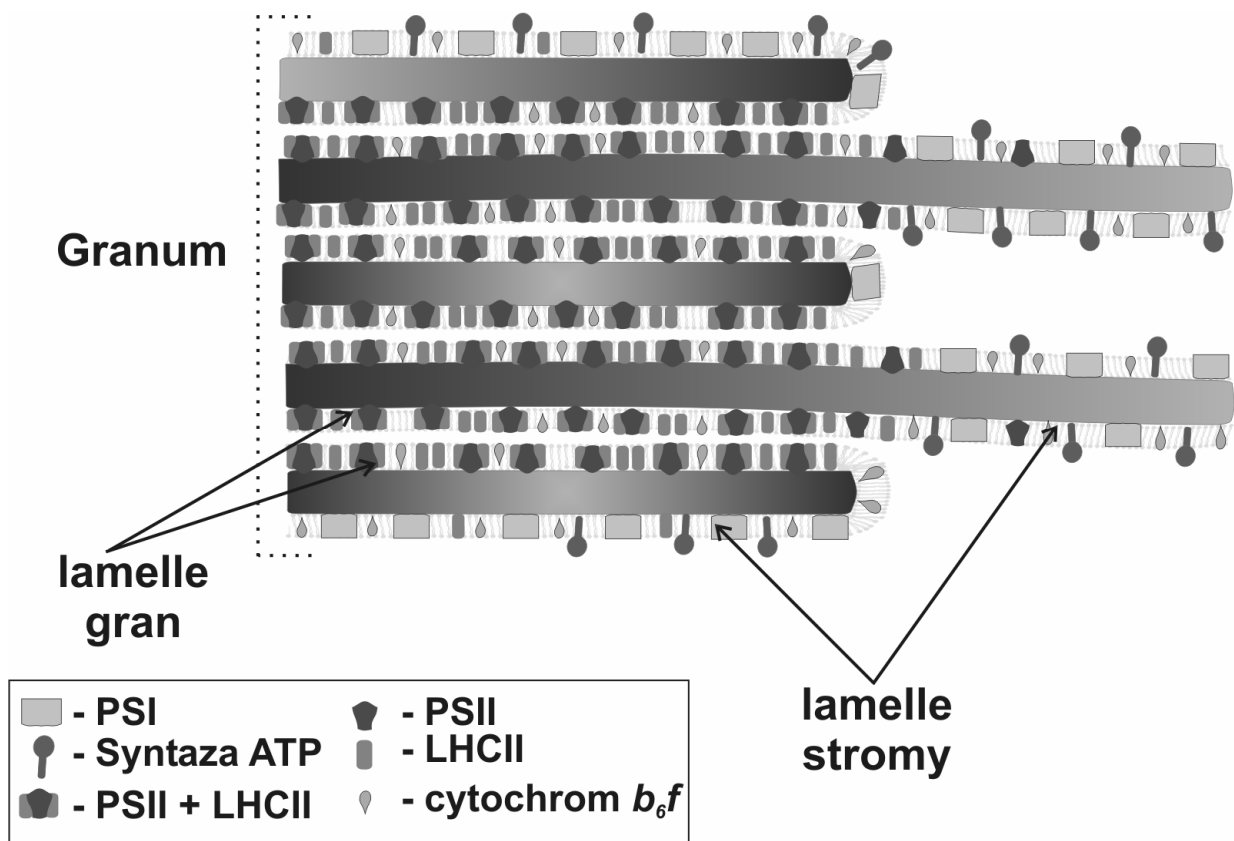


Rys. 3 Schemat budowy i przenoszenia energii w obrębie fotoukładu II u **(A)** roślin wyższych oraz **(B)** sinic i krasnorostów.

- 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 LHCI, 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.

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 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:

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

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

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

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

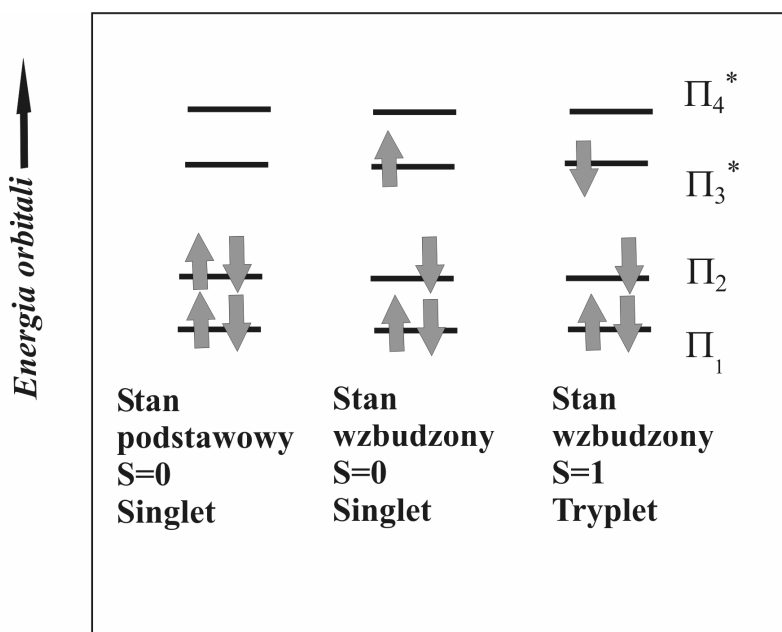
Zadanie 3. Badanie właściwości chlorofili:

Okolo 2 g liści rozetrzeć w moździerzu w 96% etanolu z dodatkiem odrobiny piasku i CaCO_3 . Homogenat przesączyć na lejku Schotta pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość przemywać etanolem aż do uzyskania ok. 20 ml przesączu. Otrzymany ekstrakt rozdzielić równomiernie do trzech probówek, do dwóch z nich dodać 3 – 4 krople stężonego HCl i ostrożnie wymieszać, zaobserwować powstawanie feofityny. Do jednej z probówek z feofityną dodać niewielką ilość octanu miedzi i dokładnie wymieszać, zaobserwować zajście reakcji. Roztwory w probówkach oświetlać światłem UV przy długości fali 365 nm i porównać ich zdolność do fluorescencji *in vitro*.

W opisie do ćwiczenia należy umieścić wyniki (razem z obliczeniami) przedstawiające zawartości barwników fotosyntetycznych i relacje między poszczególnymi ich grupami dla roślin kontrolnych i starzejących się, wyciągnąć wnioski. Przedstawić również zależność między budową cząsteczki chlorofilu i jego pochodnych a zdolnością do fluorescencji.

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 jest o dłuższej fali niż światło absorbowane.



Rys.1. Stany wzbudzone elektronów.

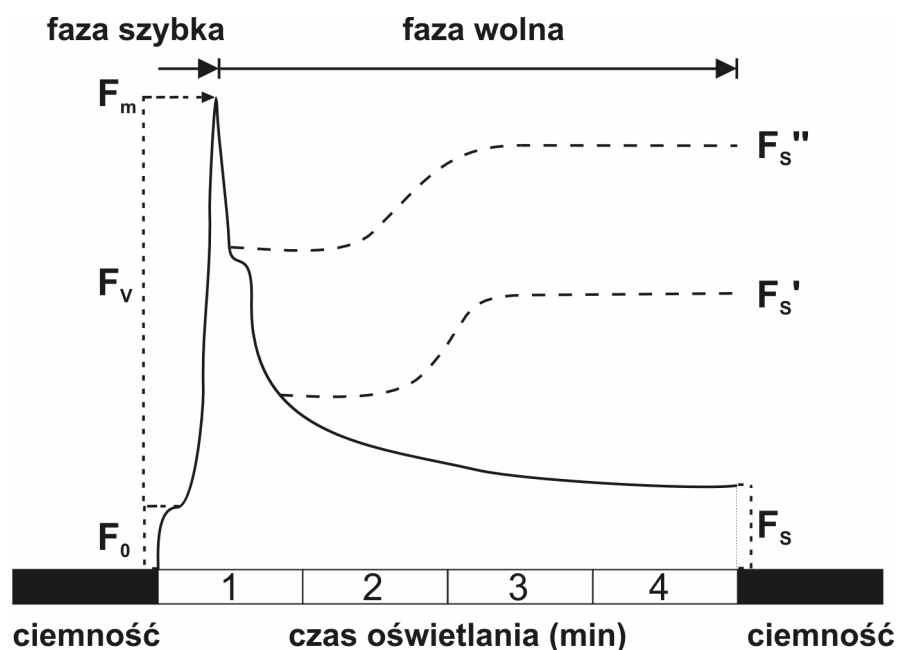
Intensywność fluorescencji zależy od ilości cząsteczek chlorofilu znajdujących się aktualnie w stanie wzbudzonym (o tzw. zamkniętych pułapkach energetycznych, niezdolne do przyjmowania elektronów). Im jest ich więcej tym intensywniejsza fluorescencja, osiągająca maksymalnie 3-5% pochłoniętego światła. 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 oświetlania 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.



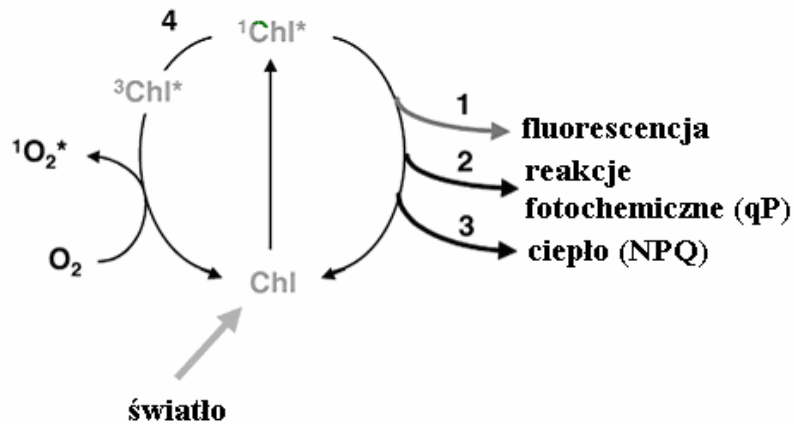
Rys. 2 Kinetyka fluorescencji chlorofilu *a*.

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 ($^3Cl^*$) 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 liści prosa lub kukurydzy poddanych działaniu czynników stresowych.

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

Odcięte liście roślin poddano przez 24 godziny działaniu szeregu czynników mających wpływ na aktywność fotochemiczną chloroplastów:

1. kontrola - liście umieszczono w wodzie
2. liście umieszczono w temperaturze 4°C
3. liście umieszczono w temperaturze 35°C
4. liście poddano działaniu roztworu 1 M NaCl
5. liście poddano działaniu roztworu 100 μM dwunitrofenolu (DNP)
6. liście poddano działaniu roztworu 5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

Fluorescencję chlorofilu *a* oznaczamy wykorzystując trzytygodniowe liście roślin prosa lub kukurydzy rosnących przy natężeniach światła $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Do pomiarów pobieramy środkowy, ok. 12 cm fragment trzeciego i czwartego liścia. Odcięte liście umieszczamy na 24 godziny w warunkach opisanych powyżej. Po tym czasie wykonujemy pomiary. Za pomocą klamer zaciemniamy (na 15 min) środkową część badanego fragmentu liścia i mierzymy fluorescencję przy pomocy Bio Monitora S.C.I.AB PSM (Plant Stress Meter), Sweden. Mierzmy następujące parametry indukcji fluorescencji chlorofilu *a*:

1. F_o fluorescencja podstawowa próbki adaptowanej do ciemności
2. F_m fluorescencja maksymalna próbki adaptowanej do ciemności
3. F_v fluorescencja zmienna ($F_m - F_o = F_v$)
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.

FOTOSYNTeza

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 łączą 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 wiolegen).

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.

Wykonanie

1. Izolowanie chloroplastów

- a) 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.

- b) 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 5°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.

2. 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 ₂)	- 5 ml
0.25 M chlorek potasowy (KCl)	- 5 ml
0.01 M żelazicyjanek potasowy (K ₃ Fe(CN) ₆)	- 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.

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

Zadanie 2. Wymiana CO₂ u roślin C₃ i C₄. Wpływ stężenia tlenu

(ćwiczenie w części demonstracyjnej)

Ćwiczenie zapoznaje z charakterystycznymi cechami podstawowych typów fotosyntezy oraz ze sposobem badania wymiany CO₂.

Rośliny wiążą CO₂ w procesie fotosyntezy (Pn) i jednocześnie wydzielają CO₂ w procesie fotooddychania (PR) oraz oddychania mitochondrialnego (DR). Przepływ CO₂ w roślinie, w przeciwnych kierunkach, nazywany jest wymianą CO₂. Przyjmuje się w praktyce, że udział DR w wymianie CO₂ na świetle jest niewielki, gdyż przebiega ono z natężeniem niskim, w stosunku do Pn i PR.

Wiązanie CO₂ (fazę ciemną fotosyntezy) inicjuje reakcja przyłączenia CO₂ (karboksylacji) do rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBP) z wytworzeniem 2 cząsteczek 3-fosfoglicerynianu (PGA). Przyłączenie O₂ do RuBP (oksygenacja) wytwarza 1 cząsteczkę PGA i 1 cząsteczkę fosfoglikolanu (P-glikolanu), co inicjuje proces fotooddychania (wydzielanie CO₂ na świetle z przemian glikolanu). Te dwa typy reakcji katalizuje chloroplastowy enzym, karboksylaza/oksygenaza RuBP, nazywany Rubisco. Ponieważ CO₂ i O₂ współzawodniczą o centrum katalityczne enzymu, to szybkość Pn i PR zależy od stężenia tych gazów w chloroplastach.

Rośliny C₃, gdzie pierwszymi produktami wiązania CO₂ są związki trójwęglowe (stąd nazwa rośliny C₃) wykazują fotooddychanie, które zależy od stężenia O₂ w otaczającej atmosferze. U roślin C₄, wiązanie CO₂ zachodzi przy udziale dwóch typów komórek: mezofilowych (M) i pochw okołowiązkowych (BS) oraz przy udziale dwóch enzymów karboksylujących: Rubisco (w chloroplastach BS) i karboksylazy fosfoenolopirogronianowej (PEPC) – w cytozolu M. Źródłem CO₂ dla Rubisco są C-4 kwasy (stąd nazwa rośliny C₄) wytwarzane w M (jabłczan i asparaginian) w ilościach tak dużych, że oksygenacja RuBP w chloroplastach BS (gdzie jest wysokie stężenie CO₂) praktycznie nie zachodzi (stąd brak fotooddychania).

Wykonanie

Odcięte liście rośliny C₃ (np. kostrzewy), a następnie rośliny C₄ (np. kukurydzy) umieścić w szczelnej kamerze z pleksiglasu i połączyć w zamknięty układ cyrkulacyjny z analizatorem CO₂ w podczerwieni (IRGA). Przyrząd ten wykorzystuje zdolność cząsteczek CO₂ do absorbowania promieniowania podczerwonego (cieplnego). Umożliwia to ciągłą i automatyczną rejestrację zmian w stężeniu CO₂ w zamkniętym układzie, na świetle oraz w ciemności. Przy zmianie stężenia tlenu, do zamkniętego

układ cyrkulacyjny wprowadzić azot techniczny z 1% O₂ lub czysty tlen (100% O₂), zamiast powietrza (21% O₂). Azot i tlen nie zawierają CO₂, stąd pewną ilość czystego CO₂ podać do układu strzykawką, tak aby jego wyjściowe stężenie, po wymieszaniu, wynosiło 600 – 800 µl l⁻¹ (ppm). Zmianę atmosfery gazowej prowadzić na świetle, przy rozwartych szparkach liści (dla ułatwienia dyfuzji), natomiast wymieszanie podanej porcji CO₂ do układu – przy zaciemnionej kamerze z liśćmi.

Dla liści badanych roślin oznaczyć:

- fotosyntezę netto (Pn),
- kompensacyjne stężenie CO₂ (Γ)
- oddychanie ciemniowe (DR) - po 3-4 min. od wyłączenia światła.

Opracowanie wyników: Na podstawie zarejestrowanych na taśmie zapisów w zmianie stężenia CO₂, na świetle i w ciemności (i dodatkowych danych dostarczonych przez prowadzącego), obliczyć natężenie Pn i DR na jednostkę powierzchni liści w czasie jednej sekundy (w mg CO₂ m⁻²s⁻¹) oraz Γ (w µl l⁻¹). Wyniki zestawić w tabeli, opisać i przedyskutować. Napisać wnioski.

Zadanie 3. Wydzielanie tlenu podczas fotosyntezy

(ćwiczenie w części demonstracyjnej)

Ćwiczenie zapoznaje ze sposobem oznaczenia fotosyntezy w środowisku wodnym przy pomocy elektrody tlenowej oraz z wpływem CO₂ na natężenie wydzielania O₂.

Podczas fotosyntezy, rośliny oraz glony, wiążą CO₂ (reakcje ciemniowe) i wydzielają O₂ (reakcje świetlne). Przebieg tych reakcji (faz fotosyntezy) jest wzajemnie powiązany (sprzężony), głównie poprzez szybkość wytwarzania oraz zużywania NADPH i ATP. W obecności CO₂ w chloroplastach, NADPH i ATP są zużywane w cyklu Calvina, do redukcji 3-fosfoglicerynianu (PGA) do aldehydu 3-fosfoglicerynowego (G3P). Ciągłe odtwarzanie akceptora elektronów (NADP⁺) oraz ADP warunkuje prawidłowe działanie łańcucha transportu elektronów/protonów oraz mechanizmu rozkładu H₂O. Ograniczenie dostępności CO₂ do chloroplastów powoduje spadek natężenia wydzielania tlenu, a intensywnemu wiązaniu CO₂ w fotosyntezie towarzyszy intensywne wydzielanie tlenu.

Wykonanie

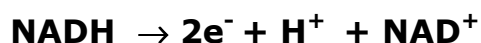
1. Skalibrować miernik elektrody według udzielonej instrukcji.
2. Fragment liścia (ok. 1 x 8 cm, z uszkodzoną epidermą) umieścić w termostatyзованej (25°C) kamerze. Włożyć mieszadło i umieścić kamerę na mieszadle magnetycznym.
3. Do kamery wprowadzić ok. 13 – 15 ml buforowego roztworu KH_2PO_4 w stężeniu 50 mM (pH 7.2). Włączyć mieszanie i oświetlenie. Przepłukiwać azotem technicznym przez około 10 – 15 min., celem maksymalnego obniżenia stężenia CO_2 i O_2 w roztworze, i w liściu.
4. Przerwać przepłukiwanie azotem i natychmiast umieścić elektrodę w kamerze, tak aby pod czujnikiem elektrody nie było pęcherzyków gazu. Włączyć rejestrator.
5. Rejestrować na taśmie, w ciągu kilku minut, zapis stężenia O_2 . Przy braku lub minimalnej ilości CO_2 w fazie wodnej (i w komórkach liścia) O_2 nie powinien być praktycznie wydzielany.
6. Przy pomocy igły i strzykawki wprowadzić do kamery 0.1 ml 1 M roztworu NaHCO_3 . Rejestrować zmiany w stężeniu O_2 podczas okresu fotosyntezy, a po zaciemnieniu kamery – zmiany w stężeniu O_2 podczas okresu oddychania.

Opracowanie wyników: Na podstawie zarejestrowanych zapisów w zmianie stężenia O_2 , na świetle (przed i po podaniu NaHCO_3) oraz w ciemności i objętości kamery pomiarowej (10 ml) obliczyć natężenie fotosyntezy netto (P_n) oraz natężenie oddychania (DR) na jednostkę powierzchni liścia (w $\text{mg O}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Podać stężenie NaHCO_3 w roztworze. Na podstawie równania Hendersona-Hasselbacha ($\text{pH} = \text{pK}_1 + \log [\text{HCO}_3^-] / [\text{CO}_2]$) obliczyć stężenie CO_2 , przy którym zachodziło wydzielanie tlenu. Przyjąć wartość $\text{pK}_1 = 6.365$ dla temperatury 25°C. Przebieg zmian w wydzielaniu i pobieraniu O_2 przedstawić schematycznie w postaci rysunku. Opisać i przedyskutować wyniki, napisać wnioski.

ODDYCHANIE

Oddychanie to proces utleniania związków organicznych. W oddychaniu tlenowym, gdzie czynnikiem utleniającym jest O_2 , 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.

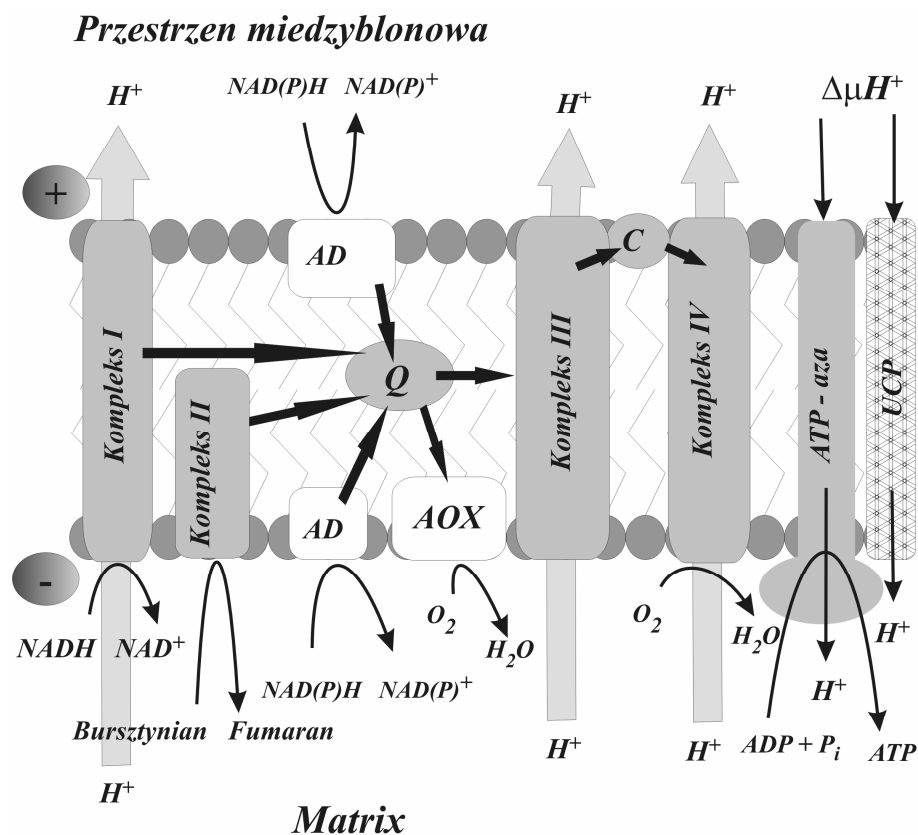
Oddychanie zachodzi w **mitochondriach** – organellach komórkowych otoczonych podwójną błoną. Powierzchnię **błony wewnętrznej** powiększają liczne uwypuklenia, zwane grzebieniami. Błona ta charakteryzuje się stosunkowo niską przepuszczalnością. Znajdują się w niej kompleksy białkowe, stanowiące składniki 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^+ 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_2 do H_2O . 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 – pula ubichinonu, AD – alternatywne dehydrogenazy NAD(P)H, AOX – oksydaza alternatywna, UCP – białko rozprzegające, $\Delta\mu H^+$ - 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.

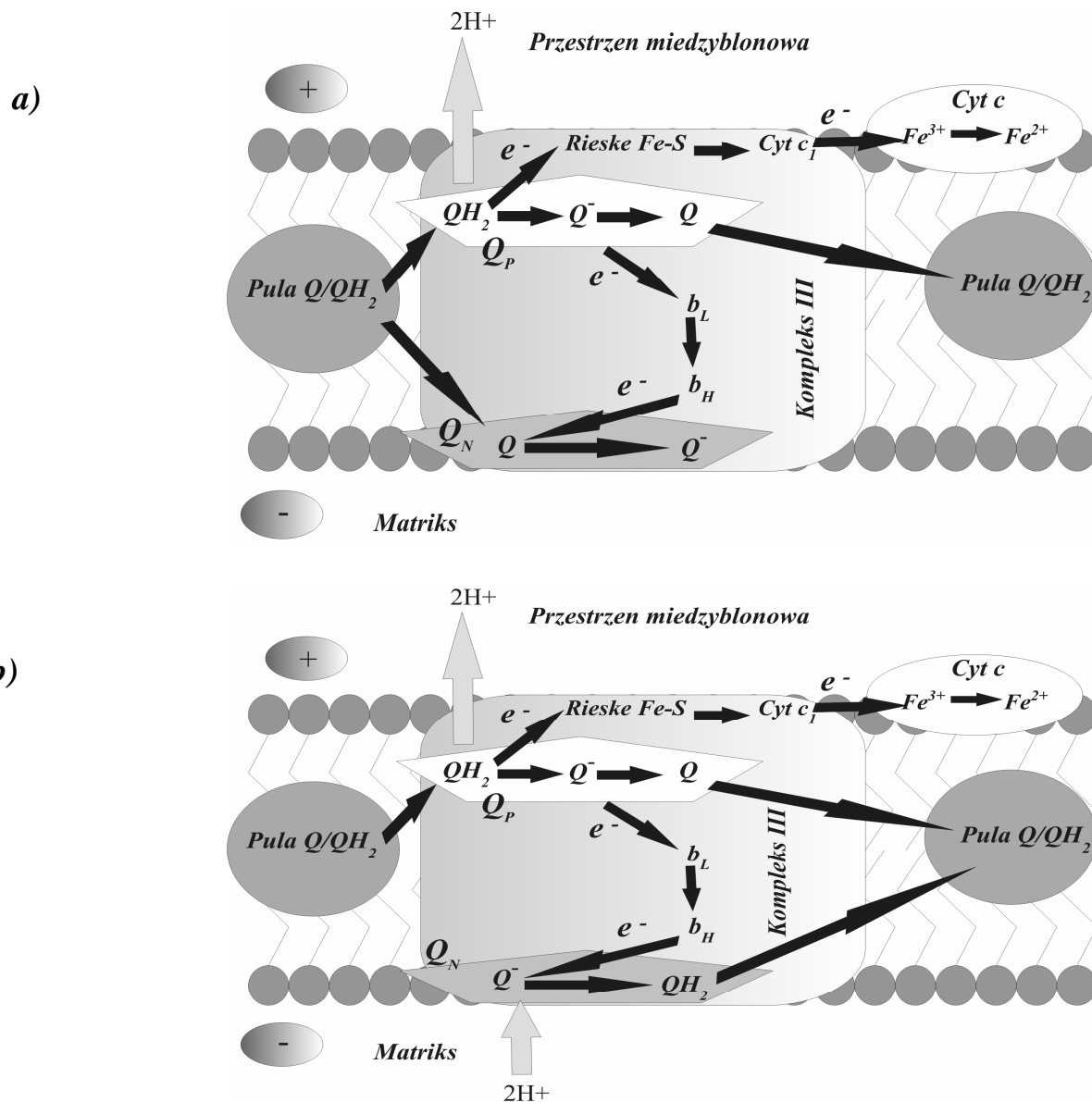
- **Kompleks III** – zawiera cytochromy b, cytochrom c_1 oraz białko Rieske (białko Fe-S); odpowiada za przenoszenie elektronów z ubichinolu na cytochrom c. Transportowi elektronów przez ten kompleks towarzyszy pompowanie protonów do przestrzeni międzybłonowej; inhibitor – antymycyna A, myksotiazol.
- **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_2), 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_2) 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_1 (kompleks III). Model tego procesu opracował w latach 70-tych ubiegłego stulecia Mitchell i nazwał go Q-cyklem. Zakłada on istnienie w kompleksie III dwóch miejsc wiążących ubichinon, zlokalizowanych na przeciwległych stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej: Q_p - miejsce utleniające ubichinol, leżące od strony przestrzeni międzybłonowej i Q_n - 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_p jest utleniany dwustopniowo. Pierwszy uwalniany elektron transportowany jest do wysokopotencjałowej żelazo-sulfoproteiny - białko Rieske ($E_m = .280mV$). Ubichinol przekształca się w anion ubisemichinonowy (Q^-), który dostarcza drugi elektron do niskopotencjałowego hemu typu b ($E_m = -60mV$) w cytochromie b_{566} . Ten z kolei oddaje elektron na hem cytochromu b_{562} ($E_m =$

60mV), tzw. wysokopotencjałowy. Protony powstające podczas utleniania QH_2 w Q_p uwalniane są do przestrzeni międzybłonowej. Cytochrom b_{562} oddaje elektron na ubichinon związany w Q_n , a ten zostaje zredukowany do anionu ubisemichinonowego (**Rys. 2a**).



Rys. 2. Q-cykl, opisujący mechanizm transportu elektronów i protonów przez kompleks cytochromowy b-c₁.

b_L - niskopotencjałowy hem typu b w cytochromie b_{566} ,

b_H - wysokopotencjałowy hem typu b w cytochromie b_{562} .

Aby ubichinon w Q_n mógł zostać zredukowany do ubichinolu, w miejscu Q_p musi zostać przyłączona kolejna cząsteczka QH_2 , ulegająca utlenieniu w identyczny sposób jak poprzednia – pierwszy elektron trafia poprzez białko Rieske na cytochrom c, zaś drugi redukuje Q^- w miejscu Q_n do QH_2 (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_2 z Q w miejscu Q_n , zaś myksotiazol blokuje transport elektronów w Q_p .

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 konserwatywnych 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 syntazę 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 nadąża z przenoszeniem elektronów na tlen. Dodatkowo działanie alternatywnych dróg transportu elektronów pozwala pozbyć się nadmiaru NADH wytworzonego podczas cyklu Krebsa, dostarczając 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°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 O₂ i wydzielania CO₂. 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 O₂ 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. Wydzielanie CO₂ i pobieranie O₂ podczas oddychania przez kiełkujące nasiona

Celem ćwiczenia jest zapoznanie ze sposobem oddychania nasion kukurydzy i grochu. Pomiar wykonywany jest przy pomocy aparatu Warburga.

1. Zasada pomiaru

W aparacie Warburga odczytujemy zmiany ciśnienia wywołane wydzielaniem lub pobieraniem gazu przez badany obiekt, przy zachowaniu stałej objętości i temperatury układu. Czujnikiem zmian ciśnienia (h) jest umieszczony w ramieniu manometru płyn Brodiego – zmianę jego poziomu (w mm) odczytujemy w otwartym ramieniu urządzenia. W przypadku pobierania gazu, poziom płynu Brodiego w otwartym ramieniu opada ($h < 0$), jeśli zaś badany obiekt wydziela gaz, poziom płynu podnosi się ($h > 0$). Zanim rozpoczniemy pomiary, należy zamknąć ramię manometru i doprowadzić poziom płynu do poziomu wyjściowego (150 mm). Aby obliczyć ilość pobranego lub wydzielonego gazu, należy otrzymaną wartość h pomnożyć przez wartość stałej naczynkowej (jest ona określona dla danego gazu i danego układu).

2. Wykonanie

- Przygotować zestaw pomiarowy: dwa manometry i dwa naczynka reakcyjne (ze studzienką i bez studzienki)
- Na dnie naczynek umieścić po 5 nasion grochu lub kukurydzy
- Do studzienki na dnie naczynka wlać 0,2 ml 10% roztworu KOH (pochłaniacz CO₂) i włożyć kawałek złożonej w harmonijkę bibuły filtracyjnej, tak aby 0,5 cm wystawało ponad krawędź studzienki. Do drugiego naczynka nie dodajemy KOH
- Do ramienia bocznego obu naczynek wlać po 0,5 ml wody destylowanej, aby zapewnić odpowiednią wilgotność w układzie
- Naczynka nasadzić na szlif manometrów i spiąć gumkami. **Krany manometrów muszą pozostać otwarte!**
- Równolegle przygotować manometr kontrolny – termobarometr, czyli manometr z pustym naczynkiem
- Tak przygotowany zestaw umieścić w łaźni wodnej aparatu (temperatura 30°C) i włączyć wytrząsanie dla wyrównania temperatury między łaźnią a naczynkiem

- Po około 15 min. ustawić punkt zerowy w manometrach (poziom płynu Brodiego na 150 mm). Zamknąć krany trójdrożne manometrów, zanotować czas. Odczyty ciśnienia należy wykonywać co 10 minut w ciągu 1,5 h. Przystępując do odczytu należy sprowadzić płyn manometryczny w zamkniętym ramieniu do poziomu zerowego (do 150 mm) poprzez pokręcenie śrubą zaciskającą gumowy zbiorniczek z płynem Brodiego w dolnej części manometru i wówczas odczytać poziom płynu w ramieniu otwartym (w mm). Należy dokonywać odczytów zarówno prób doświadczalnych, jak i termobarometru. Wyniki umieścić w tabelach:

Naczynko z KOH							
czas	Odczyt termobarometru	Odczyt manometru badanego	Poprawka dla termobarometru	Zmiana bezwzględna	Zmiana rzeczywista (h)	Ilość pobranego O ₂ $x=(h \cdot k_1[O_2])$	Ilość O ₂ pobranego od początku pomiaru

Naczynko bez KOH									
czas	Odczyt termobarometru	Odczyt manometru badanego	Poprawka dla termobarometru	Zmiana bezwzględna	Zmiana rzeczywista (h ₁)	Zmiana ciśnienia spowodowana pobieraniem O ₂ $x/k_2[O_2]$	Zmiana ciśnienia spowodowana wydzielaniem CO ₂ $H=h_1-(x/k_2[O_2])$	Ilość wydzielonego CO ₂ $H \cdot k[CO_2]$	Ilość CO ₂ wydzielonego na początku pomiaru

3. Opracowanie wyników:

a) obliczyć stałe naczynkowe $k[\text{O}_2]$ i $k[\text{CO}_2]$ dla temperatury 30°C

$$k = (V_g \cdot 273/T + V_c \cdot \alpha) / P_0 \text{ } [\mu\text{l}/\text{mm}],$$

gdzie: V_g – objętość fazy gazowej, V_c – objętość fazy ciekłej,

T – temperatura absolutna, P_0 – 10000 mm

α – rozpuszczalność gazu w temperaturze T przy 760 mmHg

($\alpha[\text{O}_2](30^\circ\text{C}) = 0,0261$; $\alpha[\text{CO}_2](30^\circ\text{C}) = 0,665$)

$$V_g = V_{\text{ukl}} - (V_{\text{cieczy}} + V_{\text{nasion.}}) \text{ (w } \mu\text{l)}$$

V cieczy dla naczynka z KOH = 700 μl

dla naczynka bez KOH = 500 μl

$$V_{\text{nasion grochu}} = 2500 \mu\text{l}$$

$$V_{\text{nasion kukurydzy}} = 2000 \mu\text{l}$$

b) obliczyć natężenie oddychania badanej tkanki i wyrazić je w $\mu\text{l O}_2/1\text{g}$ świeżej masy/1 godz

c) sporządzić wykres przedstawiający natężenie pobierania tlenu i wydzielania dwutlenku węgla

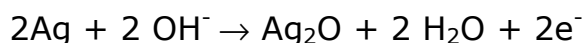
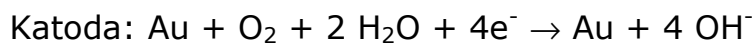
d) obliczyć współczynnik oddechowy

Zadanie 2. Pobieranie tlenu podczas oddychania

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

1. 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_2) cienką teflonową błonką przepuszczalną dla gazów, ale nieprzepuszczalną dla innych rozpuszczalnych związków mogących uszkodzić katodę. Gdy do elektrod przyłożyć napięcie (0,5 – 0,8V), tlen reagując na katodzie powoduje przepływ prądu. Natężenie prądu jest proporcjonalne do stężenia tlenu. Zachodzące reakcje chemiczne można przedstawić następująco:



2. 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 termostatyзованej 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_3). Rejestrować na taśmie zmiany stężenia tlenu
- Po pomiarze zmierzyć objętość wody w kamerze i zważyć korzenie

3. 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_2 /g świeżej masy/godz lub w nmol O_2 /g świeżej masy/godz.