

Laboratorní cvičení č. 7

1. Extrakce lipofilních barviv a stanovení jejich vlastností

Princip

V listech zelených rostlin se vyskytuje větší počet lipofilních barviv. Jejich typickou vlastností je rozpustnost v tucích. Pro fotosyntézu mají rozhodující význam chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a karotenoidy.

Charakteristickou vlastností roztoků obsahujících chlorofyl *a* je fluorescence, která je známkou jeho fotochemické aktivity. Principem fluorescence je absorpce energie dopadajícího záření molekulami chlorofylu *a* a následná emise (vyzáření) části této energie zpět do okolí rostliny v podobě záření o vyšší vlnové délce, která je stále ve viditelné oblasti spektra.

Z listů lze směs lipofilních barviv extrahovat nepolárními rozpouštědly (acetone, etanolem). K separaci jednotlivých složek extraktu lipofilních barviv se používá papírová chromatografie. Principem chromatografie je mnohonásobné opakované rozdělování látek mezi nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní) fází. Jako stacionární fázi můžeme použít filtrační papír, jako mobilní fázi pak organické rozpouštědlo. Při rozdělování látek mezi mobilní a stacionární fázi se jednotlivé složky rozdělují podle schopnosti adsorpce na adsorpční vrstvu.

Výsledkem chromatografie je chromatogram, na kterém rozlišíme jednotlivá barviva podle charakteristického zbarvení – zelený chlorofyl *a*, modrozelený chlorofyl *b*, žluté xantofyly a oranžové karoteny.

Materiál a pomůcky

Listy vybraných druhů rostlin, 96 % etanol, třecí miska s tloučkem, nůžky, filtrační papír, nálevka, Erlenmeyerova baňka, zkumavka, kádinka, lampa meotaru, odměrný válec.

Postup

Nejprve připravte etanolvý roztok rostlinných barviv. Připravené listy rozstříhejte a rozetřete ve třecí misce s trochou etanolu. Vzniklý extrakt přefiltrujte.

Část získaného extraktu přelijte do zkumavky a zjistěte jeho barvu. Pak extrakt prosvětlete lampou meotaru a pozorujte jeho zbarvení. Zaznamenejte, jakou barvu má extrakt v procházejícím a odraženém světle.

Zbylý extrakt přelijte do malé kádinky. Úzký pruh filtračního papíru ponořte jedním koncem do extraktu a nasajte roztok do výšky 1 až 2 cm. Nechte na vzduchu oschnout, postupně několikrát zopakujte. Do širšího odměrného válce nalijte asi 5 ml benzínu. Filtrační papír se zaschlým barevným proužkem vložte (proužkem napřed) do benzínu a upevněte tak, aby se nedotýkal stěny válce. Jakmile se čelo mobilní fáze přiblíží hornímu okraji filtračního papíru, vyjměte proužek z válce a nechte uschnout. Tužkou obtáhněte obrysy jednotlivých skvrn a zaznamenejte jejich barvu.

2. Důkaz uvolňování kyslíku při fotosyntéze

Princip

Při fotosyntéze je rostlinami uvolňován do prostředí kyslík. Produkce kyslíku je dobře pozorovatelná u vodních rostlin. Tyto rostliny kumulují kyslík tvořený v procesu fotosyntézy v mezibuněčných prostorách stonku. Jestliže je stonek poškozen, z řezné plochy unikají bublinky, které jsou dobře pozorovatelné pouhým okem. Počet bublinek kyslíku uvolněných za časovou jednotku můžeme považovat za míru fotosyntézy. Fotosyntézu lze podpořit zvýšením intenzity světelného záření nebo vnějšího prostředí rostliny o oxid uhličitý.

Materiál a pomůcky

Douška (*Egeria* sp.), voda sycená oxidem uhličitým (minerálka), destilovaná voda, lampa meotaru, velké kádinky, nálevky s krátkou stopkou, zkumavky, digitální váha.

Postup

Naplňte dvě kádinky destilovanou vodou, třetí pak sycenou minerální vodou. Do každé kádinky ponořte stopkou nahoru nálevku naplněnou stejným počtem stonků vodních rostlin, (rostliny orientačně zvažte tak, aby jich bylo přibližně stejně pro všechna tři opakování pokusu). Rostliny umístěte vzrostnými vrcholy směrem dolů. Na stopku nálevky nasadte pod hladinou zkumavku tak, aby do ní nevznikl vzduch. Jednu sestavenou aparaturu s čistou vodou intenzivně osvětlete lampou meotaru, zbývající dvě (s vodou a jedlou sodou) ponechte volně na laboratorním stole.

Pozorujte uvolňování bublinek a hromadění kyslíku na dně zkumavek. Stanovte, kolik bublinek se uvolní za minutu a zhodnoťte vliv prostředí na intenzitu fotosyntézy.

3. Demonstrace vlivu světla na morfologické utváření rostlin (fotomorfózy)

vyhodnocení v některém z následujících cvičení

Princip

Světlo je nezbytným tzv. morfogenním faktorem potřebným k normálnímu růstu rostliny. Nadzemní části rostlin vyrůstající ve tmě rostou rychle do délky, jsou však slabší a nevytvářejí chlorofyl, je omezeno zakládání listů a růst jejich čepelí. Soubor příznaků týkajících se růstových změn vyvolaných vlivem nedostatečného nebo žádného osvětlení se nazývá etiolizace.

Materiál a pomůcky

Obilky pšenice seté (*Triticum aestivum*), semena hrachu setého (*Pisum sativum*), nádoby se substrátem, voda.

Postup

Semena hrachu a obilky pšenice zasejte do připraveného substrátu. Polovinu rostlin pěstujte na světle, polovinu ve tmě. V některém z příštích cvičení vyhodnoťte průměrnou délku nadzemních částí rostlin a popište jejich morfologický vzhled.

4. Příjem vody semenou s obsahem různých zásobních látek

vyhodnocení v příštím cvičení

Princip

Při příjmu vody semenem bobtnají nejprve koloidy buněčných stěn a protoplastu, poté voda začne vnikat do vakuol buněk. Množství vody přijímané semenem k nabobtnání koloidů závisí na charakteru zásobních látek přítomných v semeni. Semena obsahující hodně bílkovin bobtnají podstatně více než například obilky, kde je rezervní látkou především škrob. O tom se můžeme přesvědčit jednak z objemových změn semen, jednak zjišťováním změn hmotnosti semen v důsledku přijaté vody.

Materiál a pomůcky

Semena hrachu setého (*Pisum sativum*), semena sóji luštěinaté (*Glycine max*) a pšenice seté (*Triticum aestivum*), kádinky, odměrný válec, váhy.

Postup

Připravte vzorky semen a obilek o objemu 10 ml. Vzorky zvažte a vsypte do kádinek o objemu 50 ml. 24 hodin před příštím cvičením bude ke vzorkům přidáno vždy 30 ml vody. V následujícím cvičení stanovte objemové a hmotnostní změny jednotlivých vzorků. Rozdíly mezi jednotlivými druhy rostlin zdůvodněte.

5. Růstová zkouška klíčivosti

vyhodnocení v příštím cvičení

Princip

Ke stanovení klíčivosti semen v laboratorních podmínkách se používají různé metody. K nejčastěji používaným patří metody růstové. Semena se nechají naklíčovat v klíčidlech nebo Petriho miskách na filtračním papíru případně písku. Nádoby se semeny se zpravidla umísťují v termostatu s konstantní teplotou a zavlažují stejným množstvím destilované vody.

Stanovení klíčivosti růstovou zkouškou trvá zpravidla sedm až deset dní, podle testovaného druhu rostliny. Klíčivost se vyjadřuje v procentech všech vyklíčených semen z celkového počtu semen, u nichž byla růstová zkouška realizována. Energie klíčení se udává v procentech vyklíčených semen v jednotlivých dnech počínaje druhým dnem po přidání vody k semenům až do dne, kdy vyklíčí všechna klíčivá semena. Energii klíčení lze znázornit grafem, kde na osu x vyneseme dny po přidání vody, na osu y procenta vyklíčených semen.

Materiál a pomůcky

Semena různých druhů rostlin, klíčidla (případně Petriho misky), filtrační papír, destilovaná voda.

Postup

Na klíčidla nebo Petriho misky položte filtrační papír a zvlhčete jej asi 10 ml vody (semena na miskách nesmí být ponořena). Na něj pak rozložte do pravidelné mřížky vzorky semen. Přikryté misky (klíčidla) ponechte při laboratorní teplotě. Klíčení obilek pravidelně

sledujte (v časovém rozestupu cca 24 hodin). Výsledné hodnoty zapisujte do tabulky. Vypočtete klíčivost semen a graficky vyjádřete energii klíčení.