

Laboratorní cvičení č. 5

1. Stanovení osmotického tlaku buněčné šťávy metodou hraniční plazmolýzy

Princip

Rostlinnou buňku lze přirovnat k osmometru. Buněčná stěna je propustná pro vodu i pro rozpuštěné látky a osmotických pochodů se neúčastní. Nositelem semipermeability je cytoplazmatická membrána a membrány uvnitř buňky, zejména tonoplast. Je-li rostlinná buňka ponořena do vhodného plazmolytika, které je vzhledem k osmotické hodnotě buněčné šťávy hypertonické (má vyšší koncentraci), nastává jev zvaný plazmolýza. Rozumí se tím výdej vody z buňky do hypertonického roztoku přes semipermeabilní membrány. Zmenšuje se objem vakuoly a klesá turgorový tlak protoplastu na buněčnou stěnu. Ta je značně elastická, zatímco byla původně napjatá, začne zpočátku zmenšovat svůj objem tak, že se mění i velikost celé buňky. V okamžiku, kdy je buněčný turgor nulový, přestane se buněčná stěna smršťovat. Ale tonoplast s vakuolou se zmenšuje dál. Dochází k odtrhování protoplastu od buněčné stěny. Ponechá-li se takto plazmolyzovaná buňka v hypertonickém prostředí, pak odumírá. Přeneseli-li se včas do prostředí hypotonického (destilovaná voda), buňka začne znovu nasávat vodu, až se protoplast dostane do původního stavu. Tento jev se nazývá deplazmolýza. Jako plazmolytika je třeba používat látky, které nepůsobí na buňky jedovatě, a pro které jsou membrány impermeabilní.

Ve vakuolách rostlinných buněk jsou přítomny směsi rozmanitých látek, jako cukrů, organických kyselin a jejich solí i solí anorganických. Sledování průběhu plazmolýzy je jednou z metod, kterou můžeme zjistit koncentraci buněčné šťávy a z ní pak vypočítat hodnotu jejího osmotického tlaku. Je třeba zjistit koncentraci plazmolytika, kdy nepatrně dochází k odtržení protoplastu od buněčné stěny, což nastává nejdříve v rozích buňky. Tento stav plazmolýzy je označován jako plazmolýza hraniční. Průměrná koncentrace buněčné šťávy pozorovaného souboru buněk pak odpovídá koncentraci roztoku, v němž hraniční plazmolýza nastala u 50 % pozorovaných buněk.

Materiál a pomůcky

Cibule kuchyňská (*Allium cepa*, odrůda Karmen), vodní mor kanadský (*Elodea canadensis*) nebo douška (*Egeria* sp.), 1 M roztok sacharózy, destilovaná voda, odměrný válec, kádinky, preparační souprava, podložní a krycí sklička, mikroskop.

Postup

Připravte vždy 20 ml roztoků sacharózy o koncentracích 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M a 0,8 M podle následujícího výpočtu pro míchání roztoků různých koncentrací:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

kde c_1 je koncentrace původního roztoku sacharózy (v našem případě 1 M), V_1 je objem 1 M roztoku, který použijeme pro zředění, V_2 je objem roztoku, který chceme získat (20 ml), c_2 je výsledná koncentrace roztoku.

Příklad: 0,2 M roztok sacharózy

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$V_1 = c_2 \cdot V_2 / c_1$$

$$V_1 = (0,2 \cdot 20) / 1 = 4$$

→ na přípravu 0,2 M roztoku sacharózy budeme potřebovat 4 ml 1 M roztoku sacharózy (a 16 ml destilované vody)

Dopočítejte ředění pro ostatní roztoky (výsledky výpočtu nezapomeňte vložit do protokolu).

Do připravených roztoků umístěte po jednom vzorku svrchní epidermis suknic cibule kuchyňské (*Allium cepa*) a lístek vodního moru/doušky (*Elodea canadensis/Egeria* sp.). Nechte inkubovat asi 30 minut, pravidelně promíchávejte. Poté z jednotlivých vzorků připravte nativní preparáty. Mikroskopujte, v každém preparátu spočítejte sto buněk a stanovte, kolik z nich je plazmolizovaných.

Koncentrace roztoku sacharózy	% plazmolizovaných buněk
0,2	
0,3	
0,4	
0,5	
0,6	
0,8	

Zjištěné hodnoty vynesete do grafu (na ose x bude koncentrace sacharózy, na ose y % plazmolizovaných buněk). Z grafu odečtete, při které koncentraci roztoku nastala hraniční plazmolýza u 50 % buněk.

Vypočtete osmotický tlak buněčné šťávy podle van't Hoffovy rovnice:

$$\pi = R \cdot T \cdot c \cdot i$$

kde π je osmotický tlak (jednotka kPa); R je molární plynová konstanta ($R = 8,31447 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$); T je teplota (jednotka K, Kelvin), při které byl pokus prováděn (teplotu laboratoře převedete na Kelviny přičtením hodnoty 273); c je molární koncentrace roztoku (jednotka M, $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$); i je konstanta zohledňující disociaci rozpuštěné látky, pro neelektrolity $i = 1$. Výsledek uveďte v Mpa.