

28. STANOVENÍ OSMOTICKÉHO POTENCIÁLU BUNĚČNÉ ŠŤÁVY METODOU HRANIČNÍ PLAZMOLÝZY

Látky rozpuštěné v buněčné šťávě vakuoly jí udělají určitý osmotický potenciál. Osmotický potenciál má značný význam pro vodní bilanci pletiv i celých rostlin. Projeví se teprve tehdy, dostane-li se živá buňka do prostředí, jehož osmotický potenciál je odlišný (prostředí hypertonické nebo hypotonické). V hypotonickém prostředí je nasávána voda do buňky, v hypertonickém prostředí dochází k odsávání vody z buňky. Tato ztráta vody se projeví smrštěním protoplastu - dochází k plazmolýze. V prostředí o stejné koncentraci nedochází k příjmu ani k výdeji vody a nenastávají tedy žádné objemové změny protoplastu (prostředí isotonické). Tyto děje v buňce dovolují plazmolyticky stanovit osmotický potenciál vakuoly. Při tom je důležitý stav začínající plazmolýzy, kdy je protoplast jen málo v rozích odchlípen od buněčné stěny. Tato tzv. hraniční plazmolýza nastává jako rovnovážný stav v roztocích, které jsou proti obsahu vakuoly jen málo hypertonické. V tomto případě osmotický potenciál isotonického roztoku odpovídá osmotickému potenciálu buněčné šťávy.

Princip: Sledujeme stupeň plazmolýzy v buňkách pletiv, exponovaných v roztocích různé koncentrace. Isotonickou koncentraci má roztok, v němž dochází k počáteční plazmolýze, t.j. stav, kdy se protoplast v rozích začíná odtahovat od stěny buněčné. Mluvíme o hraniční plazmolýze (obr. č. 9). Jako plazmolytika je nutno použít roztoků takových látek, které nepůsobí na tkáň jedovatě a pro něž je protoplast impermeabilní. Nejběžněji se používá roztok sacharózy, která vyhovuje těmto požadavkům a svou velkou molekulovou hmotností umožňuje přesné odstupňování koncentrace roztoků. Osmotický potenciál je analogický osmotickému tlaku, je však vyjádřen v negativních hodnotách.

Potřeby: Cibule (*Allium cepa* L.) nejlépe odrůda obsahující v epidermálních buňkách antokyan, 1 M roztok sacharózy nebo 1 M roztok KNO_3 , 11 kádinek nebo Petriho misek o průměru 5 cm, 2 dělené pipety, mikroskop, preparační potřeby, podložní a krycí skla, skleněné tyčinky, tužka na sklo.

Provedení: Z 1 M roztoku sacharózy si do kádinek připravíme řadu roztoků odstupňovaných po 0,1 mol. Z cibule odloupneme jednu ze zdužnatělých suknic a epidermis z její vnitřní (vyduté) strany v nejširším místě stáhneme a nařežeme žiletkou na kousky rozměru 5x5 mm. K pokusu nebereme epidermis z různé výše suknic, protože vodní potenciál jejich buněk je v různých vzdálenostech od podpučí různý. Kousky stažené epidermis ponoříme po 3 do roztoků v kádinkách. Štětečkem je stále udržujeme pod hladinou. Po 30 minutách je postupně vyjímáme, vkládáme na podložní sklo vždy do odpovídajícího roztoku a přikrýváme krycím sklíčkem. Připravené preparáty mikroskopujeme a hodnotíme stupeň plazmolýzy. Výsledky zapisujeme do tabulky.

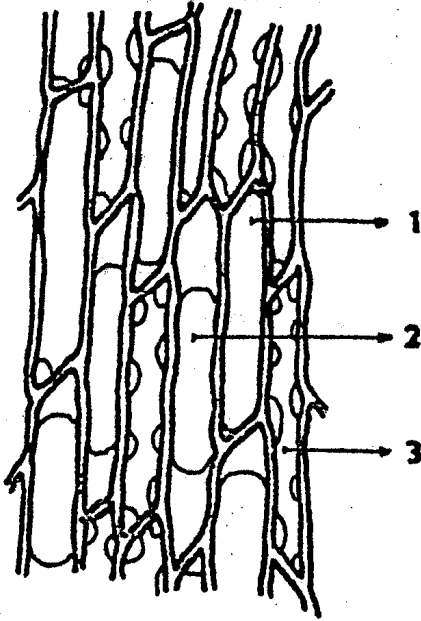
Výsledky: Průměrný osmotický potenciál vakuol pozorovaného souboru buněk odpovídá osmotické hodnotě takového roztoku, v němž hraniční plazmolýza nastala u 50% pozorovaných buněk. Při popsané metodě najdeme však zpravidla u některých dvou sousedních roztoků nejbližší nižší a nejbližší vyšší hodnoty (např. 45% a 60%). Izotonická koncentrace leží pak mezi koncentracemi obou těchto roztoků a přesněji ji můžeme zjistit tak, že v rozmezí obou těchto koncentrací připravíme řadu roztoků odstupňovaných po 0,01 mol. a měření opakujeme s čerstvým, pokud možno identickým materiálem.

Přesněji lze zjistit koncentraci plazmolytika, ve kterém nastává hraniční plazmolýza, také graficky následujícím způsobem: Do grafu vyneseme počet plazmolyzovaných buněk v procentech (osa y). Na ose y vyhledáme hodnotu 50% a tímto bodem vedeme rovnoběžku s osou x . Z bodu, ve kterém tato přímka protne křivku závislosti počtu

plazmolyzovaných buněk na koncentraci plazmolytika, spustíme kolmicí na osu x , kde odečteme hledanou koncentraci odpovídající hraniční plazmolýze.

Závěr: Vyhledáme v tabulkách hodnotu osmotického potenciálu odpovídajícího molaritě roztoku, ve kterém nastala hraniční plazmolýza nebo ji vypočteme podle rovnice

$P = C.R.T.i.$, kde P je osmotický potenciál v MPa, R je konstanta o hodnotě 0,0082, T je absolutní teplota (273 + teplota laboratoře), i je disociační koeficient (u sacharózy rovný 1), C je koncentrace roztoku sacharózy odpovídající hraniční plazmolýze. Výsledné hodnotě přiřadíme záporné znaménko.



Obr. č. 10: Plazmolýza v pletivu *Allium cepa* L.- 1 - počáteční (hraniční) plazmolýza, 2 - normální plazmolýzová buňka (konvexní plazmolýza), 3 - křečová plazmolýza.

Tabulka č. II : Osmotický potenciál (v MPa) roztoků sacharózy při 20 °C
(Koncentrace roztoků sacharózy v molech)

M	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	0,000	0,026	0,053	0,079	0,106	0,135	0,159	0,185	0,211	0,238
0,1	0,264	0,291	0,317	0,343	0,370	0,396	0,422	0,448	0,475	0,501
0,2	0,529	0,557	0,586	0,614	0,642	0,670	0,698	0,727	0,755	0,784
0,3	0,813	0,842	0,871	0,900	0,929	0,958	0,987	1,017	1,048	1,0880
0,4	1,111	1,143	1,174	1,206	1,237	1,269	1,301	1,333	1,366	1,399
0,5	1,431	1,464	1,496	1,529	1,564	1,599	1,635	1,671	1,706	1,742
0,6	1,777	1,813	1,850	1,887	1,924	1,961	1,998	2,035	2,072	2,110
0,7	2,149	2,188	2,227	2,265	2,305	2,344	2,384	2,427	2,469	2,511
0,8	2,554	2,596	2,638	2,680	2,720	2,760	2,800	2,840	2,880	2,930
0,9	2,97	3,02	3,07	3,11	3,16	3,21	3,26	3,31	3,36	3,41
1,0	3,46	3,51	3,57	3,62	3,67	3,72	3,77	3,82	3,88	3,93
1,1	3,98	4,04	4,09	4,15	4,20	4,25	4,31	4,37	4,42	4,48
1,2	4,54	4,60	4,66	4,72	4,78	4,84	4,90	4,96	5,03	5,09
1,3	5,16	5,22	5,29	5,36	5,43	5,49	5,56	5,63	5,70	5,77
1,4	5,84	5,91	5,999	6,06	6,13	6,21	6,28	6,36	6,43	6,50
1,5	6,58	6,65	6,73	6,81	6,89	6,97	7,06	7,15	7,25	7,31

31. MĚŘENÍ VODNÍHO POTENCIÁLU ROSTLINNÝCH PLETIV KOMPENSAČNÍ ŠMOUHOVOU METODOU

Princip: Rozdílnost resp. shoda vodního potenciálu pletiva a osmotické hodnoty prostředí se neprojeví jen změnami rozměrů studovaného pletiva (viz předchozí úlohu), nýbrž i změnou koncentrace prostředí, jemuž pletivo - podle velikosti svého vodního potenciálu - vodu buď odnímá nebo odevzdává. Tyto změny koncentrací jsou ovšem jen malé, lze je však zaznamenat a tím i změřit vodní potenciál pletiva podle následující metody.

Potřeby: Listové čepele krmné kapusty (*Brassica oleracea* var. *acephala* DC.), cukrovky (*Beta vulgaris* var. *altissima* L.), špenátu setého (*Spinacia oleracea* L.). 1 M roztok sacharózy, 1% roztok metylénové modři, 2 dělené pipety, pipety 1 ml, stojan se zkumavkami opatřenými zátkami, korkovrt.

Provedení: Naředěním 1 M roztoku sacharózy destilovanou vodou připravíme řadu koncentrací odstupňovaných po 0,1 M. Tyto roztoky napipetujeme po 5 ml do dvou řad zkumavek a do zkumavek jedné z obou řad přidáme po 1 kapce roztoku metylénové modři. Z listových čepelí vyřežeme korkovrtem terčíky o průměru 10 mm a do každé zkumavky v řadě s obarvenými roztoky jich 5 vložíme a zkumavky obou řad uzavřeme zátkami. Za občasného protřepání necháme pak zkumavky 45 minut stát. Zbarvené roztoky se následkem výdeje nebo příjmu vody terčíky zředily nebo zahustily ve srovnání s výchozí koncentrací, kterou mají odpovídající roztoky bezbarvé (kontrolní). Srovnání koncentrace roztoků provedeme takto: Do suché pipety nasajeme několik kapek zbarveného roztoku a opatrně vpustíme do bezbarvého roztoku kontrolního odpovídající koncentrace. Je výhodné, ponoříme-li při tom ústí pipety pod hladinu kontrolního roztoku. K provedení úkolu potřebujeme 3 hodiny.

Výsledky: Jestliže se roztok, v němž byly terčíky, zředí (byl hypertonický), bude vytékající modrá kapalina proudit vzhůru. Jestliže se jeho koncentrace naopak zvýšila (byl-li hypotonický), bude modrý roztok klesat ke dnu. Roztok, jehož osmotická hodnota je rovna vodnímu potenciálu listů, vytvoří modrý obláček kapaliny kolem ústí pipety. Takto vyjádříme s větší či menší přesností vodní potenciál v molaritě sacharózy, odpovídající hodnotu v MPa vyhledáme v tabulkách. Průběh pokusu a výsledky měření zaznamenáme do protokolu.

Citlivost metody můžeme podle potřeby zvětšit zmenšením objemu roztoku nebo zvětšením počtu a průměru listových terčíků.

155. PŘÍMÁ ORGANOGENEZE PRÝTŮ NA LISTECH TABÁKU A PETUNIE

Princip : Vysoká koncentrace cytokininů a nízká koncentrace auxinů v kultivačním médiu navozuje organogenezi pupenů a prýtů. Organogenní druhy rostlin snadno regenerují přímo bez tvorby kalusu. V případě tvorby kalusu můžeme dosáhnout organogeneze snížením koncentrace auxinu v kultivačním médiu za zachování koncentrace cytokininu (tzv. nepřímá organogeneze).

Potřeby : sterilně předpěstované rostliny petunie (*Petunia hybrida*), tabáku (*Nicotiana tabacum* L.), africké fialky (*Saintpaulia* Wendl.) či jejich nesterilní listy, sterilizační činidla, sterilní destilovaná voda.

Provedení : ze sterilních rostlin petunie, tabáku či africké fialky nastříháme segmenty listové čepele i řapíku. Čepele položíme abaxiální stranou na médium, řapíky položíme podélně nebo je do média zapícháme.

Kultivace: MS médium + 0,18 mg.l⁻¹ NAA + 1,5 mg.l⁻¹ BAP, na světle, teplota 25 °C

Výsledky : Už po několika dnech je možno pozorovat zprohýbání listových segmentů na médiu, po 1 týdnu tvorbu pupenů na segmentech listů tabáku (u. petunii po 2 -3 týdnech), později je možno pozorovat jejich prorůstání v prýty .

Závěr : Po měsíční kultivaci kulturu přepasážujeme.

