62. GRAVIMETRICKÉ STANOVENÍ INTENZITY FOTOSYNTÉZY Z PŘÍRŮSTKU SUŠINY LISTOVÝCH TERČÍKŮ

Princip : Intenzitu fotosyntézy lze měřit také z přírůstků sušiny fotosyntetizujícího pletiva. Měření se provádí na terčících vyseknutých z listových čepelí. Metoda je založena na zjištění, že fotosyntéza terčíků probíhá po dosti dlouhou dobu velmi pravidelně a téměř stejně intenzívně jako u intaktního pletiva. Protože asimiláty nemohou z izolovaných terčíků odtékat, hromadí se a zvyšují hmotnost jejich sušiny. Přírůstek sušiny za určitou dobu (G_t) fotosyntézy se zjistí porovnáním hmotnosti sušiny terčíků před (v čase 0, G_o) a po expozici (v čase t, G_t).

Potřeby : Listy cukrovky (*Beta vulgaris* L.), kukuřice (*Zea mays* L.)**,** aparatura s expoziční komorou, molitanové podložky, kroužky z PVC, korkovrt, pinzeta, sušárna, váhy, váženky.

Provedení : Z nejširších částí čepelí vysekneme korkovrtem terčíky tak, aby nezahrnovaly silnější svazky cévní. 50 kusů terčíků použijeme pro stanovení sušiny v čase 0. Terčíky vložíme do váženky a vysoušíme v sušárně při teplotě 95^{o}C po dobu 1 hodiny. Dalších 50 kusů terčíků vkládáme do molitanové podložky. Pro dokonalejší manipulaci je vhodné vložit do výseče v molitanu PVC kroužek. Terčík je tak vypodložen a nekroutí se. Podložky s terčíky se vkládají do komory, v níž budou po dobu 3-6 hodin terčíky intenzívně nasvětleny. Molitan musí být neustále nasáklý vodou! Po skončení expozice se stanoví sušina exponovaných terčíků (G_t).

Výsledky : Stanovíme intenzitu fotosyntézy P_N :

$$P_N = \frac{G_t - G_o}{S.t}$$

S... plocha segmentů

t... doba expozice

G_o,G_t hmotnosti sušin

55. BAREVNÉ REAKCE ANTOKYANŮ

Princip : Ztrátou semipermeability plazmatických membrán (tonoplastu) rostlinných buněk dojde k pronikání obsahu vakuol do prostředí. Antokyany obsažené v buněčné šťávě je pak možno extrahovat jen vodou. Takto získaný extrakt mění své zabarvení v závislosti na pH. V kyselém prostředí jsou červené, v neutrálním fialové a v zásaditém modré, zelené až žluté.

Potřeby : Barevné bobule černého bezu (*Sambucus* L.), ptačího zobu (*Ligustrum* L.), listy červeného zelí (*Brassica* L.), 0,1N CH_3COOH, 0,1N NH_4OH, kádinka, stojan na zkumavky, sadu 6 zkumavek, filtrační papír, indikátorový pH papírek, skleněná nálevka.

Provedení : Zhomogenizovaný nebo nakrájený rostlinný rostlinný materiál povaříme v pětinásobném množství destilované vody. Vychladíme a zfiltrujeme. Filtrát pipetujeme po 2ml do zkumavek. Do zkumavek přidáváme postupně kyselinu a zásadu. Snažíme se docílit škály různých barev.

Výsledky a závěr : Do protokolu zapíšeme barvy a změříme jejich pH.

56. EXTRAKCE A ROZDĚLENÍ LISTOVÝCH BARVIV

Princip : Organickými rozpouštědly jsou z listů extrahována barviva, která jsou lokalizována na membráně plastidů. Získaný extrakt je možno rozdělit chromatografií na papíře nebo na tenké vrstvě (TLC). Tenkovrstevná chromatografie představuje metodu dělení látek na tenké vrstvě silikagelu, který je nanesen na hliníkovou folii.

Chlorofyly (a,b) a karotenoidy jsou barviva v listech zelených rostlin, která mají rozhodující význam pro fotosyntézu. Jsou to lipochromy, tzn. že charakteristickou vlastností je rozpustnost v tucích a tukových rozpouštědlech. Jsou značně citlivá vůči světlu a vzdušnému kyslíku. Rozkladnými produkty chlorofylů jsou feofytiny, karoteny přechází přes epoxydy na bezbarvé sloučeniny.

a) příprava extraktu chlorofylu

Potřeby : rostlinný materiál /listy kukuřice (*Zea mays* L.), hrachu (*Pisum sativum* L.) /, aceton, $MgCO_3$(nebo $CaCO_3$), mořský písek, třecí miska, odměrný válec, kádinky, odměrnou baňku
(25 ml),

Provedení : Odvážené množství rostlinného materiálu (0,5g) nadrobno nastříháme do třecí misky a po přidání $MgCO_3$(pro neutralizaci buněčné šťávy) a písku rozetřeme. Přidáme 2 ml acetonu a ještě pokračujeme v homogenizaci. Směs zfiltrujeme přes malý filtr smočený v acetonu do 25 ml odměrné baňky. Filtrát musí být čirý! Dokonalejší filtrace je dosaženo použitím Büchnerovy nálevky se sintrem S3 nebo G4. Dalšími dávkami acetonu kvantitativně převedeme barviva do odměrné baňky a doplníme objem po značku. Než přistoupíme k další manipulaci s extraktem (TLC, měření na spekolu) uchováváme extrakt v ledničce.

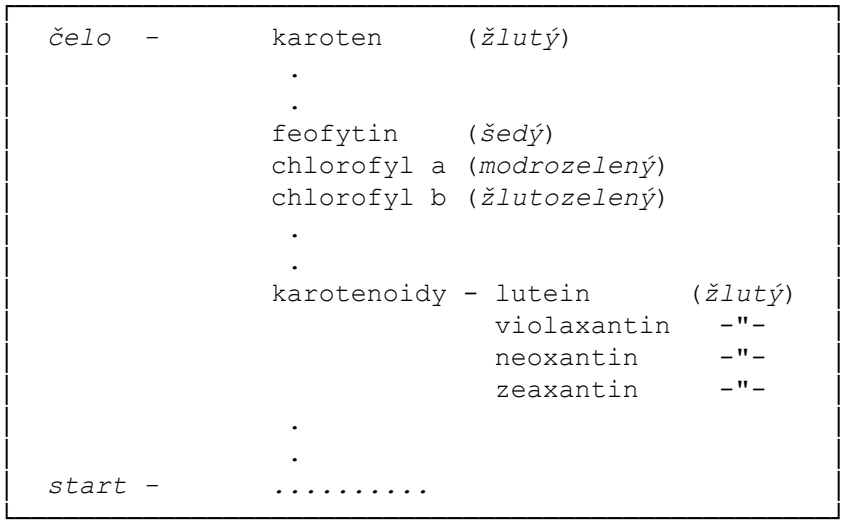
b) chromatografie

Potřeby : acetonový extrakt, chromatografická deska SILUFOL, mikropipeta, vyvíjecí činidlo (benzin: isopropanol: voda=100:10:0,25), chromatografická kyveta.

Provedení : Asi 2 cm od spodního okraje naneseme 0,5 ml extraktu. Dbáme toho, aby velikost nanesené skvrny byla co nejmenší a aby nedošlo k porušení povrchu. Desku umístíme téměř v kolmé poloze do chromatografické kyvety, ve které je 1-2cm vrstva vyvíjejícího činidla. Start nesmí být ponořen ! Jakmile čelo dosáhne téměř okraje desky, chromatogram vyjmeme.

Výsledky : Vyhodnotíme pořadí rozdělených pruhů barviv na chromatogramu podle schématu obr. č. 17.
Chromatogram lze použít pro kvantitativní stanovení přítomných barviv. Jednotlivé pruhy s barvivy vystříháme. Tyto proužky silufolu vložíme do popsaných zkumavek a přidáme 2 ml rozpouštědla. Zkumavky uzavřeme a 2 minuty extrahujeme. Čiré extrakty separovaných barviv použijeme k proměření absorpčního spektra.
A_{max} (maximální absorbance) pro lutein je při 445 nm, pro violaxantin při 441 nm, pro neoxantin při 435 nm, pro karoten při 447 nm.

Obr. č. 19: Schéma pořadí rozdělených pruhů barviv na chromatogramu



$$Rf = \frac{\text{vzdálenost START - ROZDĚLENÁ LÁTKA}}{\text{vzdálenost START – ČELO}}$$

57. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ OBSAHU LIPOCHROMŮ ABSORPČNÍ ANALÝZOU

Princip : Základem metod absorpční analýzy je závislost absorpce elektromagnetického záření ve viditelné, ultrafialové nebo infračervené oblasti spektra na složení zkoumané látky v určitém absorbujícím prostředí. Absorpční analýza ve viditelné oblasti elektromagnetického záření se nazývá kolorimetrie. Základní vlastností atomů a molekul je schopnost emitovat a absorbovat elektromagnetické záření o jistých vlnových délkách. Závislost mezi absorpcí elektromagnetického záření a složením absorbující látky (při konstantní tloušťce vrstvy) vyjadřuje Lambert-Beerův zákon: "Prochází-li monochromatické záření s počáteční intenzitou I_o vrstvou absorbujícího prostředí o tloušťce *l*, pak se zeslabuje jeho intenzita na hodnoti *I."* Absorpce se zvyšuje se zvyšujícím se obsahem a vrstvou absorbujícího prostředí. Absorbance (dříve Extinkce) platí pro výraz $log\ I_o/I$.

Potřeby : střička s destilovanou vodou, aceton, acetonový chlorofylový extrakt (viz. pok. č. 50), buničitá vata, filtrační papír, spekol.

Provedení : Provedeme měření při vlnové délce 645 nm, při níž má maximum absorpce chlorofyl *b* a potom při vlnové délce 663 nm, při níž má maximum absorpce chlorofyl *a*.

Výsledky : Naměřené hodnoty absorbance chlorofylů dosadíme do rovnic. Tímto výpočtem získáme hodnotu vyjadřující množství chlorofylu v mg . l^{-1} rozpouštědla při tloušťce kyvety 1 cm. A_{663}, A_{645} a A_{440} jsou hodnoty naměřené absorbance chlorofylu při vlnových délkách 663 a 645 a karotenoidů při 440.

chlorofyl *a* (c_a) = $12{,}7.A_{663} - 2{,}69.A_{645}$

chlorofyl *b* (c_b) = $22{,}9.A_{645} - 4{,}68.A_{663}$

chlorofyl *a*+*b* (c_{a+b}) = $8{,}02.A_{663} + 20{,}2.A_{645}$

karotenoidy $c_k = 4{,}968.A_{440} - 0{,}268\ .\ (c_a+c_b)$

Vzhledem k tomu, že vzorek se nezpracovával do objemu 1l, ale podle objemu odměrné baňky (25 ml), navíc v některých případech musel být vzorek ředěn (pro nedostatečný rozsah stupnice spekolu), je zapotřebí hodnoty získané z rovnic upravit podle ředění.

1) stanovíme kolik mg chlorofylu (c_a,c_b) a karotenoidů c_k se nachází v původním extraktu, tedy i v navážce listů

2)

$$\frac{c_{a,b}\ (mg)\ .\ objem\ (ml)}{1000\ (ml)} = mg\ chlorofylu$$

2) přepočteme množství chlorofylu *a*, *b*, *a*+*b* a karotenoidů na jednotku hmotnosti čerstvé hmoty (g) nebo na jednotku plochy (m^2), v případě, že byla stanovena listová plocha vzorku.

3) vypočítáme $c_a : c_b$, $c_{a+b} : c_k$

Závěr : Hodnoty sestavit do přehledné tabulky.