STANOVENÍ OSMOTICKÉHO POTENCIÁLU METODOU HRANIČNÍ PLAZMOLÝZY

OSMOTICKÉ JEVY V ROSTLINNÉ BUŇCE

Předpokladem uskutečňování normálních životních funkcí buněk i pletiv je jejich dostatečné nasycení vodou. Za normálních vnějších (vlhkostních) podmínek existuje v buňkách mírný hydratační deficit (nebývají plně nasyceny vodou). Tento deficit vody je příčinnou difůzního (buňky bez vakuol) či osmotického vyrovnávání. Osmotické vyrovnávání předpokládá přítomnost polopropustné membrány (plazmalema cytoplazmy a tonoplast vakuoly). Semipermeabilita membrány zajišťuje propouštění rozpouštědla (vody), nikoli však či jen v malé míře, rozpouštěné látky (osmotikum).

Většina dospělých buněk rostlinných pletiv je **vakuolizována**. Hlavní funkcí vakuol je regulace vodního režimu buňky prostřednictvím osmotických jevů. Osmotické jevy se týkají hydratačně vázané vody, kterou rozlišujeme na koloidně a osmoticky vázanou. Za osmoticky vázanou vodu považujeme vodu obsaženou v **buněčné šťávě** (tj. ve vakuolách), ve které jsou obsaženy **osmoticky aktivní látky** (mono- a disacharidy, anorganické soli, organické kyseliny a jejich soli, různé glukosidy aj.).

Více než koloidní prostředí cytoplazmy usměrňuje vakuolární roztok osmotické vyrovnávání ve vztahu k osmotickým hodnotám vnějšího prostředí. Hydratační úroveň buňky a pletiv je proto dynamickou hodnotou. Vzhledem k obsahu osmoticky aktivních látek v buněčné šťávě mají vakuoly určitý osmotický potenciál. Ten se dynamicky projevuje v případě, že se buňka dostane do prostředí vyšší koncentrace osmotik tzv. **exosmózou**, nebo nižší koncentrace osmotik tzv. **endosmózou**. Výsledkem exosmózy je výdej vody z vakuoly a zmenšení jejího objemu, v případě endosmózy vakuola zvětšuje objem přijímaním vody. Příkladem intenzivně probíhající endosmózy je **plazmoptýza** u pylových zrn. Pylová zrna ve vodě přijímají vodu nad hranici možné turgidity (stav nasycenosti), přičemž buněčná stěna se nemůže dále rozpínat a praská.

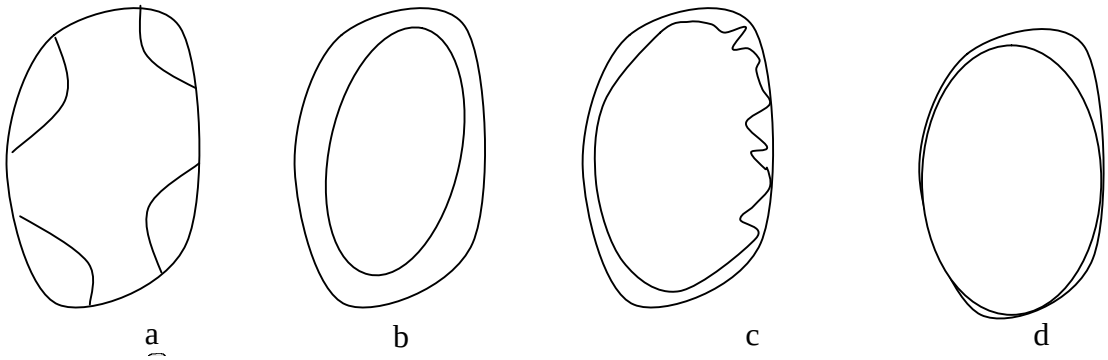
PLAZMOLÝZA A DEPLAZMOLÝZA, TYPY PLAZMOLÝZY

Podle koncentrace osmotik ve vnějším prostředí (roztoku) rozlišujeme výše zmíněnou ex- a endosmózu. Projevem exosmózy je **plazmolýza**, při níž se buňka nachází v hypertonickém roztoku (roztok o vyšší koncentraci osmoticky aktivních látek než je v buněčné šťávě). Při plazmolýze dochází pod vlivem ztráty vody z buňky ke zmenšení objemu vakuoly a celého protoplastu. Velmi dobře je plazmolýza pozorovatelná na epidermálních buňkách s vakuolou s barvivy v 1M roztocích plazmolytik (sacharóza, KNO_3 aj.). Nedojde-li k nevratnému (letálnímu) poškození cytoplazmy, lze proces revertovat dějem známým jako **deplazmolýza**. K deplazmolýze dochází u plazmolyzovaných buněk ve vodě nebo u turgescentních buněk v hypotonickém prostředí. Hypotonické prostředí má nižší koncentraci osmoticky aktivních látek než buněčná šťáva.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Typ plazmolýzy rozlišujeme podle toho, jaký objem a tvar zaujímá protoplast po odtržení od buněčné stěny. Je dán účinkem plazmolytika na protoplast, dále viskozitou cytoplazmy, která se mění se stářím buňky a také druhovými zvláštnostmi rostlin. Při **konkávní plazmolýze** (a) je odlučování protoplastu vzhledem k buněčné stěně vyduté, při **konvexní** (b) vypouklé. **Křečovitá plazmolýza** (c) označuje mnohonásobné vyduté uvolňování protoplastu od buněčné stěny. Rozeznáváme ještě tzv. **hraniční plazmolýzu** (začínající) (d) což je plazmolýza v okamžiku, kdy se právě odtrhne protoplast (plazmalema) od buněčné stěny v roztoku, který je proti obsahu osmotik ve vakuole jen málo hypertonický.

Typy plazmolýzy



OSMOTICKÝ TRANSPORT VODY V BUŇCE

Uvnitř buňky se přemisťuje voda z jedné části do druhé až do dosažení rovnováhy vodních potenciálů. Modelový příklad jednotlivé buňky v hypotonickém nebo hypertonickém roztoku však nastává jen u mořských rostlin za vysychání odlivových tůněk či v brakické vodě (přítok sladké vody).

Ve vodném roztoku mají buňky pletiv roztažení či smrštění protoplastu ovlivněno buňkami sousedícími. V případě jemných buněčných stěn je turgidita zachována i při malém obsahu vody (při malé vakuole). V případě pevného povrchu buněčné stěny nemůže buněčná stěna následovat stažení protoplastu.

POZOR !!!

Buňky pletiv v přirozeném prostředí ztrácejí vodu výparem z buněčné stěny, buněčná stěna následuje protoplast, neplazmolyzuje až do doby dokud nejsou buněčné stěny propustné pro vzduch. Buňky po ztrátě turgoru vysychají a osmotický systém je eliminován. Buňky vyšších rostlin tvoří řadu osmoprotektivních látek nebo se brání stresu z nedostatku vody mechanicky (trichomy, trny, pohyby listů aj).

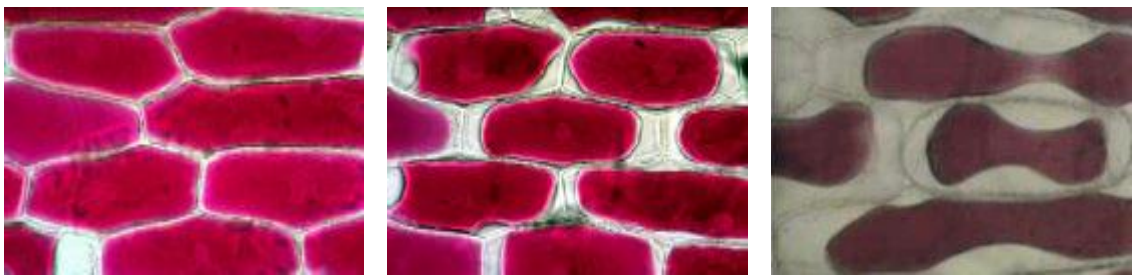
PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

METODA HRANIČNÍ PLAZMOLÝZY

Metoda hraniční plazmolýzy využívá mikroskopického pozorování v okamžiku začínající plazmolýzy v koncentrační řadě roztoků. Vyžaduje tenké řezy živými rostlinnými pletivy s maximálně 3 vrstvami buněk, vhodná je pro epidermální buňky. Pro každý materiál se musí odzkoušet doba expozice. Z inkubačních roztoků je přeneseno pletivo pod mikroskop a je pozorováno, zda-li proběhla plazmolýza. Pokud ano, tak v preparátu je na 100 buňkách sledováno % těch, u nichž plazmolýza právě začala. Výhodou metody je, že doba po níž zůstaly vzorky pletiv v plazmolytických roztocích, neovlivňuje výsledek tehdy, je-li větší než minimálně nutná, jak byla předběžně pro pokusný materiál odzkoušena.

Další výhodou je, že každá buňka v osmotiku prochází hraniční plazmolýzou. Orientačně lze tedy zaznamenat všechny plazmolyzované buňky (tj. buňky se zřetelnou plazmolýzou), ve větším počtu opakování (více preparátů, objektů z téhož inkubačního roztoku). Po vynesení závislosti frekvence plazmolýzy na koncentraci je pak možno vhodnou matematickou funkcí vyhodnotit koncentraci izotonického roztoku.

Turgescentní buňky, hraniční plazmolýza a konvexní plazmolýza v buňkách epidermis cibule kuchyňské



Praktické provedení úlohy

1. Experimentální záměr

Cílem úlohy je stanovit izotonický roztok pomocí hraniční plazmolýzy. Koncentrace osmotika v něm vyvolává osmotický potenciál totožný s osmotickým potenciálem vakuoly. Metoda využívá stanovení 50% frekvence hraniční plazmolýzy v daném roztoku. Hodnotu hledané koncentrace extrapolujeme z křivky závislosti frekvence plazmolyzovaných buněk (osa y) na stoupající koncentraci osmotika (osa x) z hodnoty 50% frekvence na osu x. Po té se vypočte hodnota osmotického potenciálu.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

2. Pracovní postup

1. předem připravit řadu inkubačních roztoků sacharózy o koncentracích 0,1 - 1 M ředěním 1M roztoku, rozlít do označených petriho misek (cca 5 – 10 ml)
2. stáhnout epidermis z vnitřní (vyduté) strany zdužnatělé suknice cibule kuchyňské a připravit z ní segmenty 5 x 5 mm, ihned vkládat do inkubačbích roztoků
3. inkubovat vždy 3 segmenty v roztocích sacharózy o koncentracích 0,1 - 1M po dobu 20 až 30 minut
4. pozorovat segmenty pod mikroskopem - počítat buňky se zřetelnou plasmolýzou v zorném poli a vyjádřit v % (vzhledem ke 100 pozorovaných buněk), zaznamenávat výsledky do tabulky
5. z výsledků sestrojit křivku závislosti frekvence hraniční plazmolýzy na koncentraci osmotika.
6. vypočítat osmotický potenciál

! Izolovaná pokožka se musí ihned vložit do roztoku plazmolytika. Pouze neporušené (intaktní) buňky zachovávají ve vakoulách barviva. Před uzavřením preparátu je vhodné pokožku pomocí jehly a skalpelu či pinzety vyrovnat, aby nedošlo k překrývání pokožky (tj. vrstvy buněk).

Pokyny pro práci studentů

- pracuje se ve dvojicích
- šetřit s rostlinným materiálem – nejprve nacvičit způsob izolace pokožky, pak inkubaci založit
- nejprve vhodně vycentrovat mikroskop, vhodně zaclonit a zaostřit
- v průběhu mikroskopování dbát na to, aby preparát nevysychal v důsledku zahřívání od světla mikroskopu
- při práci s mikroskopem volit pro každý preparát stejné zvětšení (nejlépe objektiv 5x, 10x)
- neznečistit mikroskop, stolek , optiku od roztoků sacharózy
- systém počítání buněk v mikroskopu je obtížný – 100 buněk lze hodnotit následovně – umožňuje-li to otočení stolku nastavit preparát tak, aby bylo možno počítat buňky v řadách (u cibule kuchyňské je to možné), neumožňuje-li to otočení stolku, pootočit objektem na podložním sklíčku
- při nedostatku času hodnotit méně buněk při větším zvětšení (menší zorné pole) při více opakováních jednoho i jiného preparátu z téhož inkubačního roztoku a hraniční plazmolýzu vyjádřit opět jako %
- po ukončení práce očistit mikroskop i podložní sklíčka od sacharózy, vytřít do sucha, stejně tak petriho misky
- zaznamenávat hodnoty do tabulky

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

3. Záznam naměřených hodnot

Naměřené výsledky po 20-ti minutové inkubaci budou zaznamenány do tabulky ve všech opakováních, tj. všech pracovních dvojic. Všechny hodnoty budou vyneseny do grafu závislosti frekvence plazmolýzy na koncentraci roztoku. Z této závislosti bude odečtena koncentrace izotonického roztoku z křivky závislosti protínající se s 50% linií frekvence plazmolýzy.

Tabulka pro záznam frekvence plasmolýzy v inkubačních roztocích

c (mol)	I. opak	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
0,1								
0,2								
0,3								
0,4								
0,5								
0,6								
0,7								
0,8								
0,9								
1,0								

4. Výpočet osmotického potenciálu

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

kde veličiny znamenají:

- π - osmotický potenciál [MPa]
- R - plynová konstanta [8,314 kPa . l^{-1} . mol^{-1} . K^{-1}]
- T - absolutní teplota [273 + teplota laboratoře]
- c - koncentrace osmotika [mol . l^{-1}]
- i - disociační koeficient rozpouštědla, pro roztok sacharózy > 1

Zpracování výsledků a vypracování protokolu

V protokolu bude zaznamenána tabulka s výsledky všech pracovních dvojic, dále graf závislosti s proložením křivky a odečtením hodnoty izotonické koncentrace, dále výpočet osmotického potenciálu. Celá skupina odevzdá jeden protokol.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz