

# FIZIOLOGIJA RASTLIN

Priročnik z navodili za vaje

Jana  
AMBROŽIČ-DOLINŠEK

Terezija  
CIRINGER



Univerzitetna založba  
Univerze v Mariboru





Univerza v Mariboru

Fakulteta za naravoslovje  
in matematiko

# Fiziologija rastlin

Priročnik z navodili za vaje

Avtorici

**Jana Ambrožič-Dolinšek**

**Terezija Ciringar**

Junij 2022

<b>Naslov</b> <i>Title</i>	<b>Fiziologija rastlin</b> <i>Plants Physiology</i>
<b>Podnaslov</b> <i>Subtitle</i>	<b>Priročnik z navodili za vaje</b> <i>Exercise Instructions Manual</i>
<b>Avtorici</b> <i>Authors</i>	Jana Ambrožič-Dolinšek (Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko)  Terezija Ciringer (Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko)
<b>Recenzija</b> <i>Review</i>	Andreja Urbanek Krajnc (Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede)  Nataša Pipenbaher (Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko)
<b>Jezikovni pregled</b> <i>Language editing</i>	Mojca Garantini
<b>Tehnični urednik</b> <i>Technical editor</i>	Jan Perša (Univerza v Mariboru, Univerzitetna založba)
<b>Oblikovanje ovitka</b> <i>Cover designer</i>	Jan Perša (Univerza v Mariboru, Univerzitetna založba)
<b>Grafične priloge</b> <i>Graphic material</i>	Avtorici
	<b>Grafika na ovitku</b> <i>Cover graphics</i> Foto: Ambrožič-Dolinšek in Ciringer, 2022
<b>Založnik</b> <i>Published by</i>	<b>Univerza v Mariboru, Univerzitetna založba</b> Slomškovo trg 15, 2000 Maribor, Slovenija <a href="https://press.um.si">https://press.um.si</a> , <a href="mailto:zalozba@um.si">zalozba@um.si</a>
<b>Izdajatelj</b> <i>Issued by</i>	<b>Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko</b> Koroška cesta 160, 2000 Maribor, Slovenija <a href="https://www.fnm.um.si">https://www.fnm.um.si</a> , <a href="mailto:fnm@um.si">fnm@um.si</a>
<b>Izdaja</b> <i>Edition</i>	Prva izdaja
	<b>Izdano</b> <i>Published at</i> Maribor, junij 2022
<b>Vrsta publikacije</b> <i>Publication type</i>	E-knjiga
	<b>Dostopno na</b> <i>Available at</i> <a href="https://press.um.si/index.php/ump/catalog/book/660">https://press.um.si/index.php/ump/catalog/book/660</a>

CIP - Kataložni zapis o publikaciji  
Univerzitetna knjižnica Maribor

581.1 (075.8) (076.5) (0.034.2)

AMBROŽIČ-Dolinšek, Jana  
Fiziologija rastlin [Elektronski vir]  
: priročnik z navodili za vaje / avtorici  
Jana Ambrožič-Dolinšek, Terezija Ciringer.  
- 1. izd. - E-knjiga. - Maribor : Univerza  
v Mariboru, Univerzitetna založba, 2022

Način dostopa (URL) :  
[https://press.um.si/index.php/ump/catalog/  
book/660](https://press.um.si/index.php/ump/catalog/book/660)

ISBN 978-961-286-614-3 (PDF)  
doi: 10.18690/um.fnm.3.2022  
COBISS.SI-ID 112629763



© Univerza v Mariboru, Univerzitetna založba  
/ University of Maribor, University Press

**Besedilo / Text** © Ambrožič-Dolinšek, Ciringer, 2022

To delo je objavljeno pod licenco Creative Commons Priznanje avtorstva 4.0 Mednarodna. / *This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License.*

Uporabnikom je dovoljeno tako nekomercialno kot tudi komercialno reproduciranje, distribuiranje, dajanje v najem, javna priobčitev in predelava avtorskega dela, pod pogojem, da navedejo avtorja izvirnega dela.

Vsa gradiva tretjih oseb v tej knjigi so objavljena pod licenco Creative Commons, razen če to ni navedeno drugače. Če želite ponovno uporabiti gradivo tretjih oseb, ki ni zajeto v licenci Creative Commons, boste morali pridobiti dovoljenje neposredno od imetnika avtorskih pravic.

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

**ISBN** 978-961-286-614-3 (pdf)

**DOI** <https://doi.org/10.18690/um.fnm.3.2022>

**Cena**  
*Price* Brezplačni izvod

**Odgovorna oseba založnika**  
*For publisher* prof. dr. Zdravko Kačič,  
rektor Univerze v Mariboru

**Citiranje**  
*Attribution* Ambrožič-Dolinšek, J., Ciringer, T. (2022). *Fiziologija rastlin: priročnik z navodili za vaje*. Maribor: Univerzitetna založba.  
doi: 10.18690/um.fnm.3.2022

# Kazalo

<b>Rastlinska barvila .....</b>	<b>1</b>
1. vaja: Antocianini, betacianini .....	3
2. vaja: Fotosintetsko aktivna asimilacijska barvila .....	7
3. vaja: Ločitev zelenih in rumenih barvil iz kloroplastov .....	15
4. vaja: Določitev barvil na osnovi topnosti .....	19
<b>Izmenjava plinov .....</b>	<b>21</b>
5. vaja: Dihanje rastlin .....	23
6. vaja: Fotosintetska aktivnost .....	27
<b>Encimska aktivnost .....</b>	<b>29</b>
7. vaja: Aktivnost katalaze .....	31
<b>Sprejem, prevajanje in uravnavanje vode v rastlinah .....</b>	<b>39</b>
8. vaja: Specifična prevodnost lesa .....	41
9. vaja: Stopnja sukulentnosti .....	45
10. vaja: Merjenje sprejema vode v rastlino .....	51
<b>Disperzijski sistemi, koloidi, plazmoliza .....</b>	<b>57</b>
11. vaja: Koloidni sistemi .....	59
12. vaja: Plazmoliza .....	65
13. vaja: Merjenje vodnega potenciala z mejno plazmolizo .....	71
<b>Mineralna prehrana rastlin .....</b>	<b>77</b>
14. vaja: Spremljanje simptomov fizioloških motenj ob pomanjkanju določenih hranil .....	79
<b>Reduktivni sladkorji .....</b>	<b>87</b>
15. vaja: Kvalitativno določanje reduktivnih sladkorjev .....	89
16. vaja: Kvantitativna ocena reduktivnih sladkorjev .....	95
<b>Biotesti .....</b>	<b>103</b>
17. vaja: <i>Triticum</i> test za določanje hormonov – citokininov .....	105
18. vaja: <i>Mungo</i> test za določanje hormonov – avksinov .....	111
<b>Zaključek .....</b>	<b>115</b>
Dodatek: Spektrofotometrija .....	117
Izbrane osnove kemijske stahiometrije .....	119
Literatura .....	121



# RASTLINSKA BARVILA







## 1. vaja:

# Antocianini, betacianini

## UVOD

**Antocianini** so vodotopni flavonoidi v glikozidni obliki (glikozidi z vezanimi sladkorji), ki se kopičijo v vakuolah. Aglikoni antocianinov brez vezanega sladkorja so antocianidini. Najdemo jih samo pri rastlinah v različnih tkivih, na primer v jesenskem listju, v cvetovih in plodovih, ki jih obarvajo rdeče, roza, vijolično ali modro.

Najpogostejši antocianini so:

- cianidin (antocianidin modre, vijolične, rdeče barve najdemo npr. v cvetu plavice (*Centaurea cyanus*), plodu šipka (*Rosa*), v plodu črnega ribeza (*Ribes nigrum*), češnje (*Prunus avium*);
- delfinidin (antocianidin modre barve najdemo v cvetovih in plodovih nekaterih rastlin, npr. ostrožnika (*Delphinium*), v plodovih borovnice (*Vaccinium myrtillus*))
- pelargonidin (antocianidin rdeče, vijolične barve najdemo v cvetovih in plodovih mnogih rastlin, npr. krvomočnicevk (Geraniaceae), v plodovih jagodnjaka (*Fragaria*);
- malvidin (modra barva, ki jo najdemo v cvetnih listih rastlin rodu *Primula* (*Primula*  $\times$  *polyantha*), v modrih cvetovih modrega pimperela (*Anagallis monelli*), v rdečem vinu iz vinske trte (*Vitis vinifera*);

- **petunidin** (temno rdeč ali vijoličast pigment, ki ga najdemo v številnih robidnicah (*Rubus*), na primer v aroniji, v rdečem vinu, predvsem iz grozdja vinske trte (*Vitis rotundifolia*)).

Antocianini sodelujejo v interakciji med rastlinami in živalmi. Antocianini, ki so prisotni v cvetovih določenih rastlinskih vrst privabljajo oprasovalce, prav tako antocianini v plodovih privabijo živali, ki le-te pojedjo, in tako sodelujejo pri razširjanju semen in plodov. V fotosintetskem tkivu (asimilacijskem parenhimu) listov antocianini ščitijo celice pred poškodbami, ki so posledica svetlobnega stresa v povezavi z drugimi stresnimi dejavniki, kot sta mraz in suša. Antocianini so antioksidanti, ki ščitijo rastlino pred vplivi UV svetlobe. Uporabljajo se kot prehranski dodatki, z oznako E 163, za obarvanje marmelad, sadnih pekarskih izdelkih, bonbonov in krem. Njihova barva je odvisna od strukture (vezave sladkorne molekule, števila hidroksilnih (-OH), in metoksilnih (-OCH<sub>3</sub>) skupin na B obroču antocianidina), prisotnosti nekaterih kovinskih ionov (Fe, Al, Cr) in pH vakuole. **Betacianini** (betaciani) so rdeča barvila, z dušikom (N) vezanim v heterocikličnem obroču. Nahajajo se v vakuoli kot vodotopni proteinski kompleksi. Najdemo jih v korenu rdeče pese (*Beta vulgaris*) in drugih predstavnikih družine metlikavk (Chenopodiaceae) ter v cvetovih družin kaktusovk (Cactaceae), tolščakovk (Portulacaceae), v nekaterih vrstah amarantusa (*Amaranthus*) in tudi v nekaterih glivah višjega reda. Uporabljajo se kot prehranski dodatki z oznako E 162, kot naravna barvila za hrano.

## CILJI

- Seznanili se boste s fenolno reakcijo, značilno za antocianine in betacianine.
- Sami boste pripravili pH indikator in z njim izmerili pH.

## NALOGA

1. S fenolno reakcijo (FeCl<sub>3</sub>) določite vrsto rdečega barvila v ekstraktu.
2. Iz ekstrakta antocianinov pripravite barvno skalo za pH indikator.
3. S pripravljenim pH indikatorjem izmerite pH vina, mleka, paradižnika, limone ...
4. S spreminjanjem pH lahko spremenite tudi barvo z antocianinom obarvanega celičnega soka.

**MATERIAL:** rdeče zelje (*Brasica oleracea* var. *capitata rubra*), rdeča pesa (*Beta vulgaris* var. *conditiva*), 2 čaši (500 ml), kuhalnik, stojalo za epruvete, 20 epruvet, FeCl<sub>3</sub>, alkoholni flomaster.

## IZVEDBA

S kuhanjem koščkov rdeče pese in rdečega zelja (vsakega posebej) pripravite njuna vodna ekstrakta barvil. Tako z ekstraktom rdečega zelja, kakor tudi z ekstraktom pese napolnite po eno epruveto (1–2 cm visoko).

1. Vrsto rdečega barvila v epruveti z ekstraktom rdeče pese in v epruveti z ekstraktom rdečega zelja ugotovite s fenolno reakcijo tako, da po kapljicah dodajate  $\text{FeCl}_3$  in opazujete barvo. Pozitivna fenolna reakcija (temno vijolično-črno obarvanje) pomeni, da so barvila antocianini; negativna fenolna reakcija (rdečkasto rjavo obarvanje) pomeni, da so barvila betacianini (Preglednica 1).
2. Indikatorski pH standard (barvno skalo) iz antocianinov pripravite tako, da iz čaše z antocianini nalijte ekstrakt barvila v 8 epruvet (1 cm visoko). Postavite jih v stojalo in razporedite v eno vrsto. V prvo zunanjo epruveto (epruveta 1) na levi strani dodajte tolikšen volumen kisline (1 M HCl), da se barva ekstrakta spremeni v rdečo barvo. V prvo zunanjo epruveto (epruveta 8) na desni strani dodajte toliko baze (1 M NaOH), da se barva ekstrakta spremeni v rumeno barvo (Slika 1, Preglednica 2). Nato iz prve zunanje epruvete v naslednjo notranjo s kapalko dodajajte vsebino do nove spremembe barve (Slika 1, Preglednica 2). In tako naprej v vsako naslednjo epruveto (iz leve proti desni do sredine in od desne proti levi do sredine). Po ureditvi barvne lestvice to ovrednotite tudi s pH vrednostmi, da se barve ujemajo s spremembo pH (Slika 1, Preglednica 2).
3. Točko 2 ponovite tudi z betacianini.
4. S pomočjo pripravljene pH indikatorja iz antocianinov izmerite (ocenite) pH različnim raztopinam (npr.: raztopine pralnega praška, kisa, limoninega soka, raztopine tekočega mila ...) in vrednosti zabeležite (Preglednica 3). V pet epruvet ali manjših čašic nalijte (1–2 cm visoko) posamezne raztopine, katerim dodajte ekstrakt antocianinov. Ko se barva raztopin z antocianini ustali, jo primerjajte z barvo antocianinskega indikatorskega pH standarda in ocenite pH le-teh.
5. S pomočjo mikroskopa opazujte povrhnjico rdeče čebule. Pod krovno stekelce (ob strani) dodajte bazo (1 M NaOH) in opazujte spreminjanje barve celičnega soka ter razložite to spremembo!

## REZULTATI IN OPAŽANJA

Preglednica 1: Vrsta barvila, določena s fenolno reakcijo

Ekstrakt	Fenolna reakcija (+ pozitivna, - negativna)	Vrsta barvila (antocianini, betacianini)
rdeče zelje		
rdeča pesa		



Slika 1: Indikatorna barvna lestvica z določenimi pH vrednostmi 1 do 13.

Preglednica 2: pH indikatorna skala iz antocianinov, betacianinov

Epruveta	1	2	3	4	5	6	7	8
Dodaj	HCl	—————>		neutrarno	<—————			NaOH
Barva ekstrakta zelja				modro vijolična				
pH				7				
Barva ekstrakta pese								
pH								

Preglednica 3: Meritve pH

	pH
zemlja	
milo	
pralni prašek	
kis	
limona	

## 2. vaja:

# Fotosintetsko aktivna asimilacijska barvila

## UVOD

Absorpcija svetlobe s pomočjo fotosintetskih barvil omogoča proces fotosinteze pri rastlinah, algah in modrozelenih cepljivkah. Fotosintetska barvila obsegajo tri skupine, ki se med seboj razlikujejo v kemijski zgradbi in v absorpciji svetlobe: klorofile, karotenoide in fikobiline.

Ločimo glavna in pomožna fotosintetska barvila. Od vseh pigmentov, ki sodelujejo pri fotosintezi, ima klorofil temeljno vlogo. Zato so ostali fotosintetski pigmenti znani kot pomožni pigmenti. Vsako barvilo absorbira samo določeno valovno dolžino svetlobe. Glavno barvilo, ki je klorofil a (pri bakterijah bakterioklorofil), absorbira svetlobo modre in kratkovalovne rdeče svetlobe in jo pretvarja v energijo elektronov. Pomožna barvila so v pomoč pri absorpciji svetlobe, energijo resonančno prenašajo do glavnega barvila, ki edini lahko odda elektron. Ko foton svetlobe trči v molekulo fotosintetskega barvila, se svetloba določene valovne dolžine absorbira, nekaj svetlobe odbije, nekaj pa jo list prepušča.



Katera so fotosintetsko aktivna barvila?

---

---

---

---

---

---

Opišite fotosistem I in II!

---

---

---

---

---

---

Kaj je fluorescenca?

---

---

---

---

---

---

Ponovite znanje o svetlobnih in ogljikovih reakcijah fotosinteze!

Kakšne so anatomske in fiziološke razlike med metabolizmom fotosinteze tipa C4, C3 in CAM?

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**Kromatografija** je laboratorijska metoda, s katero na podlagi razlike v hitrosti potovanja različnih snovi v vzorcu po stacionarni fazi le te v vzorcu ločujemo. Snovi, ki vzorec sestavljajo, potujejo po stacionarni fazi s pomočjo mobilne faze.

Ločevanje omogočajo razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih sestavin v vzorcu, kot so: velikost, oblika, naboj, hlapnost, topnost, adsorpcija ... Gre za separacijsko metodo, ki ločuje kemijsko podobne substance. Po zaključeni ločbi dobimo kromatogram. Za kvalitativno in kvantitativno ugotavljanje posameznih sestavin vzorca, je nujno potreben tudi ustrezen detekcijski sistem. Kromatografski sistem sestavlja več komponent: stacionarna faza, kromatografski nosilec, mobilna faza.

Obstajajo številni tipi kromatografij, kot so: papirna, tankoplastna, kolonska, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), plinska kromatografija (GC) ...



### Papirna kromatografija:

Razdalja potovanja vzorca (barvil) vzdolž kromatografskega papirja je odvisna od dveh dejavnikov:

- a) od topnosti (polarnosti oziroma nepolarnosti) barvila v vsaki od kemikalij, ki sestavlja kromatografsko topilo (mobilna faza). Bolj topno, nepolarno barvilo bo potovalo dlje, kot manj topno.
- b) od adsorpcije barvila na kromatografski papir (stacionarna faza). Bolj adsorbirano barvilo bo potovalo počasneje.

Potovanje sestavin (barvil) v vzorcu podajamo relativno na potovanje topila in je konstantno ter ga podamo, kot relativno frontalno mobilnost ( $R_f$ ).  $R_f$  izračunamo z enačbo (1):

$$R_f = \frac{\text{razdalja potovanja vzorca}}{\text{razdalja potovanja topila}} \quad (1)$$

### **CILJI**

- Spoznali boste različna barvila, vključena v absorpcijo svetlobe.
- Seznanili se boste z ekstrakcijo barvil in njihovim ločevanjem.
- Seznanili se boste s kromatografskim ločevanjem snovi.
- Seznanili se boste z absorpcijskimi lastnostmi barvil.
- Seznanili se boste s spektrofotometrijo.

### **NALOGA**

1. S papirno kromatografijo ločite barvila v kloroplastih.
2. Izračunajte relativno frontalno mobilnost ( $R_f$ ) za posamezno barvilo (Preglednica 4).
3. Pred vir svetlobe (lučka) postavite epruveto z ekstraktom ne ločenih barvil in opazujte obarvanost presvetljene vsebine epruvete.
4. S spektrofotometrom izmerite (absorbanco) absorpcijo vsakega od ločenih barvil, kontrolne raztopine topila in ekstrakta barvil v območju z valovnimi dolžinami od 350 nm do 750 nm.

## MATERIAL

Trava (*Poa* sp.) ali listi poljubne rastline, škarje, podlaga za rezanje, terilnica s pestilom, 100-ml čaša, manjša čaša, kromatografski papir, kromatografska komora s plutovinastim čepom za kromatografijo, kapilara, stojalo za epruvete, 7 epruvet, 7 zamaškov za epruvete, lučka, spektrofotometer.

## KEMIKALIJE

Aceton, petroleter, aceton : petroleter (v/v = 1 : 6), kremenčasti pesek

## IZVEDBA

1. Izrežite kromatografski papir tako, da po merah ustreza višini in širini kromatografske komore. Papirnat trak naj bo nekoliko ožji kot premer komore (da ni v stiku s steno komore) in tako dolg, da se bo dotikal gladine razvijalne tekočine oziroma da bo potopljen vanjo približno 2 mm. 1,5 cm od spodnjega roba kromatografskega papirja zelo narahlo s svinčnikom zarišite startno črto za nanos vzorca.
2. Travo s škarjami narežite na majhne koščke, prilijte malo acetona in travo v terilnici z dodatkom konice spatule kremenčevega peska dobro strite nad ledeno kopeljo. Temno zeleno obarvan grobi acetonski ekstrakt barvil dekantirajte v čašo, ki jo postavite na ledeno kopel. S kapilaro (nastavkom za pipeto) ekstrakt barvila nanesite na zarisano startno črto (1,5 cm od spodnjega roba). Nanos večkrat ponovite (ob vsakem nanosu progo sprti posušimo) tako, da dobimo temnozeleno progo. Preostanek ekstrakta barvil shranite v eno od epruvet.
3. Kromatografski papir z nanešenim ekstraktom pritrdite na zamašek in namestite v sredino komore tako, da bo 2–3 mm potopljen v mobilno fazo ((aceton : petroleter (v/v = 1 : 6)). Kromatografski papir naj se ne dotika stene komore. Ko mobilna faza doseže končno linijo, kromatogram snemite iz komore, ga posušite na zraku in na njem izmerite (označite) fronto topila, fronto barvil.
4. Posamezne lise z barvilom iz kromatograma izrežite in vsako liso posebej dajte v epruveto ter prelijte z acetonom, da se barvilo lise v njem ekstrahira.
5. Ekstraktom posameznih barvnih lis ločenih barvil s spektrofotometrom izmerite (absorbanco) absorpcijo, pri valovni dolžini od 350 nm do 750 nm in absorpcijske spektre grafično predstavite.

## REZULTATI IN OPAŽANJA

Preglednica 4: Ekstrakti posameznih front barvil iz kromatograma

Vzorec	Barva lise	Rf	Prisotno barvilo
F			
E			
D			
C			
B			
A			



3. vaja:

# Ločitev zelenih in rumenih barvil iz kloroplastov

## UVOD

Glejte: predhodne vaje Rastlinska barvila

## CILJI

- Seznanili se boste z metodo ekstrakcije.
- Spoznali boste ločitev zelenih in rumenih asimilacijskih barvil na osnovi topnosti.

## NALOGA

1. Barvila, ekstrahirana v etanolu, ločite z dvema različnima topiloma (petroleter in etanol).

## MATERIAL

Trava, 100-ml in 20-ml čaši, kuhalnik, terilnica s pestilom, epruveta.









## 4. vaja:

# Določitev barvil na osnovi topnosti

## UVOD

Glejte: predhodne vaje Rastlinska barvila.

## CILJI

- Seznanili se boste s kemijskimi lastnostmi določenih barvil in z rabo ustreznih topil za ekstrakcijo le-teh.
- Določili boste vrsto barvila v rdeči papriki (*Capsicum*).
- Določili boste vrsto barvila v hibiskusu (*Hibiscus*).

## NALOGA

1. Barvila v rdeči papriki in hibiskusu ekstrahirajte z različnimi topili, z vodo in z jedilnim oljem.

## MATERIAL

Rdeča paprika v prahu, sušen hibiskus (za čaj), dve 100-ml čaši (visoki), steklena palčka.



# IZMENJAVA PLINOV





## 5. vaja:

# Dihanje rastlin

## UVOD

### Dihanje semen

Pri mirujočih semenih so mitohondriji še nerazviti. Metabolizem in izmenjava plinov sta izredno nizka, saj je vsebnost vode nizka (<10 %). Med nabrekanjem (imbibicijo) semena se intenzivnost dihanja večja in je merljiva s preprostimi metodami. Poraba kisika strmo narašča; aktivirajo se encimi, ki so skladiščeni v semenu. Porabijo se primarne zaloge hranil (v večini nižji sladkorji) v embriju. V teh procesih se porablja tudi kisik, ki je skladiščen v različnih tkivih semena. Mitohondriji se razvijajo, poveča se njihovo število in naraste količina njihovih encimov. Pri nekaterih vrstah rastlin začne po nekaj urah poraba kisika stagnirati ali celo rahlo upade. To se običajno zgodi ob koncu imbibicije. Vzrok zanjo je verjetno slaba prepustnost semenske ovojnice (teste) za kisik, ki je v imbibiranem stanju še manjša. Kisik, ki prihaja skozi njo, prestrezajo tudi fenolne substance, ki so v njej po navadi prisotne v visokih koncentracijah. Metabolizem je v tem času delno anaeroben, kljub temu v semenu poteka intenzivna sinteza encimov.

Ponoven porast porabe kisika opazimo, ko se pojavijo s prostim očesom vidni znaki kalitve – prodor korenčice (radikule). Embrio intenzivno izkorišča rezerve iz sekundarnega endosperma ali kotiledonov in redko iz hipokotila. Na svetlobi lahko pri kalici opazimo pozitivno fototropično reakcijo. Razvije se tudi fotosintezni aparat in kalica

preide na avtotrofni način življenja (Likar in Vogel-Mikuš, 2011). Več o dihanju rastlin boste izvedeli na predavanjih!

Dihanje rastlin lahko spremljamo tako, da ugotavljamo, kaj pri tem nastaja in kaj se pri tem porablja. Pri dihanju dokazujemo ali merimo sproščeni CO<sub>2</sub> oziroma porabljeni O<sub>2</sub>. Ta proces lahko spremljamo s pomočjo Vernierjevega merilnika za merjenje koncentracije plinastega CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>

## CILJI

- Dokazali boste, da pri dihanju nastaja CO<sub>2</sub>.
- Dokazali boste, da se pri dihanju porablja O<sub>2</sub>.
- Izmerili boste količino porabljenega O<sub>2</sub> in nastalega CO<sub>2</sub> pri suhih in imbibiranih semenih.
- Spoznali boste vpliv različnih obravnjav (različne koncentracije NaCl) na dihanje semen pri kalitvi (3–4 dni).

## NALOGA

1. Izmerite količino porabe O<sub>2</sub> in nastanka CO<sub>2</sub> pri suhih in imbibiranih semenih.
2. Izmerite količino porabe O<sub>2</sub> in nastanka CO<sub>2</sub> pri obravnavanih semen z 0-%, 1-%, 5-% in 10-% raztopino NaCl, za vsako obravnavo posebej.
3. Primerjajte meritve posameznih obravnjav med seboj.

## MATERIAL

Tri do štiri dni stara kaleča semena pšenice (*Triticum*), ali semena drugih rastlin, ki smo jih za kalitev različno obravnavali; z 0-%, 1-%, 5-% in 10-% raztopino NaCl.

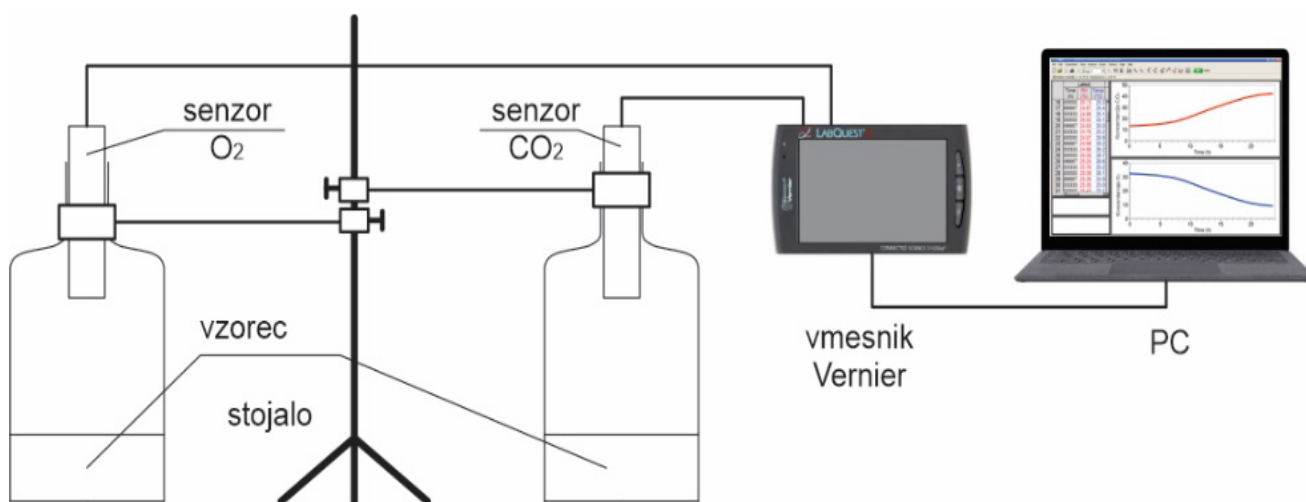
Vernierjev merilnik za merjenje plinastega CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>, vmesnik, računalnik, programska oprema LabPro, tehtnica.

## KEMIKALIJE

NaCl

## IZVEDBA

Koncentracijo plinastega kisika in ogljikovega dioksida boste izmerili s pomočjo Vernierjevega merilnika za merjenje koncentracije plinastega CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>, ki je povezan z Vernierjevim vmesnikom. Rezultate boste spremljali s pomočjo programske opreme LabPro (Slika 2).



Slika 2: Shematski prikaz delovanja Vernierjevega merilnika

**Zelo pomembno:** Merilnik se uporablja za merjenje plinastega O<sub>2</sub> in ne O<sub>2</sub> raztopljenega v tekočini, zato ga ne potaplajte v nikakršno tekočino. Medtem, ko merilnika ne uporabljamo, mora biti nameščen navpično. To je pomembno za vzdrževanje merilnika!

1. Meritve opravite najprej pri suhih semenih (kontrola 1) in nato pri imbibiranih semenih, tretiranih z 0-% (kontrola 2), 1-%, 5-% in 10-% raztopino NaCl. Sočasno merite koncentracijo plinastega kisika (O<sub>2</sub>) in ogljikovega dioksida (CO<sub>2</sub>).
2. Kaleča semena istega tretmaja predhodno stehtajte in z njimi napolnite epruveto (komoro) za O<sub>2</sub> in za CO<sub>2</sub> (rastlinski material se ne sme neposredno dotikati Vernierjevega merilnika!).
3. Vstavite Vernierjev merilnik za merjenje O<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub> v komoro navpično navzdol. Komori nežno pričvrstite/vpnite s prižemo v stojalo.
4. Povežite merilnika z vmesnikom in vmesnik z računalnikom (merilnik O<sub>2</sub> in merilnik CO<sub>2</sub>) in odprite program Logger pro, določite (nastavite) čas meritve in počakajte, da program samodejno prepozna merilnika in začne meritev. Med posameznimi meritvami komore temeljito prezračite (5–10 min).

## REZULTATI IN OPAŽANJA

Rezultate meritev kontrole in vseh tretmajev zberite na en graf in jih komentirajte ter razložite.

## VPRAŠANJA

Zakaj imate pri tem eksperimentu dve kontroli (kontrola1 in kontrola2)?

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Razložite vpliv NaCl na intenzivnost dihanja!

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



## 6. vaja:

# Fotosintetska aktivnost

## UVOD

Fotosintetsko aktivnost lahko ugotavljamo z merjenjem proizvodnje  $O_2$  ali porabe  $CO_2$ .  $CO_2$  se z difuzijo prenese v kloroplaste, kjer se v procesu asimilatorne redukcije v Calvinovem ciklu s pomočjo encima RUBISCO vgrajuje v triožo gliceraldehid in naprej v glukozo. Glede na razlike v fotosintezni karboksilaciji ločimo fotosintezni metabolizem  $C_3$ ,  $C_4$ , in CAM rastlin. Pri  $C_4$  in CAM metabolizmu je prvi proizvod vezave  $CO_2$  oksalacetat, malat ali aspartat s po 4 atomi ogljika, ki predstavlja vmesno skladiščenje  $CO_2$  za ohranjanje visokega delnega tlaka  $CO_2$ , ki se z dekarboksilacijo nadalje usmerja v Kalvinov cikel. Pri vseh treh metabolizmih poteka asimilatorna redukcija  $CO_2$  po Calvinovem ciklu (Likar in Vogel-Mikuš, 2011).

## CILJI

- Spoznali boste fotosintetsko aktivnost meritev porabe  $CO_2$  pri svetlobah različnih valovnih dolžin (bela, rdeča, modra, zelena).

## NALOGA

1. Vodno lečo (*Lemna minor*) izpostavite svetlobi različne kakovosti za določen čas (20 min ali več) in spremljajte porabo  $CO_2$  pri vsaki posamezni svetlobi.



# ENCIMSKA AKTIVNOST





## 7. vaja:

# Aktivnost katalaze

## UVOD

Katalaza je široko razširjen encim, ki ga najdemo praktično v vseh aerobnih celicah v peroksisomih in glioksisomih (živali, rastline in mikroorganizmi). Je encim, ki spada v skupino encimov oksidoreduktaz. Katalizira razgradnjo vodikovega peroksida ( $H_2O_2$ ), pri čemer se sprošča kisik ( $O_2$ ):



Je relativno stabilen encim, ki ga lahko preprosto merimo s količino sproščenega kisika iz substrata. Sestavljen je iz štirih podenot, ki tvorijo tetramer (1 podenota = 65 kD). Vsaka polipeptidna podenota ima v aktivnem mestu prostetično skupino, ki je hemin (porfirin s  $Fe^{+3}$ ). Ena molekula železa katalizira reakcijo dveh molekul vodikovega peroksida. Znotraj ene vrste lahko najdemo različne katalazne izocime. Katalaza ščiti celice pred toksičnimi učinki vodikovega peroksida tako, da ga razgradi v molekularni kisik in vodo.

Vodikov peroksid nastaja kot stranski proizvod metabolizma. Nastaja v skoraj vsakem aerobnem procesu v celici še posebej v dveh procesih: ob fotorespiraciji (v peroksisomih) in ob kalitvi semen v  $\beta$ -oksidaciji maščobnih kislin (v glioksisomih). Za celice je toksičen, saj je zelo močan oksidant, ki bi sicer napadal druge organske molekule.

## VPRAŠANJA

Kaj so encimi?

---

---

---

---

---

---

Katere skupine encimov še poznamo?

---

---

---

---

---

---

Katere skupine oksidoreduktaz poznamo in kaj katalizirajo?

---

---

---

---

---

---

Katere hidrolaze poznamo, kako delujejo in katere reakcije katalizirajo?

---

---

---

---

---

Znanje o encimih lahko najdete na spletni strani [www.plantphys.net](http://www.plantphys.net) v poglavju »Energy and Enzymes«!

## CILJI

- Spoznali boste, kako dejavniki (pH, koncentracija encima, temperatura, koncentracija substrata -  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) uravnavajo encimsko aktivnost katalaze.

## NALOGA

1. Izmerite vpliv pufrskih raztopin s pH (4, 5, 6, 6,6, 7,2, 7,8, 8,4, 9, 10, 12) na aktivnost katalaze.
2. Narišite krivuljo hitrosti reakcije v odvisnosti od pH medija.
3. Izmerite vpliv koncentracije encima – katalaze (0,00, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 ml encima v vzorcu, ki ga vedno dopolnimo s pufrom pH = 7,2 do 22 ml) na hitrost encimske reakcije.
4. Narišite krivuljo hitrosti reakcije v odvisnosti od koncentracije encima.
5. Izmerite vpliv koncentracije substrata -  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,0, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 10,0 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ki ga, če je potrebno, dopolnimo s pufrom pH = 7,2 do 10 ml) na aktivnost katalaze.
6. Narišite krivuljo hitrosti reakcije v odvisnosti od koncentracije substrata.
7. Izmerite vpliv T (T vodne kopeli = 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C) na aktivnost katalaze.
8. Narišite krivuljo hitrosti reakcije v odvisnosti od T vodne kopeli.

## MATERIAL

Gomolj krompirja ali drug rastlinski material, 50-ml bireta, 60-ml lij ločilnik, 100-ml reakcijska steklenica z zamaškom, cevke za povezavo, terilnica s pestilom, 0,1- do 10-ml pipete, grelna plošča z mešalom.

## KEMIKALIJE

3-%  $H_2O_2$ , različni pufri, ki smo jih pripravili iz 0.1 M citronsko kislino (A), 0.2 M  $Na_2HPO_4$  (B), 0.2 M  $NaH_2PO_4$  (C), 0.2 M KCl (D), 0.2 M  $H_3BO_3$  (E), 0.2 M NaOH (F).

## IZVEDBA

Encimski ekstrakt pridobite iz 3 g poljubnega rastlinskega materiala (npr. sveži listi špinače brez pecljev ali drobno nastrgan gomolj krompirja). Pripravite si 50 ml deionizirane vode. Del vode prilijte v terilnico, dodajte na drobno sesekljan (nastrgan) rastlinski material, ki ga dobro strete, da se encim sprostí iz tkiva. Dodajte preostanek (od 50 ml) deionizirane vode in počakajte, da se grob rastlinski material usede na dno. Ekstrakt (supernatant) brez sedimenta dekantirajte ob stekleni palčki v stekleničko in ga za čas trajanja eksperimenta hranite v njej.

S pomočjo asistenta po shemi (Slika 3) sestavite aparaturo! Vodno kopel lahko nadomestite z grelno ploščo.

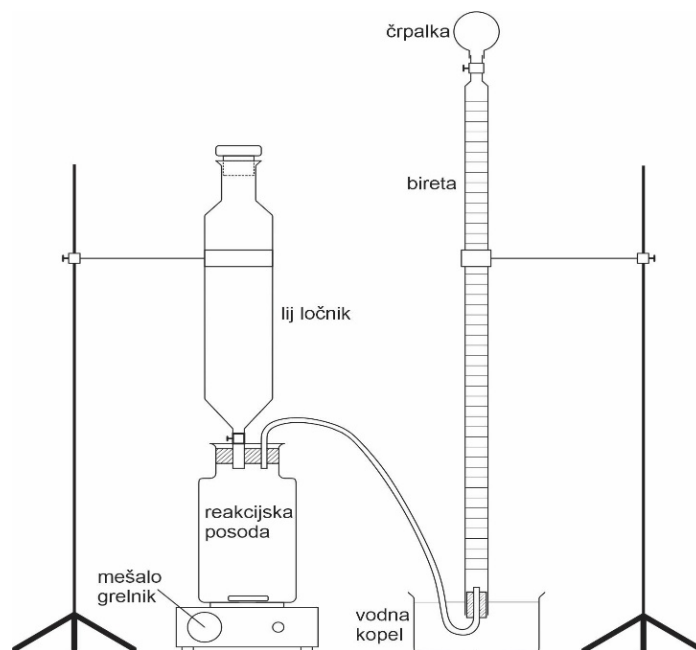
V reakcijsko posodo dodajajte encimski ekstrakt (supernatant) z ustreznim pufrom in v lij ločilnik  $H_2O_2$  – substrat (glejte točke izvedbe 1., 2., 3., 4. in 5).

Reakcijsko posodo potopite v vodno kopel ali posredno na grelno ploščo z mešalnikom na 30 °C in jo s cevko povežite z narobe obrnjeno bireto, napolnjeno z vodo.

Po 5 min termične akomodacije počasi spustite substrat ( $H_2O_2$ ) iz lija ločilnika v reakcijsko posodo. Takoj nato zaprite pipo na lij ločilniku, da preprečíte uhajanje nastalega kisika. Ko substrat zaradi fizikalnih pojavov izpodrine že nekaj zraka v bireti, hitro odčitajte nivo vode (označíte) in začnite z meritvijo časa poteka reakcije. Vsebinsko v reakcijski posodi ves čas reakcije nežno mešajte.



Po 10 minutah reakcije zapišite na podlagi izpodrinjene vode volumen sproščenega kisika, (ali čas, v katerem se je nabralo 50 ml kisika, če je ta čas krajši kot 5 min).



Slika 3: Skica postavitve merilnika za merjenje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze preverjajte pri različnih dejavnikih:

1. Vpliv pH na hitrost reakcije: V reakcijsko posodo dajte 2 ml encimskega ekstrakta (supernatant) in 20 ml pufru z ustreznim pH (4, 5, 6, 6,6, 7,2, 7,8, 8,4, 9, 10, 12) in v lij ločilnik 10 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Pri vsakem pH naj teče reakcija 10 minut. Po desetih minutah zabeležite volumen nastalega kisika (Preglednica 6).
2. Vpliv koncentracije encima na hitrost reakcije: V reakcijsko posodo dajte zmes encimskega ekstrakta in pufru (0,00, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 ml encima v vzorcu, ki ga vedno dopolnite s pufrom pH = 7,2 do 22 ml) in v lij ločilnik 10 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Pri vsaki navedeni koncentraciji encima naj teče reakcija 10 minut. Po desetih minutah zabeležite volumen nastalega kisika (Preglednica 7).
3. Vpliv koncentracije substrata na hitrost reakcije: V reakcijsko posodo dajte 2 ml encimskega ekstrakta (supernatant) in 20 ml pufru s pH = 7,2 in v lij ločilnik ustrezno redčen substrat (0,0, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 10,0 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ki ga za različne razredčitve dopolnite s pufrom pH = 7,2 do 10 ml). Pri vsaki navedeni koncentraciji substrata naj teče reakcija 10 minut. Po desetih minutah zabeležite volumen nastalega kisika (Preglednica 8).
4. Vpliv temperature na hitrost reakcije: V reakcijsko posodo dajte 2 ml encimskega ekstrakta (supernatant) in 20 ml pufru s pH = 7,2 in v lij ločilnik 10 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ .







# SPREJEM, PREVAJANJE IN URAVNAVANJE VODE V RASTLINAH





## 8. vaja:

# Specifična prevodnost lesa

## UVOD

Voda vstopa v rastlino skozi koreninske laske in nato z radialnim transportom po koreninski skorji po endodermu kot fiziološki zapori/pregradi za vodo v ksilemu in po njem z aksialnim transportom po stebelu v liste, kjer izhlapeva s površine celic mezofila in prehaja skozi listne reže in v malem deležu po kutikuli iz rastline.

Hitrost prevajanja vode ni odvisna samo od transpiracije, ampak tudi od zgradbe in delovanja prevajalnih elementov – ksilema. Na vajah bomo raziskali prevodnost sekundarnega ksilema (lesa) pri golosemenkah in kritosemenkah. Med lesom različnih lesnih vrst so razlike tako v zgradbi kot v prevodnosti. Prevajanje praviloma poteka samo po zunanjih branikah in v nekaterih primerih (hrast, brest, pravi kostanj ...) samo po zadnji, najmlajši braniki. Sposobnost lesa, da prevaja vodo, izrazimo v obliki specifične prevodnosti.

## VPRAŠANJA

Kako se po zgradbi razlikujeta les iglavcev in listavcev?

---

Kaj je venčasto porozni les in kaj raztreseno porozni les?

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Kaj je mikroporen in kaj makroporen les?

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## **CILJI**

- Spremljali boste razlike v prevodnosti lesa različnih vrst dreves in grmov.



## NALOGA

1. Izmerite volumen obarvane tekočine, ki priteče skozi vejo v 30 minutah.
2. Izračunajte površino prereza vejice.
3. Izračunajte specifično prevodnost ( $sp$ ) po enačbi (3):

$$sp = \frac{V \cdot l}{t \cdot S \cdot p} \quad (3)$$

$V$  = volumen pretočene tekočine ( $m^3$ )

$l$  = dolžina vejice (m)

$t$  = dolžina poskusa (h)

$S$  = presek veje ( $m^2$ )

$p$  = tlak (Pa)\*.

\* Tlak vode nad cevko je enak 0,01MPa za vsak meter tekočine nad vejo.

$$1 \text{ at} = 760 \text{ mmHg} = 1,013 \text{ bar} = 0,1013 \text{ MPa}$$

## MATERIAL

Veje različnih dreves debeline približno 1 cm, cev dolžine 1 m, gumijasta cev (zamašek), ki se prilega stekleni ali kovinski cevi in veji, žica, stojalo, prižema, menzura, čaša, lijak, žaga, milimetrski papir, ravnilo, škarje.

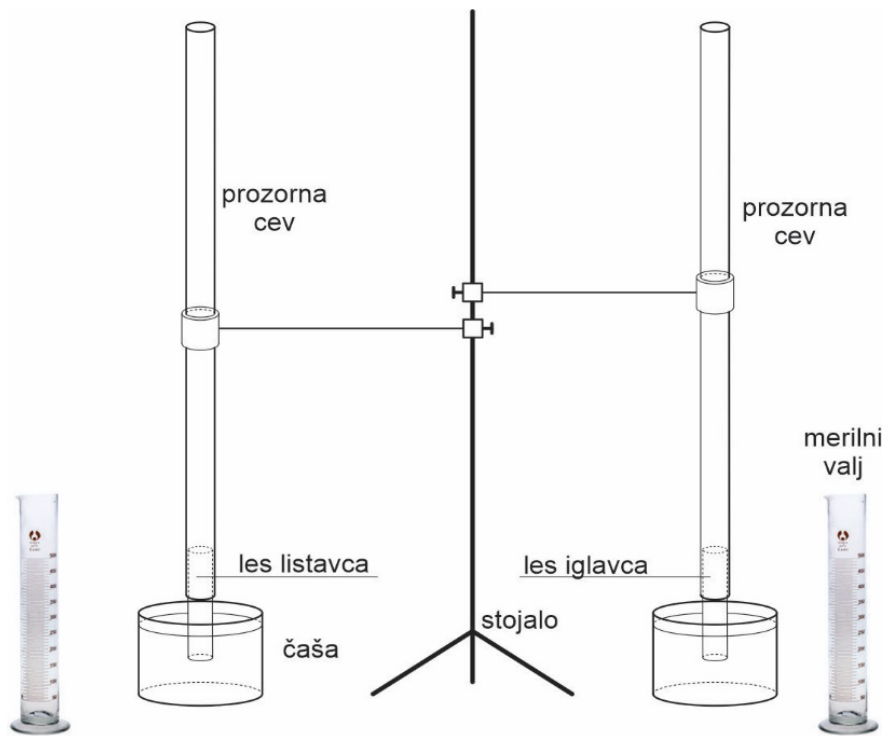
## KEMIKALIJE

0,05 % metilensko modrilo.

## IZVEDBA

Odrežite približno 30 cm dolge veje in jih do poskusa shranite v vodi, da preprečite nastanek kavitacij. Iz sredine veje odžagajte 10 cm dolg kos brez stranskih vejic in ga z gumijasto cevjo (zamaškom) pritrdite na stekleno cev. To vpnite na stojalo tako, da je veja v vertikalnem (navpičnem) položaju (Slika 4). Cev napolnite 1 m visoko z raztopino metilenskega modrila in počakajte, da barvilo priteče skozi vejo v čašo. Nato z menzuro izmerite volumen tekočine, ki se pretoči skozi. Med poskusom ves čas dolivajte metilensko modrilo, da je višina tekočine v cevi vedno enaka. Meritev ponovite dvakrat in rezultate zabeležite (Preglednica 10). Po končani meritvi izmerite premer veje (lesa) in jo vzdolžno

razpolovite. Oglejte si obarvane in ne obarvane dele in iz obarvanja sklepajte, katere branike so prevajale vodo.



Slika 4: Skica aparature za merjenje prevodnosti lesa

## REZULTATI IN OPAŽANJA

Preglednica 10: Specifična prevodnost različnih vrst lesa

Objekt				
V				
t				
S				
P				
sp				

## 9. vaja:

# Stopnja sukulentnosti

## UVOD

Stopnja sukulentnosti (SS) je kvocient, ki opisuje razmerje med volumnom in površino listov. Številne rastlinske vrste suhih rastišč imajo debele liste, z relativno nizkim razmerjem med površino in volumnom, debelo kutikulo in zelo nizko transpiracijo. Običajno imajo slabo razvit sloj stebričastega tkiva, zato večino listov ali stebel sestavljajo fotosintetsko aktivne celice gobastega tkiva, ki imajo velike vakuole in malo citoplazme. Sprejem  $\text{CO}_2$  in metabolizem fotosinteze pri sukulentih je CAM tip (kisli metabolizem sočnic). Več o metabolizmu ogljika pri rastlinah boste izvedeli na predavanjih.

## VPRAŠANJA

Kako poteka sprejem in metabolizem  $\text{CO}_2$  pri  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  in CAM rastlinah?

---

---

---

---

Za katere rastlinske skupine je značilen posamezen cikel?

---

---

---

Na kakšnih rastiščih jih najdemo?

---

---

---

---

Skozi katere organe in tkiva poteka transpiracija?

---

---

---

---

Kako rastline regulirajo transpiracijo?

---

---

---

---

Kako so nekatere rastline zavarovane pred preveliko transpiracijo?

---

---

---

---

Kako jih imenujemo?

---

---

---

---

## CILJI

- Spoznali boste stopnjo sukulentnosti listov različnih rastlinskih vrst.

## NALOGA

1. Izračunajte stopnjo sukulentnosti (SS) za posamezne liste po formuli (4).

$$SS = \frac{m}{2 \cdot p} \quad (4)$$

m = vsebnost - masa vode (g) v listih

p = površina lista (cm<sup>2</sup>).

2. Ugotovite ali starost listov vpliva na spremembo stopnje sukulentnosti.

## MATERIAL

Sveže odrezane vejice z listi različnih rastlin, petrijevke, aluminijasta folija, milimetrski papir, škarje, svinčnik, tehtnica, sušilnik.

## IZVEDBA

Izberite pet različnih rastlin in jim odrežite po en list (Preglednica 11). Nato, izmet teh petih rastlin izberite eno, ki ji odrežite prvih pet listov od vršička navzdol (Preglednica 12). Vse odrezane liste stehtajte.

Izmerite površino listov tako, da jih narišete na milimetrski papir. Liste položite na stehtan povoščen papir (peki papir) in jih sušite do konstantne teže pri 105 °C. Liste ponovno stehtajte in določite vsebnost vode vseh listov (Preglednica 11, Preglednica 12).

## REZULTATI IN OPAŽANJA

Preglednica 11: Stopnja sukulentnosti različnih rastlinskih vrst

Listi različnih rastlinskih vrst	površina (cm <sup>2</sup> )	sveža teža (g)	suha teža (g)	vsebnost vode (g)	stopnja sukulentnosti

**Preglednica 12: Vpliv starosti listov na stopnjo sukulentnosti**

Listi ene rastlinske vrste	površina (cm <sup>2</sup> )	sveža teža (g)	suha teža (g)	vsebnost vode (g)	stopnja sukulentnosti
1. list					
2. list					
3. list					
4. list					
5. list					





## 10. vaja:

# Merjenje sprejema vode v rastlino

## UVOD

Voda v rastlini je v stiku z vodo v tleh in v zraku. Za vodo v rastlini velja, da potuje z mesta višjega na mesto nižjega vodnega potenciala (iz smeri manj negativnega v smer bolj negativnega vodnega potenciala). Zato transport vode vedno poteka z mesta višjega vodnega potenciala v tleh, v smeri nižjega vodnega potenciala v atmosferi, torej v smeri gradienta vodnega potenciala. Ker je vodni potencial bolj ali manj suhega zraka nekaj deset do nekaj tisoč kPa nižji od tistega v rastlinah, voda v rastlini teži k temu, da zapusti rastlino.

Voda vstopa v rastlino skozi koreninske laske in nato z radialnim transportom po koreninski skorji skozi endoderm kot fiziološko zaporo/prepreko v ksilem. Po njem potuje v stebelce in liste, kjer izhlapeva s površine celic mezofila in nato difundira skozi listne reže in v manjšem deležu skozi kutikulo iz rastline. Transport vode po rastlini imenujemo transpiracijski tok, izgubo vode s površine rastlin pa transpiracija. Transpiracija poteka večinoma skozi liste, in sicer skozi listne reže, v manjšem deležu skozi kutikulo (kutikularna transpiracija) in lenticle lubja (peridermalna transpiracija).

Več o vodnem potencialu, njegovih komponentah in transpiraciji boste izvedeli na predavanjih.



Posredno – z merjenjem zmanjševanja mase potometra v enoti časa.

Čeprav na vsebnost vode vplivajo tudi številni metabolni procesi v rastlini (dihanje, fotosinteza), vplivajo na vsebnost vode in maso rastline, so njihovi učinki v primerjavi z transpiracijo zanemarljivi in jih ne upoštevamo.

Pri sestavljanju potometra moramo paziti na dvoje:

- steblo rastline moramo odrezati pod vodo, da v žile ne prodre zrak;
- vsi sestavni deli morajo tesniti, tako da voda izhaja samo s transpiracijo skozi rastlino.

## CILJI

- Ugotavljali boste vpliv vetra, vlažnosti in listne površine na sprejem vode in na transpiracijo.

## NALOGE

1. S pomočjo asistenta sestavite potometer (Slika 5).
2. Izmerite sprejem vode ( $\text{cm}^3 \text{h}^{-1}$ ) v rastlino tako, da bomo odčitavali porabo vode v graduirani cevki (1-ml pipeti).
3. Narišite graf sprejema vode v različnih pogojih.
4. Izračunajte izgubo vode, preračunano na površino listov ( $\text{cm}^3 \text{h}^{-1} \text{m}^{-2}$ ).

## MATERIAL

Mladi olistani poganjki različnih rastlin, doma izdelan potometer, večja prozorna plastična vrečka, električni fen; štoparica, termometer, injekcijska brizga, milimetrski papir.

## KEMIKALIJE

Vosek ali vazelin.

## IZVEDBA

### 1. Sprejem vode

Pripravite vse za sestavo potometra (Slika 5).

Izberite rastlino, jo odrežite in odrezan konec takoj potopite v vodo. Tako se izognete vdoru mehurčkov zraka v ksilem. Pod vodo, nekaj cm nad prvim rezom takoj še enkrat gladko, poševno odrežite poganjek. Še v vodi ga vstavite v preluknjan zamašek potometra. Potometer napolnite z vodo in ga sestavite v kadici z vodo. Prav tako v vodi vanj namestite 1-ml pipeto z merilom in brizgalko. Sestavljen potometer vzemite iz vode, vpnite v stojalo in preverite vodni stolpec v kapilari (pipeti). Potometer je pripravljen za meritev, ko se vodni stolpec v kapilari začne premikati v smeri vodnega stolpca. Pred vsako meritvijo z brizgalko uravnajte menisk v kapilari, in nato v 30 minutah na 10 minut (ali čas prilagodimo dejanskim dogajanjem) odčitajte porabo vode. Rezultati naj bodo izračunani kot volumen na enoto časa ( $\text{cm}^3 \text{h}^{-1}$ ) (Preglednica 14).

Po vsaki spremembi poskusnih pogojev morate potometer adaptirati (preurediti)!

Izvedite serijo štirih meritev in sproti beležite rezultate (Preglednica 13):

- a) Kontrolna meritev.
- b) Veter: simulirajte ga tako, da v rastlino zelo rahlo pihate s fenom (pri močnem vetru se reže zaprejo).
- c) Povečanje vlažnosti: povečate jo tako, da poganjek prekrijete s plastično vrečko.
- d) Zmanjšanje listne površine za 1/2: zmanjšajte jo tako, da odstranite polovico listov.

### 2. Transpiracija

Listno površino izmerite tako, da po koncu meritev s poganjka odstranite vse liste in izračunate njihovo listno površino. To naredite tako, da liste prerišete na milimetrski papir in na njem preštejete kvadrate. Rezultate izrazite v porabi vode na enoto časa in na listno površino ( $\text{cm}^3 \text{h}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) (Preglednica 15).




Preglednica 14: Sprejem vode pri različnih dejavnikih okolja

Povprečna poraba vode ( $\text{cm}^3 \text{h}^{-1}$ )			
kontrola	veter (fen)	vlažnost (vrečka)	1/2 listne površine

Preglednica 15: Transpiracija vode pri različnih dejavnikih okolja

Povprečna izguba vode na listno površino ( $\text{cm}^3 \text{h}^{-1} \text{m}^{-2}$ )			
kontrola	veter (fen)	vlažnost (vrečka)	1/2 listne površine

Narišite krivulji časovnega poteka porabe vode in transpiracije!



# DISPERZIJSKI SISTEMI, KOLOIDI, PLAZMOLIZA







## 11. vaja:

# Koloidni sistemi

## UVOD

V živih organizmih je ogromno spojin v koloidnem stanju. Njihovi pomembni lastnosti sta: da imajo električni naboj in da nabrekajo – na svojo površino vežejo ione ali molekule z drugačnim električnim nabojem (liofilni koloidi).

Koloidno raztopino v notranjosti celice predstavlja citoplazma. Citoplazma je koloidna raztopina snovi v velikosti 1–1000 nm, ki napolnjuje notranjost celic in je razdeljena na dve komponenti: tekočo frakcijo, znano kot citosol ali citoplazemski matriks, in organele, ki so v njej pri evkariontskih celicah.

Citosol je želatinasta koloidna raztopina celice (včasih brezbarvna, včasih sivkasta snov), citoplazme in je sestavljen iz ogromne količinetopljenih snovi, kot so ioni, vmesni presnovki, ogljikovi hidrati, lipidi, beljakovine in ribonukleinske kisline (RNA). Lahko je v dveh medsebojno spremenljivih fazah kot gel ali kot sol.

Med najpomembnejšimi elementi so: ogljik, vodik, dušik, kisik, fosfor in žveplo.

Prav tako je citosol bogat z ioni, ki povzročajo zvišanje osmotskega tlaka celice in pomagajo vzdrževati optimalno kislino-bazično ravnovesje v celičnem okolju.

Raznolikost ionov, ki jih najdemo v citosolu, je odvisna od tipa celice. Na primer, mišične in živčne celice imajo visoke koncentracije kalija in magnezija, kalcijevih ionov pa je še posebej veliko v krvnih celicah.

V rastlinskih celicah so predvsem koloidi, v katerih je disperzijsko sredstvo voda (hidrofilni koloidi). Pri njihovem nabrekanju se dipoli vode vežejo na makromolekule, ki so največkrat proteini, lahko pa so tudi polisaharidi.

Delovanje takih koloidnih sistemov ponazarja vaja, v kateri pripravimo disperzijski sistem iz agarja (polisaharida z negativnim nabojem makromolekul) in iz vode oziroma različnih ionskih raztopin. Negativno nabit agar v vodi nabreka, ker se na njegovo površino vežejo molekule vode.

## VPRAŠANJA

Kaj so disperzni sistemi?

---

---

---

---

---

---

---

---

Kateri od njih so koloidni sistemi?

---

---

---

---

Kaj je disperzijska faza in disperzijsko sredstvo?

---

---

---

---

Kako pripravimo spodaj omenjene koncentracije raztopin?

---

---

---

---

Kako jih izračunamo?

---

---

---

---



Katere podatke potrebujemo?

---

---

---

---

Kaj je molarnost in molarna koncentracija?

---

---

---

---

## CILJI

- Na modelu boste simulirali tista dogajanja v rastlinskih celicah, ki so posledica lastnosti hidrofilnih koloidov.

## NALOGA

1. Ugotovite vpliv dodanih ionov na nabrekanje agarja v odvisnosti od kombinacije dodanih ionov, njihovih el. nabojev, velikosti ionov in njihovega hidratacijskega ovoja.

## MATERIAL

Šest epruvet enakega premera, 25-ml menzura, večja čaša, žlička, tehtnica, stojalo za epruvete.

## KEMIKALIJE

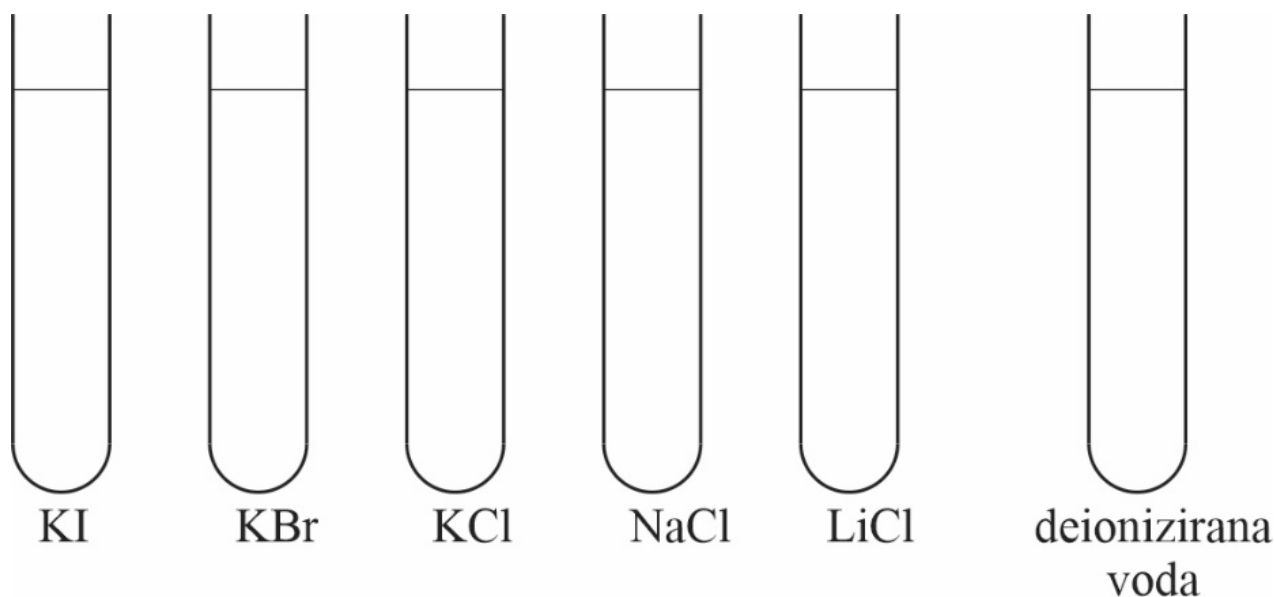
Agar, 1 M raztopine KI, KBr, KCl, NaCl, LiCl, deionizirano voda.

## IZVEDBA

1. V šest enakih epruvel pazljivo stresite po 0,5 g agarja (Slika 6).
2. V pet epruvel napolnite po 10 ml posameznih raztopin (KI, KBr, KCl, NaCl, LiCl), šesto pa z enako količino destilirane vode in na epruvete takoj označite vrsto raztopine.
3. Epruvete postavite v vročo vodno kopel. Po eni uri preverite in zabeležite nivo nabreklih agarja.

## REZULTATI IN OPAŽANJA

Vrišite (fotografirajte) nivo nabreklih agarja v vsaki od epruvel in razložite rezultate (Slika 6).



Slika 6: Vpliv ionov (KI, KBr, KCl, NaCl, LiCl) v koloidnem sistemu



## 12. vaja:

# Plazmoliza

## UVOD

**Plazmoliza** je odstop celična membrane od celične stene kot posledica krčenja vakuole zaradi oddajanja vode v hipertoničnem okolju (okolju z večjo koncentracijo raztopljene snovi).

Rastlinske celice so v običajnem stanju v turgorju. Zaradi turgorja se hranilne raztopine premikajo med celicami, rastline imajo tonus in ostanejo pokonci.

V celici s pravo količino vode celična membrana stisne celično steno in je v popolnem stiku z njo. Ko je ta celica v hipertonični raztopini, voda začne prehajati iz celice, kar sprva ne vpliva na celično steno. Ker pa se voda iz celice, zaradi hipertoničnega okolja, še naprej izgublja, se pojavi prvi znak krčenja celične vsebine – začetna prva faza plazmolize, kjer se celična membrana na koncih odtrga od celične stene, a še ohranja stik v drugih regijah.

V drugi fazi, ko celica v hipertoničnih pogojih še naprej izgublja vodo, se celična membrana popolnoma strga s celične stene, se skrči in doseže sferično obliko ter ostane v središču celice.

Ko eksosmoza traja, krčenje celice in citoplazme doseže najnižjo mejo in nadaljnje krčenje prostornine ni mogoče. Glede na končno obliko citoplazme je končna plazmoliza razdeljena na dve vrsti: konkavna plazmoliza in konveksna plazmoliza.

Med konkavno plazmolizo se protoplazma in celična membrana krčita in ločujeta od celične stene zaradi izgube vode. Ko se začne ločevati od celične stene, se protoplazma spremeni v protoplast. Ta postopek se lahko obrne, če celico postavimo v hipotonično raztopino, zaradi katere bo voda spet tekla v celico.

Konveksna plazmoliza nastopi, ko celična membrana in protoplast izgubijo toliko vode, da se popolnoma ločijo od celične stene. Konveksne plazmolize ni mogoče popraviti in vodi do uničenja celic. Takšna rastlina ovne, umre zaradi pomanjkanja vode.

V laboratoriju lahko plazmolizo ponazorimo tako, da damo živo celico v raztopino natrijevega klorida ali raztopino katere druge soli, kjer bo koncentracija vode v celici večja kot zunaj celice. Zato voda potuje iz celice skozi celično membrano do medija zunaj celice. Končno se protoplazma loči od celične stene in prevzame sferično obliko in povzroči plazmolizo.

Ko plazmolizirano celico damo v hipotonično raztopino (raztopina, v kateri je koncentracija topljene snovi nižja od celičnega soka), voda potuje v celico zaradi večje koncentracije vode zunaj celice. Nato celica nabrekne in ponovno dobi svoj turgor. Ta proces obnovitve normalnega turgorja plazmolizirane celice je znan kot **deplazmoliza**.

## VPRAŠANJA

Kaj je difuzija, osmoza, osmolarnost, toničnost, plazmoliza, vodni potencial celice?

---

---

---

---

---

---





## CILJI

- Spoznali boste obnašanje celic v različnih raztopinah z različnim vodnim potencialom.
- Spoznali boste plazmolizo: vrste plazmolize, mejno plazmolizo in deplazmolizo.

## NALOGA

Opazujte in narišite posamezne stopnje plazmolize:

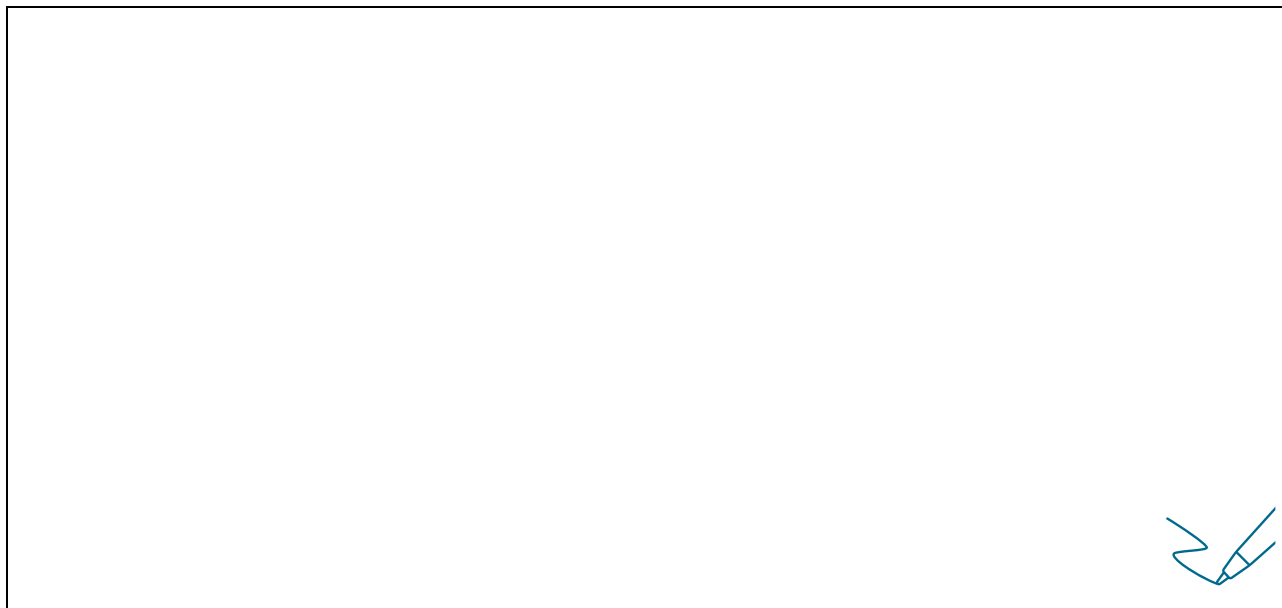
### 1. mejna plazmoliza,



### 2. konkavna plazmoliza (nizka viskoznost protoplazme)



### 3. konveksna plazmoliza (visoka viskoznost protoplazme)



### 4. čepičasta plazmoliza (tonoplast in plazmalema nista enako propustni za ozmotik)



## MATERIAL

Rdeča čebula (*Allium cepa*), mikroskop in pribor za mikroskopiranje, britvica ali skalpel, filtrirni papir.

## KEMIKALIJE

1 M raztopina  $\text{KNO}_3$ , 0,7 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 M raztopina saharoze, 1 M raztopina  $\text{KSCN}$ .

## IZVEDBA

1. V zgornjo stran omesenele listne baze čebule z britvico zarezite približno 5 x 5 mm velik kvadrat. S pinceto previdno oluščite povrhnjico, jo položite na objektno steklo v kapljico izbrane hipertonične raztopine, pokrijte s krovnim steklom in takoj z mikroskopom opazujte spreminjanje protoplasta celice. Opazujte tako dolgo, da se plazmoliza ustali in neha napredovati. Posamezne stopnje plazmolize narišite. Delajte postopno, zato si vedno pripravite samo en preparat, ga opazujte, narišite in šele nato pripravite novega. Pripravili boste štiri preparate:
  - a) Tkivo položite v kapljico hipertonične raztopine  $\text{KNO}_3$  in takoj opazujte spreminjanje protoplasta celice, posamezne stopnje plazmolize narišite.
  - b) Tkivo položite v kapljico hipertonične raztopine  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  in takoj opazujte spreminjanje protoplasta celice, posamezne stopnje plazmolize narišite.
  - c) Tkivo položite v kapljico hipertonične raztopine saharoze in takoj opazujte spreminjanje protoplasta celice, posamezne stopnje plazmolize narišite.
  - d) Tkivo položite v kapljico hipertonične raztopine  $\text{KSCN}$  in takoj opazujte spreminjanje protoplasta celice, posamezne stopnje plazmolize narišite.
2. Ob krovno stekelce, pod katerim je tkivo v eni od zgoraj omenjenih raztopin, dokapajte destilirano vodo in jo s pomočjo filtrirnega papirja povlecite na drugo stran. Opazujte spremembe protoplasta celice in razložite ter definirajte dogajanje.

## REZULTATI IN OPAŽANJA

---

---

---

---

---

---

---

---

13. vaja:

# Merjenje vodnega potenciala z mejno plazmolizo

## UVOD

Večina teorije o plazmolizi, vodnem potencialu ste usvojili na predavanjih. Z odgovori na vprašanja ponovite in razložite teoretične osnove.

## VPRAŠANJA

Kaj je vodni potencial celice?

---

---

---

---

---

---

Kaj je osmotičnost?

---

---

---

---

---

---

---

Kaj je toničnost?

---

---

---

---

---

---

---

Kdaj je celica (ali tkivo) izo-, hipo- ali hipertonična(o) v primerjavi z raztopino, v kateri se nahaja?

---

---

---

---

---

---

---

Kdaj v celici nastopi mejna plazmoliza in kakšen je takrat njen vodni potencial in vodni potencial raztopine, ki jo obdaja?

---

---

---

---

---

---

---

Kako pripravimo različne raztopine plazmolitikov?

---

---

---

---

---

---

---

Katere podatke potrebujemo in kako bi to izračunali?

---

---

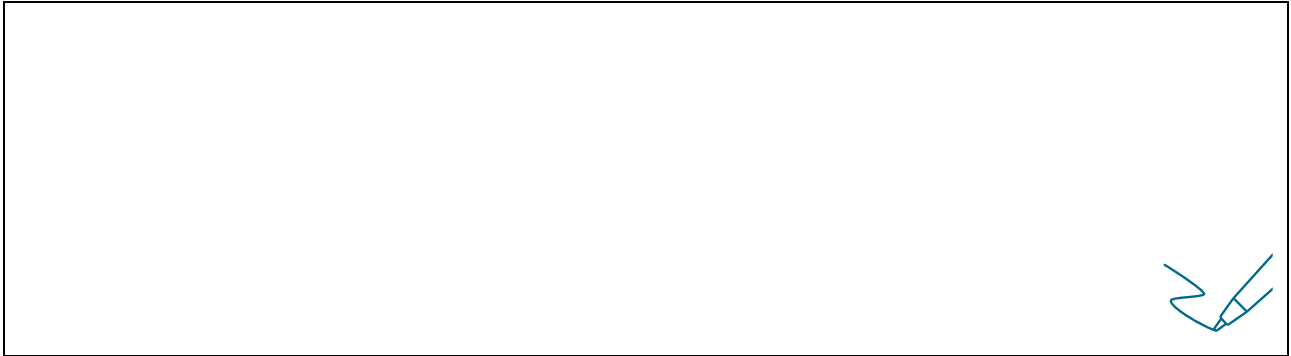
---

---

---

---

---



Kaj je molarnost ali molarna koncentracija?

---

---

---

---

---

---

---

Obstaja več metod, s katerimi ugotavljamo vodni potencial celic ali tkiv. Eden najpogostejših načinov je s pomočjo **mejne plazmolize**. Takrat velja, da je vodni potencial celice ( $\psi_c$ ) enak vodnemu potencialu raztopine ( $\psi_r$ ), v kateri se celica nahaja. V tej točki velja  $\psi$  celice =  $\psi$  raztopine. Raztopina, v kateri se je začela mejna plazmolizo, ima skoraj enak (nekoliko nižji) vodni potencial kot raztopina, ki se nahaja znotraj celice.

## CILJI

- Izmerili boste vodni potencial celice z mejno plazmolizo.



## NALOGA

1. Tkivo luskolista čebule oziroma celice tkiva boste polagali v serijo plazmolitikov z naraščajočo koncentracijo in ugotavljali, v kateri raztopini plazmolitika nastopi mejna plazmoliza! (Mejna plazmoliza nastopi med raztopino, ko protoplast celice začne odstopati od celične stene in med raztopino z nižjo koncentracijo).
2. Na podlagi podatka mejne plazmolize izračunajte vodni potencial raztopine.

## MATERIAL

Rdeča čebula (*Allium cepa*), 12 objektnih in krovnih stekel, britvica ali skalpel, pinceta, krovna stekelca, mikroskop.

## KEMIKALIJE

Raztopine plazmolitika  $\text{KNO}_3$  (ali saharoze): 0,00 M, 0,05 M, 0,10 M, 0,15 M, 0,20 M, 0,25 M, 0,30 M, 0,35 M, 0,40 M, 0,45 M, 0,50 M, 0,60 M.

## IZVEDBA

1. Na posamezno objektno stekelce kanite dve kapljici posamezne raztopine iz serije različnih koncentracij.
2. V vsako položite košček povrhnjice z luskolista čebule in ga prekrije s krovnim stekelcem.
3. S pomočjo mikroskopa opazujte, pri kateri koncentraciji je nastopila mejna plazmoliza. Če je plazmolitik  $\text{KNO}_3$ , takoj opazujemo plazmolizo, če pa je plazmolitik saharoza, opazujemo plazmolizo šele po približno pol ure. (Zakaj?) Raztopina v celici je izotonična nekje med raztopino, pri kateri nastopi mejna plazmoliza, in med raztopino z nižjo koncentracijo. Vodni potencial raztopine izračunajte po enačbi (5):

$$\psi_r = -c \cdot i \cdot R \cdot T \quad (5)$$

$\psi_r$  = vodni potencial raztopine (1 Pa = N m<sup>-2</sup>, N = Newton);

c = molarna koncentracija raztopine (mol l<sup>-1</sup>);

i = izoozmoška konstanta; za saharozo i = 1; za  $\text{KNO}_3$  i = 1.69;

R = splošna plinska konstanta (8,3 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>; J = N m);



# MINERALNA PREHRANA RASTLIN





## 14. vaja:

# Spremljanje simptomov fizioloških motenj ob pomanjkanju določenih hranil

## UVOD

Avtotrofni način prehranjevanja ne obsega samo sinteze ogljikovih hidratov iz  $\text{CO}_2$  in iz  $\text{H}^+$ , katerega donator (darovalec) je voda, ampak vključuje tudi sintezo drugih organskih snovi, za katere so potrebni mineralni elementi, kot so N, S, P, K, Ca ... Nekateri od njih so rastlinam potrebni v velikih količinah ( $>0.1\%$ ), zato jih imenujemo makrohranila (N, O, H, C, P, S, K, Ca, Mg), drugi so potrebni v zelo majhnih količinah ( $<0.1\%$ ), zato jih imenujejo mikrohranila (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, Co).

Pomanjkanje posameznega elementa se kaže v simptomih, ki so bodisi zaostajanje v rasti, rumenenje (kloroza – propad klorofila), rjavenje (nekroza – propad mezofila) ali drugo. Simptomi pomanjkanja elementov, ki se dobro prevajajo po rastlini, se kažejo po celi rastlini (N, P) ali v starejših delih rastlin, kot so starejši listi (K, Mg). Simptomi tistih, ki se slabo prevajajo po rastlini, pa se kažejo predvsem v mladih delih rastlin, kot so poganjki in mladi listi (S, Ca, Fe, B, Mn).

Več o mineralni prehrani boste izvedeli na predavanjih.

## CILJI

- S pomočjo tehnike vodne kulture – hidroponike (rastline rastejo v hranilnih raztopinah z znanimi količinami mineralnih elementov) boste spoznali rast in razvoj rastlin v popolni hranilni raztopini in v hranilnih raztopinah, ki smo ji odvzeli enega ali več elementov in ob tem spremljali (spoznali) simptome ob pomanjkanju določenih hranil

## NALOGA

1. Pripravite posamezne hranilne vodne raztopine.
2. Hranilnim raztopinam izmerite pH in v njih namestite rastline, katerim pred tem izmerite dolžino cele rastline, poganjka in glavne korenine, določite število listov.
3. V času trajanja poskusa (poskus traja dva meseca) vsak teden nadomeščajte izhlapelo vodo oziroma ustrezno hranilno raztopino.
4. Vsakih štirinajst dni opazujte in opišite simptome pomanjkanja, izmerite dolžino cele rastline, poganjka in glavne korenine, določite število listov.
5. Na koncu poskusa izmerite pH hranilne raztopine.

## MATERIAL

Mlade rastline paradižnika, enolitrske kozarce, ovite z aluminijasto folijo, nalepke, svinčnik ali alkoholni flomaster, indikator pH, pokrovi z dvema manjšima in eno večjo odprtino.

## KEMIKALIJE

1 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 M  $\text{KNO}_3$ , 1 M  $\text{MgSO}_4$ , 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , raztopina Na-FeEDTA\*1, 1 M  $\text{NaNO}_3$ , 1 M  $\text{MgCl}_2$ , 1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 M  $\text{CaCl}_2$  1 M  $\text{KCl}$ , raztopina mikroelementov\*2

Priprava raztopin:

\*1 raztopina Na-FeEDTA; 5,57 g  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  v 200 ml deionizirane vode. Nato raztopi 7,45 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  v 200 ml deionizirne vode. Obe raztopini segrevaj in med segrevanjem mešaj, nato ohladi in dopolni do 1000 ml.

\*2 raztopina mikroelementov; 2,86 g  $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 1,81 g  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,11 g  $\text{ZnCl}_2$ , 0,05 g  $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  in 0,025 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  dopolnimo z deionizirano vodo do 1000 ml.

**IZVEDBA**

1. Vsak kozarec napolnite najprej z deionizirano vodo do polovice predvidenega volumna, nato po spodnji preglednici (Preglednica 16) odpipetirajte posamezne ionske raztopine in jih dopolnite z deionizirano vodo do umeritvene oznake. Vsaki raztopini izmerite pH.
2. Kozarec ovijete v aluminijasto folijo in ga opremite z nalepko, na kateri je zapisan manjkajoči element ali kontrolna polna raztopina (komplet) ali deionizirana voda.
3. Rastlinam, ki ste jih izbrali za poskus, iz korenin očistite (sperite s tekočo vodo) zemljo in jim izmerite vse potrebne parametre (Preglednica 17).
4. Vsako od njih vstavite v največjo odprtino pokrova tako, da je na mestu stika s pokrovom ovita (stabilizirana) z vato. Vata naj ostane ves čas trajanja poskusov suha.
5. Z zamaškom zaprite kozarec in ga prenesite poskusni prostor v učilnici. Nivo hranilne raztopine vzdržujte tako, da po potrebi dolijete ustrezno hranilno raztopino. Vsak drugi teden izvedite meritve (Preglednica 17) in opazovanja ter vse zabeležite (Preglednica 17). Pazite, da ob tem ne poškodujete rastlin.

**Preglednica 16: Sestava hranilnih raztopin**

Hranilna raztopina (1M)	ml									
	Komplet	- Ca	- S	- Mg	- K	- N	- P	- Fe	- Mikro- elementi	Deion. H <sub>2</sub> O
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10	-	10	10	10	-	10	10	10	-
KNO <sub>3</sub>	10	10	10	10	-	-	10	10	10	-
MgSO <sub>4</sub>	4	4	-	-	4	4	4	4	4	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	2	2	2	-	2	-	2	2	-
NaFeEDTA	2	2	2	2	2	2	2	-	2	-
Mikroelementi	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-
NaNO <sub>3</sub>	-	20	-	-	10	-	-	-	-	-
MgCl <sub>2</sub>	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
CaCl <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-
KCl	-	-	-	-	-	10	2	-	-	-

## REZULTATI IN OPAŽANJA

Preglednica 17: Hranilna raztopina: \_\_\_\_\_ in opaženi simptomi

Datum	pH hranilne raztopine*	Dolžina poganjka (cm)	Dolžina korenin (cm)	Opaženi simptomi

\*Izmerimo na začetku poskusa in na koncu poskusa.







Preglednica 18: Simptomi pomanjkanja

MAKROELEMENTI			
Elem.	Oblika sprejema	Kje ga najdemo?	Simptomi pomanjkanja?
N	NO <sup>3-</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	proteini, NK, encimi, klorofil, nukleotidi,	
P	PO <sub>4</sub> <sup>3+</sup> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	proteini, NK, GTP, ATP, FAD, NADP, lipidi	
K	K <sup>+</sup>	povezan je s funkcijami membran, kofaktor v fotosintezi in respiraciji, v citoplazmi v ionski obliki, vezan tudi na beljakovine	
S	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	sinteza proteinov (cistein, cistin, metionin), koencim A, - SH skupina v encimih	
Ca	Ca <sup>2+</sup>	v osrednji lameli celične stene (protopektinsko omrežje), vezan je v organelih, v citoplazmi ga je malo	
Mg	Mg <sup>2+</sup>	sprejemnik elektronov v klorofilu – fotosinteza, strukturni gradnik osrednje lamelle, ionska vez med molekulami pektina, povezovanje ribosomskih podenot	
Fe	Fe <sup>3+</sup>	sodeluje v biosintezi klorofila (na koncu ga zamenja Mg) fotosinteza (feredoksin), dihalna veriga (citokrom oksidaza),	

MIKROELEMENTI			
Elem.	Oblika sprejema	Kje ga najdemo?	Simptomi pomanjkanja?
Mn		kofaktor v encimih (fosfataze, avksin oksidaza)	
Cu		kofaktor v encimih (citokrom oksidaza), dihalna veriga (PQ)	
Zn		anaerobna respiracija (alkoholno vrenje), biosinteza triptofana	
Mo		kofaktor v encimih (nitrat reduktaza)	
B		normalna celična delitev meristemov, biosinteza NK	
Co		kofaktor vitamin B12	

# REDUKTIVNI SLADKORJI





15. vaja:

## Kvalitativno določanje redukativnih sladkorjev

### UVOD

Reduktivni sladkorji so aldoze in ketoze s prosto reaktivno -OH skupino, ki ni blokirana z glikozidno vezjo. Reduktivni sladkorji so vsi monosaharidi, kot sta glukoza in fruktoza, in nekateri disaharidi, kot so na primer maltoza, laktoza in celobioza. Saharoza ni redukativni sladkor.

### VPRAŠANJA

Kje v metabolizmu rastlinskih celic nastajajo redukativni sladkorji?

---

---

---

---

---

---

Kje in v kakšni obliki se transportirajo sladkorji po rastlini od mesta nastajanja na mesto porabe in kako poteka transport?

---

---

---

---

---

---

---

---

V kakšni obliki jih rastlina skladišči?

---

---

---

---

---

---

---

---

V katerih celičnih organelih in rastlinskih organih rastline skladiščijo rezervne sladkorje?

---

---

---

---



---

---

V katerem delu leta je največ sladkorjev v založni obliki?

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Kako prehajajo sladkorji skozi celulozno celično steno in plazmalemo?

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## CILJI

- Ugotavljali boste prisotnost redukativnih sladkorjev v listih.
- Seznanili se boste Fehlingovim testom za redukativne sladkorje.

## NALOGA

1. Ugotovite prisotnost redukativnih sladkorjev v ekstraktu listov trave in ekstraktu luskolistov čebule in ju med seboj primerjajte (fotografirajte).

## MATERIAL

Rastlinski material (zelena trava, čebula idr.), voda, terilnica s pestilom, filtrirni papir, lijak, manjša čaša, višja epruveta, gorilnik, oprijemalka.

## KEMIKALIJE

Fehlingov reagent I. ( $3,5 \text{ g CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O} + 100 \text{ ml destilirane H}_2\text{O}$ ) in Fehlingov reagent II. ( $18 \text{ g C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{NaK} + 6 \text{ g NaOH} + 100 \text{ ml destilirane H}_2\text{O}$ ).

## IZVEDBA

Travo in luskoliste čebule, vsakega posebej stremo v terilnici. Dodamo nekaj ml vode in ekstrakt prefiltriramo.

Fehlingov test: V epruveto nalijemo približno 2 ml ekstrakta (2 prsta) in dodamo najprej 1 ml Fehlingovega reagenta I. (1/2 prsta), nato pa enako količino Fehlingovega reagenta II. in segrevamo nad plamenom do nastanka oborine.





## 16. vaja:

# Kvantitativna ocena reduktivnih sladkorjev

## UVOD

Alternativa Nelson-Somogyijeve metodi za kvantitativno oceno reduktivnih sladkorjev je metoda z reagentom DNS (dinitrosalicilne kisline). Je preprosta, občutljiva in sprejemljiva ter primerna za obdelavo večjega števila vzorcev v danem času (Sadasivam & Manickam, 2007, str. 6).

## CILJI

- Določili boste količino reduktivnih sladkorjev, prisotnih v vašem izbranem vzorcu, s pomočjo umeritvene krivulje in z uporabo standardnega grafa.

## MATERIAL

Spektrofotometer (SpectroVis Plus), program LoggerPro3, računalnik, kivete, vata, puhalka z destilirano vodo, 1000-ml čaša za odpadno tekočino, epruvete, stojalo za epruvete, pipete, tipsi, erlenmajerice s pokrovčki, čaše, lij, filtrirni papir, terilnica s pestilom, nož, podlaga za rezanje, vodna kopel (100-ml čaša, napolnjena z vodo do oznake 500 ml), kuhalnik, analitska tehtnica, steklene palčke, dozirne žličke, papirnate brisače, alkoholni flomaster; rastlinski material (npr. kalčki semen, plodovi dreves, gomolji ...).

## KEMIKALIJE

Destilirana voda ( $H_2O$ ), glukoza v prahu ( $C_6H_{12}O_6$ ), fruktoza v prahu ( $C_6H_{12}O_6$ ), 3,5-dinitrosalicilna kislina ( $C_7H_4N_2O_7$ ), natrijev hidroksid ( $NaOH$ ), kristalni fenol ( $C_6H_5OH$ ), natrijev sulfit ( $Na_2O_3S$ ), kalij-natrijev tartrat ( $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ ).

### Priprava DNS reagenta (reagenta iz 3,5-dinitrosalicilne kisline)

V prvo 50-ml čašo natehtamo 1 g 3,5-dinitrosalicilne kisline, v drugo 200 mg kristalnega fenola in v tretjo 50 mg natrijevega sulfita. Z alkoholnim flomastrom na čaše napišemo njihovo vsebino. V 100-ml čašo natehtamo 1 g natrijevega hidroksida in dopolnimo z destilirano vodo do oznake 100 ml. Dobro premešamo. Tako dobimo 1 % raztopino  $NaOH$ . Nekaj te raztopine vlijemo v čaše, v katere smo prej natehtali kemikalije in dobro premešamo. Raztopine iz vseh treh čaš vlijemo v 100-ml bučko. Vse tri čaše operemo z 1 % raztopino  $NaOH$  in vse skupaj prelijemo v 100-ml bučko. Preostanek 1 % raztopine  $NaOH$  prelijemo v 100-ml bučko. Bučko označimo z nalepko, na katero napišemo DNS reagent in datum. Raztopino hranimo pri temperaturi 4 °C. V primeru daljšega hranjenja raztopine lahko natrijev sulfit dodamo, ko bomo raztopino uporabili, saj natrijev sulfit poslabša kakovost reagenta ob dolgem hranjenju (Preglednica 18).

**40-% raztopino Rochellejeve soli (kalij-natrijevega tartrata) pripravimo** tako, da v 50-ml čašo natehtamo 20 g kalij-natrijevega tartrata, dopolnimo z destilirano vodo do oznake 50 ml in dobro premešamo. Raztopino hranimo v 5-ml bučki, ki jo označimo z nalepko, na katero napišemo 40-% Rochellejeva sol in datum (Preglednica 19).

**Preglednica 19: Priprava DNS reagenta**

Kemikalije		Količina
1-% raztopina $NaOH$	natrijev hidroksid	1 g
	destilirana voda	do oznake 100 ml
dinitrosalicilna kislina		1 g
kristalni fenol		200 mg
natrijev sulfit		50 mg
40-% raztopina Rochellejeve soli	kalij-natrijev tartrat	20 g
	destilirana voda	do oznake 50 ml

## NALOGA

1. Pripravite standardne raztopine za glukozo in nato različne koncentracije le-te.
2. Na podlagi izmerjenih absorbanč posameznih koncentracij glukoze narišite umeritveno krivuljo za glukozo.
3. Na podlagi izmerjenih absorbanč ekstraktov izbranih vzorcev iz umeritvene krivulje določite količino glukoze.
4. Pripravite standardne raztopine za fruktozo in nato različne koncentracije le-te.
5. Na podlagi izmerjenih absorbanč posameznih koncentracij fruktoze narišite umeritveno krivuljo za fruktozo.
6. Na podlagi izmerjenih absorbanč ekstraktov izbranih vzorcev iz umeritvene krivulje določite količino fruktoze.

## IZVEDBA

### Priprava umeritvene krivulje

#### Osnovna standardna raztopina glukoze (1 mg ml<sup>-1</sup>)

V 100-ml merilno bučko natehtajte 100 mg glukoze in z destilirano vodo dopolnite do oznake 100 ml ter dobro premešajte.

#### Osnovna standardna raztopina fruktoze (1 mg ml<sup>-1</sup>)

V 100-ml merilno bučko natehtajte 100 mg fruktoze in z destilirano vodo dopolnite do oznake 100 ml ter dobro premešajte.

### Priprava standardnih raztopin glukoze

Pripravite 8 erlenmajeric z volumnom 50 ml in jih označite s črkami od Ag do Hg. V vsako erlenmajerico odpipetirajte ustrezen volumen osnovne standardne raztopine glukoze, in sicer 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0 14,0 in 16,0 ml. Vse erlenmajerice dopolnite z destilirano vodo do oznake 50 ml in dobro pretresite (Preglednica 20).

Tako boste dobili standardne raztopine glukoze z masnimi koncentracijami 0,04 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,12 mg ml<sup>-1</sup>, 0,16 mg ml<sup>-1</sup>, 0,20 mg ml<sup>-1</sup>, 0,24 mg ml<sup>-1</sup>, 0,28 mg ml<sup>-1</sup> in 0,32 mg ml<sup>-1</sup> (Preglednica 20).





## Priprava raztopin fruktoze za merjenje s spektrofotometrom

V slepo epruveto nalijte 3 ml destilirane vode in 3 ml DNS reagenta. V ostale epruvete (označite s številkami od 1f do 8f) dodajte 3 ml ustrezne standardne raztopine fruktoze in 3 ml DNS reagenta. Vse epruvete dajte za 5 min v vrelo vodno kopel, nato pa jih ohladite, da so še vedno tople, ter dodajte v vsako po 1 ml Rochellejeve soli. Epruvete dobro pretresite. V vse epruvete dodajte tudi 3 ml destilirane vode, jih pretresite in ohladite na sobno temperaturo (Preglednica 23).

**Preglednica 23: Priprava raztopin fruktoze za merjenje absorbance**

Epruveta	Slepa f	1f	2f	3f	4f	5f	6f	7f	8f
Standardna raztopina fruktoze (merilna bučka)	/	A	B	C	D	E	F	G	H
Standardna raztopina fruktoze (ml)	0,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
DNS reagent (ml)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Destilirana voda (ml)	6,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Raztopina Rochellejeve soli (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

## Merjenje absorbance (A) raztopinam glukoze in fruktoze

S spektrofotometrom izmerite absorbanco raztopine v vsaki epruveti posebej pri valovni dolžini 512 nm ( $A_{512}$ ).

Nato pripravite umeritveno krivuljo – glukozno specifično absorbanco v odvisnosti od koncentracije glukoze in fruktozno specifično absorbanco v odvisnosti od koncentracije fruktoze. Na podlagi rezultatov narišite umeritveno krivuljo (Preglednica 24 in Preglednica 25).

## Priprava ekstrakta (vzorcev) iz preiskovanega rastlinskega materiala

Natehtajte 0,5 g rastlinskega materiala (trave, čebule ...) in jo ob dodajanju destilirane vode strite v terilnici. Ekstrakt prefiltrirajte v čašo in filtrat dopolnite z destilirano vodo do oznake 50 ml.

## Merjenje absorbance rastlinskih vzorcev

V epruveto odpipetirajte 3 ml ekstrakta rastlinskega materiala (vzorca) in dodajte 3 ml DNS reagenta. Epruveto 5 min segrevajte v vreli vodni kopeli in jo nato ohladite pod tekočo vodo tako, da je še vedno topla. Dodajte 1 ml Rochellejeve soli in dobro pretresite. Dodajte tudi 3 ml destilirane vode in epruveto pretresite. Epruveto ohladite na sobno temperaturo in izmerite absorbanco pri valovni dolžini 512 nm ( $A_{512}$ ) in zabeležite (Preglednica 26 in Preglednica 27).



Preglednica 26: Absorbance (optične gostote) posameznih vzorcev za določitev glukoze

Vzorec	Absorbanca (A)				Glukozno specifična A ( $\bar{A}-A$ slepa)
	1. meritev	2. meritev	3. meritev	Povprečna absorbanca ( $\bar{A}$ )	

Preglednica 27: Absorbance (optične gostote) posameznih vzorcev za določitev fruktoze

Vzorec	Absorbanca (A)				Fruktozno specifična A ( $\bar{A}-A$ slepa)
	1. meritev	2. meritev	3. meritev	Povprečna absorbanca ( $\bar{A}$ )	

**Račun:**

Izračunajte količino redukativnih sladkorjev, prisotnih v vzorcu, z uporabo standardnega grafa.

---



---



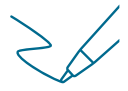
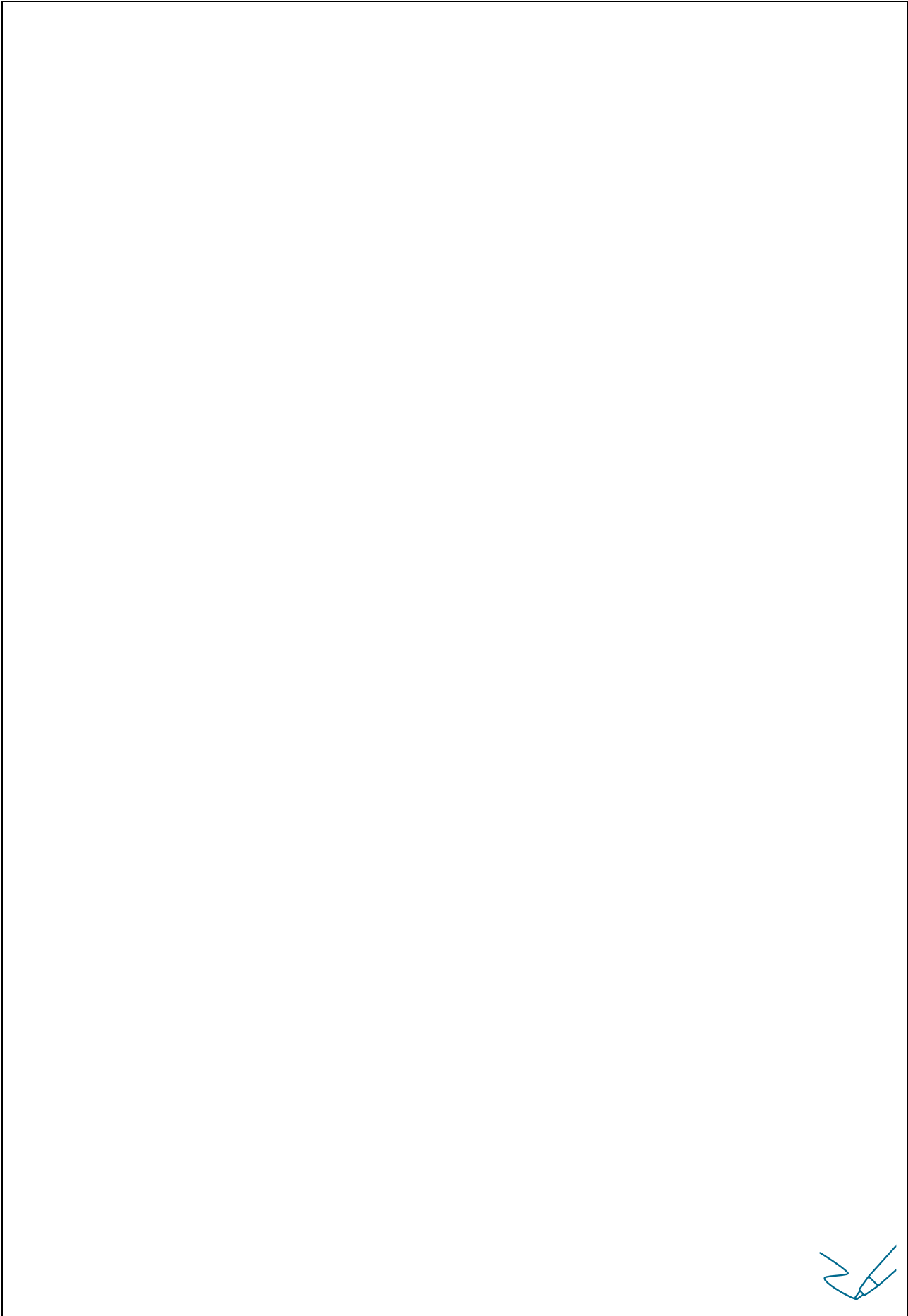
---



---



---



# BIOTESTI





17. vaja:

## *Triticum* test za določanje hormonov – citokininov

### UVOD

Bioteste lahko uporabimo za določanje rastlinskih hormonov ali njim podobnih substanc. Rastlinski hormoni so naravni rastlinski rastni regulatorji (RRR). Tako naravni RRR kot tudi sintetični RRR, v majhnih količinah kvalitativno ali kvantitativno vplivajo na rast.

Rastlinski hormoni so skupina organskih snovi in so najpomembnejši notranji regulatorji rasti in razvoja. Gre za organske molekule, ki so v rastlinah v zelo majhnih koncentracijah in ne služijo kot hranila. Sintetizirajo se v določenih delih rastline, se po njej premeščajo in v tarčnih celicah, tkivih, sprožijo odzive celic (Vodnik, 2012).

Za kvantitativno merjenje vsebnosti rastlinskih hormonov uporabljajo dve prevladujoči metodi: Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC – angl. high performance liquid chromatography) in plinska kromatografija (GC – angl. gas chromatography), ki ji v nadaljevanju sledi tudi masna spektrometrija (MS – angl. mass spectrometry). Obe metodi sta natančni, a zapleteni in dragi.

Obstajajo tudi klasični načini določanja rastlinskih hormonov in njim podobnih substanc, in sicer z biotesti, ki vključujejo uporabo rastlinskega materiala za določanje rastlinskim hormonom podobnih substanc (Vodnik, 2012).

Biotest (biološki test) je sistem testiranja, pri katerem zaznamo specifičen odziv, ki se pridobi s pomočjo testiranja na živih organizmi ali njihovih delih. Z biotesti določamo prisotnost ali koncentracijo določene kemične substance (Yopp, 1990).

Biotesti temeljijo na uporabi bioloških odzivov kot sistema za odkrivanje biološko aktivnih snovi (npr. rastlinskih hormonov). V najenostavnejši obliki jih uporabljamo za analizo prisotnosti (in koncentracije) določene snovi v primerjavi z znano količino iste snovi.

Eden od standardiziranih biotestov za določanje vsebnosti citokininov je pšenični (*Triticum*) biotest. Z njim lahko ugotavljamo vsebnost citokininina 6-benzilaminopurinu (BAP) podobnih substanc. Citokinini ob ostalih dejavnikih (svetloba, hranila, razvojni stadij) regulirajo tudi razvoj kloroplastov. Če etiolirane rastline pred izpostavitvijo svetlobi tretiramo s citokinini, se kloroplasti, klorofili in fotosintetski proteini v takšni rastlini razvijejo prej, kot brez dodatka citokininov (Vodnik, 2012).

Pšenični biotest temelji na citokininskem zaviranju razpada kloroplastov. Iz ekstraktov klorofila – segmentov prvih listov pšenice, ki so izpostavljeni različnim koncentracijam hormona BAP ali ekstraktom iz preiskovanih rastlin (vzorcev) s pomočjo spektrofotometra izmerimo absorbanco.

## CILJI

- Določiti količino citokininov v izbrani preiskovani rastlini s pomočjo *Triticum* biotesta.

## NALOGA

1. Pripravite kalice pšenice. Semena kalite na svetlobi 7–10 dni, da kalice dosežejo velikost 10–13 cm.
2. Pripravite znane koncentracije citokininskih raztopin za umeritveno krivuljo.
3. Določite vsebnost citokininu BAP podobnega hormona v izbrani preiskovani rastlini.



## MATERIAL

Skalpel, ravnilo, epruvete, stojalo za epruvete in gumice.

## KEMIKALIJE

Citokinin BAP (6-benzilaminopurina), seme pšenice za pripravo kalic, rastlinski material za preiskavo.

## IZVEDBA

### Priprava kalic

Testni material – kalice pripravite iz semena pšenice. Semena pšenice 5 minut namakajte v 2-% natrijevem hipokloritu. Nato jih 2 uri spirajte pod tekočo vodo.

Seme pšenice nato dajte v kadico, ki jo prej jo očistite in razkužite z natrijevim hipokloritom ali etanolom in vanjo pripravite z vodo omočen perlit. Razkužite si roke in sprana semena posadite 1 cm globoko v vlažen perlit (ali položite semena na predvideno podlago perlita in jih prekrijete z vlažnim perlitom do višine enega cm). Semena naj kalijo 1 teden na svetlobi.

### Priprava vodnega ekstrakta preiskovanega rastlinskega materiala

Ekstrakt preiskovane rastline pripravite tako, da stehtan rastlinski material posušite v liofilizatorju (-50 °C) in ga nato s pomočjo pestila v terilnici zdrobite v prah. Znano količino zdrobljenega materiala ekstrahirate v znanem volumnu vode (50 ali 100 ml) z dodatkom nekaj kapljic alkohola za boljšo topljivost – ekstrakcijo.

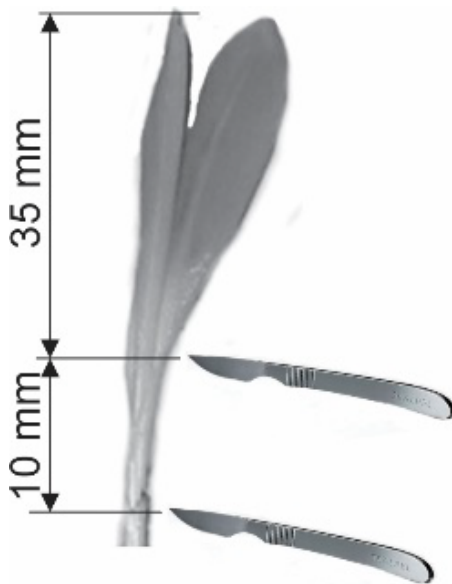
### Priprava biotesta

Po enem tednu liste kalic pšenice odrežite 35 mm pod apikalnim meristemom v 10 mm dolge segmente (Slika 7).

Biotest vzorca (preiskovane rastline) **delajte sočasno** s testom za umeritveno krivuljo! Pripravite po štiri vzporedne teste (4 epruvete) za vsako znano koncentracijo BAP (0, 0,3, 0,5, 1, 3, 10) mg l<sup>-1</sup> in prav tako tri vzporedne teste za vsak ekstrakt naše preiskovane rastline.

V epruveto nalijte 5 ml določene koncentracije in prav tako 5 ml ekstrakta naše preiskovane rastline in v vsako epruveto dajte po deset 10-mm segmentov.

Epruvete pokrijte, da preprečite izhlapevanje, in jih za 4 dni postavite na popolnoma temno mesto.



Slika 7: Priprava segmentov iz kalic pšenice za obravnave v biotestu

### Priprava ekstraktov za meritev absorbance

Po štirih dnevih iz epruvet s segmenti listov pšenice, odpipetirate (odlijete) hormonske raztopine in ekstraktov preiskovane rastline. V vsako epruveto, na pšenične listne segmente nalijte 8 ml 80 % etanola in pokrijte, da preprečite izhlapevanje. Nato epruvete segrevajte v vodni kopeli na temperaturi 80–90 °C.

Po segrevanju dolijte etanol do oznake 10 ml in epruvete ohladite na sobno temperaturo. Začnite z meritvijo absorbance pri 645 nm. Rezultate meritev znanih koncentracij BAP in vzorcev zapišite v preglednico (Preglednica 28 in Preglednico 29) in izračunajte povprečje.

Na podlagi izmerjenih absorbanc znanih koncentracij BAP narišite umeritveno krivuljo in iz nje odčitajte (izračunajte) koncentracijo hormona v vzorcu (Preglednica 28 in Preglednico 29).





## 18. vaja:

# *Mungo* test za določanje hormonov – avksinov

## UVOD

Test mungo (Mungo) temelji na koreninjenju kalic mungo fižola (*Vigna radiata*). Gre za relativno enostaven biotest (Hess, 1961), ki ne zahteva drage opreme in je dokaj neobčutljiv na prisotnost inhibitorjev. (glejte tudi uvod 17. vaje).

## CILJI

- Določiti količino avksinov v izbrani preiskovani rastlini s pomočjo *Mungo* (*Vigna*) biotesta.

## NALOGA

- 1) Pripravite kalice fižola mungo. Semena kalite na svetlobi 7–10 dni, da kalice dosežejo velikost 10–13 cm.
- 2) Pripravite znane koncentracije avksinskih raztopin za umeritveno krivuljo.
- 3) Določite vsebnost avksinu IBA podobnega hormona v izbrani opazovani rastlini.

## MATERIAL

Rastno komoro ali rastlinjak, vir svetlobe, plastične pladnje, steklene vialo (25 mm x 90 mm).

## KEMIKALIJE

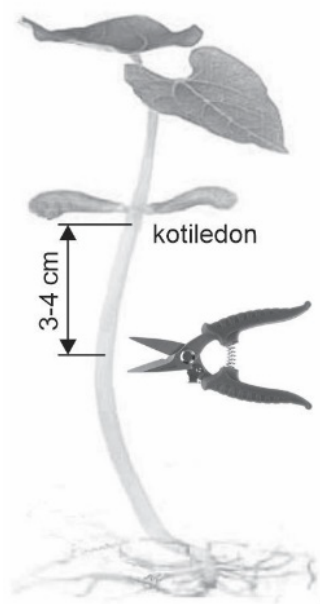
sterilni perlit ali vermikulit, raztopino natrijevega hipoklorita (NaOCl, 0,33 %), auxin IBA (indol-butanojska kislina), seme fižola mungo, rastlinski material za raziskavo.

## IZVEDBA

### Priprava kalic

Seme fižola mungo (*Vigna radiata*) namočite za 4 minute v 0,33 % raztopino natrijevega hipoklorita in jih po sterilizaciji čez noč spirajte pod majhnim curkom tekoče vode. Tako pripravljena imbibirana semena posadite v navlažen perlit (vermit) v plastične kadičke. Pladnje prenesite na svetlobo v rastno komoro, ali na svetlo in toplo mesto, dokler niso velike 10–13 cm. Kalice so pripravljene za poskuse po 7 do 10 dneh.

Ko so kalice primerno velike, jih nežno izpulite iz zemlje in vsaki posebej s čistim skalpelom ali britvico odrežite steblo s koreninami, na razdalji približno 3 cm pod kotiledonoma (Slika 8).



Slika 8: Priprava kalice fižola za obravnave v biotestu

## Priprava vodnega ekstrakta preiskovanega rastlinskega materiala

Ekstrakt preizkovanega rastline pripravite tako, da stehtan rastlinski material posušite v liofilizatorju ( $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in ga nato s pomočjo pestila v terilnici zdrobite v prah. Znano količino zdrobljenega materiala ekstrahirate v znanem volumnu vode (50 ali 100 ml) z dodatkom nekaj kapljic alkohola za boljšo topljivost – ekstrakcijo.

## Priprava biotesta

Pripravite ustrezen volumen različnih koncentracij rastnega regulatorja IBA. Pripravite naslednje koncentracije IBA: (0, 0,3, 0,5, 1, 3, 10)  $\text{mg l}^{-1}$ . Štiri nizke epruvete (višine 5-10 cm) napolnite s po 10 ml posamezne koncentracije IBA.

Na posamezne epruvete zapišite točen datum začetka biotesta, in koncentracijo hormona oziroma vrsto preiskovanega rastlinskega ekstrakta (vzorca). Vsako epruveto napolnite s štirimi kalicami fižola. Fižolove kalice pustite v posameznih raztopinah različnih koncentracij IBA približno 24 ur. Po 24 urah zamenjate raztopine IBA z 10 ml destilirane vode. Biotest traja 7 dni. V tem času v epruvete dodajate manjkajočo vodo. Po 7 dneh se biotest zaključi. Kalice vzamete iz eksperimentalnih raztopin in preštete nastale korenine, ki so večje kot 1 mm. Rezultate zberite v Excelovi preglednici.

Število korenin je neposredno sorazmerno s koncentracijo auksina znotraj območja testa.

Pri vsaki koncentraciji izračunajte povprečno število korenin, standardno deviacijo (SD) in standardno napako (SE).

Iz dobljenih povprečnih vrednosti števila korenin za vse znane koncentracije IBA pripravite umeritveno krivuljo (graf), na osnovi katere boste določili vsebnost IBA oziroma ostalih avksinov v vaših preiskovanih rastlinah (vzorcih).

Biotest vzorca **delajte sočasno** s testom za umeritveno krivuljo! Biotest vzorcev pripravite po enakem postopku kot umeritveno krivuljo. Razlika je samo v tem, da namesto znane koncentracije vodne raztopine avksina v epruveto s fižolovimi rastlinami dodate znano količino vodnega ekstrakta vašega rastlinskega vzorca, za katerega nas zanima vsebnost rastlinskih hormonov – avksinov. Po sedmih dneh kalice vzamete iz eksperimentalnih raztopin in preštete nastale korenine, ki so večje kot 1 mm. Izračunajte povprečno število korenin, SD in SE. Iz prej pripravljene umeritvene krivulje odčitajte (določite) količino avksinov v vaših vzorcih.





# ZAKLJUČEK





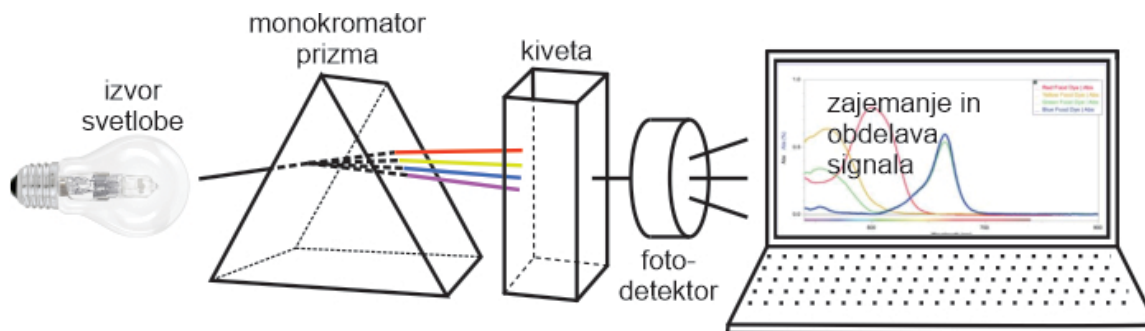
## Dodatek: Spektrofotometrija

Absorpcijska spektrofotometrija je metoda za merjenje količine svetlobe, ki jo absorbira vzorec pri določeni valovni dolžini. Metoda omogoča tudi določanje koncentracije snovi v vzorcu, ki se nahaja v kiveti z določeno dolžino ( $l$ ), in sicer s primerjanjem z določenim standardom. Najuporabnejša meritev svetlobe je absorbanca ( $A$  – optična gostota), imenovana tudi optična gostota. Definirana je kot  $A = \log I_0 / I$ , pri čemer je  $I_0$  intenziteta vpadne svetlobe, ki pade na vzorec, in  $I$  intenziteta prepuščene svetlobe.

Absorpcijo svetlobe prikažemo grafično tako, da na valovno dolžino ( $\lambda$ ) nanašamo na absciso – neodvisna spremenljivka; - absorbanco ( $A$ ) pa na ordinato – odvisna spremenljivka. Graf, ki ga dobimo, imenujemo absorpcijski spekter in pokaže tiste valovne dolžine, ki jih vzorec (pri nas barvila) najbolj absorbirajo.

Absorbanco (optično gostoto) merimo s spektrofotometrom in metodo imenujemo absorpcijska spektrofotometrija. Delovanje spektrofotometra prikazuje Slika 9.

Napravo sestavlja vir svetlobe, monokromator z mehanizmom (to je lahko prizma), s katerim izbiramo valovno dolžino, nosilec za vzorec v stekleni kiveti, fotodetektor in snemalnik ali računalnik. Valovno dolžino svetlobe spreminjamo z rotiranjem prizme v monokromatorju. Svetloba prehaja skozi monokromator, ki razcepi polikromatsko svetlobo na več valovnih dolžin, od katerih samo ena monokromatska svetloba prehaja skozi vzorec v kiveti na fotodetektor.



Slika 9: Shematska zgradba spektrofotometra

Optična gostota ( $A$  – absorbanca) vzorca je povezana s koncentracijo po Beerovem zakonu:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (6)$$

Pri tem je  $c$  – koncentracija, običajno merjena v molih na liter,  $l$  – dolžina svetlobne poti (kivete), običajno 1 cm, in  $\epsilon$  – konstanta, imenovana molarni ekstincijski koeficient z enoto liter na mol na centimeter ( $l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Običajni  $\epsilon$  za klorofil je  $100.000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## Izbrane osnove kemijske stahiometrije

### Odstotna koncentracija

Ločimo masne in volumske odstotke. Če v besedilu ni navedeno, za katere gre, pomeni, da so mišljeni masni odstotki.

Koncentracija masnih odstotkov je izražena v gramih topjenca na 100 g raztopine.

Koncentracija volumskih odstotkov je izražena v volumskih delih snovi v 100 volumskih delih raztopine.

### Molarna koncentracija

Koncentracija je izražena s številom gram molekul (molv) raztopljene snovi v 1000 ml (1 liter) raztopine ( $\text{mol l}^{-1}$ ). Molekulska masa v gramih (g) izračunamo iz relativnih molekulski mas,  $M_r$ , posameznih elementov. Najdemo jih v priročnikih, napisane pa so tudi na embalaži vseh izvorno zapakiranih kemikalij. V uporabi so tudi drugi simboli za izražanje molarosti ( $\text{mol l}^{-1} = \text{M}$ ) in milimolarosti ( $\text{mmol l}^{-1} = \text{mM}$ ) in mikromolarosti ( $\mu\text{mol l}^{-1} = \mu\text{M}$ ).

### Masna koncentracija

Koncentracija je izražena z maso raztopljene snovi v določenem volumnu raztopine, kot na primer v miligramih na liter ( $\text{mg l}^{-1}$ ).

**Pretvorbe enot**

$$1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{l} = 1000 \text{ nl} = 1 \times 10^{-6} \text{ pl}$$

$$1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml} = 10^{-3} \mu\text{l} = 1000 \mu\text{l}$$

$$1 \mu\text{m}^3 = 10^{-9} \text{ mm}^3 = 10^{-9} \mu\text{l} = 10^{-6} \text{ nl} = 10^{-3} \text{ pl}$$

## Literatura

- Bidwell R. G. S., 1974. *Plant physiology*. Macmillan publishing, New York.
- Gabrovšek K., Gogala N. 1991. Navodila za vaje iz fiziologije rastlin, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Ljubljana.
- Gros N., Harrison T., Štrumbelj Drusany I., Kapun Dolinar A. 2010. *Science In School*. Prevezeto 30. marec 2011 iz Spektrometrija v šoli: eksperimenti z izkustvenim pristopom:  
<http://www.scienceinschool.org/2010/issue14/spectrometer/slovene>
- Greulach V. A., 1973. *Plant physiology*. Macmillan publishing, New York.
- Hess C. E., 1961. The mung bean bioassay for detection of root promoting substances. – *Plant Physiology* 36(I): Suppl. 21.
- Kühnle J.A., Fuller G., Corse J. and Mackey B.E. 1977. Antisenescent activity of natural cytokinins. *Physiol. Plant.*, 41: 14–21.
- Krajncič B. 1993. *Fiziologija in biokemija rastlinskih hormonov*. Fakulteta za kmetijstvo, Maribor.
- Kutschera U. 1998. *Grundpraktikum zur Pflanzenphysiologie*. Quelle & Meyer Verlag Wiesbaden.
- Likar M., Regvar M. 2003. *Praktikum fiziologije rastlin*. Scripta, Študentska založba, Ljubljana.
- Likar M., Vogel-Mikuš K. 2011. Navodila za laboratorijske vaje pri predmetu Fiziologija rastlin za študente biologije. pč. <https://issuu.com/plantbiol/docs/collectanea>, sep 2017.
- Mohr H., Schopfer P. 1995. *Plant physiology*. Springer-Verlag.
- Sadasivam S., Manickam A. 2007. *Biochemical Methods*. Prevezeto 30. marec 2011 iz *New Age International*:  
<http://www.newagepublishers.com/samplechapter/000091.pdf>
- Salisbury F.B., Ross C.W. 1991. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company Belmont, California.
- Sitte P., Weiler E.W., Kadereit J.W., Bresinsky A., Körner C. 2002. *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. Begründet von Strasburger E., Noll F., Schenck H., Schimper. Spectrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- Stušek P., Podobnik A., Gogala N. 1997. *Celica*. DZS Ljubljana.
- Šarič M. R., *Fiziologija biljaka*. 1974. Naučna knjiga, Beograd.
- Taiz L., Zeiger E., Moller IM., Murphy A. 2018. *Plant Physiology and Development*. Sinauer Associates, Oxford University Press, New York, United States of America.
- Yopp J.H. 1990. Bioassays for plant hormones and other naturally occurring plant growth regulators. In: Mandava, N.B. (ed.): *CRC Handbook of Natural Pesticides: Methods*. Vol. 1. Theory, Practice, and Detection. CRC Press (Boca Raton, Ann Arbor, Boston), 329–477.
- Vinković Vrček., Loretić. 2010. *Aditivi u hrani*. Vodič kroz E-brojeve. Zagreb. Školska knjiga.
- Vodnik, D. 2012. *Osnove fiziologije rastlin*. Ljubljana: Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta





# FIZIOLOGIJA RASTLIN

## PRIROČNIK Z NAVODILI ZA VAJE

JANA AMBROŽIČ-DOLINŠEK, TEREZIJA CIRINGER

Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Maribor, Slovenija  
jana.ambrozic@um.si, terezija.ciringer@um.si

**Povzetek** Priročnik je namenjen študentom na študijskih programih s področja biologije, ekologije z naravovarstvom in bodočim učiteljem biologije, ki bi se radi spoznali z eksperimentalnim delom s področja fiziologiji rastlin. Sestavlja ga osem vsebinskih sklopov, ki obravnavajo rastlinske pigmente, dihanje rastlin in fotosintezo, encimsko aktivnost rastlin, uravnavanje vodnih razmer v rastlinah, plazmolizo, mineralno prehrano rastlin s prepoznavanjem simptomov pomanjkanja posameznih hranil, metode določanja vsebnosti sladkorjev in bioteste za rastlinske hormone. Vsaka od vaj se začne z vsebinskim uvodom ter nadaljuje s cilji, nalogami, materiali in potekom izvedbe vaje. Vaje so podprte s slikami posameznih poskusov, preglednicami, kemijskimi formulami za preračune posameznih fizioloških parametrov in navodili za delo s kemikalijami in opremo.

**Ključne besede:**

eksperimentalne vaje,  
priročnik,  
fiziologija rastlin,  
biologija rastlin,  
laboratorijske  
aparature in postopki,  
laboratorijske rastline



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kmetijstvo  
in biosistemske vede

