

**Praktická úloha č. 2****Téma: Anatómia a fyziológia rastlín – fotomorfogenéza**

Pred vypracovaním úlohy si prosím skontrolujte, že na pracovnom stole máte: misky s rastlinným materiálom označené A a B, žiletku, pinzetu podložné a krycie sklíčko, stričku s vodou, stojan so 4 skúmavkami označenými 0-XX, 3-XX, 6-XX, 9-XX (XX je súťažné číslo) a 4 prázdny skúmavkami, papierik s hmotnosťou skúmaviek, automatickú pipetu, špičky, kyvetu a rukavice. Ak Vám niečo z toho chýba, kontaktujte dozor. **Všetky strany zadania a milimetrový papier označte Vaším súťažným číslom.**

Rastliny dokážu zaznamenať rozličné signály z prostredia. Rápídne reagujú zmenou génovej expresie, metabolizmu či dokonca morfológie na zmeny podmienok prostredia. Práve vďaka tomu sa dokážu vysporiadať so stresom a prispôbiť svoj rast a vývin aktuálnym podmienkam. Významným signálom vo vývine a fyziológii rastliny je svetlo. Vnímanie svetla začína už počas vývinu semena. Pri klíčení spustí rastlina vývinový program v závislosti na prítomnosti, resp. neprítomnosti svetla. Práve tento proces bude centrálnou témou dnešnej praktickej úlohy.

Hlavným modelovým organizmom rastlinnej fyziológie a vývinovej biológie je arábkovka Thalova (*Arabidopsis thaliana*) z čeľade kapustovité (*Brassicaceae*). Dnes budete pracovať s horčicou bielou (*Sinapis alba*) pochádzajúcou z rovnakej čeľade, na ktorej výskum fotomorfogenézy začínal.

V závislosti na prítomnosti svetla vstupuje rastlina po klíčení do jedného z dvoch vývinových programov. Vývinovému programu v tme hovoríme skotomorfogenéza a svetelnému vývinovému programu hovoríme fotomorfogenéza. Rastliny v skotomorfogenetickom a fotomorfogenetickom programe sa navzájom morfológicky a fyziologicky výrazne líšia.

Na pracovnom mieste máte Petriho misky označené písmenami A, B. V miske A sú klíčiky horčice bielej, ktoré klíčili v tme a v miske B sú klíčiky horčice bielej, ktoré klíčili za svetla.

**Úloha 1:** Z nasledujúcich možností vyberte znaky, ktoré sú charakteristické pre fotomorfogenézu, skotomorfogenézu alebo sa vyskytujú u oboch vývinových programov. Výber označte krížikom v tabuľke.

Znak	Fotomorfogenéza	Skotomorfogenéza	Oba vývinové programy
Zelené sfarbenie klíčnych listov			
Apikálny háčik (Apical hook)			
Predĺžený hypokotyl			
Primárny koreň			

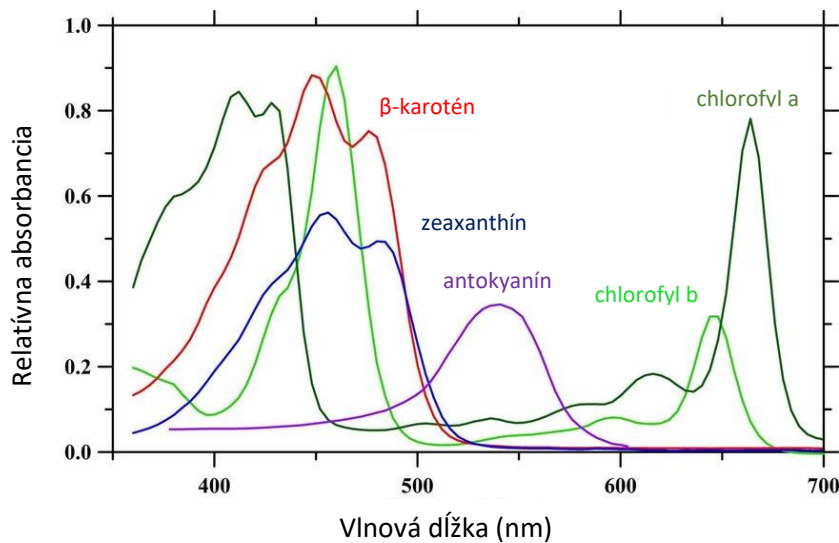
Jedným z charakteristických znakov fotomorfogenézy u horčice bielej (a aj ďalších rastlinných druhov) je akumulácia antokyánov v hypokotyle a klíčnych listoch. Antokyány sú vo vode rozpustné pigmenty, ktoré sa akumulujú špecificky v určitých pletivách. Proces je regulovaný signálmi z prostredia, napríklad svetlom, teplotou či stresom. Keďže akumulácia antokyánov býva pletivovo špecifická, je

zaujímavé preskúmať ju v kľúčnych listoch horčice bielej. Domnievame sa, že by antokyány mohli byť prítomné v spodnej pokožke kľúčnych listov. Na ich prítomnosť ukazuje fialové sfarbenie.

Zhotovte preparát pokožky kľúčneho listu rastliny horčice bielej, ktorá kľúčila na svetle. Žiletkou opatrne urobte šikmý zárez do listu a pomocou pinzety sa pokúste oddeliť spodnú pokožku. Pokožku opatrne preneste do kvapky vody na podložné sklíčko, prikryte krycím sklíčkom a pozorujte mikroskopom.

**Úloha 2:** Zakreslite pokožkový preparát kľúčneho listu horčice bielej. Popíšte všetky zakreslené štruktúry a vyšrafujte štruktúry, kde ste pozorovali fialové sfarbenie a akumuláciu antokyánov.

Antokyány sú pigmenty a absorbujú svetlo určitej vlnovej dĺžky. Ich prítomnosť tak dokážeme overiť nielen mikroskopicky, ale aj spektrofotometricky. Spektrofotometer meria absorbanciu svetla určitej vlnovej dĺžky vzorkou. Na obrázku č.1 sú znázornené absorpčné spektrá rozličných rastlinných pigmentov izolovaných z listu. Z obrázku vyplýva, že antokyány najviac absorbujú svetlo vlnovej dĺžky približne 535 nm.



Obrázok 1: Absorpčné spektrá rastlinných pigmentov

**Úloha 3:** Uvedte, akú funkciu v liste majú zvyšné pigmenty znázornené na obrázku 1:

V poslednej časti tohto praktika bude vašou úlohou zistiť, ako sa mení obsah antokyánov v klíčkoch horčice bielej v čase po ožiarení. Keďže tento experiment je časovo náročný, rastlinný materiál sme pre vás pripravili my – na stole máte 4 skúmavky označené 0-XX, 3-XX, 6-XX, 9-XX. Prvé číslo dvojčíslicia značí hodinu, v ktorej bola vzorka odobratá, XX je vaše súťažné číslo. Pred stojanom so skúmavkami leží papierik s hmotnosťou skúmavky bez a s odobratým rastlinným materiálom. K rastlinnému materiálu sme včera pridali extrakčný pufor, povarili ho vo vodnom kúpeli a nechali extrakt cez noc stáť na vašom pracovnom stole. Vašou úlohou bude experiment dotiahnuť do konca (krok 4, 5 a 6). Pri manipulácii s extraktom používajte rukavice. Výstupom bude graf znázorňujúci závislosť relatívneho obsahu antokyánov v klíčkoch horčice bielej na čase od osvetlenia klíčkov.

Experiment je naplánovaný nasledovne:

1. klíčky horčice bielej, ktoré vyklíčili v tme presunieme na svetlo a v pravidelných intervaloch (0/3/6/9 hodín) odoberieme 10 výhonkov do zvaženej skúmavky
2. skúmavku zvažíme na analytických váhach a určíme hmotnosť čerstvej biomasy (FW – fresh weight)
3. prevedieme extrakciu pigmentov – ku klíčkom napipetujeme 1 mL extrakčného puforu (izopropanol : kyselina chlorovodíková : destilovaná voda v pomere 18:1:82), skúmavku 90 s povaríme vo vodnom kúpeli a inkubujeme cez noc pri izbovej teplote
4. extrakt scentrifugujeme 10 min pri izbovej teplote na maximálnych otáčkach a supernatant prepipetujeme do novej skúmavky tak, aby sme nenarušili usadenú biomasu
5. extrakt prepipetujeme do kyvety a meriame absorbanciu pri vlnových dĺžkach 535 nm a 650 nm
6. relatívny obsah antokyánov stanovíme pomocou vzťahu  $(A_{535} - 2,2 \times A_{650})/g \text{ FW}$

**Úloha 4:** Vyplňte tabuľku. Relatívny obsah antokyánov zaokrúhlite na 3 desatinné miesta.

Vzorka	Hmotnosť prázdnej skúmavky (g)	Hmotnosť skúmavky s klíčkami (g)	Hmotnosť čerstvej biomasy (FW) (g)	$A_{535}$	$A_{650}$	Relatívny obsah antokyánov ( $g^{-1}$ )

**Úloha 5:** Na priložený milimetrový papier zakreslite graf závislosti relatívneho obsahu antokyánov v klíčkoch horčice bielej na čase od osvetlenia klíčkov.

**Úloha 6:** Prečo je zistený obsah antokyánov relatívny a nie absolútny, príp. aký dodatočný experiment by sme museli previesť, aby sme vedeli určiť presnú koncentráciu antokyánov?

**Úloha 7:** Čo sme používali ako blank (slepú vzorku) pri meraní absorbančie?

**Úloha 8:** Ako by ste vysvetlili zmenu relatívneho obsahu antokyánov medzi časom 0 a prvým meraním?

**Úloha 9:** Rastlina registruje svetelný signál pomocou fotoreceptorov. Fotoreceptory sú tvorené neproteínovou zložkou (prostetickou skupinou) absorbujúcou svetlo určitej vlnovej dĺžky a proteínovou zložkou, ktorej štruktúra sa po absorpcii svetla zmení. Práve táto zmena spúšťa signálnu dráhu. Uvedte 3 rodiny fotoreceptorov u rastlín a časť svetelného spektra, ktorú absorbujú (napr. červené svetlo).

**Úloha 10:** Predpokladáme, že absorpcia svetla určitej vlnovej dĺžky spúšťa signálnu dráhu vedúcu k biosyntéze antokyánov v klíčiach rastlín. Navrhните experiment, ktorým by ste preukázali účasť určitého fotoreceptoru v tomto procese.

**Úloha 11:** Okrem klíčnych listov sa antokyány akumulujú aj v iných rastlinných orgánoch, kde plnia rôzne funkcie. Uvedte ďalší príklad akumulácie antokyánov a príslušnú funkciu.