

Željka Vidaković-Cifrek, Branka Pevalek-Kozlina, Mirta Tkalec,  
Marija Babić i Sandra Radić Brkanac

# **PRAKTIKUM IZ FIZIOLOGIJE BILJA**

Skripta za internu upotrebu  
(II dio)

Zagreb, 2014.

#### **4. Fotosinteza**

- 4.1. Određivanje stope fotosinteze Audusovom mikrobiretom
- 4.2. Dokazivanje oslobađanja kisika tijekom fotosinteze metodom Kolkwitza
- 4.3. Ovisnost količine kisika oslobođenog fotosintezom o svjetlosti
- 4.4. Promatranje apsorpcijskih spektara klorofila, karotenoida i ksantofila
- 4.5. Razdvajanje biljnih pigmenata papirnom kromatografijom
- 4.6. Liofilizacija biljnog materijala i ekstrakcija biljnih pigmenata
- 4.7. Tankoslojna kromatografija, apsorpcijski spektri fotosintetskih pigmenata te određivanje koncentracije klorofila
- 4.8. Razdvajanje fotosintetskih pigmenata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti
- 4.9. Spektrofotometrijsko određivanje količine ukupnih klorofila i karotenoida
- 4.10. Dokazivanje škroba u listovima
- 4.11. Fluorescencija klorofila

#### **5. Disanje**

- 5.1. Razgradnja škroba enzimom amilaza
- 5.2. Djelovanje saharaze (invertaze)
- 5.3. Sinteza škroba pomoću enzima fosforilaze
- 5.4. Djelovanje lipaze
- 5.5. Reakcije na proteine
- 5.6. Određivanje stope disanja Pettenkoferovom metodom
- 5.7. Model dišnog lanca
- 5.8. Dokazivanje citokroma *c*

#### **6. Biljni hormoni i transformacija biljnih stanica**

- 6.1. Utjecaj giberelina ( $GA_3$ ) na sintezu  $\alpha$ -amilaze
- 6.2. Učinak etilena na starenje listova
- 6.3. Transformacija biljnih stanica bakterijom *Agrobacterium tumefaciens*
- 6.4. Učinak auksina na rizogenezu
- 6.5. Učinak giberelina na izduživanje stabljike
- 6.6. Učinak citokinina na odgodu starenja listova

#### **7. Dokazivanje sekundarnih biljnih metabolita**

- 7.1. Enzimska razgradnja glikozida prulaurazina i amigdalina
- 7.2. Mjerenje aktivnosti polifenoloksidaze
- 7.3. Reakcije na treslovine (tanine)
- 7.4. Dokazivanje eskulina, fraksina i berberina fluorescencijom
- 7.5. Apsorpcijski spektar antocijana
- 7.6. Obojenost antocijana pri različitim pH vrijednostima
- 7.7. Testovi za razlikovanje antocijana i betalaina

## **8. Fizologija gibanja**

- 8.1. Termonastije i fotonastije
- 8.2. Seizmonastije
- 8.3. Fototaksije kloroplasta

## **Literatura**

#### 4. FOTOSINTEZA

Fotosinteza je proces u kojem biljke, alge i neki prokarioti koriste svjetlosnu energiju za sintezu organskih spojeva koji služe kao izvor energije (hrana), ali i kao prekursori za sve ostale organske spojeve. I fosilna goriva su produkt fotosinteze biljaka koje su obitavale na Zemlji u dalekoj prošlosti. Važno je spomenuti da se tijekom fotosinteze oslobađa kisik koji je nužan za proces staničnog disanja svih aerobnih organizama.

Proces fotosinteze je niz složenih reakcija koje uključuju apsorpciju svjetlosti, prijenos elektrona i enzimske reakcije kojima se proizvode ugljikohidrati. Apsorpcija svjetlosti, prijenos elektrona do  $\text{NADP}^+$  te fotofosforilacija ADP-a u ATP događaju se na molekulama i proteinskim kompleksima u tilakoidnim membranama kloroplasta. Druga faza fotosintetskih reakcija odvija se u stromi kloroplasta, a obuhvaća fiksaciju ugljikova dioksida i prevođenje u ugljikohidrate uz korištenje NADPH i ATP nastalih u primarnim reakcijama fotosinteze.

#### 4.1. ODREĐIVANJE STOPE FOTOSINTEZE AUDUSOVOM MIKROBIRETOM

Na proces fotosinteze utječu različiti čimbenici: razvojni stadij biljke, opskrba vodom i mineralnim tvarima, temperatura, spektralni sastav i intenzitet osvjetljenja, sadržaj fotosintetskih pigmenta, otvorenost puči i volumni udio ugljikova dioksida.

##### **Voda**

Količina vode potrebne za reakcije u procesu fotosinteze je neznatna u usporedbi s ukupnom količinom vode koju biljka prima korijenom i oslobađa u atmosferu pa se manjak raspoložive vode ne odražava kao nedostatak vode kao supstrata. Pad stope fotosinteze u uvjetima nedostatne opskrbljenosti vodom posljedica je narušavanja hidratacijskog stanja plazme jer su vodeni (hidratacijski) plaševi oko makromolekula važan čimbenik njihove biološke aktivnosti. Osim toga, u uvjetima manjka vode dolazi do zatvaranja puči radi sprečavanja gubitka vode, pri čemu se ujedno umanjuje i primanje ugljikova dioksida iz atmosfere. Smanjeni volumni udio CO<sub>2</sub> u međustaničnim prostorima uvjetovat će pad stope fotosinteze.

##### **Temperatura**

Biljke mogu provoditi fotosintezu u velikom rasponu temperatura, od blizu 0 °C pa sve do oko 45 °C, ali optimalna temperatura za većinu biljaka je između 20 i 30 °C. Ako stopu fotosinteze prikažemo u ovisnosti o temperaturi, krivulja će imati oblik zvona. Rastući dio krivulje predstavlja stimulaciju stope fotosinteze s porastom temperature. Taj se porast nastavlja do točke najviše stope fotosinteze (optimalna temperatura), nakon čega slijedi pad stope fotosinteze. Optimalna temperatura je ona pri kojoj su reakcije fotosinteze optimalno izbalansirane. Promjena temperature ne utječe jednako na sve reakcijske stupnjeve u fotosintezi, pa određene reakcije u većoj mjeri doprinose usporavanju procesa u uvjetima temperature koja odstupa od optimalne.

Budući da temperatura osim na biokemijske reakcije djeluje i na fizikalne procese (npr. difuziju CO<sub>2</sub>) ovisnost procesa fotosinteze na temperaturu je složena.

## **Ugljikov dioksid**

Volumni udio CO<sub>2</sub> u atmosferi je relativno nizak - iznosi oko 0,03% (v/v) - pa je stoga stopa fiksacije CO<sub>2</sub> ograničena unatoč visokom afinitetu enzima Rubisco za CO<sub>2</sub>. S porastom temperature smanjuje se afinitet Rubisco za CO<sub>2</sub>. U C<sub>3</sub>-biljaka s povišenjem temperature povećava se stopa fotorespiracije. U C<sub>4</sub>- i CAM biljaka je fotorespiracija neznatna zbog specifičnog, mehanizma koncentriranja CO<sub>2</sub> u blizini aktivnog mjesta enzima Rubisco.

Ako se u eksperimentalnim uvjetima poveća volumni udio CO<sub>2</sub> stopa karboksilacije enzima Rubisco se povećava. U tom je slučaju jako izražen utjecaj promjene temperature na stopu fiksacije CO<sub>2</sub>. Tada stopa fotosinteze može biti ograničena primarnim reakcijama (prijenos elektrona i sinteza ATP-a i NADPH), npr. u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti.

## **Sadržaj klorofila**

U prirodnim uvjetima sadržaj klorofila nije ograničavajući čimbenik fotosinteze, jer listovi biljaka koje su u sjeni sadrže redovito više klorofila po jedinici površine lista nego listovi koji su stalno izloženi Sunčevoj svjetlosti. U eksperimentalnim uvjetima gdje biosinteza i količina klorofila mogu biti promijenjeni uslijed tretmana biljke različitim fizikalnim i kemijskim čimbenicima, sadržaj klorofila može značajno utjecati na stopu fotosinteze.

## **Svjetlost**

Ako pratimo stopu fotosinteze u ovisnosti o svjetlosti, ona će rasti s povećavanjem intenziteta svjetlosti sve do točke u kojoj drugi čimbenici (najčešće CO<sub>2</sub>) postanu ograničavajući. Nakon tog tzv. "svjetlosnog zasićenja" daljnji porast intenziteta svjetlosti više ne može povećati stopu fotosinteze. Još jače osvjetljenje može oštetiti fotosintetski aparat pa stopa fotosinteze čak opada. Ta se pojava naziva fotoinhibicija.

Cilj ove vježbe je izmjeriti stopu fotosinteze u ovisnosti o intenzitetu svjetlosti i volumnom udjelu CO<sub>2</sub>. Kao mjera stope fotosinteze poslužit će volumen oslobođenog kisika.

Važno je da za vrijeme određivanja ovisnosti fotosinteze o jednom čimbeniku (npr. svjetlosti) vrijednosti svih ostalih čimbenika (temperatura, CO<sub>2</sub> i dr.) ostanu nepromijenjeni.

## Literatura

- Pevalek-Kozlina, B. (2003). Fiziologija bilja. Profil International, Zagreb.  
Taiz, L., Zeiger, E. (2010). Plant Physiology. Fifth Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts USA.

## MATERIJAL

### Biljni materijal

-vodena kuga (*Elodea canadensis*)

### Reagensi

-natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)

### Pribor

-aparatura s Audusovom  
mikrobiretom  
-prokuhana vodovodna voda  
-svjetlomjer  
-ravnalo  
-staklena čaša

## NAČIN IZVOĐENJA

Nekoliko izdanaka vodene kuge nalazi se u malom staklenom zvonu spojenom sa staklenom kapilalom Audusove mikrobirete. Biljke su odrezanim krajem okrenute prema gore. Stakleno zvono je uronjeno u čašu volumena oko 3 litre, napunjenu prokuhanom vodovodnom vodom u koju je dodano 3 g natrijevog hidrogenkarbonata.

Izvor svjetlosti postavite na udaljenost 25 cm od vodene kuge. Zabilježite temperaturu vode te svjetlomjerom izmjerite intenzitet svjetlosti. Nakon 30 minuta uvucite kisik oslobođen fotosintezom u Audusovu mikrobiretu i očitajte njegov volumen. Nakon toga pomaknite izvor svjetlosti na udaljenost od 50 cm i ponovite postupak.

## REZULTATI

Skica aparature:

Podaci:

Udaljenost izvora svjetlosti (cm)	25	50
Temperatura (°C)		
Osvjetljenje (lux)		
Duljina mjehurića kisika (mm)		
Volumen oslobođenog kisika (mL)		

Kod računanja uzmite u obzir da 60 mm na milimetarskoj skali Audusove mikrobirete odgovara volumenu od 1 mL.

## PITANJA

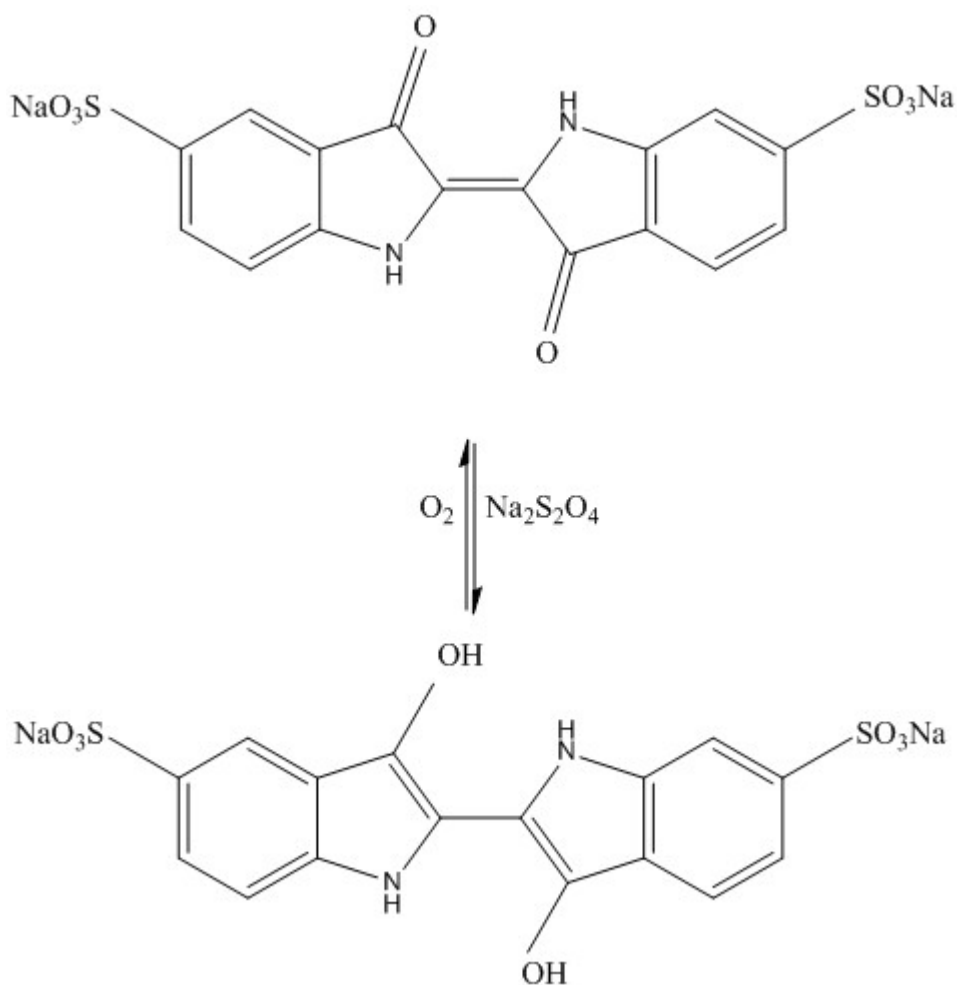
Zašto se u vodu dodaje natrijev hidrogenkarbonat?

Zašto je važno kontrolirati temperaturu?



## 4.2. DOKAZIVANJE OSLOBAĐANJA KISIKA TIJEKOM FOTOSINTEZE METODOM KOLKWITZA

Boja indigo-karmin (dinatrijeva sol indigo-5,5'-disulfonske kiseline) u oksidiranom obliku je modre boje, a u reduciranom bezbojna. Zahvaljujući tom svojstvu upotrebljava se za dokazivanje kisika oslobođenog fotosintezom.



### MATERIJAL

#### Biljni materijal

-vodena kuga (*Elodea canadensis*)

#### Reagensi

-otopina indigo-karmina ( $0,05 \text{ g dm}^{-3}$ )  
-10 %-tna otopina natrijevog hiposulfita (natrijev ditionit),  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

#### Pribor

-veća epruveta (20-25 ml)  
-manja epruveta (10-15 ml)  
-kapalica  
-stakleni štapić  
-pipeta od 10 ml  
-svjetiljka

## NAČIN IZVOĐENJA

Oksidiranom otopinom indigo-karmina (modre boje) napunite veću epruvetu do otprilike polovice volumena. Nakon toga polagano kapalicom dodavajte otopinu natrijevog hiposulfita i pritom lagano miješajte sadržaj epruvete staklenim štapićem sve dok se otopina ne obezboji. Prva kap natrijevog hiposulfita koja obezboji otopinu ukazuje na to da je otopina reducirana. Važno je da nakon obezbojenja otopine ne dodate više niti jednu suvišnu kap redukcijskog sredstva i da više ne miješate otopinu kako bi se spriječio dodir s kisikom iz zraka.

Odmah zatim u manju epruvetu stavite jednu ili dvije grančice vodene kuge te nadolijte pripremljenu otopinu. Epruvetu začepite parafilmom, okrenite otvorom prema dolje te ju ostavite u okomitom položaju u blizini izvora svjetlosti oko dva sata. Po potrebi epruvetu pričvrstite pomoću stalka i kleme.

## REZULTATI

Nacrtajte i objasnite uočene promjene:

Početno stanje

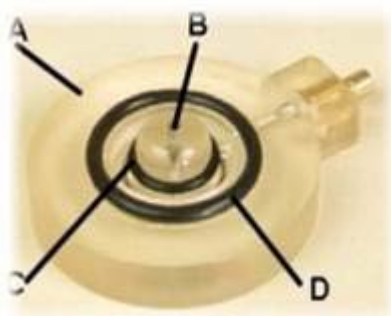
Konačno stanje (nakon 1-2 h)

#### 4.3. OVISNOST KOLIČINE KISIKA OSLOBOĐENOG FOTOSINTEZOM O SVJETLOSTI

Na krivulji koja prikazuje količinu kisika oslobođenog fotosintezom u ovisnosti o svjetlosti razlikuju se dva područja: prvo, gdje stopa fotosinteze raste s povećanjem intenziteta svjetlosti i drugo, gdje dolazi do zasićenja, što znači da daljnje povećanje svjetlosnog zračenja nema učinka na fotosintezu. U tom drugom dijelu neki drugi čimbenici onemogućavaju daljnji porast stope fotosinteze, npr. volumni udio CO<sub>2</sub> ili neka od enzimskih reakcija Calvinovog ciklusa.

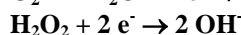
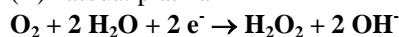
Količina kisika može se mjeriti već spomenutom Audusovom mikrobiretom, zatim manometrijskom metodom po Warburgu te u novije vrijeme pomoću uređaja koji kao senzor za detekciju količine otopljenog kisika u reakcijskoj otopini koristi Clarkov tip kisikove elektrode (slika 1). Ova metoda mjerenja stope fotosinteze je vrlo osjetljiva jer detektira promjene količine kisika od 0,01 μmol. Osim produkcije kisika u fotosintezi uređaj omogućuje i određivanje potrošnje kisika disanjem, tj. stopu disanja.

Postoje dva tipa uređaja koji rade na principu Clarkove kisikove elektrode. Jedan se koristi za mjerenje fotosinteze u tekućoj fazi (mjerenje fotosinteze jednostaničnih alga, stanica u suspenziji, protoplasta i izoliranih kloroplasta), a drugi za mjerenje fotosinteze u plinovitoj fazi (mjerenje stope fotosinteze na jednom dijelu lista poznate površine).

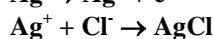
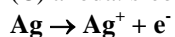


(A) disk od epoksi-smole

(B) katoda: platina



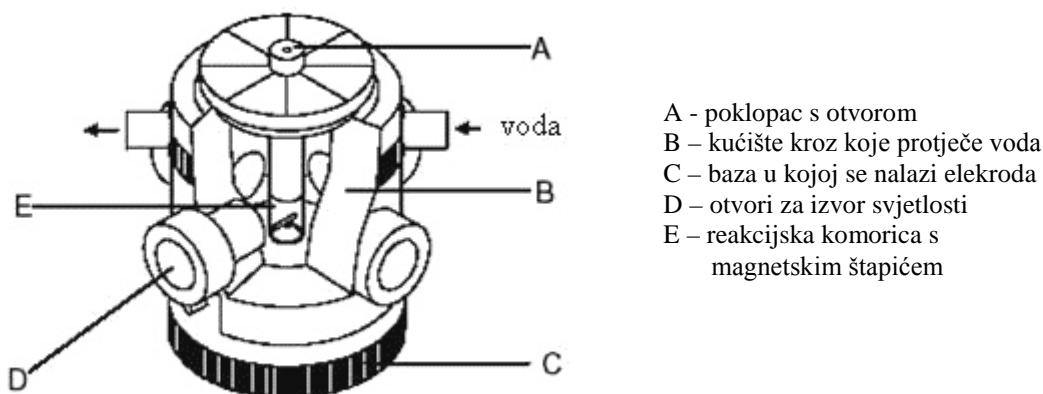
(C) anoda: srebro



(D) vanjska brazda

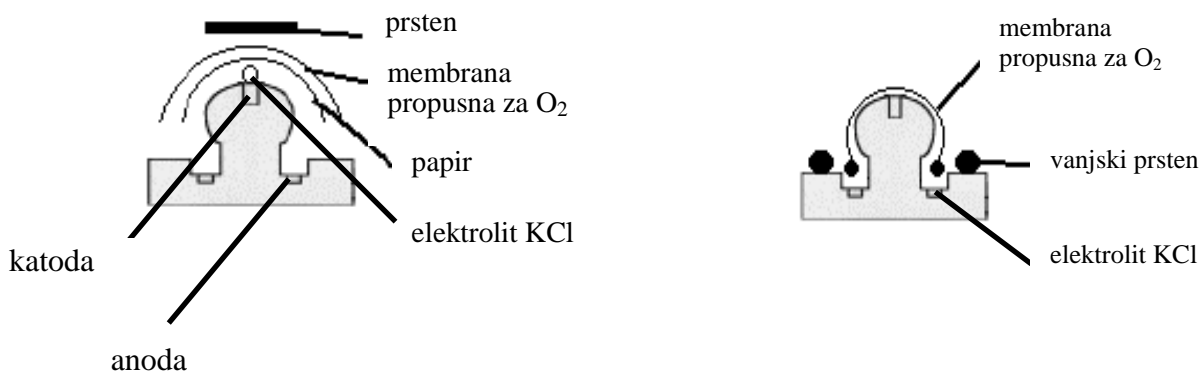
Slika 1. Clarkova kisikova elektroda i reakcije na katodi i anodi

U ovoj se vježbi koristi uređaj za mjerenje stope fotosinteze u tekućoj fazi. Uređaj se sastoji od reakcijske posude u kojoj se nalazi reakcijska komorica na čijem je dnu kisikova elektroda (slika 2). Stalna temperatura reakcijske komorice osigurana je protokom vode određene temperature kroz reakcijsku posudu.



Slika 2. Reakcijska posuda u čijoj bazi se nalazi kisikova elektroda

Za mjerenje količine kisika elektroda se mora pripremiti tako da se na katodu od platine stavi kap elektrolita (KCl), zatim komadić tankog papira odgovarajućih svojstava i na njega komadić membrane propusne za kisik (slika 3). Sve se pričvrsti gumenim prstenom koji se na elektrodu stavi pomoću „aplikatora“. Nekoliko kapi elektrolita se kapalicom nanese u brazdu u kojoj se nalazi anoda. U tu je brazdu uronjen papir koji smo položili preko katode pa je na taj način omogućena povezanost katode i anode te vođenje struje. Nakon uključivanja u struju elektroda je polarizirana – napon generira pozitivni i negativni pol na elektrodi što rezultira ionizacijom elektrolita i tokom struje kroz elektrodu. Jakost struje koja nastaje zbog reakcija na elektrodama proporcionalna je aktivitetu kisika u otopini i daje analogni signal.



Slika 3. Priprema kisikove elektrode

Analogni signal s elektrode se pojačava, preko A/D pretvornika se prenosi u osobno računalo i prikazuje na ekranu.

U pokusu se koristi suspenzija jednostanične zelene alge *Chlorella kessleri* Fott et Novák. Prati se nekoliko ciklusa disanja i fotosinteze pri različitim intenzitetima svjetlosti.

## Literatura

- Oxygen Measurements in the Liquid-Phase. Systems Manual. Hansatech Instruments Limited  
<http://www.hansatech-instruments.co.uk>
- Reis, C. (1994). Experiments in Plant Physiology. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Walker D. A. (1995). Polarographic measurement of oxygen. U: Photosynthesis and Production in a Changing Environment. A field and laboratory manual. Hall, D. O., Scurlock, J. M. O., Bolhàr-Nordenkampf, H. R., Leegood, R. C., Long, S. P. (urednici). Chapman and Hall, London.

## MATERIJAL

### Biljni materijal

-zelena alga *Chlorella kessleri*

### Pribor i uređaji

-kapaljke  
-3 laboratorijske čaše od 100 ml  
-Chlorolab 2 (Hansatech, UK) povezan s osobnim računalom  
-vodena kupelj  
-akvarijska pumpa

### Reagensi

-natrijev ditionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )  
-pufer 0,1 M  $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ , pH 8,9 (30 ml 0,1 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  + 170 ml 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ , dodatkom nekoliko kapi 0,1 M HCl namjestiti pH vrijednost na 8,9)  
-deionizirana voda

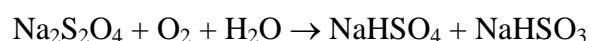
## NAČIN IZVOĐENJA

Uključite vodenu kupelj i namjestite temperaturu na 30 °C. Pokrenite program OxyLab 1.10. i namjestite brzinu miješanja reakcijske otopine na 30.

### Kalibracija elektrode

Oko 20 ml vode stavite u odmjernu tikvicu od 500 ml koju uronite u vodenu kupelj. Da biste dobili uzorak vode zasićen kisikom tikvicu snažno protresite. Napunite reakcijsku posudicu s oko 1,5 ml vode zasićene kisikom i ugrijane na 30 °C.

Koristite kapalicu sa zaobljenim vrhom da ne oštete membranu elektrode koja se nalazi na dnu reakcijske posudice. Uz pomoć posebnog uređaja izmjerite temperaturu. Taj ćete podatak upisati u računalo tijekom postupka kalibracije. Pričekajte da se signal mjerenja uzorka vode zasićene kisikom stabilizira (5-10 min), a zatim započnite kalibriranje. U reakcijsku posudicu dodajte malu količinu natrijeva ditionita (na vrh spatule) i ponovo pričekajte da se signal stabilizira. Natrijev ditionit će iz vode ukloniti sav otopljeni kisik prema reakciji:



Kapalicom ispraznite reakcijsku posudu i isperite ju četiri puta destiliranom vodom. Također pažljivo isperite mali čep i poklopac reakcijske posude. Na kraju u reakcijsku posudu opet stavite deioniziranu vodu zasićenu kisikom i izmjerite koncentraciju kisika. Provjerite odgovara li izmjerena vrijednost kisika onoj koja se nalazi u tablici 1.

Tablica 1: Koncentracija kisika u vodi zasićenoj kisikom pri različitim temperaturama.

Temp. (°C)	Konc. O <sub>2</sub> (μmol ml <sup>-1</sup> )
0	0,442
5	0,386
10	0,341
15	0,305
20	0,276
25	0,253
30	0,230
35	0,210

### Kalibriranje izvora svjetlosti

U programu Oxylab upišite željeni protokol mjerenja u PFD („photon flux density“) tablicu i kalibrirajte izvor svjetlosti prema uputama samog programa mjereći nižu i višu točku intenziteta svjetlosti. Za PFD tablicu odaberite nekoliko intenziteta svjetlosti, npr. 30, 60, 90 i 120 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> kojima ćete osvjetljavati suspenziju alge u vremenskim periodima od 10 minuta te iza svakog perioda svjetla upišite period tame (3 ili 5 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). U prozoru za dijalog u kojem se nalazi PFD tablica i kalibriranje svjetla uključite funkciju „Automatic“.

Tablica 2. Primjer PFD tablice.

Intenzitet svjetlosti ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Trajanje (min)
5	5
30	5
5	5
60	5
5	5
90	5
5	5
120	5
5	5

Izvadite kapaljkom vodu iz reakcijske posude i stavite 1,5 ml suspenzije zelene alge u puferu (sastav pufera: 0,1 M  $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ , pH 8,9). Prije stavljanja u reakcijsku posudicu, suspenziju je potrebno procijediti kroz platno za cijedenje.

Uređaj će automatski mjeriti nekoliko ciklusa disanja i fotosinteze u skladu s podacima unesenim u PFD tablicu.

Izračunajte ukupnu količinu kisika oslobođenog fotosintezom pri pojedinoj vrijednosti svjetlosne energije. Uzmite u obzir količinu kisika potrošenog disanjem. Za ovaj pokus može se pretpostaviti da je stopa disanja u mraku jednaka stopi disanja na svjetlosti jer zelena alga *Chlorella* ima mehanizam za koncentriranje  $\text{CO}_2$  pa je fotorespiracija zanemariva.

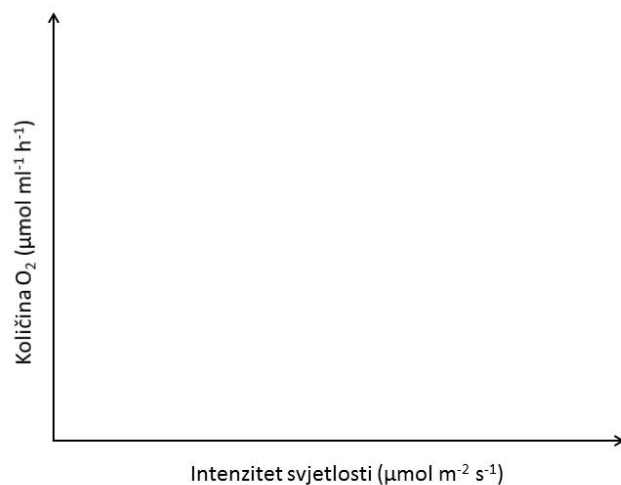
## REZULTATI

Intenzitet svjetlosti ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Oslobodeni/utrošeni kisik u minuti ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	Oslobodeni/utrošeni kisik u satu ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
5 (mrak)		
30		
5 (mrak)		
60		
5 (mrak)		
90		
5 (mrak)		
120		
5 (mrak)		

Srednja vrijednost kisika utrošenog disanjem u satu ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ ):

Intenzitet svjetlosti ( $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )					
Ukupna količina kisika oslobodjenog fotosintezom (korekcija za kisik potrošen disanjem) u satu ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ )					

Grafički prikaz:





#### 4.4. PROMATRANJE APSORPCIJSKIH SPEKTARA KLOROFILA, KAROTENOIDA I KSANTOFILA

Apsorpcijski spektar fotosintetskih pigmenata i drugih tvari može se promatrati pomoću mikrospektroskopa. Taj se uređaj sastoji od mikroskopa koji umjesto uobičajenog ima tzv. spektroskopski okular u kojem se nalazi sustav prizmi koje daju spektar. Okular je tako građen da u vidnom polju istovremeno promatramo dva spektra: kontrolni spektar te apsorpcijski spektar otopljene tvari koja se istražuje. Apsorpcijski se spektar dobiva tako da upadni snop svjetlosti prolazi kroz otopinu, npr. klorofila ili neke druge tvari. Uspoređujući kontrolni spektar i apsorpcijski spektar istraživane tvari može se utvrditi koje dijelove (koje valne duljine) spektra apsorbira istraživana tvar.

#### **Struktura fotosintetskoga aparata**

Najaktivnije fotosintetsko tkivo u viših biljaka je lisni mezofil. Stanice mezofila imaju veliki broj kloroplasta (30-40) koji u tilakoidnim membranama sadrže pigmente klorofile i karotenoide.

Poznato je više vrsta klorofila, npr. klorofil *a*, klorofil *b*, klorofil *c* i dr. U procesu fotosinteze u biljaka najveće značenje ima klorofil *a* jer jedino on može neposredno sudjelovati u reakciji razdvajanja naboja u reakcijskom središtu fotosistema. Ostale fotosintetske pigmente biljaka (klorofil *b* i karotenoide) nazivamo pomoćnim pigmentima jer oni mogu apsorbirati svjetlost i prenositi energiju na klorofil *a*. Karotenoidi su zbog brojnih konjugiranih dvostrukih veza žuto, narančasto ili crveno obojeni pigmenti, a po građi su terpeni. Karoteni su čisti ugljikovodici, a ksantofili su derivati karotena koji sadrže kisik (npr. lutein u tilakoidnim membranama viših biljaka i fukoksantin u smeđim algama i algama kremenjašicama). Karotenoidi mogu apsorbirati valne duljine modrog područja spektra, koje klorofili apsorbiraju djelomično, pa na taj način proširuju spektar svjetlosne energije koja može sudjelovati u fotosintezi. Upravo zbog postojanja pomoćnih pigmenata i njihove uloge u apsorpciji svjetlosti akcijski spektar fotosinteze se ne poklapa u potpunosti s apsorpcijskim spektrom klorofila *a*.

U većine biljnih vrsta karotenoidi su slabije djelotvorni prenosioci energije. Ako maksimalnu učinkovitost klorofila označimo sa 100%, onda je ona u karotenoida između 20% i 50% (ovisno o biljnoj vrsti). U uvjetima previsokih intenziteta svjetlosti

karotenoidi fotosintetskog aparata mogu određenim mehanizmima zaštititi klorofil od fotooksidacije.

Dakle, molekule klorofila mogu apsorbiranu energiju svjetlosnog zračenja prenositi na druge molekule ali isto tako mogu preuzeti pobudnu energiju od drugih pigmenata. Ovaj prijelaz energije od molekule do molekule u kompleksima „antena“ uvijek ide prema onom pigmentu koji apsorbira svjetlost većih valnih duljina (niže energije) od molekule koja daje energiju. Specifična struktura kompleksa antena omogućuje prijenos energije prema reakcijskom središtu fotosistema u kojem ta energija omogućuje prijenos elektrona s molekule klorofila *a* na primarni akceptor.

## MATERIJAL

### **Biljni materijal**

-listovi trave

### **Reagensi**

-96%-tni etanol

-benzen

-20%-tna alkoholna otopina KOH

-destilirana voda

### **Pribor**

-lijevak za odjeljivanje

-Erlenmeyerova tikvica

-staklene čaše od 200 i 400 ml

-5 semimikro epruveta

-menzura od 25 ml

-niska staklena posuda

-rukavice

## NAČIN IZVOĐENJA

Postoje različite metode ekstrakcije fotosintetskih pigmenata, a jedna od njih je kuhanje zelenih listova (npr. trave) u kipućem etanolu. Za ovaj pokus potrebno je skuhati oko 3 g trave u oko 100 ml etanola. Nakon hlađenja, dobivenom otopinom napunite jednu semimikro epruvetu, a oko 20 ml ulijte u lijevak za odjeljivanje.

Nastavak pokusa treba izvesti u digestoru uz upotrebu rukavica.

U isti lijevak za odjeljivanje zatim dodajte 10-20 ml benzena i nekoliko puta dobro protresite. Tijekom potresanja povremeno otvorite ventil na lijevku. Zatim stavite lijevak na stalak, izvadite čep i ostavite stajati da se odijele dvije faze. Ako se slojevi ne razdvajaju, dodajte nekoliko kapi destilirane vode i opet protresite. Ako je nakon odjeljivanja donji sloj obojen zeleno, dodajte još malo benzena. U gornjem, zelenom sloju (u kojem prevladava benzen) nalaze se klorofili *a* i *b* te karoteni, a u donjem, žutom (alkoholnom) sloju prevladavaju ksantofili. Pažljivo ispustite dio

donjeg sloja u jednu semimikro epruvetu, a ostatak otopine iz donjeg sloja ispustite u za to namijenjenu bocu.

Preostaloj smjesi klorofila i karotena dodajte približno isti volumen 20%-tne alkoholne otopine lužine, dobro protresite, stavite lijevak na stalak i izvadite čep. Odijelit će se žuti benzenski sloj u kojem su karoteni (gornji sloj) i modrozeleni alkoholni sloj u kojem se nalaze klorofili (donji sloj). Ako se slojevi ne odjeljuju, dodajte nekoliko kapi destilirane vode i opet protresite.

Uzorke pojedinih slojeva ispustite u semimikro epruvete. Spektroskopom promatrajte apsorpcijske spektre sljedećih uzoraka:

1. zeleni list
2. alkoholni ekstrakt svih pigmenata
3. alkoholni ekstrakt ksantofila
4. alkoholni ekstrakt klorofila *a* i *b*
5. benzenski ekstrakt karotena

Zabilježite rezultate i nacrtajte apsorpcijske spektre pojedinih pigmenata.

## REZULTATI

Valna duljina (nm)	UZORAK	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
700	crveno					
650	narančasto					
600						
550	žuto					
500	zeleno					
450	modro					

#### 4.5. RAZDVAJANJE BILJNIH PIGMENATA PAPIRNOM KROMATOGRAFIJOM

Kromatografija je analitička metoda koja služi za razdvajanje komponenata smjese te njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje. Temelji se na adsorpciji te razdjeljivanju uzorka između pokretne (mobilne) faze (plin ili tekućina) i nepokretne (stacionarne) faze (tekućina ili kruta tvar).

Metodu kromatografije prvi je uspješno primijenio ruski botaničar Mikhail Tswett 1906. godine odvajajući pigmente zelenih listova na stupcu kalcijevog karbonata pri čemu je dobio nekoliko žutih i zelenih zona. Metodu je nazvao kromatografija (postupak za odjeljivanje boja), iako naziv razdjeljivanje (particija) bolje opisuje metodu budući da se radi o razdjeljivanju otopljene tvari između dvaju otapala.

Postoje dva osnovna načina izvedbe kromatografije: kromatografija na stupcu i plošna kromatografija. U kromatografiji na stupcu stacionarna faza se nalazi u uskoj cijevi kroz koju se kreće mobilna faza pod utjecajem tlaka ili gravitacije. U plošnoj kromatografiji je stacionarna faza nanescena na ravnu plohu ili se razdvajanje izvodi na papiru. Mobilna faza se kreće pod utjecajem kapilarnih sila ili gravitacije.

Prema fizikalno-kemijskim procesima koji se zbivaju tijekom kromatografije razlikujemo adsorpcijsku kromatografiju, kromatografiju ionske izmjene, razdjelnu (particijsku) kromatografiju i kromatografiju isključenjem.

##### **Adsorpcijska kromatografija**

Temelji se na odvajanju pojedinih komponenata smjese na temelju različite adsorpcije na istom adsorbensu (stacionarnoj fazi) i različite topljivosti u mobilnoj fazi.

##### **Ionsko-izmjenjivačka kromatografija**

Ionski izmjenjivači su visokopolimerni spojevi koji imaju aktivne skupine na kojima dolazi do izmjene iona pa zato mogu vezati ione iz otopine i pri tome osloboditi ekvivalentnu količinu istoimeno nabijenih iona. Dije se na anionske i kationske izmjenjivače. Upotrebljavaju se za demineralizaciju prirodne vode, odjeljivanje vrijednih metala iz otpadnih produkata i dr.

## **Razdjelna (particijska) kromatografija**

Smjesa istraživanih tvari u otopini nanosi se na stacionarnu fazu (silika-gel ili papir) zasićenu polarnim otapalom koje tvori tanki sloj (film) uz stacionarnu fazu. Sastojci smjese se distribuiraju između stacionarne i mobilne faze (tekućina ili plin) i tijekom izvođenja kromatografije se razdvajaju na temelju različite topljivosti u tekućinama tih dviju faza.

## **Kromatografija isključenjem**

Ova vrsta kromatografije omogućuje razdvajanje molekula na temelju veličine i oblika. Otopina koja sadrži smjesu molekula prolazi kroz porozni gel čija struktura omogućava brži prolazak većih molekula, dok manje molekule ulaze u pore gela pri čemu prolaze veći put pa stoga zaostaju za većim molekulama.

Papirna kromatografija je vrsta razdjelne kromatografije. Stacionarnu fazu čini posebna vrsta papira koji u porama zadržava molekule vode adsorbirane iz zraka. Preko papira prelazi otapalo s istraživanim uzorkom. Komponente uzorka se kreću različitim brzinama i pri tome se razdvajaju. Mjesto na koje se nanosi uzorak naziva se startna linija, a udaljenost do koje je stiglo otapalo je fronta otapala. Omjer udaljenosti određene komponente ( $d$ ) i udaljenosti fronte otapala od startne linije ( $d_0$ ) naziva se  $R_f$  vrijednost. Ova vrijednost je pri stalnoj temperaturi, vrsti otapala i kromatografskog papira konstantna za određenu tvar. Kromatografija na papiru može biti uzlazna ili silazna, te jedno-, dvodimenzionalna ili kružna.

U ovoj vježbi će se fotosintetski biljni pigmenti iz alkoholnog ekstrakta razdvojiti uzlaznom papirnom kromatografijom.

## **Literatura**

- Lederer, E., Lederer, M. (1957). Chromatography: a review of principles and applications. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, New York.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. (1999). Osnove analitičke kemije. Školska knjiga, Zagreb.

## MATERIJAL

### Biljni materijal

-listovi trave

### Reagensi

-96%-tni etanol  
-medicinski benzin  
-petroleter  
-aceton

### Pribor i uređaji

-kada i papir za kromatografiju  
-menzura od 100 ml  
-kapaljka  
-električno sušilo  
-ravnalo  
-rukavice

## NAČIN IZVOĐENJA

Ekstrakt biljnih pigmenata priređen je kuhanjem zelenih listova u alkoholu, nakon čega je ohlađen na sobnu temperaturu.

Mobilna faza se sastoji od 100 ml medicinskog benzina, 25 ml petroletera i 20 ml acetona. Pripremite ju u digestoru i ulijte u staklenu posudu za kromatografiju. Na kromatografskom papiru označite startnu liniju (oko 5 cm iznad donjeg ruba papira). Na središnji dio te linije nanosite kapalicom oko 0,5 ml ekstrakta uz istovremeno sušenje električnim sušilom (nemojte previše približiti sušilo papiru). Pričvrstite papir na stalak tako da je donji rub uronjen u otapalo. Startna linija i nanesen ektrakt trebaju biti iznad površine otapala. Rub posude namažite vazelinom i poklopite staklenom pločom.

Po završetku kromatografije odmah označite frontu otapala te pozicije svakog razdvojenog pigmenta. Izmjerite udaljenost koju je prešao svaki pigment i izračunajte pripadajuću  $R_f$  vrijednost.

$$R_f = \frac{\text{udaljenost koju je prošao pojedini pigment}}{\text{udaljenost koju je prošlo otapalo}}$$

## REZULTATI

### Razdvajanje pigmenata

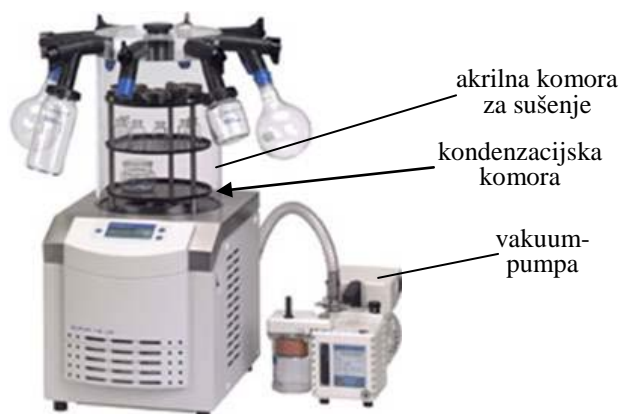
	Pigment	Udaljenost (cm)	R <sub>f</sub>
fronta otapala	<u>xxx</u>	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	<u>startna linija</u>	<u>xxx</u>	<u>xxx</u>

#### 4.6. LIOFILIZACIJA BILJNOG MATERIJALA I EKSTRAKCIJA BILJNIH PIGMENATA

Biljni pigmenti nisu osobito postojani pa je pri kvantitativnom određivanju potrebno izbjegavati izlaganje svjetlosti i toplini. Za istraživanje fotosintetskih pigmentata dobro je koristiti liofilizirane uzorke radi veće postojanosti pri čuvanju, a prednost je i to što pripremljeni ekstrakti neće sadržavati vodu.

**Liofilizacija** uzoraka je postupak uklanjanja vode iz prethodno smrznutog biljnog tkiva. Tijekom postupka se izbjegava tekuće stanje vode, a led se uklanja sublimacijom, dakle izravnim prelaskom iz krutog stanja u vodenu paru. Liofilizacija omogućava očuvanje bioloških svojstava osjetljivih tkiva i njihovih sastojaka. Pri tome se dobiva topivi uzorak kojem će se tijekom daljnjih laboratorijskih postupaka dodati vodena faza čime se dobiva uzorak koji ima slična svojstva početnom uzorku.

Uzorci vodene leće se odmah nakon ispiranja destiliranom vodom, kratkog sušenja na filter papiru radi uklanjanja suvišne vode i određivanja mase naglo smrznu u tekućem dušiku ili u ledenici na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a zatim stave u liofilizator. Budući da liofilizator Alpha 1-2 (Christ, Njemačka) provodi i hlađenje i sušenje, biljke se mogu odmah nakon vaganja staviti u ohlađenu komoru liofilizatora. Uređaj hladi na  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , i postiže tlak od 0,01 mbar.





## MATERIJAL

### Biljni materijal

-vodena leća *Lemna minor* L.

### Reagensi

-destilirana voda

-aceton (100%-tni), hladan

-CaCO<sub>3</sub> (s)

### Uređaji

-vaga

-liofilizator Alpha 1-2 (Christ)

-centrifuga

-eksikator

### Pribor

-cjedilo

-filtrar papir

-pinceta

-lađice za vaganje

-male staklene Petrijeve zdjelice

-kutija s ledom

-tarionik

-automatska pipeta

-tamne Eppendorf-epruvete (1,5 ml)

-Pasteurove pipete

-graduirane staklene epruvete (10 ml)

## NAČIN IZVOĐENJA

### Liofilizacija biljnog materijala

Za pokus se koristi vodena leća (*Lemna minor* L.) uzgojena na tekućoj hranjivoj podlozi u Erlenmeyerovim tikvicama. Biljke su kultivirane u klima-komori pri temperaturi 24 °C i fotoperiodu od 8 sati tame i 16 sati osvjetljenja (40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Biljke izvadite pincetom iz Erlenmeyerovih tikvica, stavite u cjedilo i dobro isperite destiliranom vodom. Položite ih na filtrar papir i lagano prekrijte drugim filtrar papirom radi uklanjanja suvišne vode. Vagnite po 1 g tkiva, stavite ga u male Petrijeve zdjelice koje nakon toga treba omotati aluminijskom folijom i pri tom paziti da poklopci Petrijevih zdjelica ostanu nadignuti.

Vakuumpumpu na liofilizatoru treba uključiti 30 minuta prije stavljanja uzoraka u liofilizator. Sam uređaj treba uključiti neposredno prije stavljanja uzoraka i pričekati 2-3 minute da se ohladi. Zatim ugasite i vakuumpumpu i liofilizator te otvaranjem ventila na lijevoj strani uređaja pustite zrak u liofilizator. Nakon toga pažljivo skinite akrilnu komoru, na police stavite uzorke te akrilnu komoru vratite na mjesto. Zatim zatvorite ventil te ponovo uključite vakuumpumpu i liofilizator. U narednih nekoliko minuta će se temperatura spustiti na -60 °C, a tlak na oko 0,1 mbar.

Trajanje liofilizacije ovisi o vrsti biljnog materijala. Za vodenu leću potrebno je oko 6 sati. Po završetku liofilizacije ugasite vakuumpumpu, a zatim i liofilizator. Otvaranjem ventila na lijevoj strani uređaja pustite zrak u liofilizator. Na kraju pažljivo podignite akrilno kućište i izvadite uzorke. Liofilizirani uzorci se spremaju u eksikator i čuvaju u tami.

### **Ekstrakcija biljnih pigmenata iz liofiliziranog biljnog materijala**

Vagnite po 50 mg liofiliziranog uzorka vodene leće, stavite u hladni tarionik i dodajte malo (na vrh spatule)  $\text{CaCO}_3$ . Zatim dodajte 0,5 ml ohlađenog 100%-tnog acetona i brzo homogenirajte jer aceton hlapi. Ako vam tijekom ekstrakcije aceton ishlapi dodajte još 0,5 ml. Ekstrakt prebacite u tamnu ohlađenu Eppendorf-epruvetu i stavite u kutiju s ledom. Radi ispiranja dodajte u tarionik još 0,5 ml acetona i zatim prelijte u istu Eppendorf-epruvetu. Uzorke centrifugirajte 10 minuta na 5000 g pri temperaturi  $+4\text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatant prelijte u čistu Eppendorf-epruvetu. Na preostali talog u prvoj Eppendorf-epruveti dodajte 0,5 ml ohlađenog acetona i na tresilici (Vortex) eluirajte ostatak pigmenata. Ponovno centrifugirajte i supernatant dodajte odgovarajućem ekstraktu u Eppendorf-epruveti i dodajte toliko acetona da ukupni volumen u bude 1,5 ml.

Uzorke pohranite u zamrzivač na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Koristiti ćete ih u vježbama 4.7. i 4.8.

#### 4.7. TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA, APSORPCIJSKI SPEKTRI FOTOSINTETSKIH PIGMENATA TE ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE KLOROFILA

Tankoslojna kromatografija je vrsta adsorpcijske kromatografije koja se izvodi na tankom sloju adsorbensa (stacionarna faza) nanesenog na staklenu ploču. Izvodi se kao uzlazna kromatografija u zatvorenoj posudi koja sadrži određenu količinu odgovarajućeg otapala (mobilna faza). Tom vrstom kromatografije mogu se izdvojiti male količine sastojaka smjese i nakon toga prevesti u otopinu za daljnju analizu.

Cilj vježbe je a) razdvajanje pigmenata tankoslojnom kromatografijom, b) određivanje apsorpcijskih spektara pojedinih pigmenata, c) identifikacija pigmenata na temelju položaja na kromatogramu i apsorpcijskog spektra te d) spektrofotometrijsko određivanje koncentracije klorofila *a* i *b*.

#### Literatura

Reis, C. (1994). Experiments in Plant Physiology. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

#### MATERIJAL

##### **Biljni materijal**

-ekstrakt vodene leće  
(vidi vježbu 4.6)

##### **Reagensi**

-aceton  
-petroleter

##### **Uredaji**

-rotacioni uparivač  
-centrifuga  
-sušionik  
-mućkalica  
-spektrofotometar

##### **Pribor**

-spatula  
-kutija s ledom  
-staklene ploče sa slojem Silikagela  
-kadica za kromatografiju  
-eksikator  
-Pasteurove pipete  
-graduirane kivete s čepovima  
-staklene kivete za spektrofotometar  
-automatska pipeta  
-Eppendorf-epruvete  
-stalak za Eppendorf-epruvete  
-lijevak

#### NAČIN IZVOĐENJA

##### **Tankoslojna kromatografija fotosintetskih pigmenata**

Mobilna faza je smjesa acetona i petroletera u omjeru 30:70. Pripremite 50 ml mobilne faze (15 ml acetona i 35 ml petroletera) i ulijte u staklenu posudu za kromatografiju. U posudu umetnite komad filter papira radi održavanja atmosfere u kadici zasićenom parama mobilne faze i zatim posudu poklopite.

Iz eksikatora uzmete pripremljene kromatografske ploče. Ploče se pripremaju na sljedeći način: na dobro oprane i osušene staklene ploče nanese se otopina silikagela i zatim se ploče posuše preko noći na sobnoj temperaturi. S pločama treba pažljivo rukovati i paziti da se što manje dotiče površina silikagela.

Uzmite ekstrakt priređen u vježbi 4.6 i po potrebi ga ukoncentrirajte u rotacionom uparivaču (temperatura vodene kupelji ne smije biti veća od 30 °C) do volumena 1-2 ml (zabilježite točan volumen). U čistu Eppendorf-epruvetu otpipetirajte 100 µl ekstrakta i Pasteurovom pipetom ga pažljivo nanosite u sredinu kromatografske ploče, na udaljenost 1-1,5 cm od donjeg ruba. Epruvete s ekstraktom uvijek držite u ledu. Kromatografija teče oko 45 minuta, pri sobnoj temperaturi, zaklonjena od direktne svjetlosti. Završena je kad je fronta mobilne faze oko 2 cm ispod gornjeg ruba ploče. Nakon vađenja ploče iz kadice odmah obilježiti frontu mobilne faze. Skicirajte kromatogram i za svaku izdvojenu frakciju izračunajte  $R_f$  vrijednost (v. vježbu 4.5).

### **Određivanje apsorpcijskog spektra fotosintetskih pigmenata**

Odmah po završetku kromatografije sastružite s ploče malom spatulom pojedine izdvojene frakcije i propustiti ih kroz mali lijevak u graduirane staklene kivete. Na taj silikagel (na kojeg su adsorbirani pojedini pigmenti) dodajte oko 1 ml acetona i mućkajte na mućkalici da se pigment eluira s čestica silikagela. Nakon toga sadržaj kivete ulijte u tamne Eppendorf-epruvete i centrifugirajte 10 min na 5000 g pri temperaturi 4 °C (taloženje silikagela). Supernatant prelijte u čiste Eppendorf-epruvete i nadopunite do volumena 1 ml. Ako je talog u Eppendorf-epruvetama ostao zelen ili žut, eluaciju pigmenata i centrifugiranje treba ponoviti i supernatant spojiti s onim dobivenim pri prvom centrifugiranju (i nadopuniti do točno 2 ml).

Apsorpcijski spektar pigmenata odredite spektrofotometrijski pri čemu obavezno koristite staklene, a ne plastične kivete. Kao slijepu probu koristite aceton. Skicirajte apsorpcijski spektar biljnih pigmenata i objasnite pri kojim valnim duljinama se nalaze maksimumi apsorpcije.

Ako je poznat molarni apsorpcijski koeficijent za pojedini pigment moguće je izračunati koncentraciju pigmenta u otopini korištenjem Lambert-Beerovog zakona:

$$A = \varepsilon \times c \times l$$

$A$  = apsorbancija  
 $\varepsilon$  = molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{L}$ )  
 $c$  = koncentracija u otopini ( $\text{mmol L}^{-1}$ )  
 $l$  = duljina optičkog puta (cm)

Molarni apsorpcijski koeficijent za klorofil *a* u 100%-tnom acetonu je  $\varepsilon = 75,05 \text{ mmol}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{L}$ , a za klorofil *b* je  $\varepsilon = 47,0 \text{ mmol}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{L}$ . Za većinu kiveta je  $l = 1 \text{ cm}$ . Na temelju tih podataka može se izračunati:

$$\text{Koncentracija klorofila } a \text{ (mmol L}^{-1}\text{)} = \frac{A_{663}}{(75,05 \text{ mmol}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{L}) \times 1 \text{ cm}}$$

$$\text{Koncentracija klorofila } b \text{ (mmol L}^{-1}\text{)} = \frac{A_{645}}{(47,0 \text{ mmol}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{L}) \times 1 \text{ cm}}$$

Da biste koncentraciju klorofila izrazili u odnosu na suhu masu tkiva (liofilizirani materijal) morate uzeti u obzir da je uzorak bio otopljen u 1 mL (ili 2 ml) acetona (eluacija sa silikagela) i da je na ploču sa silikagelom nanoseno 100 ili 200  $\mu\text{L}$  od početnog volumena ekstrakta (1,5 ml), koji je sadržavao pigmente iz 50 mg liofiliziranog tkiva.

$$\text{Sadržaj klorofila } a \text{ (}\mu\text{mol g}^{-1} \text{ suhe tvari)} = \text{konc. klorofila } a \text{ (}\mu\text{mol mL}^{-1}\text{)} \times 1 \text{ mL} \times \frac{1,5 \text{ mL}}{0,1 \text{ mL}} \times \frac{1}{0,05 \text{ g}}$$

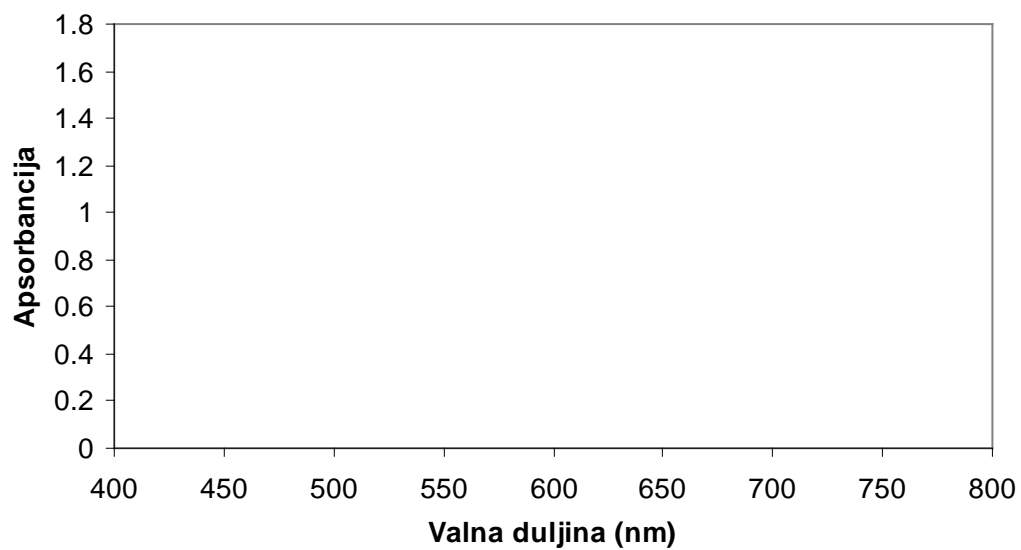
Na isti način izračunajte sadržaj klorofila *b*.

## REZULTATI

### Razdvajanje pigmenata

	Pigment	Udaljenost (cm)	R <sub>f</sub>
fronta otapala	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	<u>startna linija</u>	<u>xxx</u>	<u>xxx</u>

### Apsorpcijski spektri pojedinih pigmenata.



Koncentracija klorofila *a* ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ) =

Koncentracija klorofila *b* ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ) =

Sadržaj klorofila *a* u biljnom tkivu ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  suhe tvari) =

Sadržaj klorofila *b* u biljnom tkivu ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  suhe tvari) =

U kojem dijelu spektra su apsorpcijski maksimumi klorofila *a* i *b*?

U kojem dijelu spektra su maksimumi apsorpcije ostalih pigmenata?

Objasnite dobivenu  $R_f$  vrijednost i apsorpcijski spektar feofitina.

#### 4.8. RAZDVAJANJE FOTOSINTETSKIH PIGMENATA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti („high performance liquid chromatography“, HPLC) omogućuje razdvajanje komponenti sličnih svojstava iz smjese. Čestice stacionarne faze su vrlo sitne (promjera oko 10  $\mu\text{m}$ ) zbog čega imaju jako veliku ukupnu površinu pa je stoga moguće učinkovito razdvajanje komponenti iz smjese. Za postizanje dovoljnih brzina protoka u takvim kolonama (0,1-10 ml/min) nužni su visoki tlakovi (od nekoliko desetaka milijuna Pa).

Osnovni dijelovi sustava za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti su spremnici mobilne faze, sustav za uklanjanje plinova iz otapala, sustav za unošenje uzorka, crpke, kolona i detektor.

Od svih postupaka tekućinske kromatografije najviše se primjenjuje razdjelna kromatografija. Takva se kromatografija dijeli na kromatografiju u sustavu tekućina-tekućina i na kromatografiju u sustavu vezane faze. U prvom tipu kromatografije zadržavanje stacionarne faze na punilima kolone temelji se na fizikalnoj adsorpciji dok u sustavu vezane faze postoje kovalentne veze između punila i stacionarne faze što daje stacionarnoj fazi veću stabilnost.

Ovisno o relativnoj polarnosti mobilne i stacionarne faze razlikuju se dvije vrste razdjelne kromatografije. U prvim izvedbama tekućinske kromatografije primjenjivale su se polarne stacionarne faze i nepolane mobilne faze. Takav se tip tekućinske kromatografije danas naziva normalnom kromatografijom. Pri takvoj se kromatografiji najmanje polarni sastojak eluira prvi. Kromatografija u kojoj je stacionarna faza nepolarna, a mobilna faza polarna naziva se reverznom kromatografijom. Pri izvođenju takve kromatografije se najpolarniji sastojak eluira prvi, a najnepolarniji posljednji. Za odjeljivanje fotosintetskih pigmenata koristit ćemo reverznu kromatografiju.

Izbor detektora koji se primjenjuju pri odjeljivanju uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti ovisi o prirodi uzorka. Detekcija se može provoditi na temelju apsorbcije, fluorescencije, indeksa loma, vodljivosti, i dr. Detektor vezan uz uređaj na kojem provodimo analizu fotosintetskih pigmenata mjeri apsorbciju u vidljivom dijelu spektra. Posebnu prednost u kromatografiji predstavljaju detektori s diodnim nizom („diode array detector“, DAD) koji omogućuju simultano mjerenje apsorbcije pri velikom broju valnih duljina pa olakšavaju



određivanje pojedine komponente. Kod takvog tipa detektora polikromatska svjetlost prolazi kroz uzorak, nakon čega se rasipa na prizmi (polikromatoru) koja razdvaja svjetlost u uske vrpce sličnih valnih duljina. Svjetlost tada pada na niz dioda („array“) od kojih svaka mjeri svjetlost tog uskog dijela spektra.

## Literatura

- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. (1999). Osnove analitičke kemije. Školska knjiga, Zagreb.
- Pfeifhofer, H. (1989). Evidence of chlorophyll *b* and lack of lutein in *Neottia nidus avis* plastids. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **184**, 55-61.

## MATERIJALI

### Biljni materijal

- ekstrakt vodene leće *Lemna minor* L.
- (vidi vježbu 4.6)

### Pribor

- automatska pipeta
- tamne staklene bočice („vials“)

### Uređaji

- centrifuga
- HPLC Series 200 (PerkinElmer)
- osobno računalo s programskim paketom TotalChrom

### Kemikalije

- deionizirana voda
- acetone („HPLC grade“)
- acetonitril („HPLC grade“)
- metanol („HPLC grade“)
- etilacetat („HPLC grade“)

## NAČIN IZVOĐENJA

Pripremljene ekstrakte treba neposredno prije korištenja za HPLC centrifugirati 30 min pri 20000 g da bi se istaložile sve preostale čestice koje bi mogle smetati pri kromatografiji. Po završetku centrifugiranja uzorke automatskom pipetom prebacite u tamne staklene posudice za HPLC («vials»), začepite i posložite u ohlađeni uređaj za unošenje uzorka („autosampler“).

Za razdvajanje fotosintetskih pigmenata primjenjujemo metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti koju je uveo H. Pfeifhofer 1989. godine. Koristimo kolonu Spherisorb S5 ODS (25 × 4,6 mm) punjenu silikagelom na koji je kemijski vezan nepolarni spoj (ugljikovodik C18), i pretkolonu S5 ODS (5 × 4,6 mm).

Prije korištenja treba uključiti sve uređaje (sustav za uklanjanje plinova iz otapala, sustav za unošenje uzorka, crpke i detektor) te zatim osobno računalo i

pokrenuti program TotalChrom. Prije svake upotrebe poželjno je cijeli sustav (osobito kolonu) isprati metanolom uz protok 0,5 ml/min. Budući da računalni program TotalChrom „vodi“ cijeli postupak treba podesiti sve željene parametre: protok, volumen uzorka koji će se nanijeti i redoslijed uzimanja uzoraka, iz kojih će se spremnika koristiti otopine za eluciju i u kojem volumnom omjeru, rad pumpi i način na koji će se vršiti elucija (mobilnom fazom nepromijenjenog sastava ili gradijentnom elucijom), trajanje elucije, valne duljine detekcije i dr.)

U cilju boljeg razdvajanja pigmenata primijenit ćemo gradijentnu eluciju pri čemu ćemo linearni gradijent tijekom izvedbe ostvariti pomoću dviju otopina:

**otopina A:** smjesa acetonitrila, deionizirane vode i metanola u omjeru 100:10:5 (v/v/v)

**otopina B:** smjesa acetona i etilacetata u omjeru 2:1 (v/v).

Na početku postupka volumni udio otopine A iznosi 90%, a na kraju (nakon 18 minuta) 30%. Brzina protoka je 1 ml/min.

Rezultati dobiveni mjerenjem apsorbancije pri 440 nm bilježit će se i pratiti na zaslonu računala tijekom elucije. Za interpretaciju rezultata koriste se već od ranije poznati podaci o retencijskom vremenu svakog pigmenta. Na temelju površine ispod svakog maksimuma koji predstavljaju pigmente iz naših uzoraka i usporedbom s površinom ispod maksimuma standardnog uzorka poznate koncentracije pigmenata mogu se izračunati koncentracije pigmenata u uzorcima.

Primijenjenom kromatografskom metodom se u ekstraktu vodene leće mogu razdvojiti i odrediti količine violaksantina, neoksantina, anteraksantina, luteina, klorofila *a*, klorofila *b* te  $\beta$ -karotena.

## REZULTATI

### Kromatogram

## Retencijska vremena za pojedine pigmente

Violaksantin

Neoksantin

Anteraksantin

Lutein

Klorofil *a*

Klorofil *b*

$\beta$ -karoten

#### 4.9. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE KOLIČINE UKUPNIH KLOOROFILA I KAROTENOIDA

Omjer klorofila *a* i klorofila *b* u fotosintetskim membranama kloroplasta najčešće je 3:1. Okolišni uvjeti, kao što su intenzitet svjetlosti te prisutnost onečišćenja u okolišu mogu promijeniti taj omjer. Količina karotenoida (karotena i ksantofila) kao pomoćnih i zaštitnih pigmenata u apsorpciji svjetlosti također ovisi o uvjetima rasta te o prisutnosti stresnih uvjeta.

Za određivanje količine klorofila i ukupnih karotenoida u zelenim dijelovima biljke često se koristi spektrofotometrijska metoda koja se temelji na ekstrakciji pigmenata u 80%-tnom acetonu i spektrofotometrijskom mjerenju pri valnim duljinama od 663 nm i 645 i 470 nm.

Budući da apsorpcijski spektri pojedinih fotosintetskih pigmenata i ekstinkcijski koeficijenti ovise o otapalu (aceton, metanol, dietil eter...) matematičke jednadžbe za određivanje količine klorofila u različitim otapalima se razlikuju.

Zadatak ove vježbe je ekstrakcija biljnih pigmenata iz vodene leće te spektrofotometrijsko određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata u ekstraktima. U radu ćemo koristiti dvije skupine biljaka – jedne su uzgojene u optimalnim uvjetima a druge su bile izložene kemikaliji ili okolišnom čimbeniku koji djeluju na fotosintetske pigmente.

#### Literatura

Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* 148, 350-382.

Welburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144, 307-313.

#### MATERIJAL

##### Biljni materijal

-vodena leća *Lemna minor* L.  
uzgajana u prisutnosti kadmija  
(tretman) i bez (kontrola)

##### Reagens

-80%-tni aceton

##### Pribor i uređaji

-pinceta  
-filtar papir  
-tarionik  
-automatska pipeta  
-eppendorf epruvete  
-kivete  
-centrifuga  
-spektrofotometar

## NAČIN IZVOĐENJA

Uzmite pincetom malu količinu vodenih leća iz kontrolne tikvice te onih koje su bile izložene tretmanu i položite ih na filtar papir da se upije tekućina. Zatim vagnite po 100 mg biljaka i homogenirajte u hladnom tarioniku u 3 ml ohlađenog 80%-tnog acetona.

Pomoću Pasteurove pipete raspodijelite homogenat u dvije Eppendorf-epruvete koje stavite centrifugirati u ohlađenu centrifugu (+4 °C) 10 min na  $5000 \times g$ . Supernatant prelijte u čistu Eppendorf epruvetu. Izmjerite apsorbanciju pri valnim duljinama 470, 646 i 663 nm. Pri tom koristite staklene kivete, a kao slijepu probu 80%-tni aceton. Koncentraciju fotosintetskih pigmenata izračunajte prema sljedećim jednadžbama:

$$c_{chl\ a} = 12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646} [\mu\text{g ml}^{-1}]$$

$$c_{chl\ b} = 20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663} [\mu\text{g ml}^{-1}]$$

$$c_{car} = 1000 \times A_{470} - 3,27 \times c_a - 104 \times c_b / 198$$

## REZULTATI

	$A_{645}$	$A_{663}$	$A_{470}$	Količina klorofila ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
Kontrolne biljke				
Biljke izložene tretmanu				

#### 4.10. DOKAZIVANJE ŠKROBA U LISTOVIMA

Ako se otpremanje produkata fotosinteze ne odvija jednako brzo kao i nastajanje, višak se gomila u stromi kloroplasta u obliku škroba (primarni ili asimilacijski škrob).

Škrob je najvažniji pričuvni polisaharid u biljkama. U većini slučajeva sastoji se od dvaju molekularnih oblika - amiloze i amilopektina. Amilozu čini otprilike 200-1000 glukoernih jedinica povezanih  $\alpha$ -1,4-vezama. Na jednom kraju molekule nalazi se glikozidni C-atom (reducirajući kraj), a na drugom C-atom s hidroksilnom skupinom (nereducirajući kraj). Relativna molekularna masa je  $10^4 - 10^5$ . Lančasta molekula uvinuta je u spiralu. Karakteristično obojenje s  $I_2$ -KI posljedica je ulaganja molekularnog joda ( $I_2$ ) u spiralu, što uzrokuje snažnu apsorpciju dugovalnog zračenja pa se pojavljuje plavoljubičasto obojenje kompleksa škroba s jodom. Amiloza je većinom topljiva u vrućoj vodi. Molekula amilopektina sastoji se od 2 000-22 000 glukoernih jedinica (mol. masa  $5 \times 10^4 - 10^6$ ). Za razliku od amiloze, molekula amilopektina je razgranjena zbog prisutnosti  $\alpha$ -1,6-veza. Bočni lanci zbog toga nemaju reducirajući kraj. Razgranjenje se javlja otprilike na svakih 25-30  $\alpha$ -1,4-veza. Vjerojatno su glavni lanac i bočni lanci također uvijeni. Amilopektin se koloidno otapa u vrućoj vodi. S otopinom  $I_2$ -KI daje slabo ljubičasto do ružičasto obojenje jer u odnosu na amilozu ima kraće spiralne dijelove.

U sjemenkama nekih sorti ječma, kukuruza i riže škrob se sastoji gotovo isključivo od amilopektina, dok sjemenke nekih drugih sorti kukuruza te graška imaju pričuvni škrob koji sadrži između 50 i 80% amiloze.

Sinteza škroba odvija se u kloroplastima i amiloplastima. U kloroplastima počinje od viška trioza-fosfata stvorenog u Calvinovom ciklusu. Trioza-fosfat je također početni spoj u sintezi saharoze. Sinteza škroba i saharoze su kompetitivni procesi, a razdioba trioza-fosfata kao supstrata u sintezi škroba u kloroplastu i sintezi saharoze u citosolu regulirana je koncentracijom ortofosfata ( $P_i$ ) u tim staničnim odjeljcima. Kada je koncentracija  $P_i$  u citosolu visoka, trioza-fosfat iz kloroplasta odlazi u citosol u zamjenu za  $P_i$  i služi kao supstrat u sintezi saharoze. Kada je koncentracija  $P_i$  u citosolu niska, trioza-fosfat ostaje u kloroplastu kao supstrat u sintezi škroba.

Sintaza škroba je enzim odgovoran za spajanje  $\alpha$ -1,4-glikozidnih veza pri sintezi amiloze i amilopektina. Ona katalizira prijenos glukoze s ADP-glukoze na nereducirajući kraj lanca  $\alpha$ -1,4-glukana. Nastanak  $\alpha$ -1,6-grananja u amilopektinu katalizira enzim grananja amilo-(1,4 - 1,6)-transglikozilaza (Q-enzim).

## MATERIJAL

### Biljni materijal

- pelargonija
- biljka s panaširanim listovima (npr. *Zebrina*)

### Reagensi

- 96%-tni etanol
- Lugolova otopina ( $I_2$ -KI)
- koncentrirana otopina KOH

### Pribor

- staklena čaša
- Erlenmeyerova tikvica
- Petrijeva zdjelica
- filtar papir
- aluminijska folija
- vazelin
- električno kuhalo
- svjetiljka

## NAČIN IZVOĐENJA

S biljaka otkinite sljedeće listove:

1. panaširani list
2. list pokriven šablonom
3. potpuno pokriveni list (list iz tame)
4. nepokriveni list (list sa svjetla)
5. list iz tikvice u kojoj se nalazi koncentrirana otopina KOH\*

Otkinute listove stavite u čašu s kipućom vodom i kuhajte 1 minutu. Zatim prebacite listove u čašu s etanolom ugrijanim do vrenja, čašu pokrijte aluminijskom folijom i kuhajte na električnom kuhalu (ne na plameniku!) dok listovi posve ne izblijedu (oko 5 minuta). Isperite listove destiliranom vodom, nježno ih posušite filter papir i uronite u Lugolovu otopinu. Nakon nekoliko minuta listove kratkotrajno isperite vodom i osušite između dva filter papira.

\*Neotkinuti list biljke koja je bila dva dana u tami stavljen je u tikvicu u kojoj se nalazi 10 ml koncentrirane otopine KOH. Zatim je tikvica pažljivo zatvorena probušenim i raspolovljenim gumenim čepom, a sve pukotine premazane vazelinom. Nakon stavljanja u tikvicu list je izložen jakoj svjetlosti u trajanju dva sata.

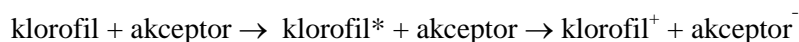
## REZULTATI

panaširani list	list pokriven šablonom	potpuno pokriveni list (list iz tame)	nepokriveni list (list sa svjetla)	list iz tikvice s KOH
-----------------	---------------------------	---	---------------------------------------	--------------------------



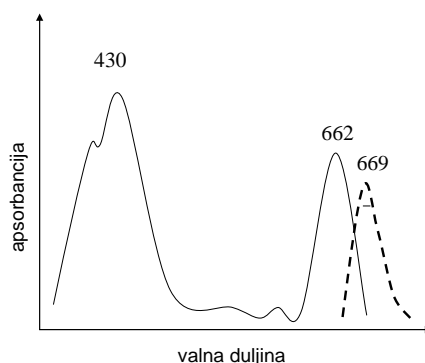
#### 4.11. FLUORESCENCIJA KLOROFILA

U kloroplastima zelenih listova molekule fotosintetskih pigmenata su raspoređene u dva fotosistema. Fotosistem čine molekule klorofila i karotenoida u interakciji s proteinima, reakcijsko središte i primarni akceptor elektrona. Pigmenti apsorbiraju svjetlosnu energiju i prenose ju do reakcijskog središta gdje u specijaliziranoj molekuli klorofila *a* dolazi do razdvajanja naboja, tj. predaje elektrona akceptorskoj molekuli. Taj proces predstavlja pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku:



U optimalnim okolišnim uvjetima se najveći dio apsorbirane energije (oko 95%) koristi za fotokemijske reakcije fotosinteze, međutim dio se energije gubi u obliku topline i svjetlosti, pri čemu nastaje fenomen koji nazivamo fluorescencija klorofila. Tri spomenuta načina oslobađanja energije prilikom deekscitacije klorofila su u međusobnoj kompeticiji što znači da povećanje učinkovitosti jednog od njih dovodi do smanjenja druga dva.

Svjetlost oslobođena fluorescencijom je veće valne duljine od apsorbirane svjetlosti, što znači da emisijski spektar klorofila ima maksimum u crvenom području, pri nešto većoj valnoj duljini od maksimuma apsorpcijskog spektra klorofila u crvenom području (slika 1).

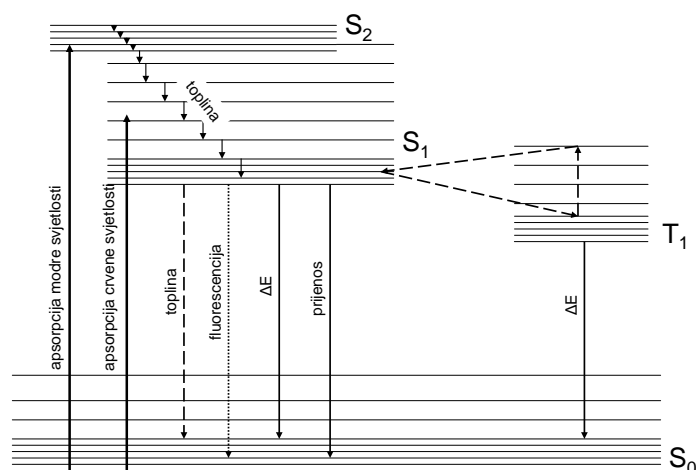


Slika 1. Apsorpcijski spektar klorofila *a* (—) i spektar svjetlosti oslobođene fluorescencijom (----).

Molekule klorofila u otopini nisu organizirane u funkcionalne komplekse i pokazuju prinos fluorescencije od 20-35%, dok u intaktnim listovima prinos iznosi svega 1-3%.

#### 4.11.1. FLUORESCENCIJA KLOROFILA U OTOPINI

Pri apsorpciji svjetlosti u molekuli klorofila neki od  $\pi$  elektrona prelaze iz osnovnog u pobuđeno stanje. Prema zakonima kvantne mehanike taj prijelaz je moguć samo kada apsorbirana energija točno odgovara energetskej razlici između osnovnog i pobuđenog stanja. Slika 2 prikazuje energetske razine i prijelaze elektrona u molekuli klorofila *a*.



Slika 2. Prikaz energetskih razina i prijelaza elektrona u molekuli klorofila *a*. Osnovno stanje molekule klorofila je singletno stanje ( $S_0$ ). Apsorpcijom crvene i modre svjetlosti delokalizirani vanjski elektroni ( $\pi$  elektroni) se podižu u više orbitale ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ), tj. u pobuđeno singletno ( $S_1$  ili  $S_2$ ) ili tripletno stanje ( $T$ ). Apsorpcija modre svjetlosti rezultira stanjem  $S_2$  koje je toliko nestabilno da se energija oslobođena tijekom vrlo brzog prijelaza  $S_2 \rightarrow S_1$  u potpunosti izgubi u obliku topline. Prijelaz  $S_1 \rightarrow S_0$  je sporiji pa su moguće i druge konverzije energije: emisija kvanta svjetlosti (fluorescencija), prijenos energije na susjedne molekule i oslobađanje elektrona bogatog energijom, tj. fotokemijska redoks reakcija ( $\Delta E$ ). U fotokemijskoj pretvorbi energije sudjeluje singletno stanje klorofila. Relativno dugotrajno, tripletno stanje je stabilnije u odnosu na  $S_1$  stanje. Tripletno stanje je pri optimalnim uvjetima u intaktnim kloroplastima rijetko prisutno, no redovita je pojava prilikom osvjetljavanja otopljenog klorofila u uvjetima *in vitro*.

Osnovno i pobuđeno stanje molekula, za razliku od atoma, sadrže mnogo bliskih energetskih razina, što je rezultat vibracija i rotacija unutar molekule. Klorofil ima dva moguća pobuđena stanja: prvo ( $S_1$ ) i drugo ( $S_2$ ) singletno stanje, pa stoga ima dva apsorpcijska maksimuma. Postojanje niza bliskih energetskih razina u

molekulama rezultira znatno širim apsorpcijskim vrpčama u odnosu na one kod atoma.

Pri povratku pobuđenog elektrona u osnovno stanje ( $S_0$ ) dio apsorbirane energije se oslobađa u obliku topline i svjetlosti (fluorescencija) a dio se prenosi na susjedne molekule i koristi za fotokemijske reakcije fotosinteze. U funkcionalnom fotosintetskom aparatu glavnina apsorbirane energije (~95) se prenosi na susjedne molekule pigmenta.

Kao što je u uvodnom dijelu napomenuto, fluorescentna svjetlost ima veću valnu duljinu od apsorbirane svjetlosti, što znači da fluorescencijski spektar klorofila ima maksimum pri nešto većoj valnoj duljini od maksimuma apsorpcijskog spektra. Naime, pri povratku iz pobuđenog u osnovno stanje i oslobađanju energije fluorescencijom prethodi deekscitacija preko niza bliskih energetske razina vibracijskom relaksacijom pri čemu se gubi dio energije (slika 2).

Cilj ove vježbe je uočiti i objasniti fluorescenciju otopine klorofila.

### **Literatura**

- B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones (2000). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Courier Companies Inc.
- H. Mohr, P. Schopfer (1995). Plant Physiology. Springer-Verlag, Berlin.
- U. Schreiber, W. Bilger, H. Hormann, C. Neubauer (2000). Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. U: Photosynthesis: A Comprehensive Treatise. A. S. Raghavendra (urednik). Cambridge University Press.

### **MATERIJAL**

- UV-svjetiljka
- alkoholni ili acetonski ekstrakt zelenog lista
- epruveta
- drvena štikaljka

### **NAČIN IZVOĐENJA**

UV-svjetiljku uključite 20 minuta prije upotrebe. Ulijte priređeni ekstrakt zelenog lista u epruvetu, uhvatite ju drvenom štikaljkom i stavite pod UV-svjetiljku. Promatrajte fluorescenciju klorofila.

## REZULTATI

Nacrtajte uočenu pojavu fluorescencije klorofila u otopini.

Zašto fluorescenciju klorofila u zelenim biljkama ne možemo vidjeti golim okom?

#### 4.11.2. MJERENJE FLUORESCENCIJE KLOOROFILA U UVJETIMA *in vivo*

(Metoda saturacijskog pulsa)

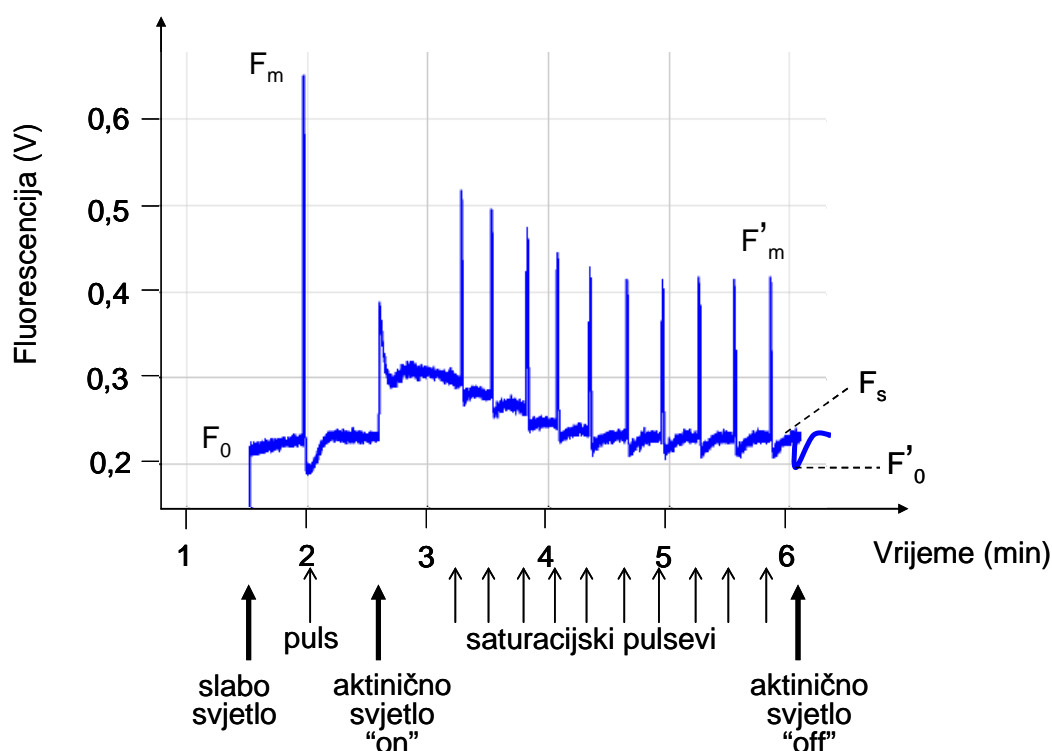
Svjetlost emitirana fluorescencijom predstavlja vrlo mali udio u svjetlosti reflektiranoj s listova biljaka pa se može detektirati samo preciznim uređajima - fluorimetrima. U posljednjem desetljeću su mjerenja i analize fluorescencije klorofila postali nezaobilazni u istraživanjima primarnih reakcija fotosinteze. U području fiziologije i ekofiziologije bilja primjenjuje se nekoliko metoda mjerenja fluorescencije, a jedna od njih je metoda saturacijskog pulsa.

Iz razloga koji još nisu u potpunosti objašnjeni, glavina fluorescencije klorofila u intaktnim listovima potječe s fotosistema II (PSII) pa se stoga izmjerena fluorescencija smatra odrazom stanja PSII. U lancu prijenosa elektrona u tilakoidnim membranama kloroplasta se elektroni s PSII prenose na molekule plastokinona. Intenzitet fluorescencije ( $\Phi_F$ ) u velikoj mjeri ovisi o tome koliki je udio plastokinona u reduciranom stanju. Pri niskom intenzitetu svjetlosti, molekule plastokinona su oksidirane i kao takve mogu primiti elektrone. U takvim uvjetima se ekscitacijska energija s velikom učinkovitošću (većom od 95%) troši na fotokemijske reakcije a intenzitet fluorescencije je vrlo nizak. Međutim, pri jačem intenzitetu osvjetljenja ne može se iskoristiti sva apsorbirana svjetlosna energija zbog malog udjela oksidiranih plastokinona koji bi mogli primiti elektrone s PSII pa se u takvim uvjetima veći dio apsorbirane svjetlosne energije oslobađa u obliku fluorescencije. Ukoliko se nakon početnog porasta intenziteta fluorescencije ustali određena stopa prijenosa elektrona i dinamika odvijanja Calvinovog ciklusa, dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije, tzv. gašenja fluorescencije („quenching“). Razlikuju se dva tipa gašenja fluorescencije: fotokemijsko i nefotokemijsko gašenje. Fotokemijsko gašenje („photochemical quenching“, qP) je pojava smanjenja intenziteta fluorescencije kada je većina akceptora elektrona u lancu prijenosa elektrona oksidirana, tj. raspoloživa za primanje elektrona. Nefotokemijsko gašenje („nonphotochemical quenching“, NPQ) ima značenje u uvjetima visokih intenziteta svjetlosti kada se sva apsorbirana energija ne može upotrijebiti za fotokemijske reakcije pa se oslobađa u obliku topline. Jedan od procesa koji doprinosi nefotokemijskom gašenju je ksantofilski ciklus.

Ukoliko različiti okolišni čimbenici ili prisutnost ksenobiotika (npr. herbicida) ometaju stopu prijenosa elektrona, vrijednost gašenja fluorescencije će biti manja, a prinos fluorescencije veći.

### Metoda saturacijskog pulsa

U okviru ove vježbe izmjerit ćemo, izračunati i objasniti najčešće korištene fiziološke pokazatelje (parametre) koji se mogu dobiti primjenom metode saturacijskog pulsa. Tijek mjerenja prikazan je na slici 3.



Slika 3. Mjerenje fluorescencije klorofila metodom saturacijskog pulsa.

Prije mjerenja, list (ili suspenziju jednostaničnih algi) treba ostaviti u uvjetima tame da bi se molekule plastokinona oksidirale. Postupak mjerenja počinje obasjavanjem lista crvenom svjetlošću niskog intenziteta (oko  $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), nedovoljnog za pokretanje fotokemijske reakcije. U takvim uvjetima se mjeri minimalna razina fluorescencije klorofila u listu prilagođenoj na uvjete tame ( $F_0$ ). Nakon toga se primijeni saturacijski puls, tj. kratkotrajna svjetlost visokog intenziteta ( $\sim 5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) koja uzrokuje redukciju svih akceptora elektrona s reducirajuće strane PSII i rezultira maksimalnom vrijednošću fluorescencije -  $F_m$ . U tom trenutku

nije prisutno fotokemijsko gašenje fluorescencije. Iz izmjerenih vrijednosti  $F_0$  i  $F_m$  izračunava se optimalna učinkovitost PSII (formula 1).

Slijedi uključivanje bijelog svjetla („actinic light“) koje je dovoljne jakosti da može pokrenuti i podržavati proces fotosinteze. Aktinično svjetlo ostaje uključeno do kraja pokusa, tijekom kojeg se u određenim intervalima primjenjuju saturacijski pulsevi, pri čemu se bilježe vrijednosti maksimalne fluorescencije ( $F'_m$ ) te fluorescencije ravnotežnog stanja ( $F_s$ ) u listu prilagođenome na uvjete svjetla. Mjerenje završava gašenjem aktinične svjetlosti te očitavanjem  $F'_0$  vrijednosti (minimalna vrijednost fluorescencije pri crvenom osvjetljenju u listu prilagođenom na uvjete svjetla). Iz očitanih vrijednosti izračunajte i preostale pokazatelje učinkovitosti PSII: efektivnu učinkovitost fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ , formula 2), stopu prijenosa elektrona (ETR, formula 3), fotokemijsko gašenje (qP, formula 4) i nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ, formula 5).

### **Izračunavanje fizioloških pokazatelja učinkovitosti PSII:**

#### *1. Optimalni prinos PSII (maksimalna učinkovitost PSII)*

$$(F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m \quad (\text{formula 1})$$

Razlika između maksimalne i minimalne fluorescencije naziva se varijabilnom fluorescencijom ( $F_v$ ). Omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije u listu prilagođenom na uvjete tame je mjera optimalnog prinosa PSII, tj. njegove učinkovitosti u uvjetima kada su svi reakcijski centri oksidirani. Za većinu biljnih vrsta optimalna vrijednost iznosi  $\sim 0,7-0,8$ .

#### *2. Efektivna učinkovitost PSII ( $\Phi_{PSII}$ )*

$$\Phi_{PSII} = (F'_m - F_s) / F'_m = \Delta F / F'_m \quad (\text{formula 2})$$

$F_s$  (fluorescencija ravnotežnog stanja) je prinos fluorescencije lista prilagođenog određenoj količini svjetlosti.  $F'_m$  (maksimalna fluorescencija) mjeri se nakon primjene impulsa saturacijske svjetlosti u listu prilagođenom uvjetima svjetla. Iz ovih podataka računa se efektivna učinkovitost PSII ( $\Phi_{PSI}$ ), koji je mjera udjela svjetlosti apsorbirane klorofilom vezanim uz PSII i energije iskorištene u fotokemijskim reakcijama.

### 3. Stopa prijenosa elektrona („electron transport rate, ETR“)

$$ETR = \Phi_{\text{PSII}} \times \text{PFD} \times 0,5 \quad (\text{formula 3})$$

Budući da  $\Phi_{\text{PSII}}$  predstavlja efektivnu učinkovitost fotokemijske reakcije na PSII, ta se vrijednost može koristiti za izračun stope necikličkog prijenosa elektrona. PFD („photon flux density“) je intenzitet apsorbirane svjetlosti ( $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a faktor 0,5 uzima se zbog pretpostavke o podjednakoj eksitaciji PSI i PSII.

### 4. Fotokemijsko gašenje (*qP*)

$$qP = (F'_m - F_s) / (F'_m - F'_0) \quad (\text{formula 4})$$

*qP* odražava redoks-stanje primarnog akceptora elektrona PSII (plastokinona), tj. pokazatelj je udjela oksidiranih reakcijskih centara na PSII.

### 5. Nefotokemijsko gašenje (*NPQ*)

$$NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m \quad (\text{formula 5})$$

*NPQ* odražava gubitak energije u obliku topline, povezano s promjenom pH vrijednosti lumena tilakoida.

## Literatura

- Maxwell, K., Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659-668.
- Schreiber, U., Bilger, W. Neubauer, C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. Str. 49–70. U: Schultz E. D. i Caldwell, M. M. (urednici). *Ecophysiology of Photosynthesis*. Ecological Studies 100. Springer, Berlin, Germany.

## MATERIJAL

### Biljni material

-biljka lončanica,  
npr. pelargonija

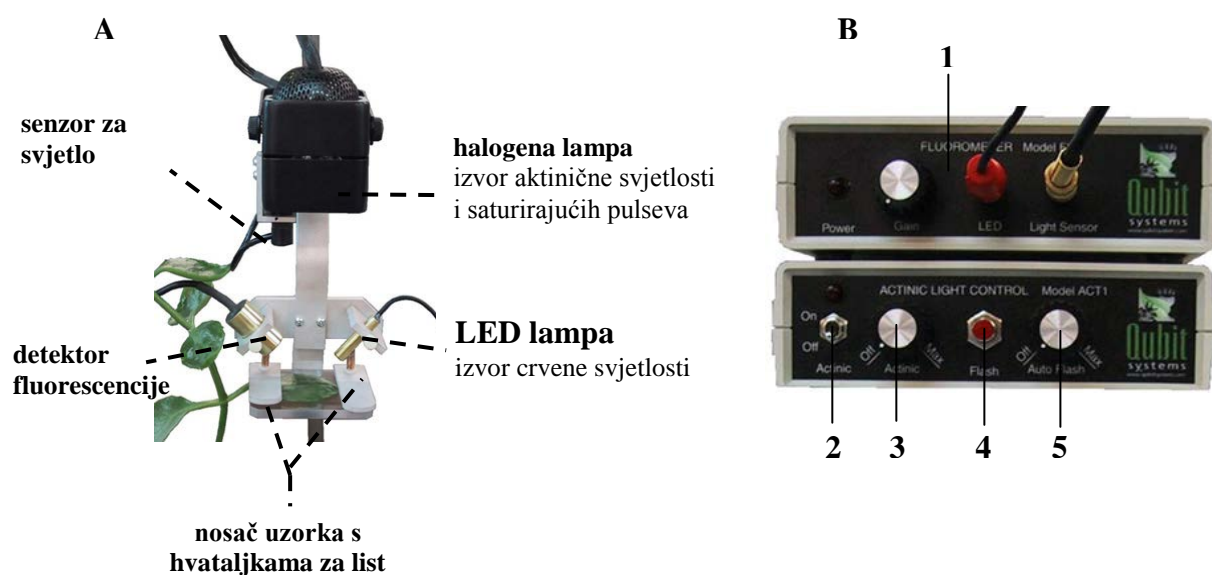
### Uređaji i pribor

-Qubit sustav za mjerenje fluorescencije  
-Elektroničko računalo i pripadajući program za mjerenje fluorescencije



## NAČIN IZVOĐENJA

Fluorescenciju klorofila *in vivo* mjerit ćemo metodom saturacijskog pulsa na listu pelargonije pomoću Qubit sustava (slika 4A). Fluorescencija klorofila pobuđuje se moduliranom crvenom svjetlošću niskog intenziteta ( $I = \sim 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $\nu = 50 \text{ Hz}$ ) koju proizvodi izvor svjetlosti LED, a bilježi se detektorom fluorescencije spojenim na fluorimetar (slika 4B gore). Halogena svjetiljka proizvodi kontinuiranu bijelu svjetlost dovoljno visokog intenziteta za fotosintezu (tzv. aktinična svjetlost). Na kontrolnoj jedinici za aktiničnu svjetlost (slika 4B dolje) nalaze se potenciometar za podešavanje intenziteta aktinične svjetlosti (3), gumb za manualnu (4) te potenciometar za podešavanje automatske primjene saturacijskog pulsa intenziteta  $\sim 5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (5).



Slika 4. **A.** Sustav za mjerenje fluorescencije. **B.** Kontrolne jedinice - **gore:** Florimetar s potenciometrom za regulaciju intenziteta crvene svjetlosti (1). **B. dolje:** Jedinica za kontrolu aktinične svjetlosti sa sklopkom za paljenje (2), potenciometrom za podešavanje intenziteta aktinične svjetlosti (3), gumb za manualnu primjenu pulsa (4) i potenciometar za kontrolu automatske primjene pulsa (5).

Mjerenjem minimalne i maksimalne fluorescencije na listu prilagođenom na uvjete tame ( $F_0$ ,  $F_m$ ) i uvjete svjetla ( $F_s$ ,  $F'_m$ ) dobit ćete podatke iz kojih ćete nakon završenog mjerenja izračunati optimalnu ( $F_v / F_m$ ) i efektivnu učinkovitost PSII ( $\Delta F / F'_m$ ). Također izračunajte stopu prijenosa elektrona (ETR) te fotokemijsko (qP) i nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ).

#### Postupak mjerenja

1. Prije mjerenja stavite biljni materijal u tamu na 30 min. Uključite računalo te pokrenite program Logger Pro 3.2. Pripremite uređaj za mjerenje fluorescencije u uvjetima *in vivo*, uključite izvor crvene (LED) i bijele svjetlosti (halogena lampa). Nakon što pomoću lijevog potenciometra (označen brojem 3 na slici 4A) namjestite intenzitet bijele svjetlosti na vrijednost  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ugasite bijelu svjetlost. Zamračite prostoriju.
2. Uz crveno osvjetljenje LED lampe postavite list biljke prilagođene na uvjete tame na nosač uzorka te pokrenite mjerenje pritiskom na ikonu „New“. Postupak mjerenja počinje obasjavanjem lista crvenom svjetlošću niskog intenziteta ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ,  $I = \sim 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), nedovoljnog za pokretanje fotokemijskih reakcija. Pomicanjem lampe LED i fluorimetra prilagodite prinos fluorescencije na signal jačine  $\sim 0,3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Nakon što ste zabilježili vrijednost minimalne razine fluorescencije klorofila ( $F_0$ ), pritisnite gumb za primjenu saturacijskog pulsa ( $t = 0,8 \text{ s}$ ;  $I = \sim 5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) što rezultira maksimalnom vrijednošću fluorescencije u listu prilagođenome na uvjete tame ( $F_m$ ). Iz izmjerenih vrijednosti  $F_0$  i  $F_m$  ćete nakon završetka pokusa izračunati optimalni prinos PSII (formula 1).
3. Nastavak mjerenja provodi se pri bijelom osvjetljenju intenziteta dovoljno visokog za pokretanje fotokemijskih reakcija. Pritisnite sklopku za uključenje bijele svjetlosti („actinic light“) čiji ste intenzitet prethodno namjestili na  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Primijetit ćete kratkotrajni porast signala fluorescencije.
4. Nakon što se signal fluorescencije ustalio, pomoću desnog potenciometra definirajte učestalost primjene saturacijskih pulseva. Na ekranu ćete nakon svake primjene saturacijskog pulsa primijetiti pik koji odgovara vrijednosti maksimalne fluorescencije u listu prilagođenome na uvjete svjetla. Mjerenje nastavite dok se signal maksimalne fluorescencije ne ustali i tek tada očitajte vrijednosti  $F_s$

(fluorescencija ravnotežnog stanja) i  $F'_m$  (maksimalna fluorescencija). Ugasite aktiničnu svjetlost (list ostaje i dalje osvjetljen crvenom svjetlošću) te očitajte minimalnu fluorescenciju ( $F'_0$ ) u listu prilagođenom na uvjete svjetla. Zaustavite mjerenje pritiskom na ikonu „Stop“ te sačuvajte podatke („Save as“).

5. Obradite dobivene podatke i očitajte vrijednosti  $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F'_m$ ,  $F_s$  i  $F'_0$ .

## REZULTATI

Iz vrijednosti dobivenih mjerenjem fluorescencije izračunajte optimalnu ( $F_v / F_m$ ; formula 1) i efektivnu učinkovitost PSII ( $\Phi_{PSII}$ , formula 2), stopu prijenosa elektrona (ETR, formula 3), fotokemijsko gašenje (qP, formula 4) i nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ, formula 5).

$F_v / F_m =$

$\Phi_{PSII} =$

ETR =

qP =

NPQ =

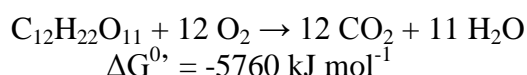
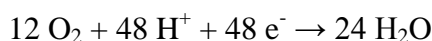
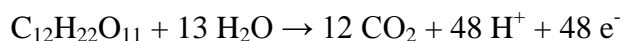
Opišite i objasnite razliku učinkovitosti PSII u uvjetima tame (optimalni prinos PSII) i u uvjetima svjetla (efektivni prinos PSII).

## 5. DISANJE

Fotosintezom se osiguravaju ugljikohidrati iz kojih se procesom disanja postupno oslobada energija i privremeno pohranjuje u molekulama ATP-a. Razgradnjom ugljikohidrata također nastaju međuspojevi koji su prekursori za biosinteze organskih spojeva potrebnih biljci za izgradnju staničnih strukturnih i funkcionalnih elemenata. Energija vezana u molekuli ATP-a koristi se za stanični rad, npr. za sintezu gradivnih tvari stanice, membranski prijenos i polimerizaciju citoskeletnih elemenata.

Kao supstrat za proces disanja najčešće se spominje glukoza. Međutim, u biljnoj stanici ugljikovi spojevi koji ulaze u proces disanja su disaharid saharoza, heksoza fosfati i trioza fosfati koji nastaju razgradnjom škroba i fotosintezom te fruktani (npr. inulin), neki drugi šećeri, lipidi (prvenstveno triacilgliceroli), organske kiseline i ponekad proteini.

U kemijskom smislu, disanje u biljaka se izražava kao oksidacija molekule od 12 C-atoma (saharoze) i redukcija 12 molekula kisika. To su dvije vezane redoks-reakcije u kojima se saharoza oksidira do CO<sub>2</sub> dok kisik služi kao akceptor elektrona pri čemu se reducira u vodu.



Promjena standardne slobodne energije za te dvije reakcije iznosi -5760 kJ mol<sup>-1</sup> (342 g oksidirane saharoze). Od toga se 3010 kJ mol<sup>-1</sup> konzervira u obliku ATP-a (52% od standardne slobodne energije oslobođene prilikom potpune oksidacije saharoze).

Kao što je ranije spomenuto, sav ugljik koji uđe u proces staničnog disanja neće se pretvoriti u CO<sub>2</sub> jer su mnogi međuspojevi u toj razgradnji ujedno početni spojevi za procese kao što su npr. biosinteza lipida, aminokiselina, nukleotida i elemenata stanične stijenke.

Stanično disanje u biljaka obuhvaća četiri glavna procesa: glikolizu, ciklus limunske kiseline (Krebsov ciklus), ciklus pentoza fosfata i oksidativnu fosforilaciju.

## 5.1. RAZGRADNJA ŠKROBA ENZIMOM AMILAZA

Sjemenke pšenice i drugih žitarica kao pričuvenu tvar sadrže škrob. Za vrijeme klijanja u sjemenkama se sintetizira enzim amilaza koja razgrađuje škrob, a produkt razgradnje su šećeri potrebni za rane procese rasta i razvoja mlade biljke.

Škrob je polimer glukoze, a prisutan je u obliku nerazgranate molekule amiloze koja se sastoji od glukoznih jedinica vezanih  $\alpha$ -1,4-vezom te u obliku razgranate molekule – amilopektina. Molekula amilopektina ima jednu  $\alpha$ -1,6 vezu na svakih 30-tak  $\alpha$ -1,4-veza. Amilaze su enzimi koji hidrolitički cijepaju molekulu škroba:  $\alpha$ -amilaza je endoenzim koji razgrađuje i amilozu i amilopektin, a  $\beta$ -amilaza je egzoenzim koji djeluje samo na glukozne jedinice koje se nalaze na nereducirajućem kraju lanca.

Aktivnost enzima amilaze ekstrahiranog iz proklijalih sjemenki pšenice može se odrediti praćenjem modrog obojenja koje nastaje u reakciji škroba i Lugolove otopine ( $I_2KI$ ). Ovo karakteristično obojenje rezultat je ulaganja molekularnog joda u spiralni lanac molekule škroba što uzrokuje snažnu apsorpciju dugovalnog zračenja i pojavu modroljubičastog obojenja.

U našem pokusu promjena modre boje u crvenkasto-smeđu predstavlja mjeru brzine enzimske reakcije razgradnje škroba. Na temelju promjene boje zaključujemo nakon koliko se vremena postiže polovica maksimalne brzine enzimske reakcije ( $1/2 V_{max}$ ). To vrijeme označavano kao  $t_{1/2}$ .

Da bismo odredili ovisnost brzine razgradnje škroba o koncentraciji enzima amilaze, izlagat ćemo uvijek istu količinu supstrata (škroba) različitim koncentracijama enzima u vremenu  $t_{1/2}$ .

## MATERIJAL

### Biljni materijal

-proklijale sjemenke pšenice

### Reagensi

-vodena otopina škroba (0,4% w/v)  
-otopina  $I_2KI$  (1:40, v/v)  
(matična otopina: 1 g  $I_2$  + 2 g KI  
u 100 ml dest.vode)

### Uređaji

-vaga  
-centrifuga  
-spektrofotometar

### Pribor

-tarionik  
-4 kivete  
-kapalica  
-pinceta  
-kivete  
-stakleni štapić  
-kutija s ledom  
-mala epruveta (~10 ml)  
-2 menzure od 5 ml  
-staklene čaše od 50 i 250 ml  
-pločica s jažicama, 2 kom.  
-pipete od 2; 5 i 10 ml  
-zaporni sat  
-bijeli karton  
-5 bočica sa čepovima  
-5 odmjernih tikvica od 100 ml

## NAČIN IZVOĐENJA

### Priređivanje ekstrakta amilaze

Homogenirajte u tarioniku 40-ak prokljalih sjemenki pšenice (izdanak uklonite) uz dodatak 50 ml destilirane vode. Ekstrakt razdijelite u 4 kivete, tarirajte i centrifugirajte (5 min pri 500 g). Supernatant, u kojem se nalazi enzim amilaza, odlijte u čašu od 50 ml. Uzorke amilaze u kivetama, odnosno u čaši uvijek čuvajte na hladnom (u kutiji s usitnjenim ledom).

### Određivanje vremena nakon kojeg se postiže polovica maksimalne brzine reakcije ( $v = 1/2 V_{max}$ )

Kapnite jednu do dvije kapi otopine  $I_2KI$  u svaku jažicu na staklenoj pločici. U određeno početno vrijeme ( $t = 0$ ) pomiješajte u maloj epruveti 2 ml ekstrakta i 2 ml 0,4%-tne otopine škroba. U tom trenutku uključite zaporni sat. Nakon 15 sekundi uzmite kapalicom malo smjese i kapnite 2 kapi u prvu jažicu. To ponavljajte svakih 15 sekundi, popunjavajući pločicu s jažicama, dok se umjesto modre boje ne pojavi crvenkastosmeđa. Zabilježite vrijeme ( $t$ ) potrebno za promjenu modre boje u crvenkastosmeđu. Izračunajte vrijeme trajanja reakcije ( $t_{1/2}$ ) koje ćete koristiti u nastavku pokusa, a ono odgovara vremenu potrebnom da se razgradi polovica ukupne

količine supstrata, u ovom slučaju škroba. To vrijeme ćete dobiti tako da vrijeme potrebno za pojavu crvenkastosmeđe boje podijelite s brojem dva ( $t_{1/2} = t/2$ ).

### Izvođenje pokusa

Uz dodatak odgovarajuće količine destilirane vode priredite u bočicama po 10 ml otopina koje sadrže ekstrakt u sljedećim volumnim udjelima: 100%, 75%, 50%, 25% i 0% (v/v). U plastične graduirane epruvete otpipetirajte po 1 ml otopine I<sub>2</sub>KI. U prvu bočicu (0% enzima) dodajte 10 ml 0,4%-tne otopine škroba i u trenutku ispuštanja otopine škroba u bočicu uključite zaporni sat. Bočicu začepite i povremeno promućkajte. Malo prije isteka vremena  $t_{1/2}$  odmjerite pipetom 1 ml reakcijske smjese, a točno po isteku vremena  $t_{1/2}$  ispustite sadržaj pipete u već pripremljenu odmjernu tikvicu u kojoj se nalazi 1 ml otopine I<sub>2</sub>KI, dobro promućkajte (I<sub>2</sub>KI zaustavlja reakciju), nadopunite destiliranom vodom do 10 ml i ponovno promućkajte. Isti postupak ponovite sa sadržajem preostalih bočica.

Apsorbanciju dobivenih otopina izmjerite spektrofotometrom namještenim na valnu duljinu 580 nm. Kao slijepu probu koristite destiliranu vodu. Relativnu koncentraciju škroba u otopini koja sadrži 0% enzima označite sa 100% ( $c_0 = 100$ ) i zatim izračunajte relativne koncentracije škroba u pojedinim otopinama prema sljedećem izrazu:

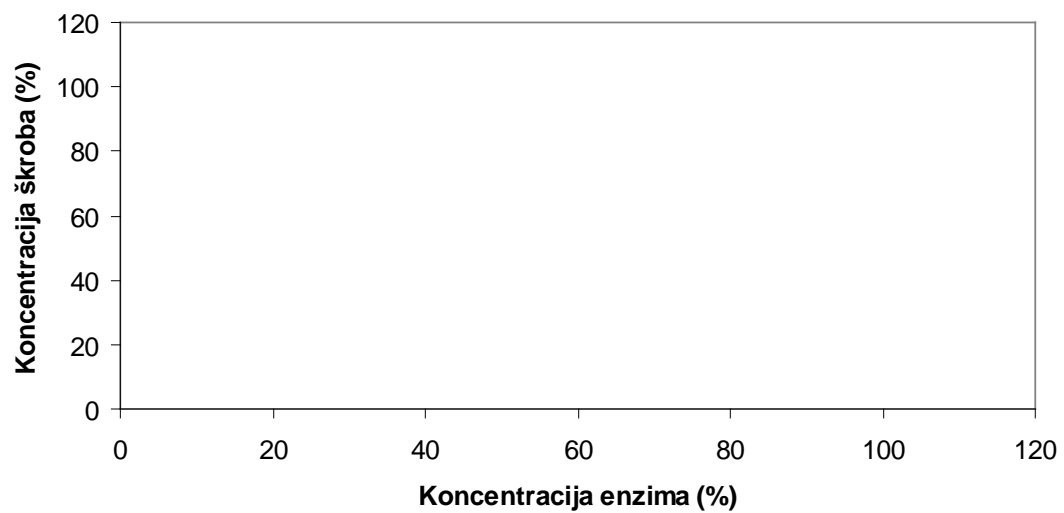
$$c_x = (c_0 \times A_x) / A_0$$

$c_x$  - relativna koncentracija škroba u pojedinoj otopini  
 $A_x$  - apsorbancija pojedine otopine  
 $c_0 = 100$   
 $A_0$  = apsorbancija otopine koja ne sadrži enzim (0 % enzima)

## REZULTATI

Volumni udio (v/v) ekstrakta u reakcijskoj smjesi	$A_{580}$	Relativna koncentracija škroba (c)
0 %		
25 %		
50 %		
75 %		
100 %		

Ovisnost relativne koncentracije škroba o koncentraciji enzima amilaze





## 5.2. DJELOVANJE SAHARAZE (INVERTAZE)

Ugljikohidrati nastali u zelenim listovima procesom fotosinteze prenose se u druge dijelove biljke floemom, najčešće u obliku disaharida saharoze. Hidrolizu saharoze u glukozu i fruktozu katalizira enzim saharaza, koji je po svojim svojstvima  $\beta$ -frukto-furanozidaza. Izlazak saharoze iz sitastih elemenata je pasivan proces i odvija se u smjeru pada koncentracijskog gradijenta. Niska razina saharoze u apoplastu (npr. kod šećerne trske) održava se djelovanjem apoplastne saharaze. Saharaza se ne mora nužno hidrolizirati u apoplastu nego može ući u stanicu sekundarnim aktivnim prijenosom u simportu s vodikovim ionom. U tom se slučaju hidrolizira citosolnom saharazom. Treća je mogućnost da saharaza uđe u vakuolu aktivnim prijenosom pomoću vodikovog antiportera gdje se može ili pohraniti ili hidrolizirati vakuolarnom saharazom.

Hidroliza saharoze naziva se i inverzijom, a smjesa glukoze i fruktoze koja se pritom dobije je invertni šećer. Naime, saharaza zakreće ravninu polarizirane svjetlosti u desno, dok tzv. invertni šećer dobiven hidrolizom zakreće ravninu u lijevo (fruktoza je jače lijevo-aktivna nego što je glukoza desno-aktivna). Na taj se način hidrolizom mijenja smjer zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti, pa se zato taj enzim nekada nazivao i invertaza.

U ovoj vježbi koristit će se ekstrakt kvasca u cilju dokazivanja utjecaja povišene temperature na aktivnost saharaze te dokazivanja reducirajućih svojstava monosaharida nastalih djelovanjem saharaze.

### MATERIJAL

#### **Biljni materijal**

-svježi kvasac

#### **Reagensi**

-Benedictov reagens  
(otopina natrijevog karbonata,  
natrijevog citrata i bakrenog  
sulfata)  
-saharaza (2%-tna otopina)  
-fruktoza (0,5 M otopina)

#### **Pribor i uređaji**

-centrifuga  
-termoblok  
-laboratorijska vaga  
-menzura od 50 ml  
-čaha od 50 i 250 ml  
-pipete od 5 i 10 ml  
-stalak sa 7 epruveta  
-4 kivete  
-stakleni štapić  
-drvena štipaljka  
-električno kuhalo

## NAČIN IZVOĐENJA

Razmutite 5 g kvasca u 40 ml destilirane vode. Dobivenu emulziju razdijelite u četiri kivete. Kivete tarirajte, a zatim centrifugirajte 5 minuta pri 500 g. Supernatant, u kojem se nalazi enzim saharaza, prelijte u čašu. U većoj čaši (250 ml) zagrijte vodu do vrenja (poslužiti će vam kao vodena kupelj).

U dvije epruvete otpipetirajte po 10 ml supernatanta, jednu označite slovom A, a drugu slovom B. Epruvetu B kuhajte u kipućoj vodenoj kupelji (100 °C) 5-10 minuta te ju zatim pažljivo ohladite pod mlazom hladne vode.

Zatim u svaku epruvetu (A i B) dodajte po 5 ml 2%-tne otopine saharoze. Sadržaj lagano promiješajte i stavite u termoblok zagrijan na 35 °C i ostavite stajati jedan sat. Svakih 5 minuta epruvete lagano protresite.

Nakon jednog sata u pet praznih epruveta otpipetirajte **po 2 ml** sljedećih otopina:

1. 2%-tna otopina saharoze
2. 0,5 M otopina fruktoze
3. ekstrakt kvasca koji sadrži sirovu saharazu (supernatant)
4. sadržaj epruvete A (sirova otopina saharaze + saharoza)
5. sadržaj epruvete B (kuhana otopina saharaze + saharoza)

### **Benedictova reakcija**

Utvrđite nazočnost reducirajućih šećera u svih pet pripremljenih uzoraka tako da u svaku epruvetu dodate 10 kapi Benedictovog reagensa. U čaši od 250 ml zagrijte vodu do vrenja i sve epruvete stavite **istovremeno** u **kipuću** vodenu kupelj. Čim primijetite prvu promjenu boje, sve epruvete izvadite iz kupelji i ohladite pod mlazom hladne vode ili u čaši s hladnom vodom. Zabilježite u kojim se epruvetama pojavio talog bakrovog (I)-oksida i objasnite zašto.

## REZULTATI

Reakcija s Benedictovim reagensom:

prije  
zagrijavanja

poslije  
zagrijavanja

epruveta  
br. 1

epruveta  
br. 2

epruveta  
br. 3

epruveta  
br. 4

epruveta  
br. 5

Objasnite zašto se rezultat dobiven u epruveti br. 1 razlikuje od rezultata dobivenog u epruveti br. 2?

Objasnite rezultat dobiven u epruveti br. 3.

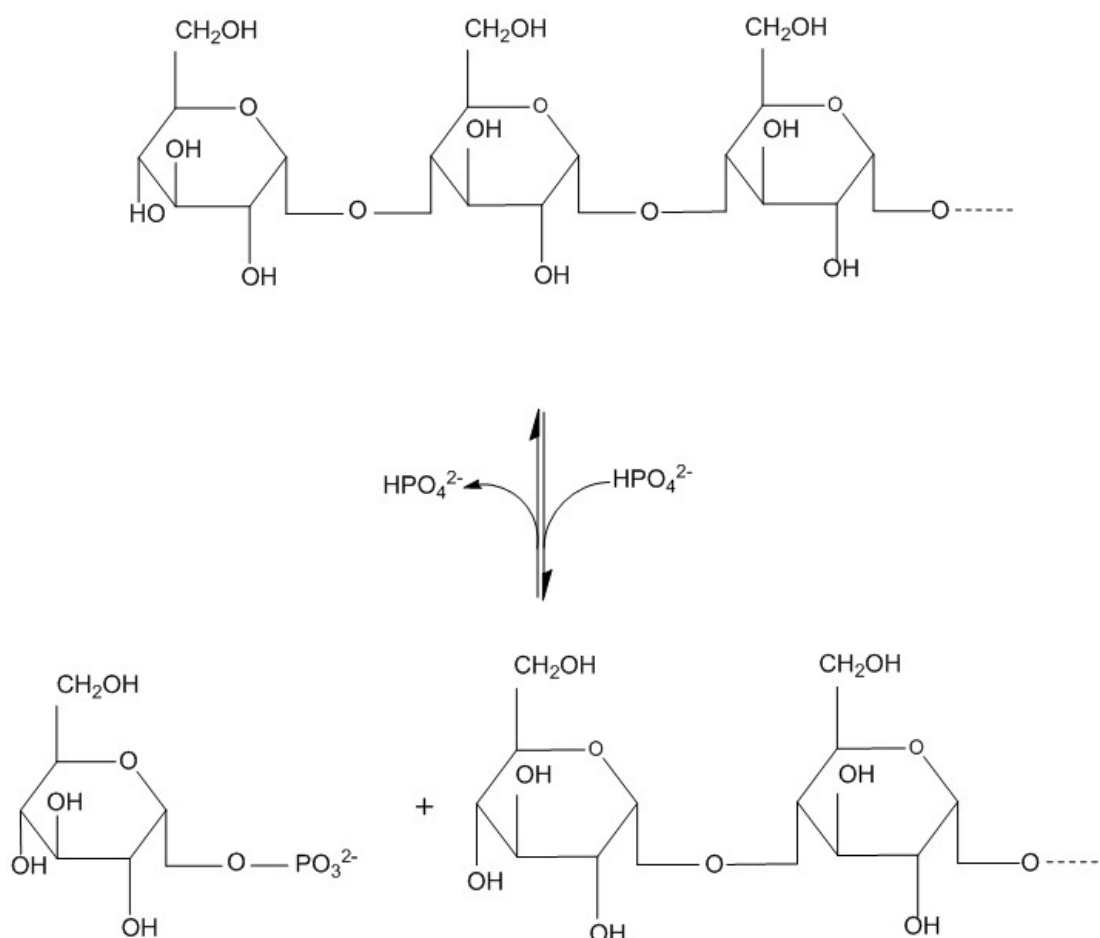
Objasnite rezultat dobiven u epruveti br. 4.

Objasnite zašto se rezultat dobiven u epruveti br. 4 razlikuje od rezultata dobivenog u epruveti br. 6?

### 5.3. SINTEZA ŠKROBA POMOĆU ENZIMA FOSFORILAZE

Razgradnja škroba u biljaka katalizirana je enzimima hidrolazama ( $\alpha$ - i  $\beta$ -amilazom) i fosforilazama. Enzim fosforilaza cijepa  $\alpha$ -1,4 vezu i skraćuje polisaharidni lanac škroba na nereducirajućem kraju za jednu glukoznu jedinicu. Glikozilni ostatak se veže na anorganski fosfat pri čemu nastaje glukoza-1-fosfat. Kemijski je neispravno proces shvatiti kao fosforolizu, jer je to zapravo prijenos posljednjeg glukoznog ostatka na fosfat (akceptorsku molekulu) pa enzim treba klasificirati kao transglikozidazu.

Amiloza se može potpuno razgraditi fosforilazom, dok se kod amilopektina razgradnja zaustavlja na četvrtoj glukoznoj jedinici prije mjesta grananja. Naime, fosforilaza i amilaze su specifične za  $\alpha$ -1,4-vezu, dok  $\alpha$ -1,6-vezu amilopektina ne mogu cijepati. Tu vezu cijepaju  $\alpha$ -(1,6)-glukanaze, tzv. R-enzimi pri čemu oslobađaju ravne lance koje fosforilaza škroba može razgrađivati.



Razgradnja škroba fosforilazom je za stanicu energetski povoljna jer samo fosforilirana glukoza može ući u proces glikolize. Stoga se nastankom glukoza-1-fosfata u samom procesu razgradnje škroba preskače prvi korak u glikolizi i štedi jedna molekula ATP-a.

Reakcija razgradnje škroba fosforilazom je reverzibilna jer je promjena slobodne Gibbsove energije ( $\Delta G^0$ ) te reakcije mala, svega 3 kJ, ali unatoč tome u uvjetima *in vivo* fosforilaze nemaju sintetsku funkciju. Razlog su nepovoljni uvjeti za sintezu škroba - relativno visoka pH vrijednost, visoka koncentracija fosfata te niska koncentracija glukoza-1-fosfata. U uvjetima *in vitro* sinteza škroba fosforilazom zahtijeva prisutnost visoke koncentracije glukoza-1-fosfata i "klicu" duljine tri do četiri molekule glukoze na kojoj će započeti sinteza škroba, tj. amiloze.

## MATERIJAL

### Biljni materijal

-gomolj krumpira

### Reagensi

-0,01 M otopina KCN  
-otop. I<sub>2</sub>KI  
-0,2 %-tna otop. glukoze  
-0,2 %-tna otop. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
-0,2 %-tna otop. topivog škroba  
-0,25 %-tna otop. glukoza-1-fosfata

### Pribor

-stalak s 5 epruveta  
-trenica i nož  
-6 Pasteurovih pipeta  
-bijeli karton  
-lijevak  
-tarionik  
-čaša od 150-250 ml  
-platno za cijedenje  
-staklena pločica s jažicama, 2 kom  
-menzura od 25 ml i 5 ml  
-pipete od 5 ml  
-rukavice  
-stakleni štapić

## NAČIN IZVOĐENJA

U epruvete obilježene brojevima od (1) do (5) otpipetirajte sljedeće otopine:

- (1) 3 ml 0,2 %-tne otopine glukoze
- (2) 3 ml 0,25 %-tne otopine glukoza-1-fosfata
- (3) 1,5 ml 0,2 %-tne otopine KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
i 1,5 ml 0,2 %-tne otopine glukoze
- (4) 1,5 ml 0,2 %-tne otopine topivog škroba  
i 1,5 ml 0,2 %-tne otopine KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- (5) 1,5 ml 0,25 %-tna otopina glukoza-1-fosfata  
i 1,5 ml 0,2 %-tna otopina KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Nakon pripreme otopina ogulite gomolj krumpira, usitnite ga na trenici i dobivenu kašu u tarioniku pomiješajte s 25 ml neutralizirane otopine kalijeva cijanida koncentracije  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ . Pomoću dvostrukog platna za cijedenje koje ste stavili u lijevak, profiltrirajte ekstrakt i odmah ga upotrijebite (**ovaj dio pokusa obavezno radite u rukavicama!**). Svakoj epruveti (1-5) dodajte po 3 ml smjese krumpirovog ekstrakta i otopine kalijevog cijanida te lagano promućkajte. Pripremite pločicu s jažicama tako da u svaku jažicu dodate 1-2 kapi otopine  $\text{I}_2\text{KI}$ . Odmah nakon toga kapnite po jednu kap (uronivši kapaljku 1-2 mm ispod površine uzorka, nikako do dna epruvete) iz prve epruvete u prvu jažicu na staklenoj pločici. Staklena pločica s jažicama neka bude na bijeloj podlozi. Zatim iz druge epruvete kapnite kap u drugu jažicu, i tako redom iz svih pet epruveta. Za svaku otopinu upotrijebite čistu Pasteurovu pipetu.

Nakon 3 minute ponovo iz svake epruveta stavite po jednu kap otopine u sljedeći red jažica na pločici.

Postupak ponavljajte svake 3 minute tako dugo dok se u jažicama u kojima očekujete pojavu škroba ne pojavi modro-sivi talog.

## REZULTATI

epruveta	sadržaj epruvete	vrijeme (min)				
		3	6	9	12	15
1						
2						
3						
4						
5						

Pojavu modrog obojenja u jažicama označite znakom "+", a odsutnost obojenja znakom "-".

Objasnite rezultate dobivene u epruvetama br. 2 i 5.

#### 5.4. DJELOVANJE LIPAZE

Lipidi su strukturno raznovrsni hidrofobni spojevi topivi u organskim otapalima, a netopivi u vodi. U lipide se ubrajaju masti, ulja, fosfolipidi, glikolipidi te neke komponente kutina i suberina. Masti i ulja su strukturno istovrsni spojevi, ali masti su na sobnoj temperaturi u čvrstom stanju, dok su ulja tekuća zbog prisutnosti jedne do tri dvostruke veze u molekuli. I masti i ulja sastoje se od dugih lanaca masnih kiselina koje su esterificirane na glicerol. Budući da su esterificirane sve tri hidroksilne skupine glicerola, masti i ulja se često nazivaju trigliceridi ili triacilgliceroli.

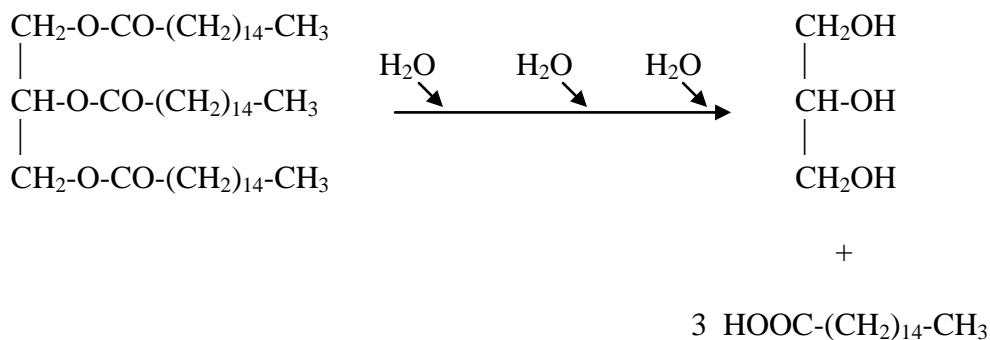
Lipidi prisutni u biljkama imaju strukturnu i pričuvnu ulogu. Masti i ulja su uz ugljikohidrate najvažniji pričuvni oblik reduciranoga ugljika. Tijekom oksidacije masti nastaje više ATP-a u odnosu na oksidaciju šećera. To znači da se u obliku masti u manjem volumenu može uskladištiti relativno veća količina energije.

Masti i ulja se nalaze kao pričuvna tvar u mnogim sjemenkama. Sjemenke soje, suncokreta, kikirikija i oraha sadrže masti u supkama, kukuruz, pšenica i ricinus u endospermu, a maslina i avokado u usplođu. Mnoge male sjemenke koje se rasprostranjuju vjetrom sadrže mast kao dominantnu rezervnu tvar.

Masti se ne mogu prenositi u sjemenke i plodove iz drugih organa, već se sintetiziraju *in situ* iz saharoze ili drugih transportnih oblika šećera. Masne kiseline sintetiziraju se u kloroplastima uzastopnim dodavanjem jedinica od dva C-atoma iz acetyl-Co-A. Zatim se u obliku acil-CoA prenose u citosol i koriste za sintezu triglicerida.

Konverzija masti u šećere provodi se u sjemenkama bogatim mastima, sporama gljiva i nekim bakterijama, ali u ljudi i životinja nije moguća. Mobilizacija masti i pretvorba u transportne šećere (najčešće saharozu) događa se u biljaka tijekom klijanja. Nastali šećer se prenosi u rastući embrio i služi kao izvor energije u najranijim fazama razvoja biljke, kada ona još nije u mogućnosti provoditi fotosintezu.

Razgradnja masti počinje djelovanjem lipaza (enzimi iz grupe esteraza).



U ricinusu, žitaricama i pamuku lipaza se nalazi u membrani lipidnih tjelešaca (oleosoma), a u kikirikiju, soji i krastavcu u glioksisomima. Tijekom lipolize oleosomi i glioksisomi su u neposrednoj blizini. Nakon razgradnje masti, masne kiseline ulaze u glioksisom. Tu se aktiviraju u acil-CoA djelovanjem enzima acil-CoA sintetaze. Acil-CoA je supstrat za  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina. U sisavaca se taj proces događa u mitohondrijima, a u biljaka u glioksisomima.  $\beta$ -oksidacijom nastaje acetil-CoA koji se dalje metabolizira u glioksisomima u seriji reakcija nazvanoj glioksilatni ciklus. Krajnji produkt je sukcinat koji se prenosi iz glioksisoma u mitohondrije gdje se prevodi u malat. Proces završava u citosolu konverzijom malata u glukozu u procesu glukoneogeneze.

Glicerol koji je nastao djelovanjem lipaze prevodi se uz utrošak molekule ATP-a u glicerol-3-fosfat, koji se često oksidira u dihidroxiacetonfosfat i u citosolu procesom glukoneogeneze prevodi u šećere, ili se razgrađuje glikolizom.

## MATERIJAL

### Biljni materijal

-sjemenke ricinusa ili suncokreta

### Reagensi

-2,5%-tna octena kiselina  
 -1%-tni kloralhidrat  
 -0,1 M otop. KOH  
 -1%-tna otopina fenolftaleina  
 -destilirana voda

### Pribor i uređaji

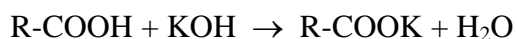
-vaga  
 -centrifuga  
 -termoblok  
 -4 kivete  
 -3 epruvete  
 -čaše od 100 i 250 ml  
 -pipete ili menzure od 5 ml  
 -4 Erlenmeyerove tikvice od 25 ml  
 -menzura od 100 ml  
 -bireta  
 -stakleni štapić  
 -električno kuhalo



## NAČIN IZVOĐENJA

Deset grama oljuštenih sjemenki ricinusa ili suncokreta izgnječite u jednoličnu masu i dobro promiješajte sa 60 ml kloralhidrata. Smjesu podijelite u četiri kivete, tarirajte i centrifugirajte 5 min pri 500 g. Zagrijte vodu u čaši za vodenu kupelj. U tri epruvete nalijte po 10 ml supernatanta. U prvu dodajte 3 ml vode, u drugu 3 ml 2,5 %-tne octene kiseline, a treću epruvetu zagrijte do vrenja u vodenoj kupelji, ohladite i dodajte 3 ml destilirane vode. Sve tri epruvete ostavite stajati u termobloku na 35 °C 1-2 sata. Za to vrijeme titrirajte 3 ml 2,5%-tne octene kiseline s 0,1 M otopinom KOH, uz dodatak nekoliko kapi fenolftaleina, do pojave ljubičastoga obojenja. Po završetku inkubacije titrirajte svaki od tri uzorka tako da ukupni sadržaj pojedine epruvete prelijete u Erlenmeyrovu tikvicu, dodate nekoliko kapi fenolftaleina i titirate s 0,1 M otopinom KOH.

Reakcija titracije:



Navedite utroške KOH za svaki pojedini uzorak.

Po završetku pokusa biretu isperite destiliranom vodom.

## REZULTATI

uzorak	sadržaj epruvete	utrošak KOH (ml)
1.		
2.		
3.		
4.		

Objasnite utrošak KOH potreban za neutralizaciju sadržaja svake pojedine epruvete.

Epruveta broj 1:

Epruveta broj 2:

Epruveta broj 3:

## 5.5. REAKCIJE NA PROTEINE

Za dokazivanje bjelančevina koristi se više karakterističnih obojenih reakcija, od kojih su najpoznatije biuretska reakcija i ksantoproteinska reakcija.

**Biuretska reakcija** je karakteristična za sve bjelančevine jer ovisi o prisutnosti peptidnih veza (-CO-NH-). Pozitivnu reakciju daju i polipeptidi, svi koji su veći od tripeptida. Ime je dobila po kondenzacijskom produktu dviju molekula uree – biuretu, koji također daje pozitivnu reakciju. Ova reakcija izvodi se tako da se alkalnoj otopini bjelančevina dodaje minimalna količina razrijeđene otopine bakrovog(II)-sulfata, pri čemu se pojavljuje ružičasto-ljubičasto obojenje.

**Ksantoproteinska reakcija** je karakteristična za bjelančevine koje sadrže aromatske aminokiseline (fenilalanin, tirozin i triptofan). Djelovanjem koncentrirane nitratne kiseline na bjelančevine dolazi do nitriranja aromatskih jezgara, pri čemu nastaju žuto obojeni aromatski spojevi. Dodatkom amonijaka ovo žuto obojenje prelazi u narančasto.

### MATERIJAL

#### Biljni materijal

-sjemenke ricinusa  
(*Ricinus communis*)

#### Reagensi

-konc. otopina HNO<sub>3</sub>  
-konc. otopina amonijaka (NH<sub>3</sub>)  
-konc. otopina CuSO<sub>4</sub>  
-konc. otopina KOH

#### Pribor

-3 satna stakla  
-kapalice  
-skalpel  
-pinceta  
-stakleni štapić

### NAČIN IZVOĐENJA

Oljuštite skalpelom sjemenku ricinusa (**oprezno, sjemenke su otrovne zbog prisutnosti lektina ricina**), raspolovite ih i pojedinačne polovice stavite na satna stakla te izvedite sljedeće reakcije:

a) **Biuretska reakcija:** Kapnite na komadić endosperma koncentriranu otopinu KOH i dodajte nekoliko kapi otopine CuSO<sub>4</sub>. Endosperm će se obojiti ružičasto-ljubičasto.

b) **Ksantoproteinska reakcija:** Na endosperm kapnite kap koncentrirane otopine HNO<sub>3</sub>. Satno staklo odmah prekriti s drugim, obrnutim satnim staklom. Nakon što se pojavi žuto obojenje, kapnite kap otopine amonijaka. Žuto obojenje prelazi u narančasto.

## REZULTATI

Dobivene reakcije prikažite crtežom:

Biuretska reakcija

Ksantoproteinska reakcija

## 5.6. ODREĐIVANJE STOPE DISANJA PETTENKOFEROVOM METODOM

Stopa disanja je različita kako u pojedinih biljnih vrsta, tako i unutar pojedine vrste, ovisno o organu, razvojnom stadiju, aktivnosti i vanjskim čimbenicima. Među vanjskim čimbenicima koji utječu na intenzitet disanja najvažnija je temperatura, ali i koncentracija kisika te opskrbljenost vodom.

Minimalna temperatura pri kojoj se disanje još može mjeriti je oko  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tkiva koja su otporna na mraz, kao što su npr. iglice četinjača, dišu još i pri temperaturama nižim od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dok disanje tropskih biljaka može biti poremećeno već kod temperatura između  $0$  i  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Temperaturni je maksimum disanja obično značajno viši od onoga u fotosinteze.

Mlado drveće gubi disanjem oko  $1/3$  dnevnih produkata fotosinteze, a to se kod starijeg drveća može udvostručiti jer se omjer fotosintetskih i nefotosintetskih tkiva smanjuje. Što je veća metabolička aktivnost tkiva, to je veći intenzitet disanja. Pupovi u razvoju obično imaju višu stopu disanja u odnosu na diferencirana tkiva. U odrasloj biljci stabljika ima općenito najnižu stopu disanja, a disanje korijena se mijenja ovisno o biljnoj vrsti i uvjetima.

Kada biljno tkivo dosegne zrelost, stopa disanja ostaje više-manje konstantna ili se sporo smanjuje starenjem. Iznimka je značajni porast disanja (tzv. klimakterično disanje) u vrijeme dozrijevanja mnogih plodova (avokado, jabuka, banana) i starenja (senescencija) otkinutih listova i cvjetova. Neki plodovi (limun, ananas, grožđe) ne pokazuju takvu promjenu u fazi zriobe.

Opskrba biljke vodom ima također značajan utjecaj na stopu disanja. Manjak vode jako smanjuje disanje od neke određene vrijednosti vodnog potencijala tkiva pa nadalje. Poikilohidrične vrste biljaka ili razvojni stadiji u kojima je sadržaj vode minimalan (sjemenke ili spore) ne pretrpe pri tome nikakvu štetu. One u suhom zraku imaju minimalnu stopu disanja, što dovodi do minimalnog utroška tvari. To je preduvjet za preživljavanje sjemenki, spora i čitavih suhih organizama (npr. lišajeva) u dugim razdobljima mirovanja.

Od okolišnih čimbenika važan utjecaj na disanje ima i kisik. Međustanični prostori olakšavaju difuziju kisika u biljnim tkivima. U biljaka koje rastu u tlu zasićenom vodom kao i u podvodnih biljaka pomanjkanje kisika može ograničiti stopu disanja. U mnogih močvarnih biljaka ovo je spriječeno dovodenjem kisika kroz sustav međustaničnih prostora iz dijelova biljke koji se nalaze iznad površine vode. U slučaju kratkotrajnog nedostatka kisika biljke mogu proizvoditi ATP procesom vrenja, ali pri tom se dobiva vrlo mala količina ATP-a. Neke biljke, osobito drvenaste vrste mogu preživjeti samo u

dobro prozračivanom tlu pa su ograničene u geografskoj rasprostranjenosti zbog potrebe snabdijevanja korijena kisikom. Korijenje koje raste duboko u tlo ili se nalazi u močvarnom tlu mora preživjeti anaerobnim metabolizmom (vrenjem) i/ili razviti strukture koje omogućuju opskrbu korijena kisikom. Primjer takvih struktura su pneumatofori prisutni kod nekih močvarnih vrsta i mangrova (*Avicennia*, *Rhizophora*, *Taxodium*).

Na disanje također djeluje i svjetlost. Prethodno osvjetljavanje fotosintetski aktivnih biljaka može zbog pojačanog dobavljanja supstrata pojačati stopu disanja u sljedećoj fazi tame.

Stopa disanja biljaka i ovisnost o različitim čimbenicima može se odrediti Pettenkoferovom metodom.

## MATERIJAL

### Biljni materijal

-prokljale sjemenke (npr. pšenice)

### Reagensi

-baritna voda  
(17 g L<sup>-1</sup> Ba(OH)<sub>2</sub> i 2,5 g l<sup>-1</sup> BaCl<sub>2</sub>)  
-konc. otopina NaOH ili KOH  
-0,1 M kloridna kiselina, HCl  
-fenolftalein  
(0,1%-tna otopina u 70%-tnom etanolu)

### Pribor

-4 boce ispiralice  
-vakuum sisaljka  
-savinuta staklena cijev  
(po Pettenkoferu)  
-bireta od 50 ml  
-vazelin  
-3 Erlenmeyerove tikvice od 20 ml  
-lijevak  
-alumijska folija ili crni papir  
-filtar papir  
-staklena zvonolika posuda s gumenim čepom

## NAČIN IZVOĐENJA

Aparatura je složena na sljedeći način: s lijeve strane nalaze se dvije boce ispiralice (prva je napunjena do polovice volumena koncentriranom otopinom lužine, a druga baritnom vodom). Druga boca ispiralice spojena je sa staklenim zvonom omotanim aluminijskom folijom ili crnim papirom. Na staklenu ploču prekrivenu zvonom stavljen je biljni materijal, a rub zvona je namazan vazelinom. Desno od staklenog zvona nalaze se još dvije boce ispiralice. Jedna je napunjena baritnom vodom, a druga lužinom. Ova druga boca ispiralice spojena je na vakuum-sisaljku.

Na stakleno zvono pričvrstite staklenu cijev po Pettenkoferu u koju zatim ulijte 20 ml baritne vode. Pettenkoferovu cijev spojite i s bocom ispiralice na desnoj strani aparature.

Uključivanjem vakuum-sisaljke započinje strujanje zraka kroz sustav. U prve dvije boce ispiralice atmosferski zrak se oslobađa ugljikovog dioksida. Zato u Pettenkoferovu cijev ulazi samo CO<sub>2</sub> oslobođen disanjem biljnog materijala smještenog

pod stakleno zvonu. U cijevi reagira  $\text{CO}_2$  s  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  iz baritne vode pri čemu se istaloži  $\text{BaCO}_3$ , a zrak bez  $\text{CO}_2$  izlazi kroz preostale dvije boce ispiralice u vakuum sisaljku. Pokus je završen kada primijetite zamućenje u Pettenkoferovoj cijevi.

Odredite količinu oslobođenog  $\text{CO}_2$  na sljedeći način: profiltrirajte 20 ml čiste baritne vode iz boce, dodajte 1-2 kapi indikatora fenolftaleina (indikator prestanite dodavati čim otopina pocrveni) i titrirajte s  $\text{HCl}$  koncentracije  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ . Zabilježite količinu utrošene kiseline ( $V_1$ ). Profiltrirajte baritnu vodu iz Pettenkoferove cijevi te ju na isti način titrirajte. Zabilježite utrošak kiseline ( $V_2$ ). Iz razlike utrošaka kiseline izračunajte količinu  $\text{CO}_2$  oslobođenog disanjem.

**Reakcija u Pettenkoferovoj cijevi:**  $\text{Ba}(\text{OH})_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{BaCO}_3 + \text{H}_2\text{O}$

**Reakcija titracije:**  $\text{Ba}(\text{OH})_2 + 2 \text{HCl} \rightarrow \text{BaCl}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$

Iz volumena otopine  $\text{HCl}$  koncentracije  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  utrošenih za titraciju čistog barijeva hidroksida ( $V_1[\text{HCl}]$ ) te barijeva hidroksida iz Pettenkoferove cijevi ( $V_2[\text{HCl}]$ ) izračunajte  $n_1[\text{HCl}]$  i  $n_2[\text{HCl}]$ .

Budući da iz jednadžbe titracije znamo da je  $\frac{n[\text{Ba}(\text{OH})_2]}{n[\text{HCl}]} = \frac{1}{2}$  izračunajte

$n_1[\text{Ba}(\text{OH})_2]$  i  $n_2[\text{Ba}(\text{OH})_2]$ .

Izračunajte količinu  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  koja je reagirala s  $\text{CO}_2$  u Pettenkoferovoj cijevi budući da je ona jednaka razlici:

$n_1[\text{Ba}(\text{OH})_2] - n_2[\text{Ba}(\text{OH})_2]$

Budući da iz reakcije u Pettenkoferovoj cijevi znamo da je  $n[\text{Ba}(\text{OH})_2] = n[\text{CO}_2]$

izračunajte  $n[\text{CO}_2]$  i zatim  $m[\text{CO}_2]$  u mg.

## REZULTATI

Skica aparature:

$V_1[\text{HCl}]$ :

$V_2[\text{HCl}]$ :

$n_1[\text{HCl}]$ :

$n_2[\text{HCl}]$ :

$n_1[\text{Ba}(\text{OH})_2]$ :

$n_2[\text{Ba}(\text{OH})_2]$ :

$n[\text{Ba}(\text{OH})_2]$ :

$n[\text{CO}_2]$ :

$m[\text{CO}_2]$ :

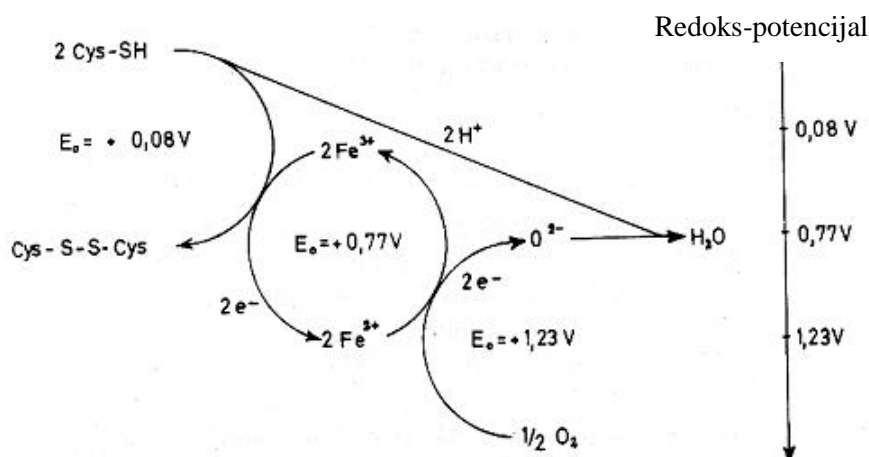
## 5.7. MODEL DIŠNOG LANCA

Najveći dobitak energije tijekom aerobnog disanja ostvaruje se pri prijenosu elektrona u dišnom lancu na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani. Visokoenergizirani elektroni prolaze kroz lanac prenosioca elektrona pri čemu se postepeno smanjuje energija elektrona i konzervira u obliku elektrokemijskog protonskog gradijenta preko unutrašnje mitohondrijske membrane. Protonski gradijent omogućuje sintezu ATP-a enzimom ATP-sintazom. Na taj se način energija oslobođena u dišnom lancu ( $\text{NADH} + \text{H}^+ + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ ,  $\Delta G_m = -220 \text{ kJ/mol}$ ) pohranjuje kao kemijska energija u obliku ATP-a.

Prijenos elektrona preko niza prenosioca elektrona na kisik kao konačni akceptor elektrona može se prikazati u uvjetima *in vitro* pomoću umjetnog redoks-sustava. Kao energijom bogatiji donor vodika služi aminokiselina cistein koja pri prelasku u cistin ( $2 \text{ Cys-SH} \leftrightarrow \text{Cys-S-S-Cys}$ ,  $E_0 = +0,08 \text{ V}$ ) predaje elektrone redoks-sustavu  $\text{Fe}^{3+} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}$ ,  $E_0 = +0,77 \text{ V}$ .  $\text{Fe}^{2+}$  prenosi elektron dalje na kisik  $\frac{1}{2} \text{O}_2 \leftrightarrow \text{O}_2^-$ ;  $E_0 = 1,23 \text{ V}$ . Ova posljednja reakcija je analogna djelovanju enzima citokrom-oksidade, koja također sadrži željezo.

Kompleks cisteina i  $\text{Fe}^{3+}$  daje modroljubičastu boju, dok je cistein u kompleksu s  $\text{Fe}^{2+}$  bezbojan. Stoga nam obojenje otopine daje informaciju o trenutnom redoks-stanju povezanih sustava. Ako otopina sadrži pored iona željeza suvišak cisteina i kisik, reakcija teče tako dugo dok se ne potroši kisik. U tom trenutku modroljubičasta boja nestane. Ako se potresanjem otopine uvede nova količina kisika, reakcija opet teče, što se uočava ponovnom pojavom modroljubičaste boje.

Kao i u dišnom lancu, i ovdje kalijev cijanid blokira reakciju jer s feri-ionima stvara stabilni kompleks i stoga blokira redoks-sustav  $\text{Fe}^{3+} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}$ .





## MATERIJAL

### Reagensi

- 0,5%-tna otopina cisteina u 0,1 M otopini natrijevog acetata
- željezni sulfat,  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
- kalijev cijanid, KCN

### Pribor i uređaji

- lađica za vaganje
- spatula
- vaga
- Erlenmeyerova tikvica od 150 ml
- gumeni čep za tikvicu
- menzura od 50 ml
- bijeli karton

## NAČIN IZVOĐENJA

Ulijte 20 ml 0,5%-tne otopine cisteina u natrijevu acetatu u Erlenmeyerovu tikvicu. Dodajte 0,05 g  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , začepite tikvicu i kratkotrajno protresite. Odmah maknite čep i stavite tikvicu na bijelu podlogu. Uočit ćete modroljubičastu boju koja će nakon 2-3 minute nestati.

Pokus možete ponoviti više puta uzastopnim potresanjem te ostavljanjem otopine da nekoliko minuta miruje.

Na kraju, dodajte otopini nekoliko kristalića kalijevog cijanida i protresite.

### Literatura

W. Urbach, W. Rupp, H. Sturm (1983). Praktikum zur Stoffwechselfysiologie der Pflanzen. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

## REZULTATI

Zašto u tikvici nastaje modroljubičasta boja?

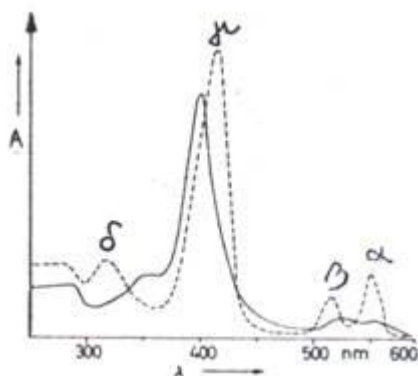
Zašto ne dolazi do pojave modroljubičastog obojenja kad u otopinu dodate kalijev cijanid?

## 5.8. DOKAZIVANJE CITOKROMA C

Citokromi su hem-proteini koji služe kao prenosioci elektrona u lancu prijenosa elektrona smještenom na unutarnjoj membrani mitohondrija. Prilikom prijenosa elektrona (redoks-reakcija), atom željeza u citokromima naizmjenice prelazi iz oksidiranog ( $\text{Fe}^{3+}$ ) u reducirani oblik ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

Citokrom *c* je jedini protein u lancu prijenosa elektrona koji se u blagim eksperimentalnim uvjetima može odvojiti s unutrašnje mitohondrijske membrane. Topljiv je u vodi, što olakšava njegovo pročišćavanje i kristalizaciju. Zato se o njegovoj strukturi i biokemijskim svojstvima zna više nego o strukturi bilo kojeg drugog prenosioca elektrona. Iako je odgovarajućim sredstvima moguće dokazati apsorpcijske spektre drugih citokroma, najjednostavnije je vidjeti apsorpcijske vrpce citokroma *c*. Citokrom *c* ima četiri apsorpcijske vrpce:  $\alpha$  - 550 nm,  $\beta$  - 520 nm,  $\gamma$  - 415 nm i  $\delta$  - 360 nm. Prilikom oksidacije citokroma *c* nestaju  $\alpha$  i  $\beta$  vrpce, a  $\gamma$  i  $\delta$  se pomaknu na niže valne duljine.

Apsorpcijski spektar reduciranog (crtkana linija)  
i oksidiranog (puna linija) citokroma *c*.



## MATERIJAL

### Biljni materijal

-svježi kvasac

### Reagensi

-10%-tna otopina saharoze

### Pribor

-2 staklene ploče  
-staklena čaša od 100 ml  
-stakleni štapić  
-ručni spektroskop  
-izvor svjetlosti  
-stalak sa stolićem

## NAČIN IZVOĐENJA

Uzmite oko 20 g svježeg kvasca i razmutite ga u nekoliko mililitara 10%-tne otopine saharoze. Dobivena smjesa treba biti gusta poput tijesta, tako da ju možete staklenim štapićem izvaditi iz čaše. Smjesu stavite na staklenu ploču, pokrijte ju drugom staklenom pločom i pritisnite toliko da dobijete sloj debljine 3-5 mm, bez zračnih mjehurića. Ploče zatim smjestite na stolić na stalku ispod kojeg se nalazi jači izvor svjetlosti. Na gornju staklenu ploču pristonite ručni spektroskop i laganim pomicanjem uz istovremeno promatranje spektra potražite mjesto na kojem će biti vidljive apsorpcijske vrpce. **Pri promatranju ne ispuštajte spektroskop iz ruke da ne bi pao i razbio se!** Primjenom ručnog spektroskopa apsorpcijska vrpca citokroma *c* jasno se vidi u zelenom području spektra (550 nm), dok je apsorpcijska vrpca u modrom području (415 nm) vrlo teško uočljiva.

## REZULTATI

Apsorpcijski spektar

Valna duljina (nm)		UZORAK
700	crveno narančasto žuto zeleno modro	
650		
600		
550		
500		
450		

Zašto je prije dokazivanja apsorpcijskih vrpca citokroma *c* potrebno kvasac pomiješati s otopinom saharoze?

## 6. BILJNI HORMONI I TRANSFORMACIJA BILJNIH STANICA

Biljni hormoni su signalne molekule prisutne u biljnim tkivima u malim količinama. Promjene koncentracije hormona te osjetljivosti tkiva dovode do cijelog niza fizioloških i razvojnih procesa u biljkama, od kojih mnogi uključuju i interakcije s okolišnim čimbenicima.

Biljni hormoni su podijeljeni u šest osnovnih grupa: auksini, giberelini, citokinini, brasinosteroidi, apscizinska kiselina i etilen. Također postoje i drugi organski spojevi koji imaju regulatornu ulogu u procesima razvoja, npr. poliamini, salicilna kiselina i jasmonska kiselina.

Biljni hormoni imaju raznolike i višestruke učinke na različita biljna tkiva. Npr. auksin može stimulirati ili inhibirati produžni rast stanice, ali i stimulirati staničnu diobu. Znači, biljni hormoni nisu specifični poput animalnih i vjerojatno ne postoji faza staničnog rasta i razvoja koja je kontrolirana samo jednim hormonom.

### Literatura

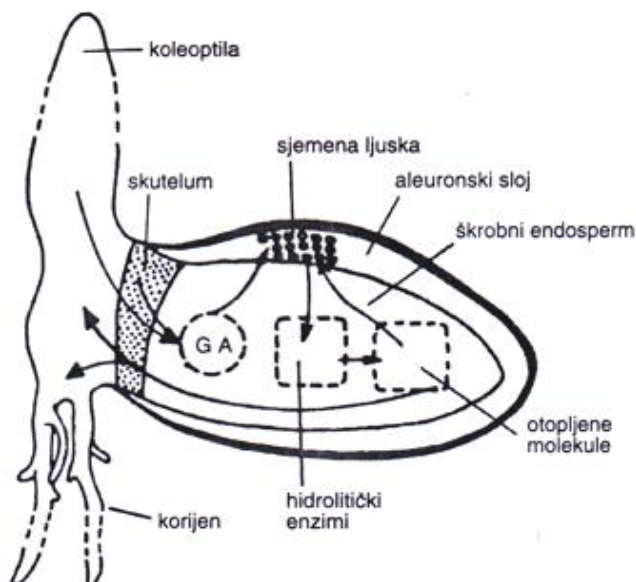
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Courier Companies Inc.,
- Moore, R., Clark, W. D., Stern, K. R., Vodopich, D. (1995). *Botany*. Wm. C. Brown Publishers. USA.

## 6.1. UTJECAJ GIBERELINA (GA<sub>3</sub>) NA SINTEZU $\alpha$ -AMILAZE

Giberelini (GA) su skupina srodnih spojeva (ima ih više od 100) koji nisu grupirani po biološkoj aktivnosti (većina ih je neaktivna) nego po kemijskoj strukturi. U molekuli imaju gibanski prsten, odnosno *ent*-gibanski kostur. Njihovu biološku aktivnost karakterizira snažno stimuliranje staničnih dioba ili produžnog rasta. Naime, stabljika visoke biljke sadrži više biološki aktivnih giberelina od stabljike patuljaste biljke.

Sinteza i razina giberelina je pod genetičkom kontrolom. Jedan od fizioloških učinaka giberelina je stimulacija sinteze enzima amilaza koji tijekom klijanja hidrolitički razgrađuju škrob. Ekspresija tih enzima je aktivirana giberelinima koje oslobađa embrio.  $\alpha$ -amilaza se sintetizira *de novo* u aleuronskom sloju koji okružuje škrobni endosperm. Prekursor  $\beta$ -amilaze je prisutan u sjemenkama prije klijanja i aktiviran je za vrijeme klijanja uklanjanjem malog peptida s C-terminalnog dijela enzima. Glukoza oslobođena djelovanjem amilaze se fosforilira heksokinazom, pretvara u saharozu u skutelumu i prenosi u embrio u razvoju.

Dakle, embrio sintetizira i oslobađa GA u endosperm tijekom klijanja. Cilj vježbe je dokazati ulogu giberelina u procesu razgradnje škroba te da dodatak giberelina može nadomjestiti ulogu embrija u stimuliranju razgradnje škroba. Ako se polovice sjemenki bez embrija namaču u otopini GA, dolazi do oslobađanja amilaze iz aleuronskog sloja.



Slika 1. Prikaz uloge giberelina pri klijanju sjemenke ječma.

## MATERIJAL

### Biljni materijal

-sjemenke pšenice

### Pribor

-4 Petrijeve zdjelice

-kapaljka

### Reagensi

-škrob

-giberelinska kiselina ( $GA_3$ )

-otopina  $I_2$ -KI (10 g KI i 5 g  $I_2$  u 100 ml, razrijeđena u omjeru 1:40)

-agar

## NAČIN IZVOĐENJA

U prve dvije Petrijeve zdjelice ulivena je hranjiva podloga koja sadrži 1% škroba, 3% agara i  $100 \text{ mg L}^{-1} GA_3$ , a u druge dvije podloga koja sadrži 1% škroba i 3% agara. Sve Petrijeve zdjelice su ostavljene stajati tako dugo dok se ne ohlade. Sjemenke pšenice su namočene 2 sata u vodi, a nakon toga su rezane poprečno tako da jedan dio sadrži embrio, a drugi ne. Na svaku od dviju vrsta priređenih podloga stavljene su u jednom nizu polovice sjemenki koje sadrže embrio, a u drugom nizu one koje ne sadrže. Sjemenke su inkubirane 24 sata pri sobnoj temperaturi.

Uklonite sjemenke s podloge, a podlogu prelijte tankim slojem otopine  $I_2$ -KI. Zabilježite na kojoj se podlozi pojavilo modro obojenje u neposrednoj blizini mjesta gdje su se nalazile polovice sjemenki.

## REZULTATI

Znakom "+" označite pojavu modrog obojenja u neposrednoj blizini mjesta gdje su se nalazile sjemenke, a znakom "-" pojavu obezbojene zone oko mjesta gdje su se nalazile sjemenke.

	Podloga s GA <sub>3</sub>	Podloga bez GA <sub>3</sub>
Dio sjemenke s embrijem		
Dio sjemenke bez embrija		

Zašto se u podlozi **bez GA<sub>3</sub>** pojavilo obezbojenje u blizini mjesta gdje su se nalazile polovice sjemenki **s embrijem**?

Zašto se u podlozi **s GA<sub>3</sub>** pojavilo obezbojenje i u blizini mjesta gdje su se nalazile polovice sjemenki **bez embrija**?

## 6.2. UČINAK ETILENA NA STARENJE LISTOVA

Za razliku od drugih regulatora rasta, etilen (eten) je jednostavni spoj ( $H_2C = CH_2$ ) koji je pri fiziološkim uvjetima u plinovitom stanju. Djeluje i kao hormon (unutar jednog organizma) i kao feromon (može djelovati na jedinke iste ili druge vrste koje se nalaze u blizini). Djelovanje etilena na biljne stanice počinje vezanjem na proteinski receptor što pokreće slijed reakcija u koje su uključene proteinske kinaze i transkripcijski faktori. Etilen može prolaziti kroz membrane i difundirati u međustanični prostor odakle lako može izaći iz biljnih tkiva.

Etilen djeluje na procese karakteristične za završne stadije razvitka biljke: dozrijevanje plodova, starenje (senescencija) listova i cvjetova, opadanje (abscizija) listova te prekid dormancije sjemenki i pupova. On izaziva tzv. trostruki odgovor sijanaca - inhibiciju produžnog rasta stabljike, lateralnu ekspanziju stabljike i horizontalni rast epikotila, epinastiju listova, produžni rast internodija submerznih biljaka, potiče razvitak adventivnog korijenja i regulira otvaranje hipokotilne kuke. Biosinteza etilena je povećana u stresnim uvjetima kao što su manjak vode, manjak kisika, niske temperature ili mehaničko oštećenje.

Za dokazivanje etilena koriste se biotestovi u kojima se kao pokazatelji koriste trostruki odgovor etioliranih sijanaca graška, epinastija listova rajčice te opadanje listova. Specifičnost odgovora i osjetljivost na niske koncentracije etilena ovih biotestova omogućava otkrivanje i određivanje približne koncentracije etilena. Određivanje točne koncentracije etilena omogućuje metoda plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom.

U ovoj će se vježbi pratiti učinak etilena na starenje listova bršljana izloženih etilenu koji se oslobađa iz ploda jabuke. Starenje je programirani proces koji dovodi do smrti organa ili čitave biljke. Pojedini regulatori rasta imaju različiti učinak na starenje. Citokinini i giberelini mogu odgoditi starenje, a etilen i abscizinska kiselina ga potiču. Etilen stimulira ekspresiju određenih gena koji kodiraju hidrolitičke enzime za razgradnju makromolekula u odraslim biljnim tkivima i organima na manje molekule, npr. aminokiseline, nukleotide, šećere i masne kiseline. Ovi spojevi se mogu prenositi u druga tkiva gdje će se koristiti za rast. Tipični enzimi koji se sintetiziraju tijekom starenja su proteaze, nukleaze, lipaze, amilaze, pektinaze i celulaza. Proces starenja prati razgradnja klorofila uslijed čega biljka gubi karakterističnu zelenu boju i postaje žuta. Uz pojavu žućenja listova, počinje razgradnja staničnih stijenki stanica u rastavnom sloju djelovanjem enzima pektinaze i celulaze. Stanične stijenke postaju tanje i mekane pa listovi uslijed vlastite težine ili mehaničkog podražaja otpadaju.



## Literatura

- Grichko, V. P., Glick, B. R. (2001). Ethylene and flooding stress in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 1-9.
- Morgan, P. W., Drew, M. D. (1997). Ethylene and plant response to stress. *Physiologia Plantarum* 100, 620-630.
- Koning, R. E. (2002). Plant Physiology Website.  
<http://koning.escu.ctstateu.edu/default.html>
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer F., Bresinsky A. (1998). Strasburger Lehrbuch der Botanik. 34. izdanje. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Taiz, L., Zeiger, E. (1991). Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California.

## MATERIJAL

### Biljni materijal

- grančice bršljana
- zreli plod jabuke

### Pribor

- 2 Erlenmeyerove tikvice od 150 ml
- 2 prozirne plastične vrećice
- voda

## NAČIN IZVOĐENJA

Erlenmeyerove tikvice napunite vodovodnom vodom i u svaku stavite po tri grančice bršljana. Uz jednu tikvicu s bršljanom stavite jabuku, a zatim svaku tikvicu prekrijte prozirnom plastičnim vrećicom.

Tijekom desetak dana promatrajte i bilježite promjene.

## REZULTATI

Objasnite promjene uočene na listovima koji su bili u vrećici zajedno s jabukom.

### 6.3. TRANSFORMACIJA BILJNIH STANICA BAKTERIJOM *Agrobacterium tumefaciens*

Infekcija ranjenoga biljnog tkiva bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* koja živi u tlu, može uzrokovati razvoj tumora vrata korijena, tzv. crown-gall tumora. Razvoj ovog tumora predstavlja dokaz da diferencirane stanice koje se normalno više ne dijele mogu ponovno postati mitotski aktivne.

Virulentni sojevi agrobakterija uz kromosomalnu DNA sadrže i plazmid, poznat pod nazivom Ti-plazmid (tumor-inducirajući plazmid).

Mali dio DNA Ti-plazmida, tzv. T-DNA, ugrađuje se u kromosomalnu DNA biljne stanice. T-DNA sadrži tzv. *onc* gene koji kodiraju enzime nužne za biosintezu citokinina i auksina te gene koji kodiraju enzime uključene u sintezu opina - metabolita specifičnih za tumor. Niti jedan od ovih gena nije aktivan u bakteriji, ali kada se ugrade u kromosom biljne stanice, ona počinje sintetizirati citokinin zeatin, auksin i neke opine. Opine koje sintetizira biljka agrobakterija može koristiti kao izvor dušika jer ima inducibilne gene za katabolizam opina.

Transformirane biljne stanice se dijele i stvaraju crown-gall tumor. Tumorsko tkivo može se osloboditi bakterija inkubacijom na 42 °C i dalje održavati neograničeno dugo u kulturi tkiva. Za razliku od normalnih tkiva, tumorsko tkivo za svoj rast ne zahtijeva dodatak niti citokinina niti auksina u hranidbenu podlogu.

Danas se Ti-plazmid koristi kao vektor za uvođenje stranih gena u biljne stanice, odnosno za dobivanje transformiranih biljaka.

#### MATERIJAL

##### **Biljni materijal**

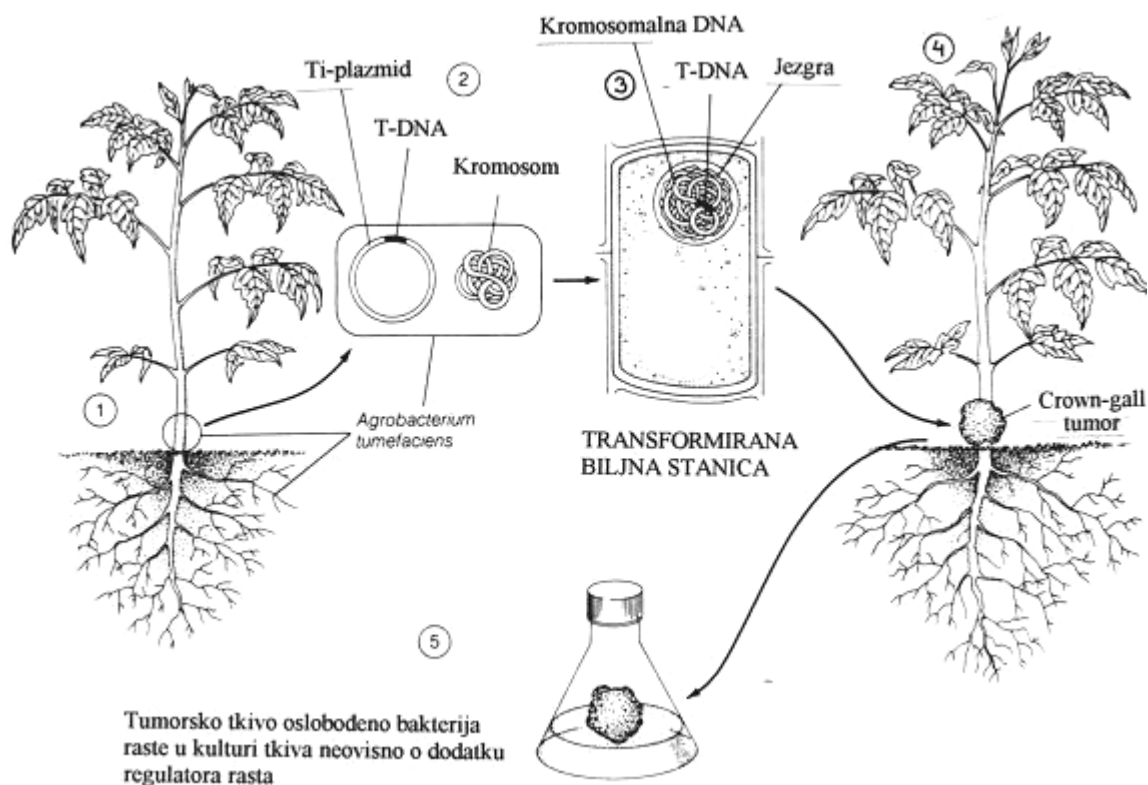
- biljka *Kalanchoe daigremontiana*
- kultura bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, soj B<sub>6</sub>S<sub>3</sub>

##### **Pribor**

- dvije iglice

## NAČIN IZVOĐENJA

Sterilnom iglicom napravite na plojci lista po 3-4 plitka ureza lijevo i desno od glavne žile. Ezom na te ozljede nanosite bakterije, ali samo na lijevoj strani plojke. Urezi na desnoj strani plojke bit će kontrola. Tijekom tri do četiri tjedna promatrajte razvoj tumora.



### Indukcija tumora bakterijom *Agrobacterium tumefaciens*

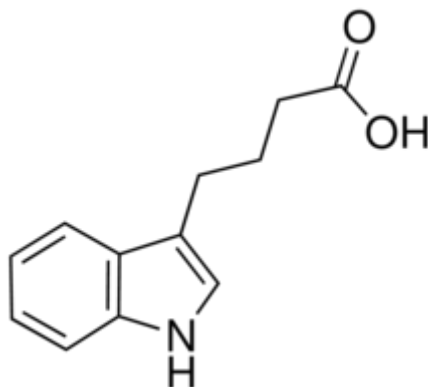
1) Tumor se počinje razvijati kada bakterije uđu kroz ozljedu koja se najčešće nalazi na prijelazu između korijena i stabljike (“vrat korijena”). 2) Virulentni sojevi bakterija uz kromosomalnu DNA sadrže i Ti-plazmid. 3) Plazmidna T-DNA ulazi u stanicu i ugrađuje se u kromosomalnu DNA biljne stanice. 4) Transformirane biljne stanice se počinju dijeliti pri čemu se stvara crown-gall tumor. 5) Tumorsko tkivo može se osloboditi bakterija inkubacijom na 42 °C i neograničeno dugo kultivirati na hranidbenoj podlozi bez dodatka regulatora rasta.

## REZULTATI

Crtež lista biljke *Kalanchoe daigremontiana* četiri tjedna nakon transformacije. Objasnite uočene promjene.

## 6.4. UČINAK AUKSINA NA RIZOGENEZU

Na reznicama nekih biljnih vrsta spontano se razvija adventivno korijenje (npr. afrička ljubičica, begonija), dok je kod drugih vrsta (npr. grah) proces rizogeneze moguć samo uz dodatak egzogenog auksina. Za indukciju rizogeneze najčešće se koriste sintetički auksini, npr. indol-3-maslačna kiselina (IBA).



indol-3-maslačna kiselina (IBA)

### MATERIJAL

#### **Biljni materijal**

- klijanci graha (*Phaseolus vulgaris* L.)

#### **Reagensi**

- matična otopina IBA (1000 mg/L)
- destilirana voda
- hranjiva podloga po Steinbergu

#### **Pribor i uređaji**

- stalak sa 4 epruvete
- automatske pipete
- menzura
- skalpel
- flomaster

## NAČIN IZVOĐENJA

Pripremite po 25 mL vodenih otopina indol-3-maslačne kiseline (IBA) sljedećih koncentracija: 10 mg/L, 25 mg/L i 50 mg/L. Pripremljene otopine stavite u epruvete na kojima je oznaka koncentracije IBA-e. U četvrtu epruvetu stavite 25 mL destilirane vode (kontrola).

Izdvojite 8 zdravih klijanaca graha približno jednake visine i podjednako razvijenih prvih listova. Odrežite stabljike 5 cm ispod supki te pomoću skalpela odstranite supke.

U svaku epruvetu stavite po dvije reznice graha. Nakon 24 sata inkubacije u vodenoj otopini IBA-e, reznice prebacite u hranjivu podlogu po Steinberg-u. Nakon 7 dana zabilježite i objasnite rezultate.

## REZULTATI



0 mg/L



10 mg/L



25 mg/L



50 mg/L

## 6.5. UČINAK GIBERELINA NA IZDUŽIVANJE STABLIJKE

Giberelini stimuliraju produžni rast internodija u brojnim biljnim vrstama. U stabljici sijanaca graha (*Phaseolus vulgaris*) egzogeno dodani giberelini stimuliraju rast i diobu stanica. Produžni rast često je popraćen smanjenim promjerom stabljike, smanjenom površinom listova i njihovom svjetlijom bojom.

### MATERIJAL

Biljni materijal	Pribor i uređaji
- klijanci graha <i>Phaseolus vulgaris</i> stari 7 dana	- Erlenmeyerove tikvice od 100 mL (usko grlo) - automatska pipeta, nastavci
Reagensi	- menzura - škare - ravnalo - marker
- matična otopina giberelina (1000 mg/mL)	
- bočica s destiliranom vodom	

### NAČIN IZVOĐENJA

#### Priprema otopine giberelina koncentracije 1,0 mg/L

U odmjernu tikvicu od 50 ml otpipetirajte potrebni volumen ( $V_1$ ) matične otopine giberelina ( $\gamma_1 = 1000$  mg/L) te ju nadopunite destiliranom vodom do oznake. Sadržaj tikvice prelijte u Erlenmeyerovu tikvicu s oznakom “GA<sub>3</sub> 1 mg/L”.

#### Izvođenje pokusa

Uzmite dvije Erlenmeyerove tikvice. U prvu ulijte 50 mL destilirane vode i označite ju oznakom “KONTROLA”), a u drugu 50 mL prethodno priređene otopine giberelina koncentracije 1,0 mg/L (označite ju oznakom “GA<sub>3</sub> 1,0 mg/L”).

Odaberite 2 zdrava klijanaca graha podjednake visine, podjednako razvijenih prvih listova te podjednako dugačkog internodija (dijela stabljike između nodija s prvim i nodija na kojem se počinju razvijati drugi listovi). Odrežite odabrane klijance 5 cm ispod supki, odstranite supke, izmjerite i zabilježite dužinu internodija u tablicu. Izmjerene reznice graha stavite u pripremljene Erlenmeyerove tikvice, a rezultate zabilježite nakon tjedan dana.

## REZULTATI

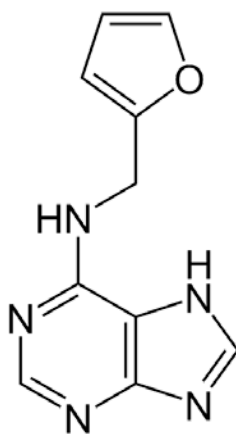
	Dužina internodija – početak pokusa	Dužina internodija – kraj pokusa	Razlika u dužini internodija
kontrola			
GA3 1 mg/L			

## 6.6. UČINAK CITOKININA NA ODGODU STARENJA LISTOVA

Listovi otkinuti s biljke vrlo brzo počinju pokazivati simptome starenja, čak i kad su dobro opskrbljeni vodom i mineralnim tvarima. Starenje listova (senescencija) je strogo kontrolirani razvojni proces koji može biti potaknut i okolišnim stresnim uvjetima. Starenje listova uključuje progresivne strukturalne promjene u stanicama (degeneracija grana-tilakoida, endoplazmatskog retikuluma, ribosoma, mitohondrija, tonoplasta i plazmaleme), što rezultira smanjenjem sadržaja klorofila, proteina, DNA, RNA,...) te promjenom metaboličke aktivnosti.

Citokinini su biljni regulatori rasta koji, između ostalog, imaju učinak na odgodu starenja listova. Utvrđeno je da citokinini povisuju aktivnost apoplastne invertaze koja cijepajući saharozu povećava metaboličku aktivnost u stanicama što rezultira odgodom procesa starenja.

U ovoj vježbi pratit ćemo učinak sintetskog citokinina kinetina na odrezane listove pelargonije.



Kinetin

### Literatura:

Pevalek-Kozlina, B. (2003). Fiziologija bilja. Profil, Zagreb.

Zwack, P. J., Rashotte, A. M. (2013). Cytokinin inhibition of leaf senescence. *Plant Signaling & Behavior* 8:7, e24737.



## MATERIJAL

### Biljni materijal

- 4 lista pelargonije

### Reagensi

- matična otopina kinetina (1000 mg/L)
- destilirana voda

### Pribor i uređaji

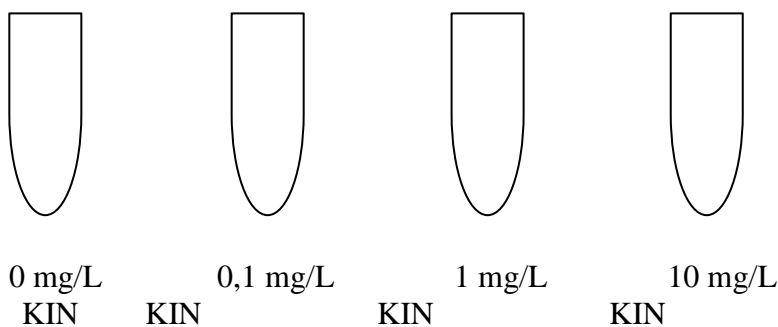
- stalak s 4 epruvete
- automatske pipete
- menzura
- skalpel
- flomaster

## NAČIN IZVOĐENJA

Pripremite po 25 mL vodenih otopina kinetina (KIN) sljedećih koncentracija: 10 mg/L, 1 mg/L i 0,1 mg/L. Pripremljene otopine stavite u epruvete s oznakama koncentracije kinetina). U četvrtu epruvetu stavite 25 mL destilirane vode (kontrola). Izdvojite 4 zdrava lista pelargonije podjednake veličine. U svaku epruvetu stavite po jedan list (s plojkom uronjenom u otopinu). Stalak s epruvetama prekrij kartonskom kutijom.

Nakon 7 dana zabilježite i objasnite rezultate.

## REZULTATI



## 7. DOKAZIVANJE SEKUNDARNIH BILJNIH METABOLITA

Uloga primarnog metabolizma u biljaka je osigurati gradivne tvari i energiju potrebnu za stanični rad. Stoga u primarni metabolizam ubrajamo reakcije npr. biosintezu i razgradnju ugljikohidrata, biosintezu aminokiselina i asimilaciju mineralnih tvari. Primarni metabolizam se odvija gotovo bez izuzetaka u svim stanicama organizma.

Sekundarni biljni metaboliti se nalaze u specijaliziranim diferenciranim stanicama i uglavnom nemaju značenje za samu stanicu nego za biljni organizam u cjelini. Primjer su cvjetni pigmenti, obrambene tvari u vakuolama epidermalnih stanica te elementi nekih potpornih tkiva.

### 7.1. ENZIMSKA RAZGRADNJA GLIKOZIDA PRULAURAZINA I AMIGDALINA

Sve eukariotske stanice, pa tako i biljne, imaju dobro razvijen membranski sustav zahvaljujući kojem je protoplazma podijeljena na brojne odjeljke (kompartimente). Ovakva stanična struktura uvjetuje neravnomjernu raspodjelu pojedinih tvari. Za unutarstanični metabolizam osobito je značajna odijeljenost enzima od supstrata. Npr. cijanogeni glikozidi se u intaktnim biljnim tkivima nalaze u vakuoli pa se ne razgrađuju jer su prostorno odijeljeni od citosolnih enzima koji ih cijepaju.

Glikozidi su kemijski heterogena skupina spojeva. Zajedničko im je svojstvo da sadrže barem jednu šećernu komponentu koja je glikozidnom vezom vezana ili na nešećernu komponentu (aglikon) ili na drugu šećernu komponentu. Svi se glikozidi specifičnim enzimima (glikozidazama) mogu razgraditi u svoje sastavne dijelove.

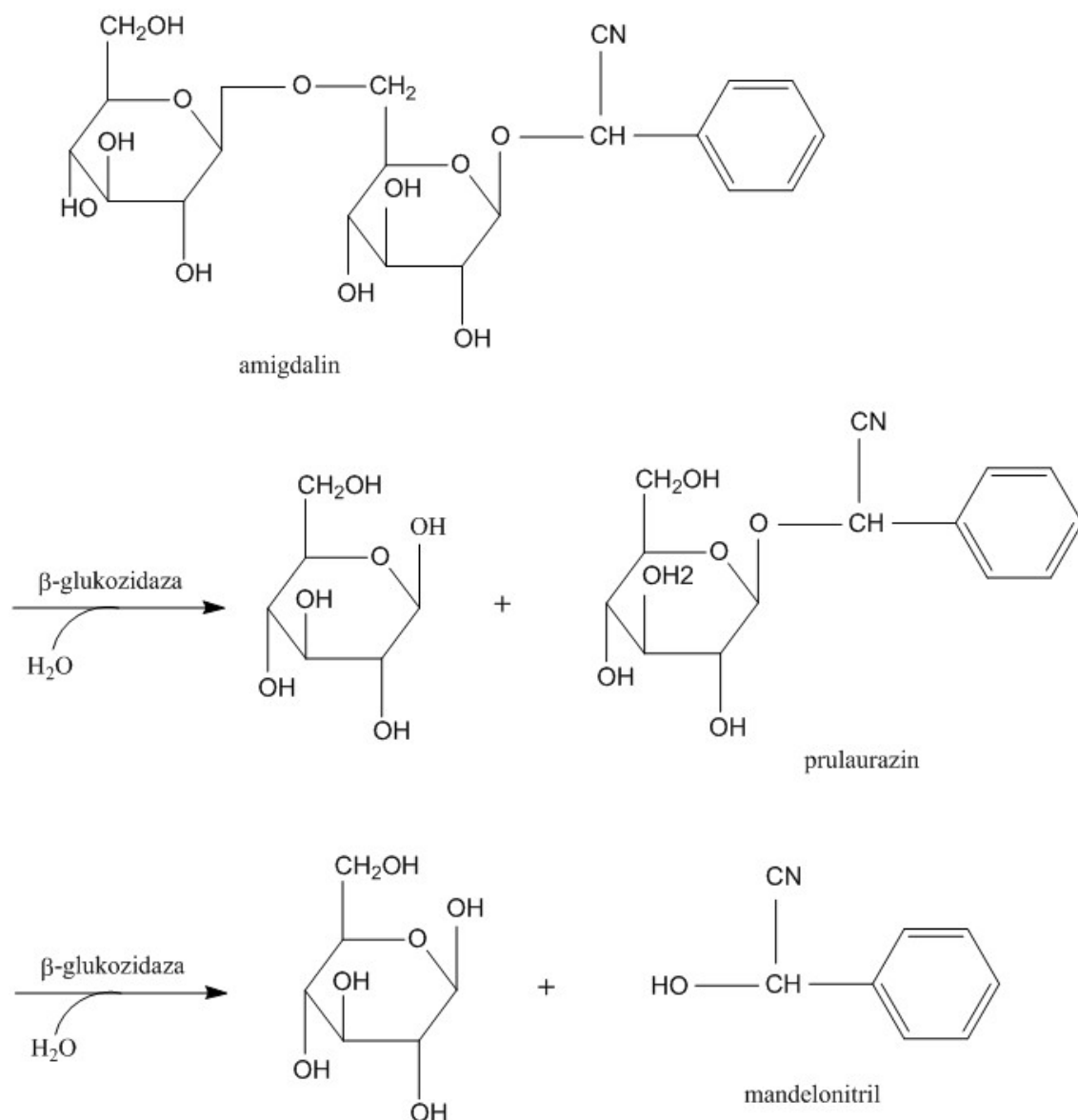
Glikozidi su česti sekundarni biljni metaboliti - npr. aromatski kumarinski glikozidi (npr. u nekih mahunarki), glikozidi iz gorušice koji sadrže sumpor (npr. sinigrin u crnoj gorušici i hrenu) ili gorki glikozidi (npr. u kičice). Često su to otrovne tvari, npr. cijanogeni glikozidi badema i drugog koštuničavog voća te glikozidi naprstka (*Digitalis*) i strupnika (*Strophantus*), digitalin i strofantin.

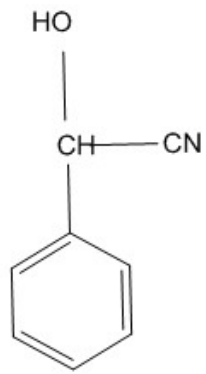
U listovima lovorvišnje nalazi se cijanogeni glikozid prulaurazin, a u sjemenkama badema, šljive i drugih koštuničavih voćnih plodova glikozid amigdalina. Hidrolizom pomoću enzima  $\beta$ -glikozidaze koji se nalazi u gorkim bademima od amigdalina se odvajaju dvije molekule glukoze, a slobodni aglikon se spontano raspada na benzaldehid i cijanovodik. Cijanovodik je brzodjelujući otrov koji inhibira stanično disanje jer se veže na hem skupinu citokrom oksidaze i drugih dišnih enzima. Upravo

zbog otrovnosti, specifičnog okusa i mirisa, prisustvo ovih glikozida ima određeno značenje u obrani biljaka od nametnika i biljojeda.

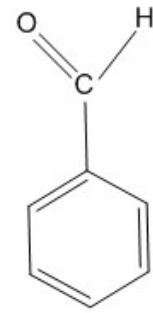
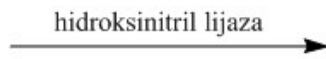
Budući da je sjemena lupina teško propusna za plinove, cijanovodik nastao razgradnjom cijanogenih glikozida ne može izaći iz sjemenke pa može biti jedan od čimbenika koji inhibira klijanje. Prisustvo inhibitora klijanja je ekološki nužno jer oni sprječavaju klijanje tako dugo dok ne nastupe povoljni okolišni uvjeti.

Cilj vježbe je dokazati cijanovodik koji nastaje razgradnjom prulaurazina, odnosno amigdalina. Dokazivanje se temelji na reakciji cijanovodika s natrijevim pikratom pri čemu nastaje smeđe obojena izopurpurna kiselina.

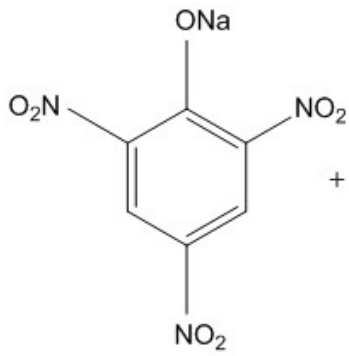




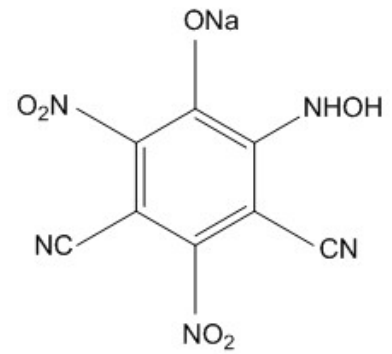
mandelonitril



benzaldehyd



natrijev pikrat



izopurpurna kiselina

## MATERIJAL

### Biljni materijal

- listovi lovorvišnje  
(*Prunus laurocerasus*)
- sjemenke marelice

### Reagensi

- 10%-tna otopina natrijevog karbonata
- filtar papir natopljen pikrinskom kiselinom
- destilirana voda

### Pribor

- tarionik
- 4 boce sa širokim grlom i gumenim čepom
- škare
- pribadače

## NAČIN IZVOĐENJA

Jedan do dva lista lovorvišnje izrežite škarama na sitne komadiće i stavite u bocu sa širokim grlom. U drugu bocu stavite čitavi, neoštećeni list. U treću bocu stavite deset neoštećenih sjemenki iz koštica marelica ili šljiva, a u četvrtu deset sjemenki smrvljenih u tarioniku. U sve četiri boce dodajte 1-2 ml destilirane vode i malo ih protresite. Uzmite filter papir već natopljen pikrinskom kiselinom (žute je boje), kapnite na njega kap 10%-tne otopine natrijevog karbonata i pričvrstite ga pribadačom na gumeni čep. Začepite boce pazeći da filter papir ne dodiruje niti biljni materijal niti stijenke boce. Promatrajte promjenu boje filter papira.

## REZULTATI

U kojim se bocama na filter papiru pojavilo smeđe obojenje?

Na temelju građe biljne stanice i smještaju biokemijskih reakcija u određene stanične odjeljke objasnite dobiveni rezultat.

## 7.2. MJERENJE AKTIVNOSTI POLIFENOLOKSIDAZE

U biljkama se nalaze različiti fenolni spojevi kojima je jedina zajednička značajka aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih grupa. Najčešći fenoli su fenol (hidroksibenzen), katehol (1,2-dihidroksibenzen), hidrokinon (1,4-dihidroksibenzen) i fluoroglucinol. U fenole se ubrajaju različiti produkti koji imaju ulogu u obrani biljke od nametnika, flavonoidi, lignin, tanini, tvari s alelopatskim učinkom, a također i redoksofaktori kao što je koenzim Q (ubikvinon). Neposredni prekursori većine fenola su aromatske aminokiseline triptofan, tirozin i fenilalanin.

Pojava smeđeg obojenja na površini ranjenog biljnog tkiva (npr. ploda jabuke, banane, gomolja krumpira) je povezana s prisutnošću grupe enzima polifenoloksidaza. To su topljivi enzimi koji uz sudjelovanje kisika iz zraka oksidiraju bezbojne polifenole (spojeve koji na aromatskom prstenu imaju više od jedne OH skupine) u kinone. Nastali kinoni se kondenziraju u tamno obojene polimere. Jedan od mnogobrojnih supstrata polifenoloksidaze je katehol. On se prvo oksidira u narančasti spoj benzokinon koji nakon toga prelazi u smeđe komplekse.

Askorbinska kiselina sprječava pojavu smeđe boje jer služi kao donor elektrona kinonreduktazi (enzimu koji katalizira reakciju u suprotnom smjeru, tj. pretvorbu kinona u difenole) pa na taj način onemogućava polimerizaciju kinona.

Budući da se u katalitičkom središtu fenoloksidaza nalazi divalentni bakar, spojevi koji s njim stvaraju komplekse, npr. dietilditiokarbaminat i feniltiourea, inhibiraju fenoloksidaze.

Moguće je da kinoni nastali djelovanjem (poli)fenoloksidaze štite biljke od infekcije bakterijama i gljivicama. Osim toga, ti enzimi sudjeluju i u izgradnji fenolnih i kinoidnih struktura, flavona, tanina, alkaloida, te u biosintezi lignina iz ligninskih monomera (npr. koniferilnog i sinapilnog alkohola) gdje fenolaze (uz peroksidazu) imaju također značajnu ulogu.

U ovoj se vježbi prati aktivnost polifenoloksidaze iz krumpira. Kao supstrat će se koristiti katehol koji se reakcijom prevodi u oksidirani oblik, benzokinon. Taj orto-kinon se brzo pretvara u crveno-smeđi produkt, što se može pratiti spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm. Budući da je ova posljednja reakcija vrlo brza, mjerenje crveno-smeđeg produkta u određenim vremenskim intervalima ukazuje na brzinu enzimske reakcije.



## MATERIJAL

### Biljni materijal

-gomolj krumpira

### Reagensi

-destilirana voda  
 -0,1 M fosfatni pufer pH 6  
 -0,024 M katehol

### Uređaji

-vaga  
 -homogenizator  
 -centrifuga  
 -spektrofotometar

### Pribor

-nož  
 -lijevak  
 -2 Erlenmeyerove tikvice od 100 ml  
 -platno za cijedenje  
 -posuda s ledom  
 -Eppendorf epruvete  
 -staklene epruvete od 10 ml  
 -automatska pipeta

## NAČIN IZVOĐENJA

### Priprema ekstrakta

Izvažite oko 20 g tkiva gomolja krumpira i usitnite ga u homogenizatoru u toliko mililitara destilirane vode koliko iznosi masa krumpira. Homogenat ulijte u Erlenmeyerovu tikvicu kroz lijevak, preko platna za cijedenje. Zatim dio homogenata prelijte u ohlađene Eppendorf epruvete i centrifugirajte 10 min na 5000 g pri 4 °C. Po završetku centrifugiranja supernatant prelijte u tikvicu koju ćete držati na ledu.

### Praćenje enzimske reakcije

U staklenoj epruveti pripremite reakcijsku smjesu koja se sastoji od 0,5 ml destilirane vode, 0,5 ml fosfatnog pufera i 0,5 ml biljnog ekstrakta. Lagano ju protresite i prelijte u staklenu kivetu spektrofotometra. Za slijepu probu u tu reakcijsku smjesu dodajte 120 µl vode, a za praćenje enzimske reakcije dodavat ćete 120 µl katehola u vremenu  $t = 0$  i pokrenuti mjerenje. Instrument je namješten da bilježi apsorbanciju pri 540 nm u vremenskim razmacima od 15 sekundi, (ukupno 20 mjerenja).

Ako reakcija teče prebrzo, razrijedite ekstrakt destiliranom vodom, a ako je prespora dodajte veći volumen homogenata, ali za odgovarajući iznos smanjite volumen

destilirane vode. Nakon toga obavezno ponovno priredite slijepu probu i nulirajte instrument prije mjerenja enzimske reakcije.

Po završetku mjerenja podatke prenesite u program Microsoft Excel i grafički prikažite ovisnost apsorbancije o vremenu reakcije. Odredite početnu brzinu reakcije (apsorbancija  $\text{min}^{-1}$ ).

## REZULTATI

Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o vremenu reakcije:

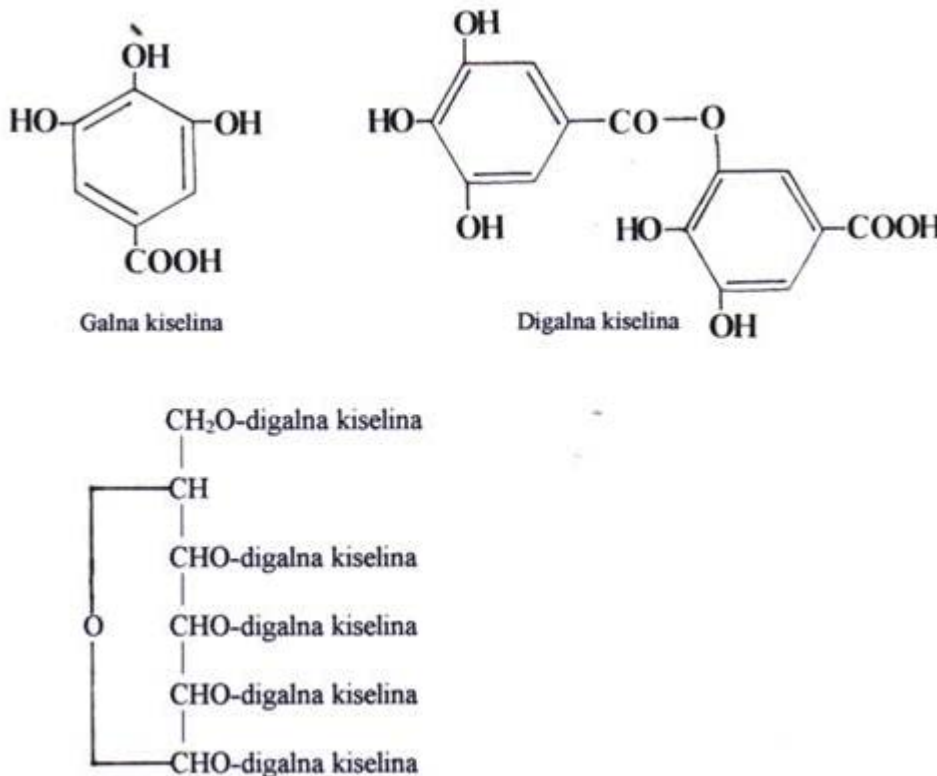
Brzina reakcije ( $\text{A min}^{-1}$ ):



### 7.3. REAKCIJE NA TRESLOVINE (TANINE)

Tanini su fenolni polimeri velike relativne molekularne mase (600 - 3000).

Postoje dvije osnovne skupine tanina: hidrolizabilni i kondenzirani. Hidrolizabilni tanini su polimeri čije su sastavne jedinice esteri fenolnih kiselina i šećera. Od fenolnih kiselina u sastavu tanina se često nalazi galna kiselina, a od šećera najčešća je glukoza. Takve tanine nazivamo taninima galotaninskog tipa. Sastoje se od heksoze (najčešće glukoze) na koju je vezano pet molekula digalne kiseline.



Kondenzirani tanini su veliki kondenzacijski produkti katehina (flavan-3-ol) ili flavan-3,4-diola.

Zajedničko svojstvo svih tanina je laka topljivost u vodi, opori okus i taloženje bjelančevina. Hidrolizabilni tanini se lako hidroliziraju u slabim kiselinama dok je za hidrolizu kondenziranih tanina potrebna jaka kiselina. Svojstvo vezanja bjelančevina omogućuje uporabu tanina za štavljenje kože. Oni se, naime, vežu uz kolagen i ostale bjelančevine kože povećavajući njezinu otpornost na temperaturu, vlagu i mikroorganizme. Njihov opori okus uzrokovan je vezanjem tanina za bjelančevine sline. Ovo svojstvo tanina da talože proteine lako se može dokazati: ako otopljenu želatinu (polipeptid) dodamo otopini koja sadrži tanine nastat će bijeli talog.

Tanini su česti sastavni dijelovi staničnoga soka. Vakuole ispunjene treslovinama osobito su česte u kori i plodovima (okus brusnica, mušmula i borovnica koji "steže"

usta). U čajevca su treslovinama bogati listovi, a u kavovca sjemenke. Treslovine često štite tkivo od napada mikroorganizama.

U stanicama se tanini mogu dokazati na više načina: sa željeznim (III)-kloridom daju modro zeleno obojenje, s p-dimetilaminobenzaldehidom daju crveno obojenje, s kalijevim bikromatom daju smeđe obojenje, a s blagom otopinom kofeina daju kapljičasti talog.

Komercijalni tanin je žućkasti prašak topljiv u vodi i alkoholu, a netopljiv u eteru. To je smjesa galne kiseline te estera glukoze i galne kiseline. Zbog velikog broja fenolnih skupina kiselog je karaktera pa se naziva i *acidum tannicum*.

## MATERIJAL

### Biljni materijal

-smjesa suhih listova biljaka *Rhus* i *Cotinus* ili listovi matičnjaka (*Melissa officinalis*)

-čuvarkuća (*Sempervivum tectorum*)

### Reagensi

-željezni (III)-klorid ( $\text{FeCl}_3$ , 1%-tna vodena otopina i 5%-tna alkoholna otopina)

-olovni acetat ( $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ , 5%-tna otopina)

-amonijev molibdat ( $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ , 5%-tna otopina)

-kalijev bikromat ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , 10%-tna otopina)

-p-dimetilaminobenzaldehid (10%-tna otopina)

### Pribor

-stalak sa 5 velikih epruveta

-menzura od 5 i 100 ml

-čaha od 100 ml

-stakleni lijevak

-stakleni štapić

-predmetna i pokrovna stakalca

-tarionik

-britvica

-iglice

-pinceta

-filtar papir

-drvena kvačica

-el. kuhalo

-mikroskop

## NAČIN IZVOĐENJA

Malo zdrobljenog suhog biljnoga materijala skuhaite u 50 ml vode, ohladite, profilirajte i razdijelite u 5 epruveta (u svaku ulijte 5-10 ml filtrata). Dobiveni filtrat u prvoj epruveti poslužit će kao kontrola, a filtrat u ostalima (od 2 do 4) za izvođenje sljedećih reakcija na tanine:

Filtratu u drugoj epruveti dodajte nekoliko kapi 1%-tne **vodene** otopine željeznog (III)-klorida. Pojavit će se modro obojenje.

Zagrijte sadržaj treće epruvete u vodenoj kupelji i dok je još vruć dodajte 5-10 ml otopine olovnog acetata. Žuti talog dokazuje prisutnost tanina.

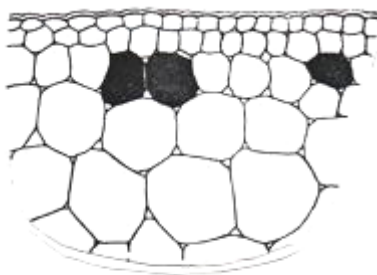
Filtratu u trećoj epruveti dodajte nekoliko kapi 5%-tne otopine amonijevog molibdata. Pojavit će se crveno obojenje.

### **Histološke reakcije na katehinske tanine**

Vakuole epidermskih stanica listova čuvarkuće sadrže mnogo tanina pa se nazivaju taninski idioblasti.

Načinite tanke plošne prereze gornje epiderme listova čuvarkuće i stavite ih na predmetnice. Na prerezima izvedite sljedeće reakcije i zatim ih promatrajte mikroskopom:

- 1) kapnite kap 5%-tne **alkoholne** otopine željeznog (III)-klorida; stanice koje sadrže tanine obojit će se tamno modro do tamno zeleno.
- 2) kapnite kap 10%-tne otopine p-dimetilaminobenzaldehida; stanice s taninima obojit će se intenzivno crveno. Ova je reakcija karakteristična za katehinske tanine.



Taninski idioblasti nakon karakterističnih reakcija

## REZULTATI

kontrola

filtrat  
+  $\text{FeCl}_3$

filtrat  
+ olovni acetat

filtrat  
+ amonijev  
molibdat

Taninski idioblasti:

Reakcija s  $\text{FeCl}_3$

Reakcija s p-dimetilaminobenzalhidom

#### 7.4. DOKAZIVANJE ESKULINA, FRAKSINA I BERBERINA FLUORESCENCIJOM

Fluorescentna tvar je ona tvar koja apsorbira svjetlost jedne valne duljine (ekscitacijska svjetlost), a emitira svjetlost specifične, veće valne duljine. Spektar fluorescencije za pojedine tvari je karakterističan pa stoga omogućuje dokazivanje prisutnosti malih količina istraživanih tvari. Kvalitativna analiza se temelji na promatranju fluorescencije i na procjeni boje i jakosti sekundarne emisije. Mjerenjima intenziteta fluorescencije (fluorometrijom) mogu se provesti i kvantitativne analize.

Mnoge biološke tvari imaju svojstvo primarne fluorescencije, tj. fluorescencije koja potječe neposredno od promatranog objekta. Tako npr. kolagena vlakna obasjana svjetlošću određene valne duljine fluoresciraju modrikasto, hrskavica svijetlomodro, lipoidi žuto, porfirini crveno, a kloroplasti tamnocrveno. U kori nekih drvenastih biljaka nalaze se sekundarni metaboliti koji također imaju svojstvo fluorescencije, npr. u kori žutike nalazi se berberin, u kori jasena fraksin, a u kori divljeg kestena eskulin.

Neke boje također fluoresciraju (npr. fluorescein, neutralno crvenilo, eozin i akridinoranž) pa u mikroskopiji mogu poslužiti za bojenje pojedinih dijelova stanice. .

#### MATERIJAL

##### **Biljni materijal**

-grančice divljeg kestena (*Aesculus hippocastanum*),  
jasena (*Fraxinus* sp.) i žutike (*Berberis* sp.)

##### **Pribor**

-UV svjetiljka  
-3 epruvete  
-skalpel

#### NAČIN IZVOĐENJA

Oko 10 minuta prije promatranja fluorescencije uključite UV svjetiljku.

Ogulite koru s grana divljeg kestena, jasena i žutike i stavite ih u epruvete koje su do polovice napunjene vodom. Epruvete redom stavljajte pod UV-svjetiljku i promatrajte pojavu fluorescencije.

Napomena: UV-svjetiljka se mora ukopčati 10 minuta prije uporabe. Nakon iskopčavanja, svjetiljka se smije ponovo uključiti tek nakon 15-20 minuta. Pri radu s UV-svjetiljkom nemojte uklanjati crni zastor niti gledati u izvor UV-svjetlosti.

#### REZULTATI

Opišite kako ste dokazali fluorescenciju sekundarnih biljnih metabolita koji se nalaze u kori kestena, jasena i žutike.

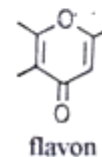
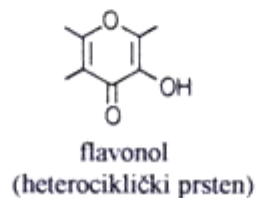
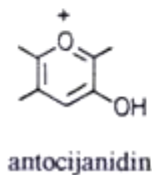
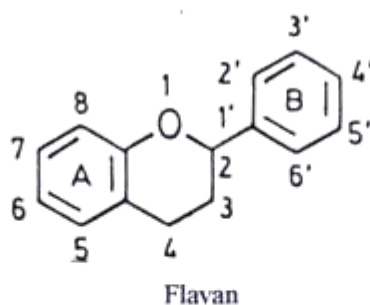
## 7.5. APSORPCIJSKI SPEKTAR ANTOCIJANA

### Antocijani

Antocijani (grč. *anthos* - cvijet, *kyanos* - tamno modro) su pigmenti iz skupine flavanoida koji se često nalaze u cvjetovima, listovima i plodovima dajući im crvenu, modru ili ljubičastu boju.

Flavanoidi su organski spojevi s 15 ugljikovih atoma. Njihov osnovni kostur se sastoji od dva benzenska prstena (A i B) te jednog heterocikličkog prstena. Opisano ih je više od 2000. Na prstenove se vežu hidroksilne skupine preko kojih su često vezani različiti supstituenti (npr. šećeri, metilne skupine).

U biljnoj fiziologiji su najvažnije tri grupe flavanoida: antocijani, flavonoli i flavoni.



Antocijani su u biljci prisutni kao glikozidi (antocijan = antocijanidin + šećer). Šećerna komponenta vezana je na prsten A ili na heterociklički prsten. Međusobno se razlikuju po broju i vrsti supstituenata na prstenima A i B. Obojenost ovisi o supstituirajućoj grupi na tom istom prstenu, o pH vrijednosti staničnog soka, nazočnosti metalnih iona koji se kompleksno vežu uz molekulu antocijana te o nazočnosti drugih flavanoida.

## Apsorpcijski spektar

Iz apsorpcijskog spektra neke tvari vidljivo je koje valne duljine ta tvar najviše apsorbira. Općenito, svi pigmenti se opisuju valnom duljinom maksimalne apsorpcije vidljivog dijela spektra. Npr. tvar koju vidimo kao tamno modru ima apsorpcijski maksimum pri valnim duljinama oko 600 nm, znači u žutom dijelu spektra. Tvar koju vidimo kao žutu ima maksimum apsorpcije u modrozelenom dijelu spektra (450 - 470 nm).

Cilj ove vježbe je snimanje apsorpcijskih spektara antocijana iz nekoliko biljaka pomoću spektrofotometra Spekol 1100 (Analytik Jena, Njemačka).

## MATERIJAL

### Biljni materijal

-biljke koje sadrže antocijan, npr. *Tradescantia zebrina*, *Tradescantia spathacea* (*Rhoeo discolor*), ukrasna kopriva *Coleus blumei*, kupus *Brassica oleracea*, barska leća *Spirodela polyrrhiza*

### Reagensi

-pufer za ekstrakciju antocijana - 1%-tna otopina kloridne kiseline u metanolu (2,73 ml 37%-tne HCl dodati u 97,27 ml metanola)

### Pribor i uređaji

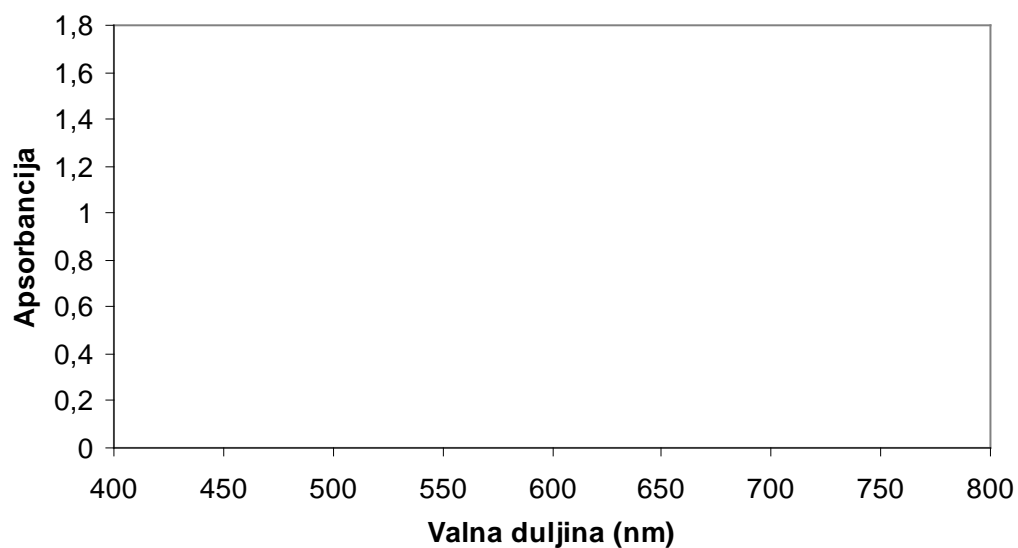
-tarionik (ohlađeni)	-Eppendorf-epruvete
-pinceta	-posudice za vaganje
-skalpel	-vaga
-staklena ploča (ohlađena)	-centrifuga
-automatska pipeta	-kivete za spektrofotometar
-Pasteurova pipeta	-spektrofotometar

## NAČIN IZVOĐENJA

Vagnite 50 mg biljnog tkiva koje sadrži pigment antocijan (svaka grupa studenata može uzeti drugu biljnu vrstu). Tkivo usitnite skalpelom na hladnoj staklenoj ploči i prenesite pincetom u ohlađeni tarionik. Automatskom pipetom dodajte 1 ml pufera za ekstrakciju antocijana i homogenirajte tkivo. Dobiveni homogenat prelijte u Eppendorf epruvete. Nakon toga tarionik isperite s još 0,5 ml pufera i dodajte u istu Eppendorf epruvetu. Centrifugirajte u ohlađenoj centrifugi 10 minuta pri 5000 g. Po završetku centrifugiranja supernatant prelijte u čiste Eppendorf-epruvete koje odmah stavite u posudu s ledom. Supernatant prelijte u kivetu i snimate apsorpcijski spektar antocijana. Za slijepu probu uzmite pufer koji ste koristili za ekstrakciju.

## REZULTATI

Apsorpcijski spektar antocijana:



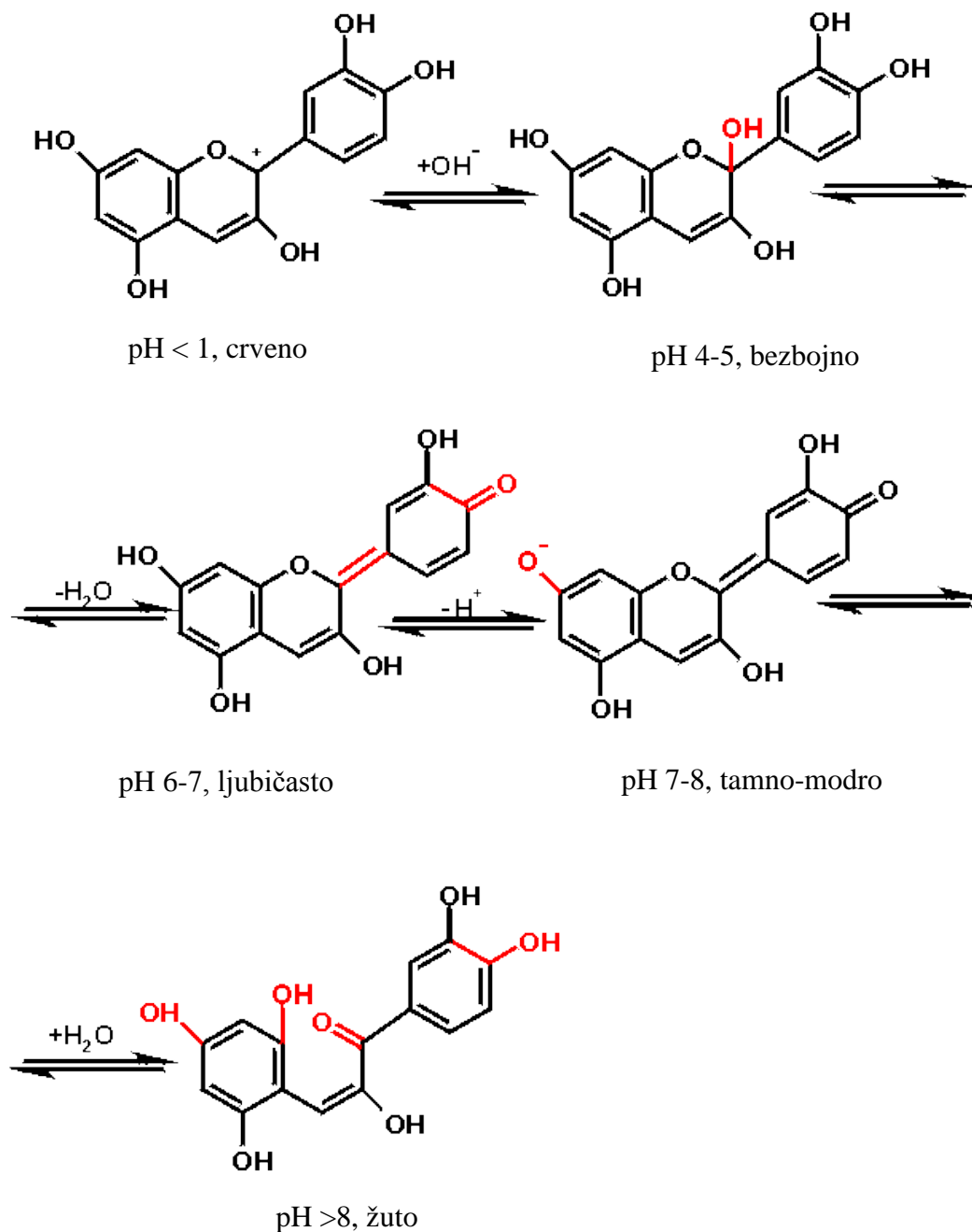
Usporedite valne duljine maksimuma apsorpcije antocijana iz različitih vrsta biljaka.

Biljka	$\lambda_{\max}$	A
<i>Tradescantia spathacea</i>		
<i>Tradescantia zebrina.</i>		
<i>Coleus blumei</i>		
<i>Brassica oleracea</i>		
<i>Spirodela polyrrhiza</i>		



## 7.6. OBOJENOST ANTOCIJANA PRI RAZLIČITIM pH VRIJEDNOSTIMA

Obojenje antocijanidina je u rasponu od crvene do plave boje. U kiselom mediju heterociklički prsten A ima oksonijsku strukturu. Aromatizacija srednjeg prstena dovodi do jake apsorpcije svjetlosti i stoga su antocijanidini tamnije obojeni u odnosu na flavone i flavonole koji se javljaju kao žuti, dijelom bezbojni te fluorescentni.



Slika. Promjena boje antocijana u otopinama različitih pH vrijednosti

Antocijanidini se međusobno razlikuju po radikalima na prstenu B. U stanici je u pravilu za njih vezan šećer preko trećeg C-atoma na heterocikličkom prstenu pa tvore glikozide - antocijane.

Oba aromatska prstena (A i B) flavanskog kostura dolaze iz dvaju različitih sintetskih puteva. Prsten A je iz acetat-mevalonatnog puta, a prsten B iz šikimatskog.

Kao što je ranije spomenuto boja antocijana je ovisna o broju i vrsti radikala na prstenu B. S porastom broja hidroksilnih grupa boja se mijenja od crvene prema modroj, dok se metiliranjem obojenost mijenja prema crvenom. S različitim metalnim ionima i ugljikohidratima antocijani mogu stvarati komplekse pri čemu im se također mijenja boja.

*In vitro* se antocijani ponašaju kao indikatori pH vrijednosti, što znači da s promjenom pH vrijednosti mijenjaju boju. U kiselom mediju su crveni, a u alkalnom plavi.

*In vivo* se promjena boje antocijana uglavnom ne događa kao posljedica promjene pH vrijednosti staničnog soka, već je za to odgovorno prisustvo metalnih iona i vrsta radikala na prstenu B. Npr. u plućnjaka *Pulmonaria officinalis* uočava se promjena boje od ljubičaste do plave, uz neznatnu promjenu pH vrijednosti staničnog soka.

[http://lecturedemos.chem.umass.edu/chemReactions4\\_9A.html](http://lecturedemos.chem.umass.edu/chemReactions4_9A.html)

## MATERIJAL

### Biljni materijal

-biljke koje sadrže antocijan, npr. *Zebrina pendula*, *Rhoeo discolor*, ukrasna kopriva *Coleus blumei*, kupus *Brassica oleracea*, barska leće *Spirodela polyrrhiza*

### Reagensi

-puferi za kalibriranje pH metra (pH vrijednosti 4, 7 i 9)  
-0,1 M fosfatna kiselina  
-2 M natrijeva lužina

### Pribor i uređaji

-skalpel	-sedam bočica s čepovima, volumena 50 ml
-staklena ploča	-stalak sa šest epruveta
-2 staklene čaše od 400 ml	-menzura
-kapaljka	-električno kuhalo
-stakleni lijevak	-pH metar
-filtar-papir	-magnetska miješalica
-pipeta od 5 ml	-automatska pipeta

## NAČIN IZVOĐENJA

### Priprema biljnog materijala

Vagnite 20 g listova biljke koja sadrži antocijan, usitnite ih skalpelom na staklenoj ploči na komadiće od oko 0,5 cm<sup>2</sup> i stavite kuhati u 30 ml destilirane vode. Nakon 5 minuta kuhanja u kipućoj vodi, ekstrakt profiltrirajte i stavite u bočicu s čepom.

### Priprema pufera

Kalibrirajte pH metar s puferima za kalibraciju pH vrijednosti 4 i 7 (kalibracija u dvije točke).

Ulijte u staklenu čašu 200 ml 0,1 M fosfatne kiseline i stavite ju miješati na magnetsku miješalicu. U otopinu kiseline uronite elektrodu pH metra. Kapalicom ili Pasteurovom pipetom dodajte kap po kap 2 M natrijeve lužine sve dok ne postignete pH vrijednost 1,8. Budući da je to približna pH vrijednost 0,1 M fosfatne kiseline možda nećete trebati dodati niti jednu kap lužine. Nakon toga odmjerite 30 ml i prenesite u staklenu bočicu s čepom.

Na isti način, dodavanjem potrebne količine lužine i uzimanjem po 30 ml uzorka priredite pufere pH vrijednosti 6, 7, 8, 10 i 12,5.

### Izvođenje pokusa

Otpipetirajte po 1 ml svakog pripremljenog pufera u epruvete na stalku. Svakoj epruveti dodajte 100-200 µl pripremljenog biljnog ekstrakta. Zabilježite i objasnite rezultate.

## REZULTATI

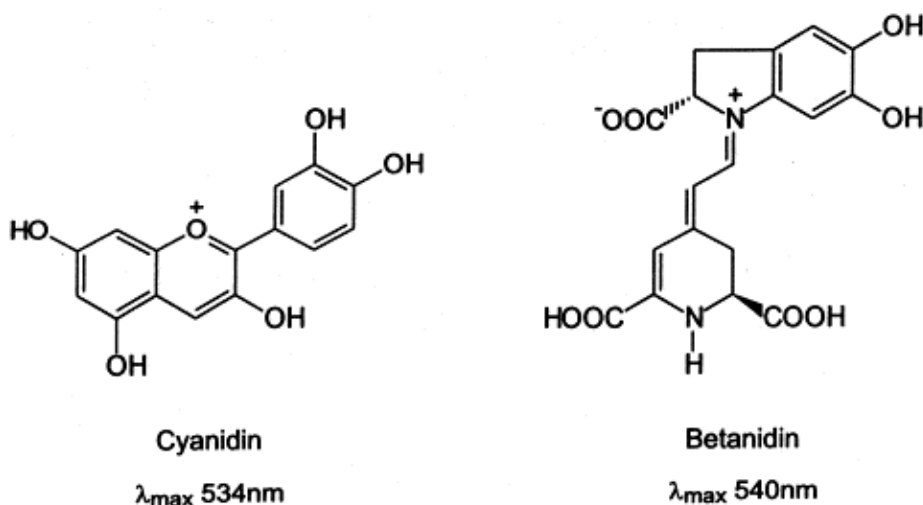
pH vrijednost	1,8	6	7	8	10	12,5
------------------	-----	---	---	---	----	------

obojenje  
ekstrakta

## 7.7. TESTOVI ZA RAZLIKOVANJE ANTOCIJANA I BETALAINA

Crveno, ljubičasto i modro obojenje u biljaka potječe od dvije skupine pigmenata - antocijana i betalaina. Obje skupine pigmenata se u biljaka nalaze u vakuoli, u obliku glikozida topljivih u vodi. Nekada se vjerovalo da su betalaini srodni antocijanima, no kasnije se utvrdilo da su ovi pigmenti kemijski vrlo različiti te da se u istoj biljci nikad ne pojavljuju zajedno.

**Antocijani** su po kemijskom sastavu flavanoidi. U biljkama su prisutni kao glikozidi (njihov aglikonski dio naziva se antocijanidin). Široko su rasprostranjeni u biljnom svijetu (npr. grožđe, borovnica, kupina, malina, trešnja, višnja, brusnica, bobice bazge, glog, akai, crveni kupus, crveni luk, peonija, petunija ...).



Slika 1. Cijanidin iz crvenog kupusa i betanidin iz cikle.

**Betalaini** su po kemijskom sastavu alkaloidi, te kao takvi sadrže dušik. U biljci su prisutni kao glikozidi (njihov aglikonski dio naziva se betacijanidin). Pojavnost betalaina ograničena je na svega 10 porodica unutar reda Caryophyllales (Achatocarpaceae, Amaranthaceae, Basellaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Didiereaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae, Portulacaceae). Betalaini se dijele na dvije skupine pigmenata, betacijane i betaksantine. Betacijani biljkama daju crvenkasta i ljubičasta obojenja (npr. betanidin iz cikle), za razliku od betaksantina koji biljkama daju žuta i narančasta obojenja (npr. indikaksantin iz kaktusa indijske smokve).

Cilj vježbe je pomoću jednostavnih testova odrediti pripada li pojedini biljni pigment skupini antocijana ili betalaina. Budući da su kemijski različiti te se u istoj biljci nikad ne pojavljuju zajedno, moguće je jednoznačno odrediti koji je pigment u biljci prisutan.

## MATERIJAL

### Biljni materijal

- korijen cikle (*Beta vulgaris* L.)
- crveni kupus (*Brassica oleracea*)

### Reagensi

- 1%-tna otopina kloridne kiseline u metanolu (2,73 ml 37%-tne HCl dodati u 97,27 ml metanola)
- 4 M otopina HCl
- 2 M otopina NaOH

### Pribor i uređaji

- stalak sa 4 epruveta
- destilirana voda
- bijeli karton
- staklena čaša od 50 ml
- staklena čaša od 100 ml
- staklene kuglice
- drvena štipaljka
- električno kuhalo
- plastične kapalice

## IZVOĐENJE VJEŽBE

### Ekstrakcija biljnih pigmenata

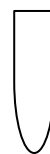
Pripremite ekstrakt crvenog kupusa i cikle (20 g svježeg tkiva homogenirajte u 200 mL 1%-tne otopine kloridne kiseline u metanolu).

### Reakcija pigmenata u kiselim uvjetima

U prvu epruvetu dodajte 1 mL ekstrakta crvenog kupusa, 1 mL destilirane vode i 1 mL 4 M HCl. U drugu epruvetu dodajte 1 mL ekstrakta cikle, 1 mL destilirane vode i 1 mL 4 M HCl. Obje epruvete istovremeno stavite u kipuću vodenu kupelj na 5 minuta. Nakon isteka 5 minuta izvadite epruvete i zabilježite promjenu boje ekstrakata. Antocijani će zadržati početnu boju, dok će betalaini izgubiti boju kuhanjem. Skicirajte rezultate te napišite kojoj skupini pigmenata pripadaju pigmenti iz priređenih ekstrakata.



prije kuhanja    poslije kuhanja  
**ekstrakt kupusa**



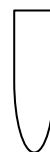
prije kuhanja    poslije kuhanja  
**ekstrakt cikle**

### Reakcija pigmenata u lužnatim uvjetima

U treću epruvetu dodajte 1 mL ekstrakta crvenog kupusa i 1 mL destilirane vode. U četvrtu epruvetu dodajte 1 mL ekstrakta cikle i 1 mL destilirane vode. Zatim u svaku epruvetu (epruvetu br. 3 i 4) dodajte po 0,5 mL 2 M NaOH i promućkajte. Antocijani prelaze u plavo-zelenu boju koja vremenom blijedi, dok betalaini trenutno prelaze u stabilnu žutu boju. Skicirajte rezultate te napišite kojoj skupini pigmenata pripadaju pigmenti iz priređenih ekstrakata.



prije NaOH      poslije NaOH  
**ekstrakt kupusa**



prije NaOH      poslije NaOH  
**ekstrakt cikle**

---

---

## 8. FIZIOLOGIJA GIBANJA

U biljnom i životinjskom svijetu postoje dvije vrste gibanja – lokomotorna gibanja i gibanja organa. Lokomotornim gibanjima nazivamo promjenu mjesta boravka cijelog organizma i ta je vrsta gibanja karakteristična za životinje te neke bakterije, gljive, alge i spolne stanice papratnjača. U biljnom je svijetu ograničena na gamete nekih golosjemenjača (*Cycas*, *Gynkgo*) te gibanja u stanicama.

Budući da su biljke sesilni organizmi kod njih postoje gibanja organa i staničnih organela pri čemu se mijenja njihova orijentacija u prostoru. Takva gibanja omogućuju biljnim organima i organelima da što bolje iskoriste povoljne okolišne uvjete a izbjegnu nepovoljne.

Gibanja organa mogu biti **gibanja rasteanjem** koja se uočavaju kao polagana gibanja organa koji se oblikuju i razvijaju te **podražajna gibanja**. Podražajna gibanja izazivaju različiti podražaji, odnosno fizički ili kemijski signali koji u stanici izazivaju niz reakcija. Većina takvih podražaja dolazi iz okoliša a izazvane reakcije nazivaju se induciranim ili aitionomnim. U biljaka su poznata i **autonomna gibanja** koja su rezultat endogenih reakcija potaknutih unutarnjim podražajima. Za primanje (percepciju) podražaja potreban je odgovarajući primatelj (receptor), npr. prikladni pigment ili protein.

U biljaka postoji skupina gibanja koja nastaju kao rezultat procesa zriobe. Ta gibanja imaju značenje u rasprostranjivanju plodova i sjemenki a dijele se u tri skupine: **turgorom uvjetovana gibanja, higroskopska gibanja i kohezijska gibanja**.

Budući da se u okviru praktične nastave iz fiziologije bilja obrađuju gibanja kloroplasta te nekoliko tipova podražajnih gibanja, ta će gibanja biti opširnije opisana dok se opis ostalih vrsta gibanja nalazi u udžbeniku B. Pevalek-Kozlina: Fiziologija bilja.

## SLOBODNA LOKOMOTORNA GIBANJA

Od slobodnih lokomotornih gibanja u biljaka su prisutne **taksije i gibanja u stanicama**.

### TAKSIJE

Taksije su gibanja u kojima okolišni čimbenik određuje smjer gibanja a mogu biti pozitivne (usmjerena prema izvoru podražaja) i negativne (usmjerena u smjeru suprotnom od izvora podražaja). Prema vrsti vanjskih čimbenika razlikuju se sljedeće taksije:

**a) Kemotaksija** omogućava saprofitskim i parazitskim bakterijama te slobodno gibljivim gljivama pronalaženje izvora hrane ili domadara, odnosno izbjegavanje područja sa štetnim tvarima, dok gametama omogućava usmjereno pronalaženje spolnog partnera. Primjer kemotaksije značajne za biljke je gibanje bakterija za fiksaciju dušika prema korijenu mahunarki.

**b) Fototaksija** je gibanje usmjereno svjetlošću, prisutno prvenstveno u fotosintetski aktivnih organizama (npr. *Euglena* i *Volvox*) koji na taj način pronalaze područje najpovoljnijeg intenziteta svjetlosti.

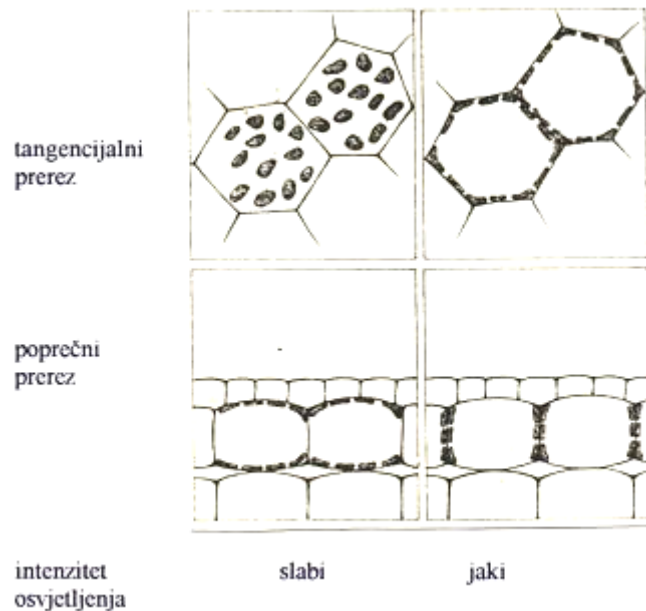
**c)** Osim kemo- i fototaksije razlikuju se i **hidrotaksija** (podražaj je razlika u vlazi), **tigmotaksija** (podražaj je mehanički dodir), **geotaksija** (podražaj je smjer sile teže) te **termotaksija** (podražaj je promjena temperature).

### GIBANJA U STANICAMA

Plazma, jezgra i plastidi se često gibaju unutar stanice. Strujanje plazme je djelomično autonomno, a djelomično izazvano vanjskim podražajima. Jezgre mogu biti nošene strujom plazme ali se mogu i samostalno gibati. Obično se kreću prema mjestima najintenzivnijeg rasta. Kloroplasti se gibanjem dovode na mjesta i u položaj gdje mogu optimalno iskoristiti svjetlost. Pri slabom intenzitetu svjetlosti nalaze se na izravno osvijetljenim gornjim i donjim stijenkama mezofilnih stanica, dok se pri jakom intenzitetu svjetlosti kreću prema bočnim stijenkama koje su paralelne s upadnom svjetlošću. Na taj se način kloroplasti štite od prejakog osvijetljenja koje bi moglo uzrokovati oštećenja.

Gibanje kloroplasta je pod utjecajem modre svjetlosti, a receptori se nazivaju fototropini.





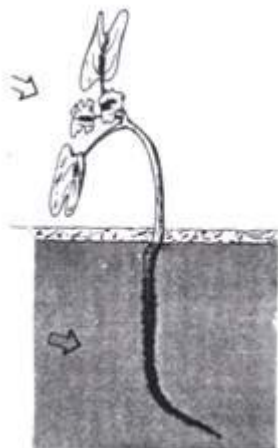
Gibanja kloroplasta u listovima vodene leće

## PODRAŽAJNA GIBANJA ORGANA

### TROPIZMI

Tropizmi su usmjerena gibanja organa potaknuta jednostranim podražajem. U odnosu na smjer izvora podražaja mogu biti pozitivno i negativno usmjerena. Većinom su rezultat različite stope rasta suprotnih strana organa, a rjeđe promjene turgora.

a) **Fototropizmi** su inducirani jednostranim osvjetljenjem. Ovakva gibanja dovode organe u položaj povoljniji za iskorištavanje svjetlosti.



**Fototropizam** klijanca gorušice: os izdanka se savija prema izvoru svjetlosti (pozitivno fototropno), listovi su u transverzalnom fototropnom položaju koji lisnim plojkama omogućuje najbolje iskorištavanje svjetlosti, a korijen je orijentiran u suprotnom smjeru od izvora svjetlosti (negativno fototropno).

**Geotropizam** klijanca: izdanak raste u smjeru suprotnom od smjera sile teže (negativno geotropno), a korijen u smjeru sile teže (pozitivno geotropno).

**b) Geotropizam** je rast organa kojim se oni dovode u određeni položaj s obzirom na smjer sile teže.

**c) Tigmotropizam** je gibanje inducirano mehaničkim podražajem. Organi nekih vrsta biljaka, npr. izdanci graška, reagiraju na dodir tako da se savijaju na stranu koja je dodirnutu. Reakcija se zbiva u smjeru koji je određen građom organa a predstavlja kombinaciju rasta i promjene turgora.

**d) Kemotropizam** je uzrokovan nehomogenom raspodjelom otopljenih ili plinovitih tvari u okolini organa pri čemu je smjer gibanja određen koncentracijskim gradijentom tih tvari. Tvari često u niskim koncentracijama djeluju privlačno a u višim odbojno. Klijanci viline kose (*Cuscuta*) rastu prema domadaru vjerojatno zbog primamljujućeg djelovanja lako hlapljivih alkohola, estera i eteričnih ulja. Srednji tentakuli listova rosike (*Drosera*) pokazuju također pozitivna kemotropna savijanja.

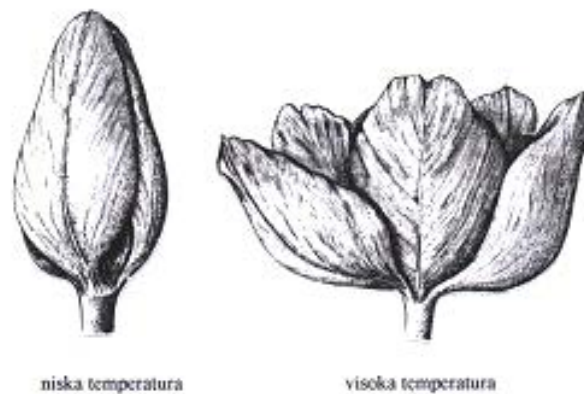


**Kemotropizam** sijanaca viline kose

## NASTIJE

Nastije su gibanja čiji je smjer određen građom organa, a podražaj služi kao signal za određeno gibanje. Za razliku od tropizama koji su uglavnom posljedica nejednolikog rasta suprotnih strana organa nastije najčešće nastaju uslijed reverzibilnih promjena turgora a samo su rijetko uzrokovane rastenjem.

**a) Termonastije** su gibanja uzrokovana promjenama temperature. Cvjetovi nekih vrsta (npr. tulipan i šafran) se otvaraju pri povišenoj temperaturi a zatvaraju pri nižim temperaturama. Uzrok ovih gibanja je različit temperaturni optimum za produžno rastenje gornje (viši temperaturni optimum) i donje (niži temperaturni optimum) strane cvjetne baze. Osjetljivost na promjene temperature ovisi o vrsti - šafran reagira na promjene od samo 0,2 °C, dok tulipan reagira na promjene od 1 °C.



### Termonastije u cvijeta tulipana

Ekološko značenje termonastijskih gibanja cvjetnih latica je zaštita rasplodnih organa za vrijeme niskih temperatura i nepovoljnih uvjeta za oprašivanje.

**b) Fotonastije** su gibanja uzrokovana promjenama intenziteta svjetlosti. Listovi mimoze su u različitom položaju u uvjetima tame i svjetlosti, a cvjetovi brojnih vrsta, npr. maslačka i tratinčice, su danju otvoreni, a noću zatvoreni.



### Fotonastije u cvijeta vrste *Leontodon hastilis*

**c) Kemonastije** su gibanja uzrokovana kemijskim podražajem. U rosike (*Drosera*) tentakuli koji su smješteni na rubnom dijelu lisne plojke na podražaj reagiraju nastijskim savijanjem prema sredini lista i tako plijen dovode u dodir s drugim tentakulima.



lisna plojka s tentakulima  
prije savijanja

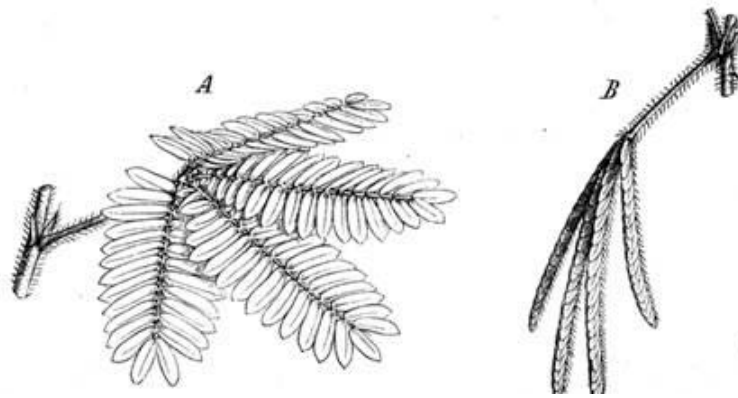
Kemonastija i seizmonastija  
lista rosike (*Drosera*)



tentakuli rosike  
nakon savijanja

#### Kemonastijska gibanja rubnih tentakula rosike

**d) Seizmonastije** su gibanja uzrokovana mehaničkim podražajima. Čak i kap kiše ili potresanje uzrokovano vjetrom mogu dovesti do vrlo brzih gibanja čiji je smjer određen građom organa koji reagiraju a samo gibanje nastaje uslijed promjene turgora određenih stanica. Tako se npr. u tropskih mimoza na bazi liski ili lisnih peteljki nalaze tzv. pulvini – specijalizirane strukture građene od stanica koje pri mehaničkom podražaju naglo mijenjaju turgor. Gibanje nastaje uslijed promjene turgora u stanicama smještenim na nasuprotnim stranama. U mimoze se kao posljedica podraživanja pojavljuje akcijski potencijal od oko 140 mV (potencijal u mirovanju je -160 mV, a nakon podražaja -20 mV; unutrašnjost stanice uvijek je negativna) nakon čega se mijenja membranska propusnost. Ponekad se podražaj može širiti kroz izdanak i prema gornjem i donjem dijelu izdanka do udaljenosti od oko 50 cm. U mesojedne vrste *Dionaea muscipula* seizmonastijska gibanja listova služe hvatanju kukaca. Prašnici nekih vrsta također mogu reagirati na mehanički podražaj, a podražljiva je samo baza filamenta. U žutike (*Berberis*) podražljiva je samo unutrašnja strana baze filamenta pa se prašnici pri podraživanju sklope prema tučku. U sobne lipe (*Sparmania*) podražljiva je vanjska strana pa se prašnici savijaju prema van. Gibanja prašnika služe rasprostranjenju peluda - često ga potakne kukac koji pri tome bude posut peludom.



Seizmonastije lisne peteljke i liski mimoze  
 A – list prije podražaja dodir  
 B – skupljene liske nakon podražaja

e) **Tigmonastija** je osobito značajna u biljaka koje se penju pomoću vitica. Osjetljiva može biti gornja ili donja strana vitice ili obje strane. Tigmonastijska percepcija uzrokuje akcijski potencijal. Prva reakcija savijanja vitice je gubitak turgora strane koja postaje konkavna te odgovarajući porast turgora na suprotnoj strani, dok je savijanje u drugoj fazi zapravo gibanje rastenjem pri kojem konveksna strana raste jače od suprotne konkavne strane.



Tigmonastija izdanka vrste *Bryonia dioica*

**f) Nastijska gibanja puči**

Otvaranje i zatvaranje puči ubraja se u nastijska gibanja jer su uvjetovana građom stanica zapornica a nastaju prilikom promjene turgora u stanicama zapornicama u

odnosu na susjedne epidermske stanice. Ako su susjedne stanice morfološki posebno oblikovane nazivaju se stanicama susjedicama. Okolišni čimbenici koji utječu na gibanja puči su svjetlost, voda i toplina, pa kao posljedica toga puči mogu reagirati fotonastijski, hidronastijski i termonastijski.

### **Literatura**

- Pevalek-Kozlina, B. (2004). Fiziologija bilja. Profil International, Zagreb.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A. (1998). Strasburger Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Taiz, L., Zeiger, E. (1991). Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California.
- Wild, A. (2003). Pflanzenphysiologie in Fragen und Antworten. Quelle & Meyer, Wiebelsheim.

## 8.1. TERMONASTIJE I FOTONASTIJE

### MATERIJAL

- cvatovi tratinčice (*Bellis perennis*)
- cvjetovi tulipana (*Tulipa* sp.)

### NAČIN IZVOĐENJA

Stavite cvjetove tulipana u hladan prostor, a nekoliko ih ostavite na sobnoj temperaturi. Nakon 1-2 sata promatrajte promjene te ih opišite.

Stavite cvjetove tratinčica u tamu a nekoliko ih ostavite na svjetlosti. Nakon 1-2 sata promatrajte promjene na cvatovima i opišite ih.

Tulipan u hladnom prostoru

Tulipan na povišenoj temperaturi

Tratinčica u tami

Tratinčica na svjetlosti

## 8.2. SEIZMONASTIJE

### MATERIJAL

- stidljiva mimoza (*Mimosa pudica*)
- žutika (*Berberis vulgaris*)
- iglica
- lupa

### NAČIN IZVOĐENJA

Iglicom nježno dotaknite pojedine listove i grančice mimoze i opišite uočene promjene. Obratite pažnju na gibanje liski i peteljke te na smjer širenja podražaja kroz biljku.

Iglicom dotaknite bazu prašničkih filamenata žutike s unutarnje strane. Promatrajte i opišite gibanje prašnika.

Peteljke i liske stidljive mimoze prije podražaja dodirom

Peteljke i liske stidljive mimoze nakon podražaja

Prašnici žutike prije podražaja dodirom

Prašnici žutike nakon podražaja dodirom



### 8.3. FOTOTAKSIJE KLOROPLASTA

#### MATERIJAL

- vodena leća (*Lemna minor* ili *Lemna trisulca*)
- predmetna i pokrovna stakalca
- kapaljka
- iglica
- mikroskop

#### NAČIN IZVOĐENJA

U dvije posude nalazi se po nekoliko primjeraka vodene leće. Jedna posuda je stavljena na difuznu svjetlost, a druga na izravnu svjetlost.

Promatrajte i nacrtajte položaj kloroplasta u stanicama listića.

Kloroplasti u stanicama vodene leće izložene izravnoj svjetlosti

Kloroplasti u stanicama vodene leće izložene difuznoj svjetlosti