

Zásady k vypracování laboratorního protokolu

Ludmila Včelařová,

Tereza Miksteinová

Olomouc 2026

Předmluva

Vážené studentky, vážení studenti,

výstupem laboratorní práce je laboratorní protokol. Protokol je záznam o provedené práci, popisující postup práce dostatečně detailně, aby bylo možné celý postup přesně zopakovat. Protokol může také sloužit k hledání chyb v postupu v případě, že výsledky neodpovídají očekávání nebo jako podklad pro optimalizaci postupu či jako příprava pro zpracování praktické části diplomové práce.

Laboratorní protokol jako výstup z laboratorního cvičení musí být původní. To znamená, že jej student (či skupina studentů) musí vypracovat samostatně a nesmí vydávat cizí práci za svou vlastní. Je prakticky nemožné, aby dvě laboratorní úlohy probíhaly zcela identicky a autoři je následně nezávisle na sobě popsali naprosto stejným způsobem. **Plagiátorství** je dle Studijního a zkušebního řádu UP (čl. 54, odst. 2) považováno za **vážné porušení povinností** a dle Zákona o vysokých školách (§ 64 a § 65, odst. 1, písm. c) může tento disciplinární přestupek vést k **vyloučení ze studia**.

Laboratorní cvičení a protokoly nejsou forma mučení, kterými by si vyučující zkracovali či zpříjemňovali pracovní den. V protokolech se velice často setkáváme s chybami, které jsou naprosto zbytečné, a které vznikly z důvodu nedostatečného pochopení a leckdy i studu se zeptat vedoucího cvičení. Pokud vám není něco jasné nebo máte nějaký problém, zeptejte se vedoucího cvičení přímo v laboratoři nebo se za ním zastavte v kanceláři během konzultačních hodin.

Na následujících stranách najdete krátký návod a tipy, jak správně vypracovat laboratorní protokol.

Obsah

1.	Základní schéma protokolu.....	5
2.	Co musí protokol obsahovat?	5
2.1	Hlavička.....	5
2.2	Úvod	5
2.3	Pomůcky, chemikálie, biologický materiál.....	6
2.5	Postup.....	6
2.6	Výpočty.....	7
2.7	Výsledky.....	7
2.8	Diskuze.....	7
2.9	Závěr.....	8
3.	Literatura	8
4.	Jazyk protokolu	8
4.1	Stručnost.....	8
4.2	Parazitující slova.....	9
4.3	Gramatické chyby.....	9
4.4	Cizí slova	9
4.5	Znaky, číslovky, veličiny	9
4.5.1	Matematické symboly a značky	9
4.5.1.1	Násobení.....	10
4.5.1.2	Dělení	10
4.5.1.3	Odečítání	10
4.5.1.4	Rovnost.....	10
4.5.1.5	Výjimky	10
4.5.2	Veličiny a jednotky	10
4.5.3	Zkratky.....	11
4.6	Zbytečné fráze a věty	11
4.7	Pevná mezera.....	11
5.	Laboratorní řád VTP-B 1.13	11
5.1	Obecné.....	11
5.2	Bezpečnost v laboratoři	13
5.3	Nemoci a jiná omezení	13
5.4	První pomoc	13
6.	Harmonogram cvičení z fyziologie rostlin.....	14
7.	Návody do cvičení	15
	Téma č. 1: Minerální výživa rostlin.....	15

Téma č. 2: Organogeneze in vitro	21
Téma č. 3: Senescence	28
Téma č. 4: Klíčení	33
Téma č. 5: Respirace	35
Téma č. 6: Transpirace	37
Téma č. 7: Fyziologie stresu	41
Téma č. 8: Percepce cytokininového signálu	44
Téma č. 9: Percepce cytokininového signálu	47

1. Základní schéma protokolu

1. Hlavička
2. Teoretická část
 - a. Úvod
3. Experimentální část
 - a. Pomůcky, chemikálie
 - b. Úkol
 - c. Postup
 - d. Výpočty
 - e. Vyhodnocení výsledků
4. Závěr

2. Co musí protokol obsahovat?

2.1 Hlavička

Hlavička protokolu slouží k snadné a rychlé identifikaci jedince/skupinky jedinců, kteří jsou zodpovědní za odevzdaný protokol.

Hlavička by měla obsahovat celé jméno studenta zodpovědného za vypracování protokolu a spolupracujících studentů (je-li cvičení vedeno ve skupinkách); studijní obor a ročník; datum a čas cvičení a název laboratorní úlohy.

Je zcela na fantazii studenta, zda výše zmíněné identifikační údaje vloží do záhlaví nebo například do tabulky.

Př.:

Tab. 1: Ukázka zpracování hlavičky laboratorního protokolu

Cvičení z fyziologie rostlin	
Vypracovala: Ludmila Včelařová	Akademický rok: 2025/2026
Spolupracovali: Aleš Pěnčík, Ondřej Novák	Termín: čtvrtek 20. 4. 2026; 9:15
Ročník: 2.	Obor: Experimentální biologie
Protokol č. 1: Minerální výživa rostlin	

2.2 Úvod

Úvod protokolu není opis teoretického úvodu v zadání laboratorního cvičení! V této části protokolu by měl být stručně a jasně definován cíl a náplň laboratorní práce v kontextu faktů a fyzikálního či chemického principu používaných metod. Budou-li součástí teoretického úvodu chemické rovnice, musí být správně vyčísleny. Součástí úvodu mohou být také schémata či obrázky znázorňující aparaturu. Všechny takové obrázky musí být řádně popsány.

Dodržujte pokyny vedoucího cvičení. V případě, že úvod v protokolu nevyžaduje, vynechte ho.

Protokol se píše na strany formátu A4 vhodným typem a velikostí písma (10–12 bodů) řádkováním 1 – 1,5. V případě většího počtu stran musí být strany číslovány.

V případě cvičení z fyziologie rostlin do protokolu **úvod nepište**.

2.3 Pomůcky, chemikálie, biologický materiál

Aby bylo možné kdykoliv protokol zopakovat, musí v něm být uvedený kompletní seznam použitých chemikálií, rostlinného materiálu, ale také používaných pomůcek a přístrojů. Vždy uvádějte pouze věci, které jste v průběhu cvičení skutečně používali (může docházet k odlišnostem mezi návodem do laboratorního cvičení a praktikem samotným). U roztoků musí být uvedeno jejich složení (koncentrace) včetně jednotek. Jednotky mohou být uváděny v jakémkoliv správném tvaru. Názvy rostlin uvádějte vždy české i latinské.

Př.:

Pomůcky: květináče, vermikulit, sada automatických pipet s příslušenstvím

Chemikálie: destilovaná voda, zásobní roztoky mikro- a makroprvků

Biologický materiál: semena rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) odrůda Tornádo F1

2.4 Úkol

Opište přesné znění úkolu z návodu do laboratorního protokolu.

Př.

Zjištění vlivu deficiencie vybraných makroprvků a růst a morfologické charakteristiky rostlin rajčete prostřednictvím kultivačního testu

2.5 Postup

Zde stručně popište, jak jste při cvičení **přesně** postupovali. Postup musí být dostatečně detailní, aby umožňoval úspěšné zopakování prováděných experimentů v budoucnu. Postup ve cvičení se může lišit od toho v návodech nebo od postupu kolegů z jiné pracovní skupiny. Dobře napsaný postup práce může být klíčem k pochopení nejednoznačných nebo od očekávání se odlišujících výsledků. Je důležité zaznamenat konkrétní navážky. Text se uvádí v minulém čase ve třetí osobě jednotného nebo množného čísla, obvyklý je trpný rod („parametry byly zjišťovány“). Pro přehlednost může být postup vypsán v bodech. Je nezbytně nutné používat správnou terminologii včetně cizích slov, nepřípustné jsou gramatické chyby.

Př:



- 1) Společnými silami jsme nakonec dopočítali navážky a koncentrace a vypsali je do tabulek v návodu do cvičení.
- 2) Podle doplněných hodnot v tabulkách, které jsme si na začátku vypočítali a vypsali, jsme připravili živný roztok. Nedělali jsme jen jednu variantu, ale rovnou tři – jeden kompletní a dvě deficientní varianty, abychom je mohli na konci semestru mezi sebou porovnat.
- 3) Vzali jsme si květináče, popsali jsme si je a nakreslili loga dle naší fantazie. Z netkané textilie jsme si vystříhali kolečko tak, aby pokrývalo dno a doplnili vermikulitem tak, aby ho tam nebylo ani málo a ani zbytečně moc. Vermikulit jsme potom namočili vodou.
- 4) Vzali jsme semena rostlin a po dvou jsme je umístili do vermikulitu, aby nebyla úplně hluboko.
- 5) Rostliny jsme nechali ve výukové laboratoři a vedoucí je později odnesla do skleníku, kde se o ně starala až do vyhodnocení.
- 6) Dle našich informací je po 3 týdnech od vyklíčení začala zalívat připravenými roztoky a ne jen vodou.
- 7) Na konci semestru jsme porovnávali vzhled rostlin podle zadání. Zbytky rostlin a vermikulit jsme vyhodili, květináče jsme umyli a vypracovali protokol.



- 1) Navážky a koncentrace byly doplněny do tabulek.
- 2) Byl připraven Hoaglandův živný roztok a jeho deficientní varianty.
- 3) Na dno květináče byla vložena netkaná textilie, květináč byl naplněn do $\frac{3}{4}$ vermikulitem a následně důkladně navlhčen.
- 4) Semena rajčat byla po dvou kusech rajčat těsně pod povrch vermikulitu.
- 5) Rostliny byly pěstovány za kontrolovaných podmínek ve skleníku.
- 6) Po třech týdnech od vyklíčení byly rostliny zalévány Hoaglandovým živným roztokem a jeho deficientními variantami.
- 7) Na konci semestru byly vyhodnoceny fyziologické změny rostlin pěstovaných v plném živném roztoku a jeho deficientních variantách dle pokynů.

2.6 Výpočty

Je-li nezbytné v rámci pracovního postupu provést výpočet, musí být uveden i v protokolu. Je-li nutné provést více stejných výpočtů, stačí uvést jeden vzorový a dále vypsát jen výsledky.

Při výpočtech nezapomínejte na všechna ředění, ke kterým v průběhu docházelo. Zaokrouhľujte až koncový výsledek. Není-li v zadání uvedeno jinak, zaokrouhľujte na čtyři desetinná nenulová místa. Pro interpretaci výsledku vždy využívejte vhodné jednotky. Je-li v zadání uvedeno, v jakých jednotkách máte výsledek uvést, musíte zadání dodržet.

Výpočty vkládejte prostřednictvím funkce „Rovnice“ dostupné v Microsoft Word. Vždy je nutné uvést vysvětlení ke všem použitým symbolům.

Př.:

Vypočítejte výslednou koncentraci roztoku (mmol/l), který vznikl rozpuštěním 0,0346 g kyseliny giberelové ($M_R = 346,37 \text{ g/mol}$) v 1 ml ethanolu.

$c = \frac{m}{M \times V}$, kde c je koncentrace (mol/l), V je objem (l) a m je hmotnost (g)

$$c = \frac{m}{M \times V} = \frac{0,0346}{346,37 \times 0,001} = 0,1 \text{ mol/l}$$

$$c = 100 \text{ mmol/l}$$

2.7 Výsledky

Nejdůležitější a rozsahově největší částí protokolu jsou výsledky, které by měly být prezentovány vhodnou formou (tabulky, grafy, fotografie, schémata) s detailním slovním popisem a komentářem. Obrázky (grafy, fotografie) a tabulky se číslují postupně a odděleně s udáním zkratky pro obrázek (Obr.) a tabulky (Tab.), za kterou se vždy píše pouze číslo (Obr. 1). Za číslem každého obrázku a tabulky musí být uvedený podrobný popis s podmínkami měření. Popis musí být pochopitelný bez dohledávání informací v dalších částech protokolu. Číslo a popisky obrázku se uvádějí vždy POD obrázku, u tabulek NAD tabulkou. Jednotlivé popisky obrázků a tabulek by měly být opticky odlišené pro odlišení od hlavního textu (lze použít například menší písmo, menší řádkování).

2.8 Diskuze

Diskuze je prostor pro zhodnocení získaných výsledků, provedení jejich výkladů a uvedení do souvislosti s publikovanými údaji a fakty. V případě, že se liší očekávané a získané výsledky, je nutné, aby se v této části protokolu autor pokusil vysvětlit, co způsobilo odlišnosti. V rámci diskuze je důležité se odkazovat na konkrétní obrázky a tabulky. V případě, že autor cituje nějakou pasáž z knihy, článku nebo z webové stránky, je nutné zdroj náležitě citovat.

Diskuze může být součástí výsledků, závěru nebo může být uváděna jako samostatná kapitola.

2.9 Závěr

V této závěrečné části protokolu jasně shrňte své výsledky a uveďte, zda byly splněny vytyčené cíle. Pokud nebyly cíle splněny, musí být uveden důvod.

Př:

Připravili jsme tři varianty Hoaglandova živného roztoku s rozdílným obsahem esenciálních makroprvků a pozorovali vliv deficiencie na růst a vývoj rajčete jedlého. U rostlin pěstovaných v kompletním živném roztoku byl zaznamenán vitální vzhled a normální růst bez známek deficiencie. Rostliny v roztoku bez dusíku vykazovaly světlání až žloutnutí listů a celkově omezený růst, což odpovídá typickým příznakům nedostatku dusíku. U rostlin s nedostatkem fosforu byl patrný zakrslý růst a fialové zbarvení listů a stonků, typické pro tuto deficitní výživu. Tyto pozorování potvrzují, že přítomnost jednotlivých makroživin je nezbytná pro optimální vývoj rostlin.

3. Literatura

Základem citování je schopnost oddělit vlastní myšlenky od převzatých. Citovat nemusíme pouze literaturu, zdrojem nám může být i video či obrázek. Všechny zdroje musí být vždy řádně ocitovány tak, aby byl původní zdroj snadno dohledatelný. Údaje pro bibliografickou citaci přebíráme z citovaného zdroje.

Př.

Internetový zdroj

Tisková zpráva společnosti Astex Pharmaceuticals (vydaná 21.9. 2012): Astex Pharmaceuticals Discontinues Amuvatinib Clinical Development Program.

<http://investor.astx.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=708646>; Staženo 5.11. 2012

Kapitola v knize

Šebela M., Frébort I., Petřivalský M., Peč P. (2002) Copper/topa quinone-containing amine oxidases - recent research developments. In Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 26 Bioactive Natural Products (Atta-ur-Rahman, ed.), pp. 1259-1299, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Článek v časopise

Šebela M., Luhová L., Frébort I., Hirota S., Faulhammer H. G., Stůžka V., Peč P. (1997) Confirmation of the presence of a Cu(II)/topa quinone active site in the amine oxidase from fenugreek seedlings. J. Exp. Botany 48, 1897-1907.

4. Jazyk protokolu

4.1 Stručnost

Laboratorní protokol není slohová práce. Vyvarujte se dlouhých souvětí.

Př.

K přibližně přesně naváženým vzorkům mleté červené papriky v mikrozkušnicích bylo pomocí automatické pipety a vhodných pipetovacích špiček do první mikrozkušnice přidáno 500 µl DMSO a do druhé mikrozkušnice 500 µl methanolu. Vzorky byly chvíli vortexovány a následně byly umístěny do centrifugy tak, aby byla centrifuga vyvážená, a následně centrifugovány 10 minut při otáčkách 4700 rpm a teplotě 4 °C. Potom byly vzorky postupně opatrně vyndány z centrifugy, aby nedošlo k protřepání obsahu, vyfoceny proti bílému pozadí a jejich obsah byl vzájemně porovnáván.

VS.

K naváženým vzorkům bylo přidáno 500 µl DMSO nebo methanolu. Vzorky byly krátce promíchány na vortexu a centrifugovány (4700 rpm, 4 °C, 10 min). Následně byly vzorky vyfoceny a vizuálně vyhodnoceny.

4.2 Parazitující slova

Parazitující (vycpávková) slova či slovní spojení jsou výrazy, které každý z nás denně používá v mluvené i psané formě projevu. Taková slova nemají vliv na sdělení informace. Často jsou používána v případě, kdy si autor není jistý nebo se mu nedaří vhodně formulovat myšlenky.

Př.

Jakoby, vlastně, prostě, jako čili, de facto, ve výsledku, jaksi, abych tak řekl, takže, jakože, atd.

4.3 Gramatické chyby

Nikdo z nás není neomylný, ale gramatické chyby do protokolů, seminárních a diplomových prací zkrátka nepatří. Před odevzdáním si protokol pozorně přečtěte. Máte-li vypracovat protokol ve skupině, dejte jej k přečtení kolegům. Jako další kontrola může sloužit i samotný Word, který vás upozorní na potenciální gramatické chyby či podezřelé úseky.

Velké množství gramatických a stylistických chyb může být důvodem neuznání laboratorního protokolu.

4.4 Cizí slova¹

Pravidla českého pravopisu v mnoha případech připouští dvojí způsob psaní cizích slov. Nicméně je nutné dodržovat zásady psaní odborných výrazů. U slov pocházejících z latiny či řečtiny je upřednostňována jejich původní podoba – ethanol, allosa, thallium, kinasa, methionin.

Pokuste se v českých textech omezit množství cizích slov, máme-li české synonymum – permanentně (stále), separace (oddělení), intracelulární (vnitrobuněčný).

Rovněž se vyhýbejte používání cizích slov s českými předponami či spojování latinských a řeckých slov s českými – vylouvat (vyloučit), přetrítovat (ošetřit látkou X), vyoptymalizovat (optimalizovat), naizolovat (izolovat, oddělit), zaočkovat (očkovat), hyperjemný (velmi jemný).

Přejaté výrazy patřící do běžné slovní zásoby zapisujeme jako analýza, syntéza, teorie, univerzita atd.

U dubletů v chemii, biologii a lékařství dávejte přednost klasickému pravopisu podobajícímu se mezinárodní formě – isomer, isotop, trombosa, mitosa, metabolismus, neurosa atd. Je nutné dodržet jednotný způsob v celém textu.

Důsledně pište krátké samohlásky na konci přejatých slov – penicilin, vitamin, meristem, kodon, foton, antigen, anemie.

Pro sacharidy je přípustná pouze koncovka -osa (glukosa, sacharosa, laktosa), pro glykosidy -osid (nukleosid) a pro enzymy -asa (hydrolasa, amylasa, kinasa, isomerasa).

Názvy aminokyselin končí na krátké -in (lysin, zkratka Lys). Totéž platí o názvech dusíkatých basi nukleových kyselin (thymín, cytosin).

Výjimku představují například přípony názvů solí a esterů anorganických i organických kyselin, které se píšou s dlouhým písmenem á, tedy fosfát, sulfát, nitrát, palmitát, benzonát, askorbát.

4.5 Znaky, číslovky, veličiny

4.5.1 Matematické symboly a značky

Ke grafickým značkám patří matematické znaky jako plus (+), minus (–), krát (×), plus minus (±), děleno (÷), menší než (<), menší než nebo rovno (≤), větší než (>), větší než nebo rovno (≥), odmocnina ($\sqrt{}$), rovná se (=). Znaky pro sčítání, odčítání, násobení a dělení v matematických operacích a při uvádění

¹ Duchoň J., Kahovec J., Kotyk A., Oliva K.: Doporučení redaktorům odborných a popularizačních časopisů přírodovědeckého zaměření, autorům vysokoškolských i středoškolských přírodovědných učebnic a tvůrcům odborných právních textů s touto tematikou. *Chemické listy* 97 (2004) 947–949

poměru a rozměru píšeme s mezerou. Výpočty do protokolů vždy vkládejte funkcí Rovnice, která mezery vkládá automaticky.

4.5.1.1 Násobení

Násobení značíme symbolem $\times$ nezaměňovat s malým písmenem (x) nebo násobící tečkou ($\cdot$), která je umístěna v poloviční výšce písmen a je oddělena před i za symbolem mezerou. Nikdy nepoužívejte pro násobení obyčejnou tečku nebo hvězdičku (*)!

4.5.1.2 Dělení

Dělení je možné vyjádřit pomocí zlomku (s využitím funkce Rovnice ve Wordu), šikmou zlomkovou čarou (/), dvojtečkou (:); vždy oddělujte mezerou z obou stran nebo znakem děleno ($\div$).

4.5.1.3 Odečítání

Pro odečítání je možné použít rozdělovník (-), určený symbol minus ($-$). V případě nouze je možné použít obyčejnou pomlčku. Zvláštní pozornost věnujte znaménku minus v exponenciálu. Rozdělovník může být snadno zaměněn za vadu papíru.

4.5.1.4 Rovnost

Zvláštní pozor si také zaslouží znaménka rovnosti. V protokolech byste měli rozlišovat následující: je rovno ($=$), je přibližně rovno ($\approx$, $\cong$) a je po zaokrouhlení rovno ($\doteq$).

4.5.1.5 Výjimky

Je-li znaménko součástí složeného slova nebo společně s číslem, mezera se nekládá (10 $\times$ - 10krát, desetkrát). Vyjadřují-li znaménka + a – kladnou či zápornou hodnotu, číslice ke znakům přiléhají bez mezer (+24 °C). Bez mezer jsou rovněž zapisovány exponenciály (5⁷).

4.5.2 Veličiny a jednotky

Veličina je vlastnost tělesa, kterou lze měřit. Její hodnotu je možné vyjádřit číselnou hodnotou a jednotkou. Pro chemické a fyzikální jednotky je od roku 1960 zavedena Mezinárodní soustava jednotek SI (Système International d'Unités), která byla v roce 2019 mírně upravena. Soustava SI obsahuje 7 základních veličin, z nichž je možné odvodit další používané odvozené veličiny.

Veličina	Teplota	Tlak	Objem	Hmotnost	Hustota	Látkové množství	Svítivost
Symbol	T, t	P	V	m	ρ	n	I
Základní jednotka	kelvin, stupeň Celsia	pascal	Metr krychlový	kilogram	Kilogram na metr krychlový	mol	kandela
Symbol	K, °C	Pa	m ³	kg	kg/m ³ kg m ⁻³	mol	cd

Jednotky musí být uvedeny při každém výskytu číselných informací, a to i na osách všech grafů. Obecné pravidlo je, že jednotky píšeme vždy s mezerou za danou hodnotu (5 g, 20 ha). Pokud se však jedná o přídavné jméno, uvádíme jednotky hned za předchozí slovo: 3 % (tři procenta), 3% (tříprocentní). U řady hodnot/měření označte jednotku na konci (3, 6 a 8 mm), výjimkou jsou procenta a stupně (2 °C až 10 °C). Zkracujte jednotky pouze po číselné hodnotě (24 h, o 5 h později, o několik hodin později).

Jednotky se píší ve formě s indexem (mg·ml⁻¹), nikoli s lomítkem, koncentrace se udávají v mol·l⁻¹, mol·dm⁻³, méně vhodné je M (mM, μ M, nM, pM), pro vyjádření koncentrace lze použít g·l⁻¹ nebo mg·l⁻¹, μ g·ml⁻¹, ng·ml⁻¹, μ g·l⁻¹, ng·l⁻¹.

4.5.3 Zkratky

Velkým problémem bývá často nadužívání zkratk v textu. Zkratky zavádějte pouze v případě, že se jedná o velmi dlouhá slova nebo opakují-li se v textu často. Nemá cenu zavádět zkratku H₂O pro vodu. Vytvoříte-li si své zkratky, nesmí být zaměnitelné s běžně používanými zkratkami. Platí pravidlo, že věta nesmí začínat zkratkou.

4.6 Zbytečné fráze a věty

Vyvarujte se při psaní protokolů citově zabarveným slovům, pocitům a frázím, které nesouvisí s cíli a výsledky.

Př.

Laboratorní cvičení se mi moc líbilo.

V laboratorním cvičení jsme si vyzkoušeli měření na spektrofotometru.

Bohužel se mi experiment nepovedl.

4.7 Pevná mezera

Pevná mezera nebo také tvrdá mezera se od klasické liší v tom, že zabraňuje zalomení textu na konci řádku mezi dvěma slovy, písmen nebo znaky, u kterých je zalomení nežádoucí. Pevnou mezeru vkládáme Pevná mezera se používá vždy mezi číslem a jednotkou (např. 10 °C, 5 kg, 20 m/s), v datu mezi dnem, měsícem a rokem (2. 9. 2025), u paragrafů a odstavců (§ 5 odst. 2), mezi iniciálami a příjmením (J. A. Komenský) a také ve víceslovných zkratkách (s. r. o., a. s.). Důležitým pravidlem je také psaní pevné mezery za jednopísmennými předložkami a spojkami, aby nezůstávaly na konci řádku (*k tabulce, s pomocí, v praxi, a výsledek*).

Pevnou mezeru lze vložit několika způsoby:

Ctrl + Shift + Mezerník

Levý ALT + 0160

Vložení → Symboly → Další symboly → Speciální znaky → Pevná mezera

5. Laboratorní řád VTP-B 1.13

5.1 Obecné

1. Student je povinen přicházet do laboratoře včas a řádně připraven v laboratorním plášti a přezůvkách a se staženými vlasy. Musí mít provedeny potřebné výpočty, znát vlastnosti látek, se kterými bude pracovat apod. Před zahájením cvičení vyučující ověřuje znalosti studentů písemnou či ústní formou. Pokud student nemá dostatečné znalosti k řešení dané úlohy, cvičení vykoná v náhradním termínu. Náhradní cvičení z důvodů nedostatečné přípravy na cvičení lze absolvovat pouze 1x.
2. Boty, oblečení, batohy a kabelky se ukládají v prostoru za dveřmi u vstupu do učebny.
3. Každá absence musí být omluvena. Má-li student vážné osobní důvody, pro které se nemůže zúčastnit cvičení, sdělí to vedoucímu **předem**. Každá zameškaná úloha musí být nahrazena. Na termínu náhradního cvičení se dohodne student s vedoucím cvičení.
4. Student může být vykázán ze cvičení z důvodu nedostatečné znalosti, pozdního příchodu, nedodržování pravidel pro bezpečnou práci nebo při závažném podezření na užití návykové látky (např. alkoholu).

5. Studenti pracují ve dvojících. Za protokol jsou zodpovědní oba členové dvojice. Pokud jeden z dvojice nespolupracuje, je nutno tuto skutečnost nahlásit vedoucímu cvičení a ten rozhodne o dalším postupu.
6. Zápočet bude udělen studentům, kteří absolvují 100 % cvičení, budou mít uznané vedoucím cvičení všechny protokoly a napíší zápočtový test na aspoň 70 %.
7. Před zahájením práce studenti zkontrolují čistotu pracovního stolu a jeho vybavenost. Všechny závady zjištěné před zahájením práce nebo v jejím průběhu neprodleně hlásí vedoucímu cvičení.
8. Při práci je nutné postupovat přesně podle zadané úlohy a pokynů vyučujícího. Před používáním přístrojů se musí student nejprve seznámit s jejich obsluhou.
9. Po celou dobu cvičení je student povinen udržovat pořádek a čistotu na pracovním stole a v laboratoři.
10. Případné závady, nedostatky, nehody, či poranění je nutné ihned hlásit vyučujícímu.
11. Průběh práce a dosažené výsledky si každý student zaznamenává do laboratorního deníku/návodu do cvičení. Po skončení experimentální části cvičení předloží výsledky vedoucímu cvičení.
12. S výjimkou focení výsledků je i zakázáno používat mobil a další elektronická zařízení.
13. Protokol musí být odevzdán nejpozději o půlnoci před dalším cvičením. Neodevzdání protokolu může být důvodem vykazání studenta ze cvičení. Protokol musí obsahovat: jména studentů, studijní obor, datum, název úlohy, seznam použitých chemikálií, pomůcek, biologického materiálu, stručný postup práce, výsledky s výpočty (vč. Tabulek a grafů; výpočty musí být vkládány ve formě funkce Rovnice), diskusi a závěr.
14. Po skončení práce je student povinen dát své pracovní místo do pořádku, doplnit špičky, vysypat nádoby na odpad do koše, řádně umýt sklo a opláchnout je destilovanou vodou. Popisky fixou odstraní ubrouskem navlhčeným ethanolem, ne proudem ethanolu ze stříčky! Houbičky a hadry nenechává ve dřezu.
15. Student smí opustit laboratoř až po kontrole dosažených výsledků a stavu pracovního stolu vyučujícím.
16. V laboratořích je přísně zakázáno konzumace jídla, pití, kouření, vapování a aplikace kosmetických přípravků.
17. Studenti jsou povinni dodržovat bezpečnostní předpisy a zásady správného pipetování. Při nedodržování bezpečnostních pokynů a pravidel může vedoucí cvičení studenta vykazat z laboratoře. Tuto skutečnost pak ohlásí vedoucímu katedry.
18. Při práci s chemickými látkami a směsmi musí být používány ochranné prostředky dle vlastností používaných chemických látek a povahy práce s nimi. Platí:
 - a. Při práci s látkami zdraví škodlivými je třeba dbát, aby nedocházelo k jejich styku s pokožkou, dýchacími orgány atd.
 - b. Při práci v laboratoři musí být nošena pracovní obuv s protiskluzovou podrážkou, kterou lze v případě potřeby rychle vyzout.
 - c. Práce, při kterých může dojít k uvolnění nebezpečných chemických látek nebo směsí do ovzduší, se musí provádět v digestoři.
19. Při rozlití hořlaviny je nutno okamžitě zhasnout otevřený oheň, vypnout elektrický proud v laboratoři, zajistit dostatečné odvětrávání (ne směrem na chodbu). Rozlitá hořlavina bude likvidována dle pokynů vedoucího cvičení.
20. Při práci s lihovými kahany je zakázáno jejich ponechání bez dozoru.
21. Střepy a odpad s ostrými hranami (použité žiletky, skalpelová ostří atd.) musí být odkládány do zvláštních nádob (žluté s červeným víčkem).

22. Po ukončení práce je student povinen si umýt ruce.
23. Pokud vypukne požár, je povinné pokusit se ho zdolat vlastními silami (hasicím přístrojem, improvizovanými hasicími prostředky). Je nutno dále vypnout elektrický proud a pokusit se odstranit z okolí požáru hořlavé látky (zejména kapaliny) a nádoby se stlačenými plyny. Nelze-li požár zvládnout vlastními silami, je nutné neprodleně volat požárníky (150).

5.2 Bezpečnost v laboratoři

1. Laboratorní práce je vždy prováděna dle pokynů vyučujícího a pracovního návodu.
2. V laboratoři je zakázáno pít, jíst, kouřit, vapovat a aplikovat kosmetické přípravky.
3. Při práci v laboratoři je nutné mít vhodnou obuv a oblečený laboratorní plášť.
4. Je přísně zakázáno provádět samovolné opravy či úpravy na elektrické instalaci a přístrojích.
5. Je přísně zakázáno chemikálie testovat chutí. V případě testování čichem rukou jemně provaňte výpary. Nikdy nečichajte přímo k láhvi!
6. Tuhé chemikálie nabírejte vždy čistou lžičkou.
7. Při práci s žiravinami či jinými nebezpečnými látkami vždy chraňte ruce rukavicemi a oči laboratorními brýlemi či obličejovým štítem.
8. Na pracovišti udržujte pořádek.
9. Koncentrované kyseliny a zásady ředte vždy tak, že kyselinu či zásadu lijete tenkým proudem po skleněné tyčince do vody.
10. Tuhý hydroxid sypte do vody. NIKDY nelijte vodu na něj.
11. Vršky a zátky od láhví nepokládějte na stůl. Láhev vždy důkladně uzavřete.
12. Zbytky jedů a organických rozpouštědel likvidujte dle pokynů vedoucího cvičení.

5.3 Nemoci a jiná omezení

1. Trpí-li student nemocí, jako např. diabetes, epilepsie atd., nebo má-li nějaké zdravotní omezení, musí to nahlásit vedoucímu cvičení v první vyučovací hodině.
2. Podle vyhlášky 180/2015 Sb. o pracích a pracovištích, je v chemické laboratoři zakázáno pracovat těhotným ženám, ženám, které kojí, a matkám do konce devátého měsíce po porodu. Proto je povinností studentky tuto skutečnost nahlásit.

5.4 První pomoc

1. Studenti se seznámí s umístěním lékárničky.
2. Případné poranění, nevolnost, bolest hlavy atd. je nutné ihned hlásit vyučujícímu, provést zápis a v případě potřeby poskytnout okamžitě první pomoc.
3. Při poleptání kůže silnou zásadou nebo kyselinou zasažené místo ihned důkladně omyjeme proudem vody a roztokem z lékárničky. Při zasažení oka chemikálií ihned oko vypláchneme slabým proudem vody. Při poleptání sliznice v ústech provedeme důkladný výplach úst vodou. Při požití chemikálií a ve všech výše uvedených případech je nutné vyhledat odborné lékařské ošetření.
4. Při malých popáleninách ošetříme postižené místo mastí na spáleniny a zakryjeme sterilním obvazem. Větší popáleniny ošetří lékař.
5. Při pořezání sklem odstraníme z povrchové rány sklo, okolí ošetříme vhodným dezinfekčním roztokem a ovážeme sterilním obvazem. Větší zranění ošetří lékař.

6. Harmonogram cvičení z fyziologie rostlin

	Téma	Náplň cvičení
1. týden	Úvod	Bezpečnost práce, seznámení s laboratoří.
2. týden	Minerální výživa 1	Demonstrace významu jednotlivých živin pro růst rostlin. Založení experimentu, příprava roztoků.
3. týden	Organogeneze in vitro	Příprava média a roztoků růstových regulátorů. Založení explantátových kultur tabáku.
4. týden	Senescence 1	Příprava roztoků. Založení biosenescenčního testu.
5. týden	Senescence 2	Vizuální vyhodnocení biosenescenčního testu. Stanovení obsahu chlorofylu v extraktech listů pšenice.
6. týden	Klíčení Respirace	Dokazování přítomnosti amylasy v naklíčených obilkách. Stanovení respiračního koeficientu naklíčených obilék.
7. týden	Transpirace	Stanovení rychlosti transpirace vybraných rostlin. Pozorování stavu průduchů.
8. týden	Fyziologie stresu	Stanovení oxidativního stresu na základě obsahu MDA a fenolických látek ve stresovaných rostlinách.
9. týden	Percepce cytokininového signálu	Stanovení ligandové specifity rostlinného cytokininového receptoru k různým testovaným látkám.
10. týden	Degradace cytokininů	Degradace cytokininů pomocí enzymu cytokinin oxidasy/dehydrogenasy.
11. týden	Minerální výživa 2	Biometrická analýza rostlin kultivovaných v neúplných živných roztocích

7. Návod do cvičení LRR/FZRSB

Téma č. 1: Minerální výživa rostlin

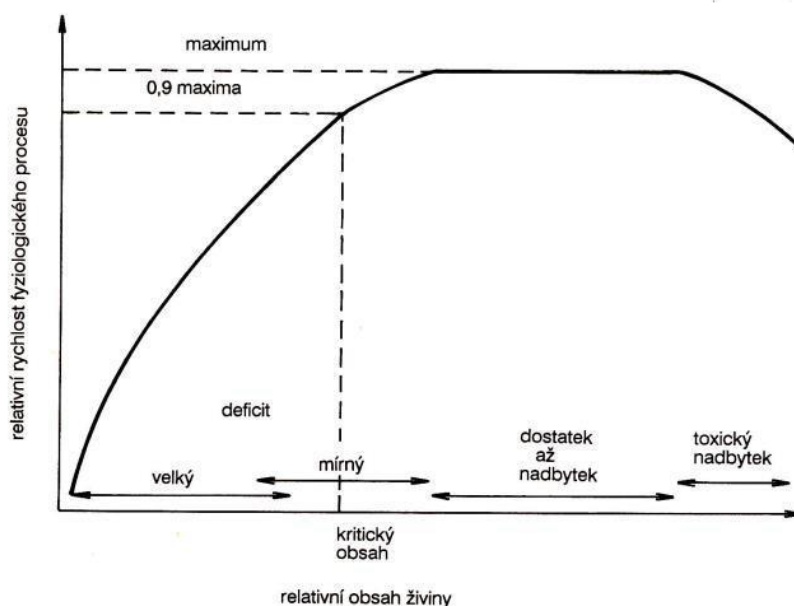
Teoretický úvod

Téma minerální výživa rostlin se zabývá otázkami, jak rostliny získávají minerální látky a jak tyto minerální živiny využívají. V rámci fyziologie rostlin se jedná o jedno z nejdůležitějších témat. Jedná se o klíčovou oblast fyziologie s praktickým dopadem zejména v zemědělství, kdy jsme schopni ovlivňovat velmi výrazně výnosy hospodářsky významných plodin.

Jako autotrofní organismy jsou rostliny schopny přeměňovat anorganické látky jako oxid uhličitý, kyslík a vodu na organické za využití energie ze slunečního záření. Ostatní prvky rostliny získávají převážně z půdy. Dle množství v sušině rostliny jsou tyto esenciální (nezbytné, nezastupitelné, nenahraditelné) anorganické prvky označovány jako makrobiogenní prvky (makroelementy) nebo mikrobiogenní prvky (mikroelementy). Rozlišujeme také tzv. benefiční prvky.

Příjem živin je zprostředkován především kořeny, v menší míře taky listy (např. aplikací hnojiva na listy). Ke kořeni se živiny dostávají difusí, hromadným tokem s pohybem vody nebo intercepcí (kořeny prorůstají do substrátu, kde ještě nebyly živiny odčerpány).

Nedostatek esenciálních minerálních látek působí zpomalení až zastavení růstu, poruchy vývoje nebo se mohou projevit specifické symptomy – žloutnutí listů, purpurové zabarvení okrajů listů, skvrnitost listů, černání vegetačních vrcholů atd. Nedostatek kteréhokoli z esenciálních prvků je pro existenci rostliny limitující. Nejčastěji se můžeme setkat s deficiencí dusíku, fosforu a draslíku (řešením je používání NPK hnojiv), méně častým je nedostatek mikroprvků. Nepříznivě působí také nadbytek živin, v krajním případě hovoříme o toxicitě. Vztah mezi rychlostí fyziologického procesu a dostupností konkrétní živiny viz Obr. 1.



Obr. 1 Závislost rychlosti tvorby sušiny, růstu nebo jiného fyziologického procesu na obsahu příslušné živiny v rostlině (převzato z Procházka a kol., 1998)

Makrobiogenní prvky jsou v sušině obsaženy v množství větším než 1000 mg na 1 kg. Jedná se o základní chemické prvky, které rostliny potřebují ve větších množstvích pro svůj růst, vývoj a reprodukci. Tyto prvky tvoří stavební kameny důležitých organických molekul, jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny, a sacharidy, a podílejí se na klíčových fyziologických procesech.

Tab. 1 Přehled makrobiogenních prvků, jejich zastoupení, forma a úloha v rostlinném organismu

Makroprvek	Zastoupení	Forma	Funkce
C	45 %	CO ₂ , HCO ₃ ⁻	Základní složka rostlinné organické hmoty
O	45 %	O ₂ , H ₂ O	Základní složka rostlinné organické hmoty
H	6 %	H ₂ O	Základní složka rostlinné organické hmoty
N	1,5 %	NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺	Součást organických uhlíkatých sloučenin – AMK*, amidy, proteiny, NK**, nukleotidy, koenzymy atd.
K	1,0 %	K ⁺	Kofaktor enzymů, regulace vodního režimu rostlin, otevírání a zavírání průduchů
Ca	0,5 %	Ca ²⁺	Zpevnění buněčné stěny, zachování permeability membrán, regulátor buněčné odpovědi, aktivace enzymů
Mg	0,2 %	Mg ²⁺	Složka chloroglylu, přenos fosfátů, aktivátor enzymů
P	0,2 %	H ₂ PO ₄ ⁻ , HPO ₄ ²⁻	Složka fosfolipidů, NK*, ATP a koenzymů
S	0,1 %	SO ₄ ²⁻	Složka proteinů (např. cystein), koenzymů

* aminokyseliny

** nukleové kyseliny

Mikrobiogenní prvky jsou v sušině obsaženy v množství menším než 100 mg. Ačkoliv jsou požadovány pouze ve stopových množstvích, hrají klíčovou roli v řadě enzymatických a metabolických procesů. Nedostatek nebo nadbytek těchto prvků může vést k závažným fyziologickým poruchám v rostlinách.

Tab. 2 Přehled mikrobiogenních prvků, jejich zastoupení, zdroj a funkce

Mikroprvek	Zastoupení	Forma	Funkce
Cl	0,01 %	Cl ⁻	Fotosyntetické reakce – vývoj kyslíku
Fe	0,01 %	Fe ³⁺	Cytochromy a nehemové proteiny pro fotosyntézu, dýchání a fixaci N ₂
B	0,006 %	H ₃ BO ₃ , HBO ₃ ²⁻ , H ₂ BO ₃ ⁻ , B ₄ O ₇ ²⁻	Tvorba buněčné stěny – prodlužování buněk
Mn	0,005 %	Mn ²⁺	Kofaktor a aktivátor enzymů
Zn	0,002 %	Zn ²⁺	Podíl na syntéze chlorofylu, kofaktor a aktivátor enzymů
Cu	0,0006 %	Cu ²⁺	Kofaktor redoxních enzymů, součástí přenašeče plastocyanin
Ni	< 0,0001 %	Ni ²⁺	Kofaktor enzymů dusíkového metabolismu
Mo	< 0,0001 %	MoO ₄ ²⁻	Kofaktor enzymů dusíkového metabolismu

Benefiční prvky, které nejsou pro rostliny esenciální, ale jsou požadované některými druhy. U ostatních mohou být prospěšné, např. stimulují růst. Jedná se o prvky jako je křemík, sodík, kobalt a selen. Např. sodík se uplatňuje v rostlinách s fotosyntézou C₄ a CAM, kde v extrémně nízké koncentraci působí při fixaci oxidu uhličitého. Křemík se hromadí v rostlinách v podobě polymerů kyseliny křemičité, inkrustuje buněčné stěny a dodává jim pevnost. Například přeslička obsahuje v sušině až 16 % křemíku.

Pokusné rostliny jsou většinou pěstovány v jiných než půdních substrátech. Důvodem je špatná definovatelnost zeminy a tím i problematická reprodukovatelnost experimentu. Často se používá kultivace

v živných roztocích, tzv. hydroponie. V tomto uspořádání jsou rostliny většinou uchyceny v oblasti krčku a jejich kořeny jsou omývány roztokem s definovaným obsahem živin. Jinou variantou hydroponické kultivace je uchycení rostlin v relativně inertním materiálu jako SiO_2 písek, perlit nebo minerální vata. Při in vitro kultivacích v tkáňových kulturách se používá živný roztok ztužený pomocí agaru.

Metoda hydroponické kultivace byla využívána i pro identifikaci esenciálních prvků, zejména u zemědělských plodin. Různých variant biotestů na pokusných rostlinách je velmi často využíváno v mnoha oblastech rostlinné biologie. Příkladem biotestů používaných v LRR UP & AV ČR může být amarantový a kalusový test pro sledování cytokininové aktivity sledovaných látek nebo fazolový internodiový test pro hodnocení brassinosteroidní aktivity látek.

Zdroje:

Procházka a kol. Fyziologie rostlin. Academia Praha 1998 (kapitola Vodní provoz, autor J. Šantrůček)

Taiz, L. and Zeiger, E. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Publishers. 2002.

Úkol

Zjištění vlivu deficiencie vybraných makroprvků na růst a morfologické charakteristiky rostlin rajčete prostřednictvím kultivačního biotestu

Rostlina ke svému optimálnímu růstu potřebuje dostatek všech esenciálních živin, včetně makro i mikroelementů. Její vývoj je vždy omezen živinou, která je v prostředí přítomna v nejmenším množství (tzv. zákon minima). Při jejím nedostatku se objevuje syndrom deficiencie, tedy soubor viditelných příznaků, jako je zpomalený růst, morfologické změny, změna zbarvení či zasychání listů. Tyto projevy jsou specifické pro každou živinu v závislosti na její funkci v rostlině a možnostech její recyklace v rostlinném organismu. Pro vyvolání a studium deficiencie se často využívá kultivace rostlin v živném roztoku, ze kterého je cíleně odstraněn některý z esenciálních prvků.

V tomto experimentu byly rostliny pěstovány v Hoaglandově živném roztoku, který obsahuje anorganické soli a je navržen tak, aby rostlinám poskytoval všechny klíčové esenciální prvky v optimálním množství. V každé variantě však byl záměrně vynechán jeden prvek, čímž byla rostlina vystavena jeho nedostatku.

Rostlinný materiál: semena rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) odrůda Tornádo F1

Pomůcky: květináče, vermikulit, sada automatických pipet se špičkami

Chemikálie: destilovaná voda, zásobní roztoky mikro – a makroprvků

Postup:

1. Před začátkem cvičení doplňte navážky a koncentrace do tabulek.
2. Připravte Hoaglandův živný roztok a jeho prvek deficientní varianty (Všechny součásti Hoaglandova roztoku se rozpouštějí v malém objemu destilované vody samostatně a následně se slučují do požadovaného objemu.).
3. Do květináče vložte netkanou textilií, naplňte květináče do $\frac{3}{4}$ vermikulitem a dostatečně navlhčete.
4. Zasaďte semena rajčat těsně pod povrch vermikulitu.

Rostliny budou po vyklíčení kultivovány za standardních podmínek ve skleníku. Po dosažení dostatečného vzrůstu budou rostliny zalévány jednotlivými variantami živného roztoku.

Hoaglandův kompletní živný roztok (pH 6,7)

Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	940 mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	520 mg/l
KNO ₃	660 mg/l
NH ₄ H ₂ PO ₄	120 mg/l
H ₃ BO ₃	2,8 mg/l
MnSO ₄ ·H ₂ O	2,38 mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,1 mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22 mg/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,1 mg/l
H ₂ SO ₄ (0.1M)	0,1 mg/l
Fe EDTA	5 ml/l

500 ml zásobního roztoku Fe EDTA (připraveno vedoucím cvičení)

Chelaton 3	3,725 g/0,5 L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,725g/0,5 L

Směs necháme míchat na magnetické míchačce přes noc při teplotě 80°C. Skladujeme v lednici.

Zásobní roztok mikroprvků (100x koncentrovaný), ✨ hodnoty dopočítejte

H ₃ BO ₃	mg/l
MnSO ₄ ·H ₂ O	mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	mg/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	mg/l

Při přípravě deficientních variant Hoaglandova roztoku, kde chceme odstranit konkrétní prvek (např. fosfor), může dojít k tomu, že spolu s danou sloučeninou odstraníme i další důležité prvky. Například pokud chceme vytvořit fosfor-deficientní variantu a odstraníme NH₄H₂PO₄, roztok ochudíme i dusík, který je v této sloučenině přítomen ve formě amonného iontu (NH₄⁺).

Abychom zachovali potřebné množství dusíku, musíme jej doplnit jinou chemikálií, která neobsahuje fosfor. Typicky se používají alternativní zdroje dusíku (např. síran amonný). Podobná náhrada se provádí i u dalších prvků, kdy je potřeba zajistit, aby odstranění jedné látky nevedlo k deficitu jiných živin nezáměrně.

Zásobní roztoky Hoaglandova živného roztoku a deficientních variant (5x koncentrované), ✨ hodnoty dopočítejte

	Kompletní	N-deficientní (7 %)	P=deficientní (0 %)	M.W.
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	mg/l	_____	mg/l	235,15
MgSO ₄ ·7H ₂ O	mg/l	mg/l	mg/l	246,48
KNO ₃	mg/l	_____	mg/l	101,11
NH ₄ H ₂ PO ₄	mg/l	mg/l	_____	115,03

Kompenzační zdroj N a D

CaCl ₂	_____	mg/l	_____	110,99
K ₂ SO ₄	_____	mg/l	_____	174,27
(NH ₄) ₂ SO ₄	_____	_____	mg/l	132,14

Přídavné roztoky

Mikroprvky 100x	50 ml/l	50 ml/l	50 ml/l
H ₂ SO ₄ (0,1 M)	0,5 ml/l	0,5 ml/l	0,5 ml/l
Fe EDTA*	5 ml/l	5 ml/l	5 ml/l

* Fe EDTA v objemu 5ml/l se do roztoků přidává až po jejich naředění těsně před použitím

Vyhodnocení experimentu - 11. týden semestru

1. Vyfoťte a popište fenotyp rostliny s důrazem na velikost, barvu a celkovou vitalitu.
2. Opatrně vyjměte rostliny z květináče, očistěte kořenový systém a rostliny zvažte, kořeny a nadzemní části rostlin zvlášť.
3. Změřte délku prýtu i kořenů, запиšte počet odnoží.
4. V rámci skupiny sdílejte nasbíraná data a porovnejte rostliny pěstované v deficientním roztoku s kontrolními podmínkami.

** Do protokolu**

Obrázek 1: Fotografie kontrolní a stresované rostliny (sdílejte v rámci skupiny).

Tabulka 1: Naměřené hodnoty, včetně směrodatných odchylek (průměrná délka nadzemní části, průměrná délka kořenů, průměrná hmotnost nadzemní části a průměrná hmotnost kořenů)

Graf 1: Srovnání délek nadzemní a podzemní části rostlin pěstovaných kompletním a N- /P-deficietním roztoku.

Graf 2: Srovnání hmotností nadzemní a podzemní části rostlin pěstovaných kompletním a N- /P-deficietním roztoku.

Téma č. 2: Organogeneze *in vitro*

Teoretický úvod

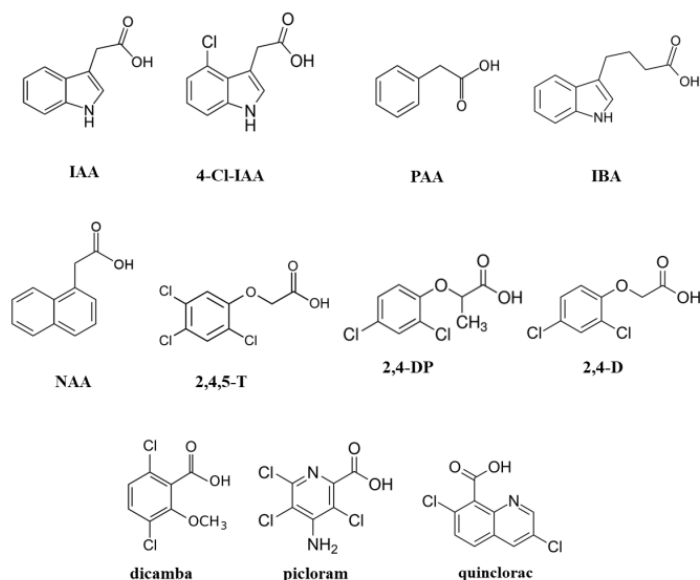
Fyziologické procesy v rostlinách jsou řízeny různorodými nízkomolekulárními látkami, které jsou na základě účinné koncentrace děleny na dvě skupiny: rostlinné hormony (fytohormony) působící ve velmi nízkých koncentracích (10^{-6} až 10^{-9} M) a růstové regulátory, jejichž účinek se projeví při vyšších koncentracích (od 10^{-5} M). Obě skupiny regulují například růst a vývoj rostlin, diferenciaci buněk a pletiv, vývoj orgánů, pohyby stomat, reakce na vnější podmínky, biotický a abiotický stres. Mezi rostlinné hormony patří auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová, ethylen a strigolaktony. Mezi látky s regulační aktivitou náleží brassinosteroidy, jasmonáty, kyselina salicylová, polyaminy, oligosacharidy a fenolické látky. Růstové a vývojové procesy v rostlinách jsou navzájem propojeny a jsou ovlivňovány vzájemným působením fytohormonů a látek s regulační funkcí.

Cytokininy a auxiny jsou zásadní pro životaschopnost rostlin. V našem cvičení se budeme věnovat organogenezi rostlin *in vitro* a budeme sledovat vliv cytokininů a auxinů na vývoj rostlinných orgánů.

Auxiny

Kyselina indol-3-octová (IAA, indole-3-acetic acid) a kyselina indol-3-másečná (IBA, indole-3-butyric acid) jsou přirozeně se vyskytující auxiny v rostlinách. Příkladem syntetických auxinů jsou kyselina naftyloctová (NAA, 1-naphtaleneacetic acid) nebo kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D).

Syntéza auxinů probíhá především v buňkách stonkového a kořenového apikálního meristému, odkud jsou vzniklé auxiny transportovány polárně, podle polohy specifických transportních proteinů. Tímto způsobem se vytváří auxinový gradient v kořeni. Auxiny ovlivňují prodlužování buněk a dělení buněk kalusu (v přítomnosti cytokininů). Stimulují diferenciaci vodivých pletiv z prokambia, aktivují kambium, růst plodů, vývoj embrya, zakládání laterálních i adventivních kořenů a udržují apikální dominanci. Auxiny regulují růst rostliny v reakci na vnější podněty - tropismy (např. gravitropismus, fototropismus).

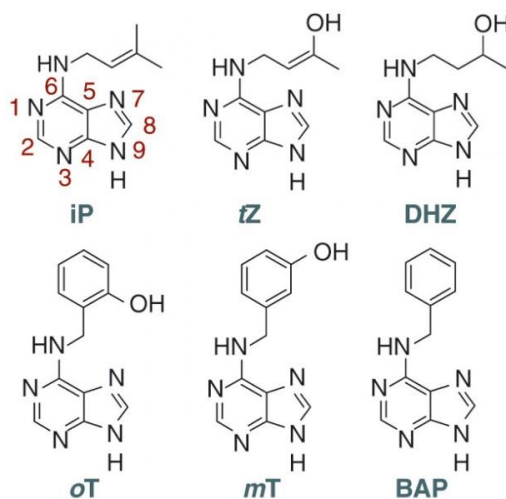


Obr. 2 Chemické struktury přírodních auxinů kyseliny indol-3-octové (IAA), kyseliny 4-chlorindol-3-octové (4-Cl-IAA), kyseliny fenylaceticé (PAA) a kyseliny indol-3-másečné (IBA) a syntetických auxinů kyseliny 1-naftalenoctové (NAA), kyseliny 2-(2,4-dichlorfenoxycetové (2,4-D).

Cytokinin

Přírodně se vyskytující cytokininy v rostlinách jsou N⁶-substituované deriváty adeninu. V závislosti na typu postranního řetězce se dělí na isoprenoidní a aromatické. Nejčastějšími isoprenoidními cytokininy jsou *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*) a N⁶-(Δ^2 -isopentenyl) adenin (*iP*). Z aromatických cytokininů se v rostlinách vyskytují benzyladenin (*BA*) a jeho hydroxy a metoxy deriváty. Kinetin (*K*, furfuryladenin) patří také mezi aromatické cytokininy, ale doteď byl identifikován hlavně u živočichů. Pro laboratorní účely je připravován synteticky. Cytokininovou aktivitu mají také některé deriváty fenylmočoviny např. thidiazuron (*TDZ*), difenylmočovina (*DPU*), 1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-fenylmočovina (*CPPU*), které se však v rostlinách přírodně nevyskytují.

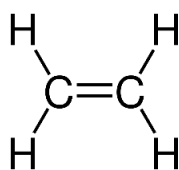
U vyšších rostlin jsou cytokininy syntetizovány především v dělicích se pletivech. Aktivují dělení buněk v meristémech, stimulují tvorbu chloroplastů i syntézu fotosyntetických barviv, oddalují senescenci listů a odbourávání chlorofylu. Snižují apikální dominanci, aktivují vývoj axilárních pupenů, což se projevuje větvením nadzemních částí rostlin. Inhibují prodlužování kořenů a internodií, zvětšují plochu listů, regulují transport a mobilizaci živin v rostlinách. Cytokininy jsou také vylučovány patogenními organismy (bakterie, hmyz, hlístice) a hrají významnou roli i v některých symbiotických procesech, např. při tvorbě hlízek pro fixaci vzdušného dusíku (bakterie *Rhizobium*).



Obr. 3 Chemické vzorce základních cytokininových bází: *iP* – N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)–adenin, *tZ* – *trans*-zeatin, *DHZ* – *dihydro*-zeatin, *oT* – *orto*-topolin, *mT* – *meta*-topolin, *BAP* – 6-benzylaminopurin.

Ethylen

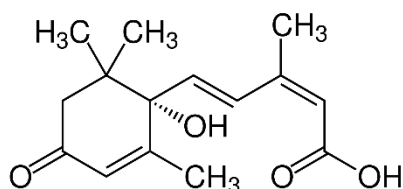
Ethylen je jediný plyný hormon. Působí hlavně na vývoj a zrání plodů a opad listů. V klíčcích rostlinách ve tmě vyvolává tzv. trojí efekt (*triple response*): podporuje radiální růst hypokotylu (krátký a silný hypokotyl), inhibuje pozitivně-geotropický růst kořenů (krátký kořen) a způsobuje tvorbu apikálního háčku. Stimuluje tvorbu kořenových vlásků, epinastii listů, urychluje senescenci, zkracuje dormanci a podporuje zrání dužnatých plodů, což se využívá hlavně u banánů, jablek, hrušek, rajčat, fíků či broskví. Inhibitory tvorby ethylenu se v praxi používají k prodloužení trvanlivosti řezaných rostlin.



Obr. 4 Strukturní vzorec ethylenu.

Kyselina abscisová

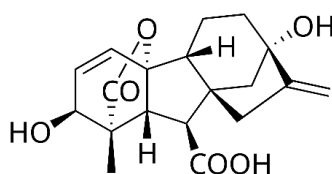
Je zapojena především v reakcích na stres. Její účinky jsou často antagonistické vůči giberelinům, cytokininům a auxinům. Působením kyseliny abscisové dochází k zavírání průduchů, reguluje zrání a dormanci semen, dormanci pupenů a navozuje senescenci listů nezávisle na ethylenu.



Obr. 5 Strukturní vzorec kyseliny abscisové.

Gibereliny

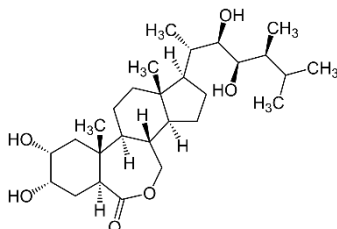
Jedná se o chemické sloučeniny odvozené od diterpenů, které se značí GA s číselným indexem popisujícím pořadí identifikace dané látky. Obecně gibereliny stimulují růst stonku u druhů s listovou růžicí a u trav, pozitivně regulují klíčení semen, podporují růst a vývoj plodů, tvorbu pylu a růst pylové láčky. Fyziologické účinky jsou druhově specifické a velmi se liší. Gibereliny i inhibitory jejich biosyntézy se používají hojně v praxi, např. proti polehávání stébel obilí (inhibitory) nebo ke zvyšování násady květů a plodů (např. u révy vinné).



Obr. 6 Struktura GA₃ (kyseliny giberelové).

Brassinosteroidy

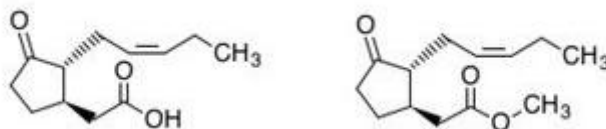
Jedná se o steroidní hormony regulující prodlužování a dělení buněk, podporující diferenciaci xylému a vývoj laterálních kořenů. Pomáhají zachovat apikální dominanci, urychlují senescenci, podílejí se na růstu pylové láčky a vývoji samčích reprodukčních orgánů a stimulují klíčení semen. Jsou zapojeny v reakcích na biotické (patogeny) a abiotické stresy (zasolení, sucho, aj.).



Obr. 7 Brassinolid, první izolovaný brassinosteroid.

Jasmonáty

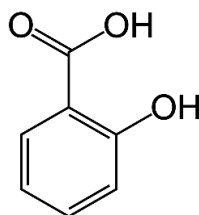
Jako jasmonáty označujeme především kyselinu jasmonovou a její methylester, methyljasmonát. Tyto látky ovlivňují expresi řady genů zapojených v obranných reakcích (poranění, napadení herbivory a patogeny), inhibují růst a stimulují senescenci. Methyljasmonát je těkavá látka sloužící ke komunikaci mezi rostlinami na daném stanovišti.



Obr. 8 Struktura kyseliny jasmonové a methyljasmonátu.

Kyselina salicylová

Fenolická sloučenina hrající klíčovou roli v obranných reakcích rostlin (biotrofní patogeny, hmyz sající na rostlinách, sucho, zasolení). Tento hormon je zapojen do regulace kvetení, termogeneze, klíčení semen, vývoje klíčících rostlin, růstu buněk a zavírání průduchů. Dále ovlivňuje fotosyntetický aparát, propustnost membrán a aktivitu řady enzymů.

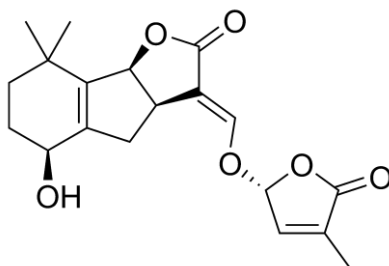


Obr. 9 Strukturní vzorec kyseliny salicylové.

Strigolaktony

Jedná se o nejmladší identifikovanou skupinu fytohormonů. Strigolaktony mají dvě hlavní funkce – jsou endogenními hormony kontrolujícími vývoj rostliny a za druhé jsou součástí kořenových exsudátů (látky vylučované rostlinnými kořeny), které podporují symbiotické interakce mezi rostlinami a půdními mikroorganismy. V případě parazitických rostlin stimulují jejich klíčení, pokud se nachází v těsné blízkosti hostitelského kořenového systému.

Strigolaktony podporují růst a tvorbu výhonků, větvení kořenů, klíčení semen, arbuskulární mykorhizu, délku internodií, druhotné tloušťnutí a urychlují stárnutí listů.



Obr. 10 Struktura strigolu.

Úkol

Založení explantátových kultur tabáku, sledování vlivů cytokininů a auxinů na jejich vývoj

Rostliny pěstované v in vitro podmínkách potřebují vhodná média obsahující všechny důležité složky pro optimální růst – vodu, mikroprvky a makroprvky, vitamíny, aminokyseliny, nebo další zdroje dusíku, sacharidy a růstové regulátory. Jedno z nejznámějších a nejpoužívanějších médií je Murashige & Skoog (MS) médium.

Na přípravu 1 l MS média se smíchají koncentrované roztoky a chemikálie (Tab. 1), upraví se pH na 5,6 - 5,8 (pomocí KOH) a nakonec se doplní roztok na 1 l destilovanou vodou. V případě přípravy pevného média se přidá agar (8 g/l). (Připraveno vedoucím cvičení)

Tab. 3 Složení MS média (Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-4).

MS Major salts	1l MS média obsahuje	0,5 l zásobní roztok (20× koncentrovaný)
NH ₄ NO ₃	1650 mg	16,5 g
KNO ₃	1900 mg	19 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440 mg	4,4 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370 mg	3,7 g
KH ₂ PO ₄	170 mg	1,7 g
MS Minor salts	1l MS média obsahuje	0,5 l zásobní roztok (200× koncentrovaný)
H ₃ BO ₃	6,2 mg	620 mg
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3 mg	2230 mg
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6 mg	860 mg
KI	0,83 mg	83 mg
Na ² MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25 mg	25 mg
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025 mg	2,5 mg
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025 mg	2,5 mg
MS Vitamíny	1l MS média obsahuje	0,5 l zásobní roztok (200× koncentrovaný)
Thiamin	0,1 mg	10 mg
Niacin	0,5 mg	50 mg
Glycin	2,0 mg	200 mg
Pyrodoxin	0,5 mg	50 mg
Železo, zásobní 200× koncentrovaný roztok (50 ml)		
0,373g Na ₂ EDTA se rozpustí v 25 ml dH ₂ O. 0,278g FeSO ₄ x 7H ₂ O se rozpustí v 25 ml dH ₂ O. Za stálého míchání a přehřívání roztoku Na ₂ EDTA postupně přidávej roztok FeSO ₄ za vzniku žlutooranžového čirého roztoku železa.		

Poznámka: Příprava zásobních roztoků rostlinných hormonů

IAA: Do čisté mikrozkuhavky navažte 3 mg IAA (MW=175,19 g/mol), rozpustěte v malém množství čistého ethanolu a doplňte teplou destilovanou vodou na objem 10 ml. **Kinetin:** Do čisté mikrozkuhavky navažte 3 mg kinetinu (MW=215,22 g/mol), rozpustěte ho v kapce 1M NaOH, doplňte destilovanou vodou na konečný objem 10 ml.

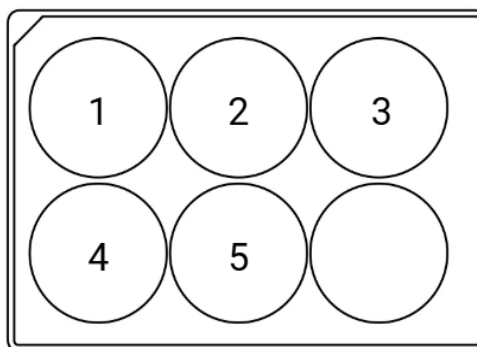
Pracovní postup

1. Množství připraveného média pro celou skupinu sdělí vedoucí na začátku cvičení.
2. Dle Tab. 4 dopočítejte objemy fytohormonů.

Tab. 4 Pipetování zásobních roztoků rostlinných hormonů do MS média (falkony 1 – 4).

	Rostlinný hormon	Číslo roztoku				
		1	2	3	4	5
Pipetování zásobních roztoků hormonů do 100 ml média	IAA	1 ml	0,1 ml	0,01 ml	0 ml	0 ml
	kinetin	0,2 ml	0,02 ml	2 ml	0,2 ml	0 ml
Pipetování zásobních roztoků hormonů do ml média	IAA					
	kinetin					
Výsledná koncentrace hormonů v MS médiu (μM)	IAA					
	kinetin					

3. Vysterilizované MS médium s agarem rozehejte v mikrovlnné troubě tak, aby byl roztok zcela rozpuštěn. V ochranných rukavicích přeneste médium do předem připravených laminárních boxů.
4. Pracujte za sterilních podmínek v laminárním boxu.
5. Připravte si sérii sterilních falkon (1–4 dle jamek v destičce), kontrolní médium bez hormonů (5) budete pipetovat přímo z lahve.
6. Označte jamky v destičce čísly dle Obr. 11.



Obr. 11 Schéma rozmístění jednotlivých roztoků na šesti jamkové desce.

7. MS médium rozlijte do označených plastových falkon a napipetujte fytohormony dle Tab. 4.
8. Připravené roztoky pečlivě promíchejte a rozpipetujte po 5 ml do jamek na desce. MS médium nechte zatuhnout.
9. Listy sterilního tabáku, nařežte pomocí sterilních nástrojů na malé explantáty (čtverečky o ploše cca 1 cm^2).
10. Nařezané explantáty po jednom pokládejte do jamek destičky a lehce zanořte do média, aby se spodní strana listu dotýkala média celou plochou.
11. Explantáty kultivujte po dobu 4-6 týdnů v kontrolovaných podmínkách, následně experiment vyhodnoťte.

Do protokolu

Obrázek 1: Fotografie destičky při ukončení experimentu.

Tabulka 1: Dopočítané objemy použitých fytohormonů

Téma č. 3: Senescence

Teoretický úvod

Senescence je vysoce řízeným vývojovým procesem programované degradace vedoucí ke smrti, který je iniciován různými vnitřními (např. fytohormony, stáří, fyziologický stav) a vnějšími (např. světlo, teplota, patogeneze, dostupnost vody) faktory. Během tohoto procesu zůstávají buňky životaschopné a dochází k expresi specifických genů. Při senescenci dochází k zastavení fotosyntézy, rozpadu chloroplastů a proteinů společně s poklesem obsahu chlorofylu a aminokyselin. Viditelným projevem senescence a jedním z jejích indikátorů je pak změna barvy listu, zpravidla žloutnutí, vyvolaná degradací chlorofylu. Chlorofyl však není jediným rostlinným pigmentem, k jehož degradaci v průběhu přirozené i indukované senescence dochází. Degradovány jsou rovněž karotenoidy – karoteny a xantofyly, v případě chlorofylu ale probíhá rozklad zpravidla ve větší míře, což má za následek žluté zbarvení senescentních listů.

Cytokininy jsou velice důležitou skupinou rostlinných hormonů. Po chemické stránce tvoří přirozeně se vyskytující cytokininy homogenní skupinu derivátů N^6 -substituovaného adeninu. Cytokininy lze rozdělit v závislosti na povaze N^6 -substituentu (postranního řetězce) na dvě skupiny: isoprenoidní (iP, DHZ, tZ a cZ) a aromatické (BAP).

Cytokininy ovlivňují celou řadu vývojových a fyziologických procesů, jako je buněčné dělení, vznik a regenerace orgánů, apikální dominance, de-etiolizace, metabolismus živin, obrana vůči patogenům a listová senescence. V průběhu senescence dochází ke snížení obsahu cytokininů v rostlinách. Exogenní aplikací či zvýšením jejich endogenní hladiny je možné senescenci oddálit. Ke stanovení biologické aktivity cytokininů jsou používány tři standardní biotesty – amaranthový, kalusový a senescenční. V těchto biotestech je hodnocena aktivita látky v daném fyziologickém procesu.

Senescenční biotest je založen na schopnosti cytokininů oddalovat degradaci chlorofylu (typický znak senescence). Je prováděn na listech rostlin pšenice (*Triticum aestivum* L.) starých sedm dní, kdy jsou jejich první listy již plně vyvinuté a druhé listy začínají růst. Špičky prvních listů jsou odděleny a bazální stranou ponořeny do roztoku testovaného cytokininu. Segmenty jsou takto inkubovány ve tmě (standardně po dobu 96 h), poté jsou z nich extrahovány pigmenty a jejich obsah je spektrofotometricky stanoven.

Extrakt fotosyntetických pigmentů ze zelených částí vyšších rostlin obsahuje zejména chlorofyl a, chlorofyl b a směs karotenoidů (β -karoten a xantofyly). Pro zjištění obsahu chlorofylu a a b v acetonovém extraktu se používá měření absorpance ve vybraných vlnových délkách. K následnému výpočtu obsahu pigmentů z naměřených hodnot absorpance jsou využívány např. Lichtenthalerovy rovnice. Obsah pigmentů v listech je možné uvádět v jednotkách množství (mol) nebo hmotnosti (kg, g, mg) vztažených na jednotku plochy listu, jednotku čerstvé hmotnosti nebo sušiny, případně i na jinou vztažnou veličinu (např. celkový obsah proteinů, objem listu atd.).

Úkol

Založení senescenčního biotestu

Rostlinný materiál: sedmidenní rostliny pšenice (*Triticum aestivum* L.) pěstované za definovaných podmínek (16h den, 23°C/ 8h noc, 18°C)

Pomůcky: třecí miska s tloučkem, skalpel, nůžky, pipety, špičky, spektrofotometr, mikrozkušavky, kyvety, pravítko, milimetrový papír, centrifuga, folie, lihový fix, špachtle, parafilm, uzavíratelný box

Chemikálie: MgCO_3 , 80 % aceton, zásobní roztok kinetinu (10^{-2} M) v DMSO

Pracovní postup: Příprava experimentu pro vyhodnocení senescenčního testu

1. Naředit zásobní roztok cytokininu na požadované koncentrace ($1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$) pro celou skupinu.
2. Mikrotitrační destičku obalit parafilmem. Perforovat parafilm ve vybraných pozicích. Do jamek mikrotitrační desky napipetovat 200 μl roztoků kinetinu nebo dH_2O .
3. Z listů pšenice oddělit segmenty o délce 5 cm (měřeno od špičky listu). Pro každou experimentální podmínku v replikátu 10 listů.
4. Listy vložit mezi folii a milimetrový papír a vyfotit nebo obkreslit pro výpočet plochy na milimetrovém papíře.
5. Listy umístit řezem do příslušného roztoku v jamkách mikrotitrační destičky tak, aby se dotýkaly dna.
6. Desku opatrně umístit uzavíratelného boxu, a do temnostního inkubátoru po dobu 96h, do vyhodnocení v dalším cvičení jsou listy zalívány vodou (zabezpečuje vyučující).

Pracovní postup: Stanovení plochy listu a stanovení počátečního obsahu pigmentů

7. Pro výpočet plochy listu použijte dva kontrolní listy, které vložíte mezi folii a milimetrový papír a vyfotíte, pro vyhodnocení v programu ImageJ (FIJI), nebo místo vyfocení obkreslíte a vypočítáte dle plochy na milimetrovém papíře.
8. Ze dvou kontrolních listů připravte acetonový extrakt.
 - a. Listy rozstříhejte a vložte do třecí misky, přidejte špetku MgCO_3 a důkladně rozetřete tloučkem.
 - b. Přidejte 1 ml 80 % acetonu a homogenizujte, obsah misky následně slijte do popsané mikrozkušavky (pracujte rychle, aceton se odpařuje).
 - c. Misku vypláchnout 1 ml 80 % acetonu a obsah znovu slít do mikrozkušavky (změřte objem ve zkumavce).
 - d. Centrifugace po dobu cca 5 min., max rpm, $t = 4^\circ\text{C}$.
 - e. Odpipetujte supernatant do čisté, popsané zkumavky.
 - f. Na spektrofotometru změřit absorbanci při vlnových délkách 646.8 a 663.2 nm v jednocentimetrové kyvetě. Jako BLANK použijte rozpouštědlo.
 - g. Supernatant případně zřeďte tak, aby absorbance při vlnové délce 663.2 nm byla v rozmezí 0.4 - 0.8 (zapište t si přesný objem supernatantu a zředění).
9. Z naměřených hodnot absorbancí (A) v příslušné vlnové délce stanovte obsah pigmentů v listech v počátku experimentu.

$$\text{Chl } (a+b) = 7,15 (A_{663.2}) + 18,71 (A_{646.8}) [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}]$$

Získanou hodnotu [$\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$] vynásobit celkovým objemem extraktu [ml] a podělit hodnotou listové plochy [cm^2] – výsledek je hodnotou obsahu chlorofylu na plochu v jednotlivých listových segmentech [$\mu\text{g}\times\text{cm}^{-2}$].

Úkol

Vyhodnocení biotestu a extrakce pigmentů (7 dní po založení testu)

1. Vizuálně zhodnotit senescenční biotest. Z každé podmínky vyberte 4 reprezentativní listy (dva replikáty po 2 listech) pro výpočet plochy listu a přípravu extraktu.
2. Vybrané listy opět vložte mezi folii a milimetrový papír a vyfotíte, pro vyhodnocení v programu ImageJ (FIJI), nebo místo vyfocení obkreslíte a vypočítáte dle plochy na milimetrovém papíře.
 - a. Listy rozstříhejte a vložte do třecí misky, přidejte špetku MgCO_3 a důkladně rozetřete tloučkem.
 - b. Přidejte 1 ml 80 % acetonu a homogenizujte, obsah misky následně slijte do popsané mikrozkušavky (pracujte rychle, aceton se odpařuje).
 - c. Misku vypláchnout 1 ml 80 % acetonu a obsah znovu slít do mikrozkušavky (změřte objem ve zkumavce).
 - d. Centrifugace po dobu cca 5 min., max rpm, $t = 4^\circ\text{C}$.
 - e. Odpipetujte supernatant do čisté, popsané zkumavky.
 - f. Na spektrofotometru změřit absorbanci při vlnových délkách 646.8 a 663.2 nm v jednocentimetrové kyvetě. Jako BLANK použijte rozpouštědlo.
 - g. Supernatant případně zřeďte tak, aby absorbance při vlnové délce 663.2 nm byla v rozmezí 0.4 - 0.8 (zapište si přesný objem supernatantu a zředění).
3. Z naměřených hodnot absorbancí (A) v příslušné vlnové délce stanovte obsah pigmentů v listech v senescenčním biotestu

$$\text{Chl } (a+b) = 7,15 (A_{663.2}) + 18,71 (A_{646.8}) [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$$

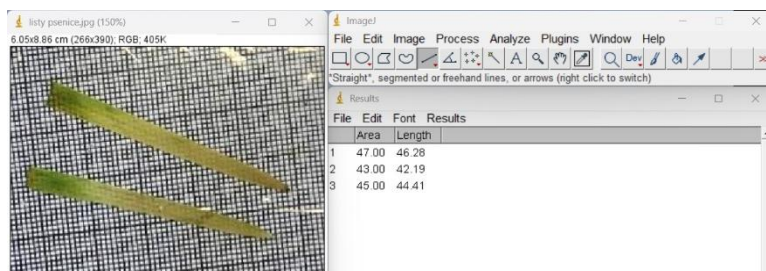
Získanou hodnotu [$\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$] vynásobit celkovým objemem extraktu [ml] a podělit hodnotou listové plochy [cm^2] – výsledek je hodnotou obsahu chlorofylu na plochu v jednotlivých listových segmentech [$\mu\text{g}\times\text{cm}^{-2}$].

Pracovní postup: Vypočtení plochy listu – domácí úkol

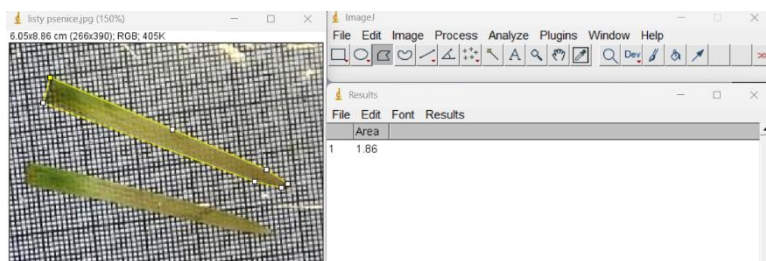
Pro vypočítání obsahu chlorofylu v listech je nutné znát jeho plochu.

1. Stáhněte si na PC ImageJ (FIJI) (<https://imagej.net/downloads>) a nainstalujte.
2. V programu si otevřete fotky listů pšenice ze cvičení.
3. Změřte počet pixelů na ploše 1 cm^2 :

- a. Přes „Straight line“ vybrat 1 cm na milimetrovém papíru a změřit jeho délku v pixelech (alespoň 3x, pak spočítat průměr): záložka Analyze → Measure.



- b. Nastavit měřítko (kolik pixelů je 1 cm): záložka Analyze → Set scale.
 c. Nastavit co chcete měřit: záložka Analyze → Set measurements → Area.
 d. Přes „Polygon selection“ označit obvod prvního listu a změřit jeho plochu (opakovat pro ostatní listy).



4. Sečtete plochu dvou listů použitých pro jeden extrakt.
 5. Vypočítejte množství chlorofylu na listovou plochu.

Druh listu a roztoku		Listová plocha (cm ²)		Objem extraktu (ml)	Ředění	ABS při λ (nm)		Koncentrace chlorofylu a+b (μg/ml)	Obsah chlorofylu na plochu listu (μg/cm ²)
		0. den	7. den			663,2	646,8		
Kontrola	1		x						
	2		x						
	3								
	4								
1 μM kin	1								
	2								
10 μM kin	1								
	2								
100 μM kin	1								
	2								

Do protokolu

Obrázek 1: Fotografie destičky na začátku experimentu.

Obrázek 2: Fotografie destičky při vyhodnocení experimentu.

Výpočty: Koncentrace chlorofylu a + b, obsahu chlorofylu na plochu listu, ředění kinetinu.

Tabulka 1: Naměřené a vypočítané hodnoty.

Graf 1: Listová plocha, porovnání den 0 (kontrola) a den 7 (všechny podmínky), včetně chybových

úseček.

Graf 1: Obsah chlorofylu, porovnání den 0 (kontrola) a den 7 (všechny podmínky), včetně chybových úseček.

Téma č. 4: Klíčení

Teoretický úvod

Klíčení začíná růstem kořínku, který po určitou dobu brzdí růst nadzemní části (plumuly). U dvouděložných rostlin rozlišujeme epigeické (asimilační) a hypogeické (zásobní) klíčení.

U jednoděložných rostlin je vytvořen zakrnělý epiblast a za vlastní dělohu je považován tzv. štítek (scutellum). Štítek je důležitý pro čerpání výživných látek z endospermu a pro metabolismus fytohormonů. U trav (jednoděložných), vyrůstá nejprve radikula a teprve později plumula krytá kápovitým primárním listem – koleoptilí. Dle místa tvorby auxinu, jeho transportu a aktivního působení se rostliny dělí na tzv. klíčící typ ovesný a klíčící typ lupiny s přechodnými formami.

Proces klíčení startuje příjmem vody semenem – hydratací pletiv semene. Dochází ke zvýšení intenzity dýchání. Po dobu asi 24 hodin převažuje anaerobní dýchání. Probouzí se enzymatická činnost a mobilizují se zásobní látky semene, které jsou následně transportovány do zárodku.

Jednou ze zásobních látek endospermu semen je škrob. Škrob slouží jako rezerva energie a uhlíkatých látek pro heterotrofní fázi růstu klíčení rostliny. Při klíčení je škrob enzymaticky štěpen činností amylas na jednodušší, transportovatelné a metabolizovatelné formy cukrů. Tyto amylasy jsou produkovány aleuronovou vrstvou a scutellem embrya. Jako náhradní substrát amylas můžeme použít škrob-agarové plotny. Aktivita amylas je následně prokázána obarvením plotny Lugolovým roztokem.

Zásobní látky semene

Škrob

Na jeho štěpení se podílejí zejména α -amylasy, β -amylasy a maltasy. Syntéza α -amylas souvisí s biosyntézou kyseliny giberelové, která probíhá ve štítku embrya a později v celém embryu. Embryo uvolňuje gibereliny do aleuronové vrstvy endospermu, kde se aktivují geny pro syntézu hydrolytických enzymů. Ty jsou potom transportovány z aleuronové vrstvy do endospermu.

Tuky

Jsou rozkládány lipázami na mastné kyseliny a glycerol. Mastné kyseliny jsou dále štěpeny na acetyl Co-A, který vstupuje do citrátového cyklu. Glycerol je využit v metabolismu sacharidů.

Bílkoviny

Jsou štěpeny proteasami na jednotlivé aminokyseliny, které jsou následně využity k syntéze nových katalytických, strukturních a regulačních proteinů. Jako substrát pro syntézu purinových a pyrimidinových heterocyklů se aminokyseliny podílí na tvorbě dusíkatých bazí a některých fytohormonů.

Úkol

Amylasa jako exoenzym klíčnicích rostlin

Rostlinný materiál: naklíčená semena olejnin, luštěnin nebo obilovin

Pomůcky: Škrob-agarové plotny, Petriho misky, preparační pomůcky

Chemikálie: Lugolův roztok, škrob, agar

Pracovní postup:

1. Pro všechny skupiny připravte médium pro přípravu škrob-agarové plotny.
 - a. Připravte 10 ml 1% škrobového mazu. Škrob rozsuspendujte ve studené vodě, následně podpořte zahřátím v mikrovlnné troubě.
 - b. Připravte 90 ml 2% roztoku agaru.
 - c. Roztoky smíchejte a přiveďte k varu v mikrovlnné troubě.
 - d. Smíchaný roztok vylijte na skleněné Petriho misky. Při okamžitém použití plotny není nutné ji sterilizovat.
2. Skalpelem podélně rozřízněte semena a umístěte je řezem na škrob-agarovou plotnu, aby se plochou dotýkaly.
3. Po 20 minutách odejměte semínka a škrob-agarovou plotnu převrstvěte tenkou vrstvou Lugolovým roztokem (ředěno 1:99), inkubujte po dobu 2 minut.
4. Vyfoťte, vizuálně zhodnoťte a vysvětlete změny na Petriho miskách.

Do protokolu

Obrázek 1: Fotografie Petriho misky po převrstvení Lugolovým roztokem, popis jednotlivých semen.

Téma č. 5: Respirace

Teoretický úvod

Buněčné dýchání – respirace, je aerobní nebo anaerobní proces biologické oxidace organických látek za účelem zajištění energie pro buňku. Při dýchání za aerobních podmínek je konečným produktem CO_2 a voda. Při nedostatku O_2 dochází k vnitrobuněčnému dýchání a substráty respirace se odbourávají jen na nižší oxidační produkty (etylalkohol, kys. octovou, kys. propionovou, kys. mléčnou). Množství získané energie je pak podstatně nižší. Nedostatek kyslíku podmiňuje u rostlin kvasné procesy, které mohou buňky zpočátku tolerovat, po určité době však hynou. Buňka je schopna regulovat intenzitu degradace substrátu v závislosti na vnějších podmínkách (Pasteurův efekt).

Aktivita respirace se vyjadřuje spotřebou O_2 nebo produkcí CO_2 . Z jejich objemů můžeme usuzovat na druh prodýchaného substrátu. Poměr objemů CO_2/O_2 se nazývá respirační koeficient (RQ).

U převážné většiny rostlinných tkání jsou respiračním substrátem glycidy. Na každou molekulu prodýchané glukózy je spotřebováno 6 molekul O_2 a při plné oxidaci substrátu, až na CO_2 a vodu, se uvolní stejný počet molekul CO_2 . RQ je v tomto případě roven jedné. Hodnoty RQ nejsou pro všechny typy rostlinných tkání stejné. Mění se v závislosti na stavu tkáně, na vnějších podmínkách a zejména v závislosti na prodýchaném substrátu. Jsou-li prodýchané látky energeticky bohatší než cukry (tuky, bílkoviny) je spotřeba O_2 tkání vyšší než produkce CO_2 a RQ dosahuje hodnot menších než jedna. Takové poměry ve výměně plynů lze zjistit při klíčení semen bohatých na tuky (semena lnu, slunečnice, atd.). Po prodýchání přítomných glycidů po dvou až třech dnech klíčení, klesá RQ těchto semen až na hodnotu 0,3.

Respirační koeficient dosahuje nižších hodnot než jedna také v tom případě, je-li prodýchaný substrát oxidován jen z části na nějaký meziprodukt, např. tuky na cukry, cukry na organické kyseliny. Prodýchávají-li rostlinné tkáně substráty energeticky chudé s vysokým obsahem kyslíku v molekule, dosahuje RQ hodnot větších než jedna (dozrávající plody).

Hodnota RQ vždy vzrůstá, když je dýchání tkáně spojeno s kvašením. K tomu dochází v podmínkách ztíženého přístupu O_2 k vnitřním tkáním, nebo při snížení jeho koncentrace v okolní atmosféře.

Intenzita dýchání závisí na fyziologickém stavu rostlin a orgánů. Vysokou intenzitu dýchání vykazují především rostoucí pletiva (meristémy, kořenové vlášení) a orgány (prašníky, blizny). U plodů dýchají nejintenzivněji periferní pletiva (dostatek kyslíku). Vysokou intenzitu dýchání mají též klíčící semena.

Úkol

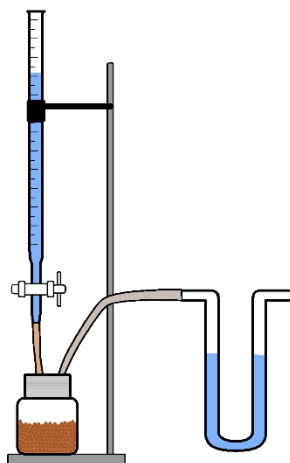
Stanovení respiračního koeficientu

Rostlinný materiál: naklíčená semena olejnin, luštěnin nebo obilovin

Pomůcky: baňka se speciální zátkou, filtrační papír, byreta, skleněná „U“ trubice, Chemikálie: 20 % KOH

Pracovní postup

1. Do baňky vložit semena jednoho druhu, zaplňte cca do ½ až 3/4.
2. Baňku napojte na manometricku trubici a byretu dle schématu (Obr. 12).



Obr. 12 Schéma aparatury pro stanovení spotřeby O₂ a CO₂

3. Ujistěte se, že je aparatura dobře utěsněna.
4. Po ustálení tlaku v aparatuře zaznamenat polohu menisku v manometrické trubici, cca 3 minuty.
5. Změnu objemů plynů stanovte po 20 minutách respirace. Dopouštěním destilované vody z byrety se vyrovnají hladiny v manometrické trubici. Rozdíl objemu odečíst ze stupnice byrety. Tímto způsobem zjistíme **celkovou spotřebu O₂ a produkci CO₂ (hodnota A)**.
6. **Čistou spotřebu O₂ (hodnota B)** zjistíte měřením za přítomnosti KOH v baňce.
7. Do již připravené baňky vložte filtrační papír 2 x 2 cm namočený v 20 % KOH a opět uzavřete. Zaznamenejte polohu menisku v manometrické trubici. KOH fixací eliminuje CO₂ z prostoru baňky. Změnu objemů plynů stanovit po 20 minutách respirace.
8. Produkci CO₂ stanovit odečtením hodnoty A od hodnoty B. Respirační koeficient stanovit dle vzorce

$$RQ = \frac{V(\text{CO}_2)}{V(\text{O}_2)} = \frac{\text{hodnota B} - \text{A}}{\text{hodnota A}}$$

Do protokolu

Sdílejte své výsledky s kolegy v rámci cvičení a porovnejte transpirační koeficienty semen s různými typy zásobních látek (v případě replikátů, zahrňte směrodatné odchylky).

Výpočet: respiračního koeficientu.

Tabulka: Vypočítané hodnoty RQ.

Téma č. 6: Transpirace

Teoretický úvod

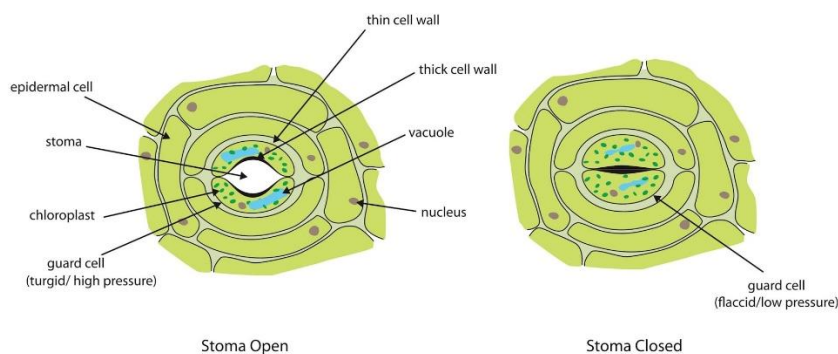
Vodní provoz rostlin zahrnuje příjem vody z okolního prostředí, vedení vody v rostlině a výdej do okolního prostředí. V případě, že se je voda vydávána ve formě vodní páry, nazývá se transpirace. Vodní provoz rostlin je neodmyslitelně spjatý s dalšími důležitými procesy jako je příjem minerálních látek, transport látek v rostlině, fotosyntéza a stabilizace teplotních poměrů v rostlině i jejím okolí.

Molekula vody je malá a jako celek elektroneutrální, avšak silně polární. Díky své polaritě je voda schopna vytvářet intermolekulární interakce s jinými polárními molekulami a účinně je rozpouštět. Voda má vysoké specifické teplo, tedy vyžaduje velké množství energie ke zvýšení své teploty, což spolu s vysokým skupenským teplem vypařování přispívá k tlumení teplotních výkyvů. Tyto vlastnosti umožňují udržování teplotní stability a teplotní rovnováhy uvnitř rostliny.

Rostliny vodu neustále přijímají i ztrácejí. Na dlouhé vzdálenosti je voda v rostlině transportována hromadným tokem, zatímco při pohybu na krátké vzdálenosti a v plynné fázi se uplatňuje difúze. Základním mechanismem příjmu, udržení i výdeje vody v rostlině je osmóza.

Hlavním mechanismem výdeje vody rostlinou je transpirace. Při transpiraci je voda vylučována do prostředí v plynném skupenství, zatímco výdej kapalné vody se nazývá gutace. V mezofylu listu vzniká vodní pára, která se odpařuje z povrchu vodních kapek v mezibuněčných prostorách houbového parenchymu. Rostlinu pak opouští přes kutikulární vrstvu (transpirace kutikulární) nebo štěrbinou průduchů (transpirace stomatární). Na světle u většiny rostlin stomatární transpirace mnohonásobně převyšuje transpiraci kutikulární (vyjma CAM rostlin). Transpirace (kutikulární i stomatární) se charakterizuje její rychlostí a je vyjadřována jako množství vody (mol, g nebo l), které se odpaří z jednotkové listové plochy (dm²) za jednotku času (s). Rychlost transpirace je díky průduchům proměnlivá, závisí na mnoha komplexně působících vnějších i vnitřních faktorech, mezi které patří dostupnost vody v půdě, potřeba a dostupnost CO₂ pro fotosyntézu, teplota, vlhkost a proudění vzduchu v atmosféře.

Průduchy jsou stěžejní pro výměnu plynů. Ovlivňují difuzní vodivost listu a tím také výdej vody ve formě páry při transpiraci. Zajišťují také příjem oxidu uhličitého pro fotosyntézu. Jestliže jsou průduchy uzavřené, probíhá fotosyntéza jen ve velmi malé míře. Průduch je otvor v epidermis, jež je ohraničen dvěma svěřacími buňkami (Obr. 13).



Obr. 13 Otevřený a zavřený průduch. (Science Learning Hub, 2026)

Jedná se o speciální typ pokožkových buněk, které na základě změn objemu vody umožňují změnu velikosti tzv. průduchové štěrbin. Zvětšení objemu (zvýšení turgoru úměrné příjmu vody) svěřacích buněk působí otevření stomat, zatímco smršťování (snížení turgoru úměrné ztrátě vody) svěřacích buněk je příčinou jejich uzavření. Průduchy reagují na celou řadu vnějších i vnitřních podnětů:

Světlo

Obecně platí, že za normálních podmínek jsou průduchy na světle otevřené, ve tmě se zavírají. Rostlina nemá v noci, kdy neprobíhá fotosyntéza, potřebu přijímat CO_2 a nedochází tak ani ke zbytečným ztrátám vody. Světlem aktivované protonové pumpy čerpají protony (H^+) ven ze svěracích buněk a dochází k depolarizaci membrány buněk, což má za následek vtok iontů K^+ a Cl^- dovnitř. Tím vzroste osmotický potenciál v cytosolu, buňka nasává vodu a zvýší se turgorový tlak. Pór je otevřený.

Rostliny s CAM metabolismem, jako jsou kaktusy nebo sukulenty, mají průduchy přes den uzavřeny. U těchto rostlin jsou fixace CO_2 a další fáze fotosyntézy časově odděleny. Jde o adaptaci na extrémní podmínky pouštních oblastí.

CO_2

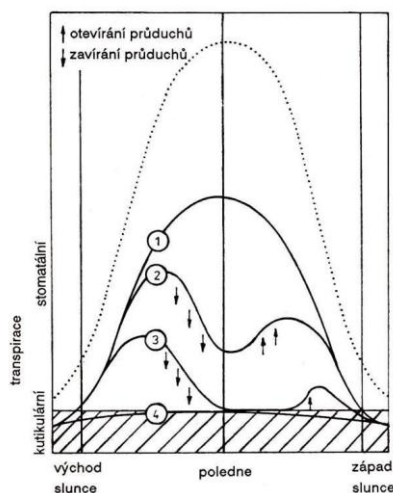
Rostliny reagují na snížení koncentrace CO_2 v mezibuněčných prostorech listu otevřením průduchů.

Vlhkost vzduchu

Průduchy přímo ovlivňuje vlhkost okolního vzduchu. Rostliny se tím brání nadměrným ztrátám vody.

Vodní potenciál rostliny

Je-li rostlina vystavena půdnímu suchu, transpirace začne převažovat nad příjmem vody kořeny a klesá vodní potenciál. Rostlina reaguje na tento stav syntézou fytohormonu – kyseliny abscisové. Ta se transportuje k membránám svěracích buněk průduchů, kde se váže na receptor. Je spuštěna signální kaskáda vedoucí k toku K^+ a Cl^- iontů ven z buněk, což vede ke snížení osmotického potenciálu a uzavření průduchu. Rostliny mohou reagovat i na velmi krátkodobé změny vlhkosti půdy. Kyselina abscisová je syntetizována také v kořenech, odkud je rychle transportována xylémem do listů, kde indukuje zavření průduchů. Rostlina tak sníží intenzitu transpirace mnohem dříve, než by mohla být ohrožena nedostatkem vody v pletivech.



Obr. 14 Denní průběh transpirace při postupném zhoršování zásobování rostliny vodou (1-4) s vyznačením podílu stomatické a kutikulární transpirace. Pro mnoho rostlin je typický polední pokles, který je způsobený omezením zásobování vodou. Tečkovaně je vyznačen.

Úkol č. 1

Stanovení rychlosti transpirace vážkovou metodou

Jednou z možností měření rychlosti transpirace rostliny je vážení odříznutých listů (Ivanovova metoda). Tato metoda vychází z předpokladu, že list několik minut po odtržení transpiruje normálním způsobem jako na intaktní rostlině. Po určité době (desítky minut) dochází k uzavírání průduchů a list dále transpiruje pouze přes kutikulu (kutikulární transpirace).

Rostlinný materiál: listy muškátu (*Pelargonium sp.*)

Pomůcky: Skalpel, váhy, stopky

Pracovní postup

1. Z rostliny skalpelem odřízneme větší list a okamžitě zvážíme. List dále opakovaně vážíme každých 5 minut po dobu jedné hodiny.
2. Sestrojíme spojnicový graf závislosti ztráty vody (v miligramech) na čase.
3. Vypočítáme rychlost transpirace, kterou vyjádříme jako hmotnost transpirované vody v miligramech na
 - a) 1 g čerstvé hmotnosti za 1 hodinu
 - b) 1 dm² listové plochy za 1 hodinu

Úkol č. 2

Stanovení rychlosti transpirace pomocí odměrného válce

Rostlinný materiál: prýty rajčete (*Solanum lycopersicum L.*)

Pomůcky: Skalpel, váhy, stopky, odměrný válec, rostlinný olej

Pracovní postup

1. Odměrný válec naplníme přibližně do poloviny vodou.
2. Odřízneme prýt nebo dostatečně velkou odnož rostliny a okamžitě zvážíme.
3. Oddělenou část rostliny vložíme do odměrného válce tak, aby byl konec stonku ponořen v roztoku.
4. Hladinu roztoku v odměrném válci opatrně převrstvíme olejem a zapíšeme přesnou výšku vodního sloupce.
5. Po 60 minutách odečteme množství vytranspirované vody, zaznamenejte si hodnotu vodního sloupce.
6. Rychlost transpirace vyjádříme jako hmotnost vytranspirované vody v gramech na 1 g čerstvé hmotnosti za 1 hodinu.

Úkol č. 3

Pozorování stavu listových průduchů listů umístěných na světle a ve tmě

Rostlinný materiál: listy fikusy (*Ficus benjamina*)

Pomůcky: mikroskop, bezbarvý lak, průhledná izolepa, podložní sklíčko

Pracovní postup

1. Na spodní stranu listu rostlin umístěných na světle a ve tmě nanese tenkou vrstvu bezbarvého laku a necháme zaschnout.
2. Zaschlý lak přelepíme izolepou a otisk strhneme.
3. Mikroskopem pozorujeme průduchy rostlin umístěných na světle a ve tmě.

Úkol č. 4

Pozorování řezu listem

Rostlinný materiál: listy fíkusu (*Ficus benjamina*)

Pomůcky: mikroskop, žiletka, podložní a krycí sklo, Pasteurova pipeta, bezová duše

Postup:

1. Zhotovíme tenký příčný řez listem fíkusu, položíme na podložní sklíčko, zakápneme vodou a překryjeme krycím sklíčkem.
2. Preparát pozorujeme pod mikroskopem, provedeme nákres řezu listem a popíšeme.

Do protokolu

Výpočet: Rychlosti transpirace – a) 1 g čerstvé hmotnosti za 1 hodinu, b) 1 dm² listové plochy za 1 hodinu

Graf 1: Závislost ztráty vody v závislosti na čase

Obrázek 1: Průduchy za světla

Obrázek 2: Průduchy za tmy.

Tabulka 1: Počty a procentuální zastoupení otevřených a zavřených průduchů listů rostlin umístěných na světle a ve tmě (ze 3 zorných polí).

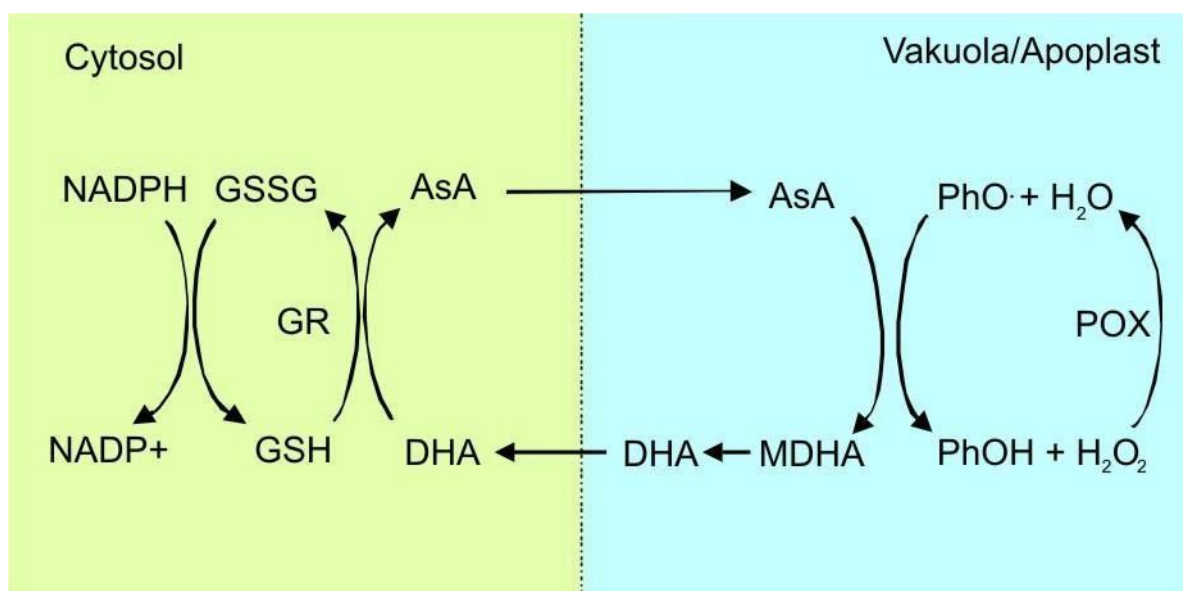
Obrázek 3: Příčný řez listem muškátu.

Téma č. 7: Fyziologie stresu

Teoretický úvod

Každá rostlina musí během svého života čelit vlivům okolního prostředí (teplotní výkyvy, minerální deficiencie, nedostatek světelného záření, poškození, infekce atd.), které lze souhrnně označit jako environmentální stres. Rostliny si proto vyvinuly celou řadu adaptačních a aklimatizačních mechanismů, které jim umožňují aktivně reagovat na danou situaci. Někdy ale míra stresového faktoru převyšuje přizpůsobivost rostliny a dochází k fyziologické nerovnováze, jejímž typickým důsledkem je nadprodukce reaktivních kyslíkových derivátů (ROS – Reactive Oxygen Species; např. H_2O_2 , O_2^- , $\text{HO}_2^\cdot$).

Tyto vysoce reaktivní molekuly jsou schopny oxidovat nukleové kyseliny, enzymy, receptory i membránové lipidy, a proto musí být rostlinnou buňkou ROS aktivně eliminovány. Systém antioxidační ochrany rostlin zahrnuje nízkomolekulární antioxidanty, mezi něž patří kyselina askorbová, α -tokoferol, karotenoidy, glutathion a fenolické látky, a dále antioxidační enzymy, jako jsou superoxiddismutáza, kataláza a peroxidáza. Jedna z možných variant součinnosti výše popsanych složek na eliminaci peroxidu vodíku je uvedena na Obr. 1. Vzhledem k urychleným změnám životního prostředí a jejich dopadu na rostlinnou produkci je výše popsán antioxidační aparát velmi intenzivně studován.



Obr. 1: Předpokládaný mechanismus antioxidačního působení fenolických látek v rostlinné buňce. AsA, askorbát; DHA, dehydroaskorbát; $\text{PhO}^\cdot$, fenoxyl radikál ($-\text{O}^\cdot$); PhOH , fenolická látka; GSH, redukovaný glutathion; GSSG, oxidovaný glutathion; GR, glutathionreduktasa; MDHA, monodehydroaskorbát; POX, peroxidasy; (Sgherri et al., 2003).

Úkol

Stanovení peroxidace membránových lipidů a celkových fenolických látek v rostlinách rajčete vystavených deficienci dusíku a fosforu.

Stanovení peroxidace membránových lipidů je založeno na kvantifikaci markeru oxidativního poškození membrán – malondialdehydu (MDA). Vzniklý MDA tvoří s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) červený komplex s absorpčním maximem při vlnové délce 532 nm. Komplex MDA-TBA lze kvantifikovat na základě známého extinkčního koeficientu $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Protože TBA nereaguje pouze s MDA, ale i s dalšími produkty peroxidace, je vhodnější místo „stanovení MDA“ užívat označení „stanovení TBARS“ (ThioBarbituric Acid Reactive Substances). Z kvantitativního hlediska představuje MDA kolem 90 % TBARS a proto jsou obě zkratky běžně užívány jako synonyma.

Stanovení celkových fenolických látek (TPC – Total Phenolic Content) je založeno na reakci „fenolických látek“ s Folin-Ciocalteu činidlem. Modré zbarvení vznikajícího polymerního komplexu je důsledkem redukce Folin-Ciocalteu činidla (snížením oxidačního čísla molybdenu). Intenzita zbarvení se měří spektrofotometricky při 750 nm. Kvantifikace je založena na srovnání vzorku se standardem kyseliny gallové a proto se výsledky uvádí v ekvivalentech kyseliny gallové (GAE – Gallic Acid Equivalents).

Protože Folin-Ciocalteu činidlo nereaguje specificky s fenolickými látkami, ale s většinou redukujících molekul (např. kyselina askorbová), vyjadřují naměřená data spíše antioxidační kapacitu vzorku. TPC je proto výborně korelován s ostatními testy pro stanovení antioxidační kapacity.

Rostlinný materiál: rajče (*Solanum lycopersicum*; *Lycopersicon esculentum*)

Potřeby a chemikálie: pinzeta, nůžky, váhy, pipety, eppendorfký, kulový mlýnek, homogenizační kuličky, centrifuga, termoblok, 2N Folin-Ciocalteu činidlo, TBA, kyselina trichloroctová, Na_2CO_3 , methanol a kyselina gallová.

Pracovní postup

1. Do mikrozkušavek navažte 50 mg listů rajčete a homogenizujte 5 minut na kulovém mlýnku spolu s 1 ml 80% methanolu.
2. Mikrozkušavky centrifugujte (13400 rpm, 4 min) a odeberte extrakt (supernatant).
3. Pro stanovení celkových fenolických látek napipetujte 60 μL extraktu do eppendorfký a doplňte do 500 μL destilovanou vodou. K takto zředěnému extraktu napipetujte 25 μL Folin-Ciocalteu činidla (2N), roztok protřepejte, dopipetujete 975 μL 2% Na_2CO_3 , a znovu protřepejte.
4. Obdobně připravte jednotlivé body kalibrační řady, pouze namísto rostlinného extraktu napipetujte 5, 10, 30 a 100 μL 0.02% kyseliny gallové.
5. Roztoky nechte inkubovat při laboratorní teplotě 30 minut.
6. Na spektrometru změřte absorbance jednotlivých roztoků při 750 nm.
7. Pro stanovení MDA napipetujte 400 μL extraktu do mikrozkušavky, přidejte 200 μL roztoku obsahujícího 0.1% kyselinu trichloroctovou a 0.5% TBA. Roztoky protřepejte a inkubujte 30 minut při 95 °C. Po inkubaci nechte vychladnout a znovu odstředte na centrifuze (13400 rpm, 4 min).
8. Změřte absorbance roztoků při vlnové délce 532 nm s korekcí při 600 nm.

Vyhodnocení:

1. Vypočítejte koncentraci MDA ve vzorcích pomocí vztahu $A = c \cdot \epsilon \cdot l$ (kde **A** je absorbance, **c** je koncentrace, ϵ je molární extinkční koeficient a **l** je optická dráha) a vyjádřete ji v **nmol.g⁻¹ FW** (Fresh Weight (FW) - čerstvá hmotnost rostlinného materiálu).
2. Metodou lineární regrese vytvořte kalibrační přímku pro kyselinu gallovou a vypočítejte obsah celkových fenolických látek vyjádřený v **μg GAE.g⁻¹ FW**.

3. Srovnajte míru poškození buněčných membrán v kontrolních a stresovaných rostlinách. Souvisí tyto hodnoty s množstvím celkových fenolů (antioxidační kapacitou) v rostlinách?

Do protokolu

Graf 1: Kalibrační přímka pro kyselinu gallovou.

Výpočet: Stanovení MDA (měření při 532 nm)

Graf 2: Stanovení celkových fenolických látek u rostlin vystavených deficienci vody, fosforu, dusíku a kontrolních rostlin (včetně chybových úseček).

Graf 3: Stanovení peroxidace membránových lipidů u rostlin vystavených deficienci vody, fosforu, dusíku a kontrolních rostlin (včetně chybových úseček).

Otázky:

Co může způsobit změny klimatu?

Vznikají ROS v rostlinné buňce i za normálních podmínek? Jakým způsobem?

Jakou funkci mají membránové lipidy a co je důsledkem poškození buněčných membrán?

Jaké znáte přírodní antioxidanty?

Téma č. 8: Percepce cytokininového signálu

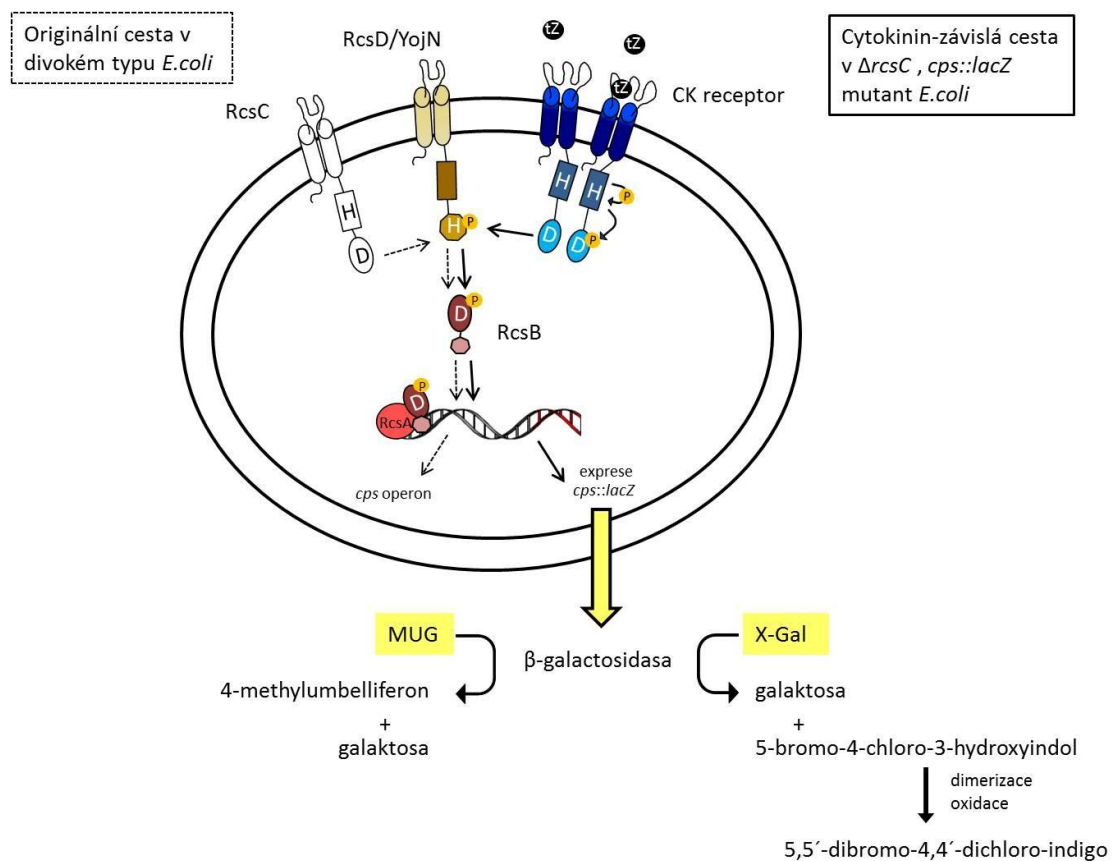
Teoretický úvod

K percepci a následné transdukci cytokininového signálu v rostlinách dochází pomocí tzv. dvousložkové signální dráhy (two-component system, TCS), která je velmi podobná signálním drahám prokaryot a nižších eukaryot. Cytokininové receptory jsou lokalizovány v plasmatické membráně a v endoplasmatickém retikulu rostlinné buňky, kde tvoří dimery. Funkčně jde o histidinkinasy. Princip přenosu signálu spočívá v postupném přenosu fosfátu cestou histidin → aspartát → histidin → aspartát. Poté, co je cytokinin rozeznán extracelulární doménou receptoru (CHASE doména - Cyclase/His kinase-Associated Sensory Extracellular domain), dochází ke konformační změně receptoru spojené s autofosforylací histidinu jedné z intracelulárních domén receptoru a následnému přenosu fosfátu na aspartát druhé z intracelulárních domén. Fosfát je dále dopraven malým proteinem, tzv. fosfotransmiterem, do jádra, kde dochází k fosforylaci jaderných proteinů s funkcí transkripčních faktorů (regulátory odpovědi typu B), které regulují expresi genů zapojených v reakcích na cytokininový signál (Obr. 1).

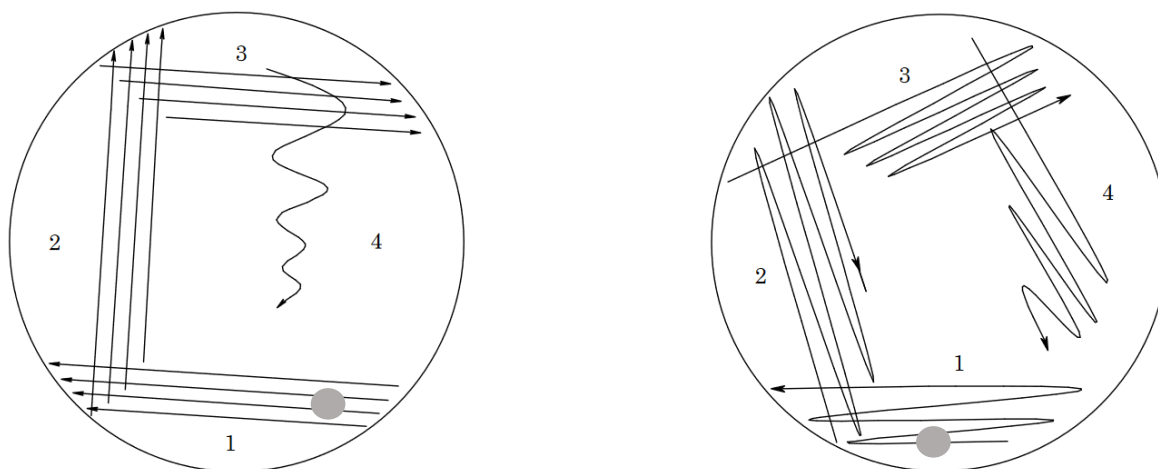
První cytokininové receptory byly objeveny a popsány u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Všechny tři receptory, CRE1/AHK4 (WOL), AHK2 and AHK3, představují strukturně podobné histidinkinasy s molekulovou hmotností nad 100 kDa. Aby bylo možné blíže identifikovat vlastnosti receptorů a jejich ligandů, byl využit poznatek o podobnosti dvousložkové bakteriální a rostlinné signální dráhy na konstrukci heterologního systému.

Bakterie *Escherichia coli* (*E.coli*) se často používá k expresi rekombinantních proteinů (proteinů z jiného organismu). Její výhodou je snadná, levná a rychlá kultivace, nevýhodou neschopnost řady posttranslačních modifikací. Kódující sekvence rekombinantního proteinu je nejprve vložena do vhodného vektoru a po ověření jeho sekvence je konstrukt transformován do hostitelského kmene *E.coli*.

Původní bakteriální dráha začíná osmosenzorem RcsC (histidinkinasa). Po rozpoznání specifického signálu dojde v nukleoidu k expresi operonu *cps* a následné tvorbě kapsulárního polysacharidu. Transgenní kmen *E.coli* KMI001 má mutované geny pro RcsC (Δ rscC) a *cps*. Zároveň konstitutivně exprimuje fúzní gen *cps::lacZ* a cytokininový receptor CRE1/AHK4, nesený vektorem pINIII. Po lokalizaci CRE1/AHK4 do plasmatické membrány bakterie dojde k heterologní komplementaci původní bakteriální signální dráhy. Za přítomnosti cytokininu v kultivačním mediu dochází k jeho percepci receptorem CRE1/AHK4 a následná transdukce signálu vede k expresi *lacZ* genu. Gen *lacZ* kóduje enzym β -galaktosidasu, jehož aktivita je snadno stanovitelná pomocí chromogenního (X-Gal; 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside), či fluorogenního (MUG; 4-methylumbelliferyl galactosid/galactopyranosid) substrátu.



Obr. 1: Propojení bakteriální a rostlinné signální dráhy



Obr. 2: Příklad křížového roztěru. 1. nanesení kultury a první roztěr → pak žihání kličky (vždy nechat kličku ochladnout); 2. přes první roztěr vedeme druhý roztěr → žihání; 3. přes druhý roztěr vedeme třetí roztěr → žihání; 4. zakončíme smyčkou/vlnovkou

Úkol

Stanovení ligandové specifity rostlinného cytokininového receptoru k různým testovaným látkám

Materiál: transgenní kmen *E. coli* (KMI001/pINIII-AHK4; $\Delta rcsC$; $cps::lacZ$), 100 μ M roztoky *trans*-zeatin (tZ), *trans*-zeatin ribosid (tZR), N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenin (iP), benzyladenin (BA), adenin (Ade), 100% dimethylsulfoxid (DMSO), X-Gal (20 mg/ml), pevné M9 médium.

Pracovní postup

1. Na přípravu 140 ml M9 média rozeďte v mikrovlnné troubě 105 ml sterilní vody s 2,1 g Bacto-agaru (pozor, povolte víčko na lahvi, aby mohla unikát pára a nedošlo k prasknutí lahve).
2. Přeneste do laminárního boxu, dejte míchat na magnetické míchačce a postupně přidávejte:

28 ml 5xM9 solí 280 μ l

1 M $MgSO_4$

2,8 ml 20% D-glukózy

0,7 ml 20% hydrolyzátu kaseinu (Casamino acids)

140 μ l 0,1 M $CaCl_2$

3,08 ml sterilní vody

Σ 35 ml

3. Po ochlazení na cca 50°C přidejte antibiotikum ampicilin (výsledná koncentrace 50 μ g/ml) a dobře promíchejte.
4. Rozlejte M9 médium do Petriho misek (20 ml/misku) a nechte ztuhnout.
5. Na povrch ztuhlého média napipetujte 20 μ l testované látky (tZ, BA, Ade, tZR, iP, v případě kontroly 100% DMSO), 40 μ l roztoku X-Gal a bakteriologickou hokejkou do sucha rozetřete po povrchu média.
6. Bakteriologickou kličkou inokulujte křížovým roztěrem (Obrázek č. 2) kulturu *E. coli* KMI001/pINIII-AHK4. Mezi každým roztěrem důkladně opláchněte bakteriologickou kličku v 70 % ethanolu a vyžehněte v plameni nad kahanem. Pozor, kličku nechte vždy vychladnout!
7. Petriho misky přiklopte víčky, uzavřete parafilmem a popište (datum, bakteriální kultura, testovaná látka, jméno skupiny).
8. Kultivujte přibližně 40 hod při 25°C (po kultivaci lze do vyhodnocení uskladnit při 4°C ve tmě).
9. Vyhodnoťte intenzitu zbarvení samostatných kolonií u jednotlivých testovaných látek.

Do protokolu

Obrázek: Fotografie Petriho misky s koloniemi *E. coli* kultivovanými na médiu s textovanými látkami

Téma č. 9: Percepce cytokininového signálu

Teoretický úvod

Enzymy jsou bílkoviny, výjimečně nukleové kyseliny, které katalyzují chemické reakce probíhající v živých organismech.

Názvosloví enzymů

- *triviální název* (starší značení, názvy odvozeny od místa výskytu nebo funkce enzymu, přípona -in, např. pepsin)
- *běžný název* (název substrátu nebo katalyzované reakce + přípona -asa; např. ureasa, peptidasa)
- *systematický název* – přesně popisuje katalyzovanou reakci, včetně substrátů a kofaktorů; pravidla pro tvorbu názvů se mírně liší pro jednotlivé třídy (viz dále). Např. N^6 -dimethylallyladenin:akceptor oxidoreduktasa;
- dimethylallyl-difosfát:AMP dimethylallyltransferasa.

Klasifikace enzymů

Enzymy se klasifikují do sedmi hlavních tříd podle typu reakce, kterou katalyzují: oxidoreduktasy, transferasy, hydrolasy, lyasy (syntasy), isomerasy, ligasy (syntetasy) a translokasy. Numerické klasifikační schéma pro enzymy EC (Enzyme Commission), vychází z klasifikace enzymů a využívá čtyřmístné systémové číslo, popisující zařazení enzymu v klasifikaci. Klasifikace popisuje třídu, podtřídu podle vazby, kterou vytvářejí/štěpí, podle případného kofaktoru a podle místa uvnitř skupiny (např. EC 1.5.99.12). Nepopisuje individuální názvy enzymů ale především třídy enzymů katalyzující stejné reakce.

Biosyntéza cytokininů

Místem biosyntézy jsou hlavně aktivně se dělící pletiva a meristémy. Nově syntetizované cytokininy jsou z kořene transportovány akropetálně transpiračním proudem, vstupují do postranních pupenů a iniciují růst. Klíčovým enzymem biosyntézy cytokininů je adenylát:isopentenyltransferasa (IPT; EC 2.5.1.27), která na adeninový skelet nukleotidu (ATP, ADP) v poloze N^6 připojuje isoprenoidní řetězec. Obecně se za aktivní formu cytokininů považují volné báze vzniklé přeměnou ribotidu daného cytokininu reakcí katalyzovanou enzymem LOG (LONELY GUY; cytokinnukleosid 5'-monofosfátfosforibohydrolasa).

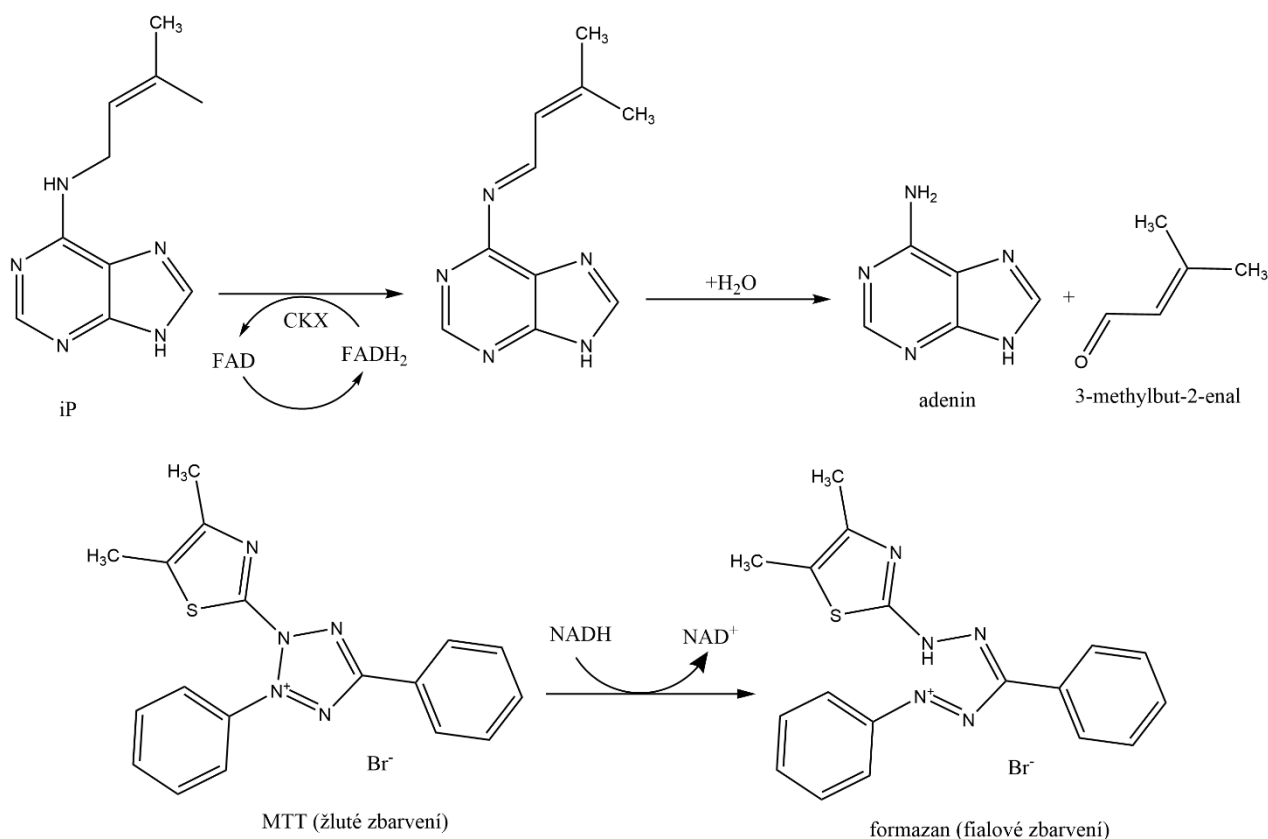
Metabolické přeměny/inaktivace

Hladina bioaktivních cytokininů v rostlinách je regulovaná mírou *de novo* syntézy, rychlostí transportu, mírou degradace nebo vznikem a rozkladem cytokininových konjugátů. Cytokininy mohou být inaktivovány konjugací se sacharidy reversibilně (*O*-glykosylace) nebo ireversibilně (*N*-glykosylace).

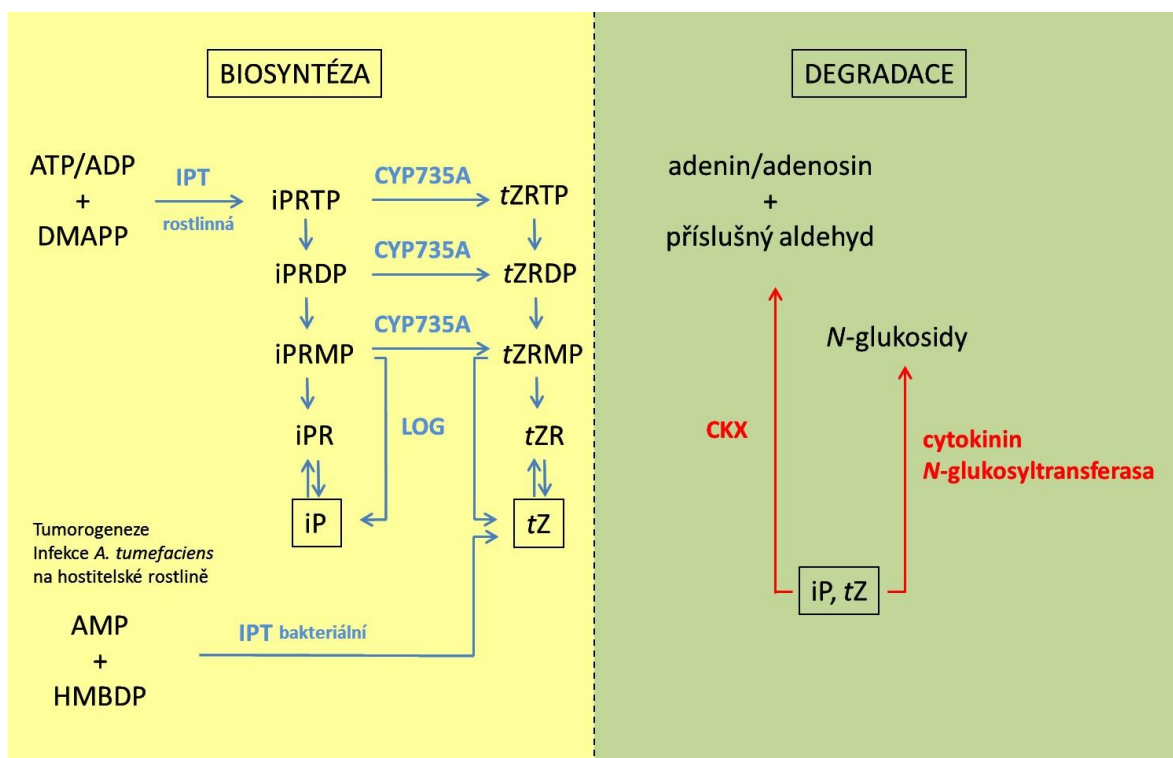
Degradace

Přirozeně se vyskytující cytokininy jsou degradovány oxidací za vzniku adeninu a aldehydu odpovídajícího postrannímu řetězci daného cytokininu. Enzymem katalyzujícím oxidaci cytokininů je cytokininoxidasa/dehydrogenasa (CKX; EC 1.5.99.12). V modelové rostlině huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) bylo detekováno sedm cytokinin-degradujících enzymů AtCKX, které se liší svou substrátovou specifikou a lokalizací v buňce. AtCKX2, AtCKX4 a AtCKX6 nejúčinněji degradují volné báze N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adeninu (iP) a *trans*-zeatinu (tZ), zatímco ostatní preferují jako substráty jejich glukosidy a/nebo nukleotidy. Jednotlivé CKX se vyskytují v různých kompartmentech buňky, například v apoplastu, cytosolu nebo vakuolách. Dosud známé CKX patří mezi oxidoreduktasy obsahující kovalentně vázaný flavinový kofaktor (výjimkou je CKX ze sinice *Nostoc sp.*) a katalyzující oxidativní štěpení cytokininů

použitím elektronových akceptorů. CKX enzym může fungovat ve dvojím módu: jako oxidasa, kde se elektronovým akceptorem stává kyslík za vzniku peroxidu vodíku; nebo jako dehydrogenasa, když CKX redukuje chinony. Účinnými elektronovými akceptory používanými v laboratoři jsou 2,6-dichlorofenol indofenol (DCPIP), 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinon (koenzym Q_0), fenazinmethosulfát (PMS). Pro účely tohoto cvičení byl připraven rekombinantní enzym z expresního systému transformovaného kmene kvasinky *Pichia pastoris* pGAP α A::AtCKX2. V tomto cvičení bude aktivita enzymu cytokininoxidasy/dehydrogenasy AtCKX2 sledována spektrofotometricky dle dříve popsané metodiky (Frébort *et al.*, 2002). Metoda je založena na spojeném redoxním systému složeném ze zprostředkujícího (PMS) a konečného (MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) akceptoru elektronů (Obr. č. 1). Výsledkem je tvorba formazanového barviva, což se projeví modrofialovým zbarvením, které lze kvantifikovat spektrofotometricky při 578 nm.



Obr. 1: Průběh reakce degradace iP enzymem CKX za vzniku formazanu



Obr. 2: Schematické znázornění biosyntézy a degradace cytokininů (iP, tZ). Donor postranního řetězce: hydroxymethylbutenyl difosfátu (HMBDP) nebo dimethylallyl pyrofosfátu (DMAPP; upraveno podle Werner et al., 2009; Ueda et al., 2012)

Úkol

Degradace cytokininů pomocí enzymu cytokinin oxidasy/dehydrogenasy

Materiál: Reakční pufr pro CKX enzym (0,1M KH₂PO₄, pH 7,4), 35% kyselina octová, PMS (0,67 mg) a MTT (4,55 mg), 10 mM roztoky *trans*-zeatin (tZ), N⁶-(Δ²-isopentenyl)adenin (iP), benzylaminopurin (BA), adenin (Ade), 100% dimethylsulfoxid (DMSO) a rekombinantní enzym AtCKX2.

Pracovní postup

1. Popište 2x5 mikrozkušavek o objemu 1,5 ml zkratkami testovaných látek: tZ, iP, BA, Ade, blank (DMSO).
2. Do připravených zkumavek napipetujte jednotlivé testované látky po 5 µl.
3. Do 15 ml zkumavky obalené alobalem vyklepněte směs PMS+MTT, přidejte 11 ml reakčního pufru a vortexujte do úplného rozpuštění. Tuto směs použijte společně s další skupinou jako reakční premix. Chraňte před přímým slunečním světlem (zabalit do alobalu).
4. Do všech mikrozkušavek napipetujte 0,5 ml této reakční směsi a zahajte reakci přidavkem 0,5 ml CKX enzymu. Zvortexujte a ihned inkubujte 30 minut při 37°C ve tmě. Jestliže jsou po této inkubaci roztoky látek málo zabarveny, prodlužte inkubaci o 10 minut.
5. Reakci zastavte přidáním 125 µl 35% kyseliny octové a promíchejte.
6. Změřte absorbanci při 578 nm a zaznamenejte do tabulky.
7. Vypočítejte aktivitu enzymu vztahenou na objem: a [pkat/ml]. (Nutno vynásobit 2x, bylo použito 0,5 ml).

	A ₅₇₈	A ₅₇₈	průměr	a [kat/ml]	a [pkat/ml]
Ade					
BA					
tZ					
iP					

Výpočet aktivity [kat]:

$$a = \frac{V}{\epsilon \times t \times l} \times A_{578}$$

V	celkový objem reakce [l]
ϵ	extinkční koeficient; pro vznikající formazan je 13000 M ⁻¹ cm ¹ s
t	čas reakce v sekundách [s]
l	délka optické dráhy v kyvetě [cm]

Do protokolu

Výpočet: Aktivita enzymu.

Tabulka 1 - Souhrn získaných a vypočítaných hodnot při spektrofotometrickém měření.