

Kolo: Krajské

Kategória: A

Teoreticko-praktická časť – Praktická úloha č. 1

### **Téma: Rastlinné pigmenty a fotosyntéza**

Farbivá sú pre rastliny dôležité pri mnohých procesoch. Asi najznámejším a najvýznamnejším z nich je sýtozelený chlorofyl *a* – pigment nevyhnutný pre priebeh fotosyntézy. Na fotosyntéze sa však podieľajú aj iné pigmenty, ako je napríklad chlorofyl *b* či rôzne karotenoidy. Tie sú súčasťou svetlozberných komplexov a líšia sa od chlorofylu *a* aj svojím absorpčným spektrom. Energiu fotónov ktoré by samotný chlorofyl *a* nemohli excitovať, tak môže zachytiť iný pigment, ktorý potom predá energiu reakčnému centru s chlorofylom *a*.

Mnohé pigmenty sa zase uplatňujú pri ochrane rastlín pred škodlivým UV žiarením, pri lákaní opelovačov či prenášačov semien. Okrem už spomínaných žltých až červených karotenoidov sú to najmä rôzne flavonoidy, medzi ktoré patria aj známe antokyány. Tie sú polárne, vo vode rozpustné farbivá a môžu mať rôznu farbu (najčastejšie fialovú), často v závislosti na pH prostredia. Práve nim vďačí za svoje sfarbenie napríklad aj červená cibuľa či čučoriedky.

Na sledovanie jednotlivých pigmentov je štandardne potrebné ich oddeliť. Na to sa využíva aj chromatografia - separačná metóda založená na delení látok v závislosti na ich afinitu k mobilnej a stacionárnej fáze. Mobilná fáza môže byť ľubovoľné rozpúšťadlo, napr. voda, etanol alebo benzín. Ako stacionárna fáza môže zase slúžiť obyčajný filtračný papier. Filtračný papier na ktorý sa naniesla vzorka sa sčasti ponorí do mobilnej fázy. Tá postupne vzlína nahor a látky s vyššou afinitou k nej sú unášané, kým látky s vyššou afinitou k stacionárnej fáze zostávajú na spodnej časti papiera. Po istom čase je potom možné pozorovať, ako sa od seba pigmenty oddelia. Vašou dnešnou úlohou bude separovať rastlinné pigmenty pomocou papierovej chromatografie za použitia dvoch rôznych mobilných fáz – vody a etanolu. Budete pritom porovnávať listy brečtanu dlhodobo vystavené priamemu slnku a zatienené listy.

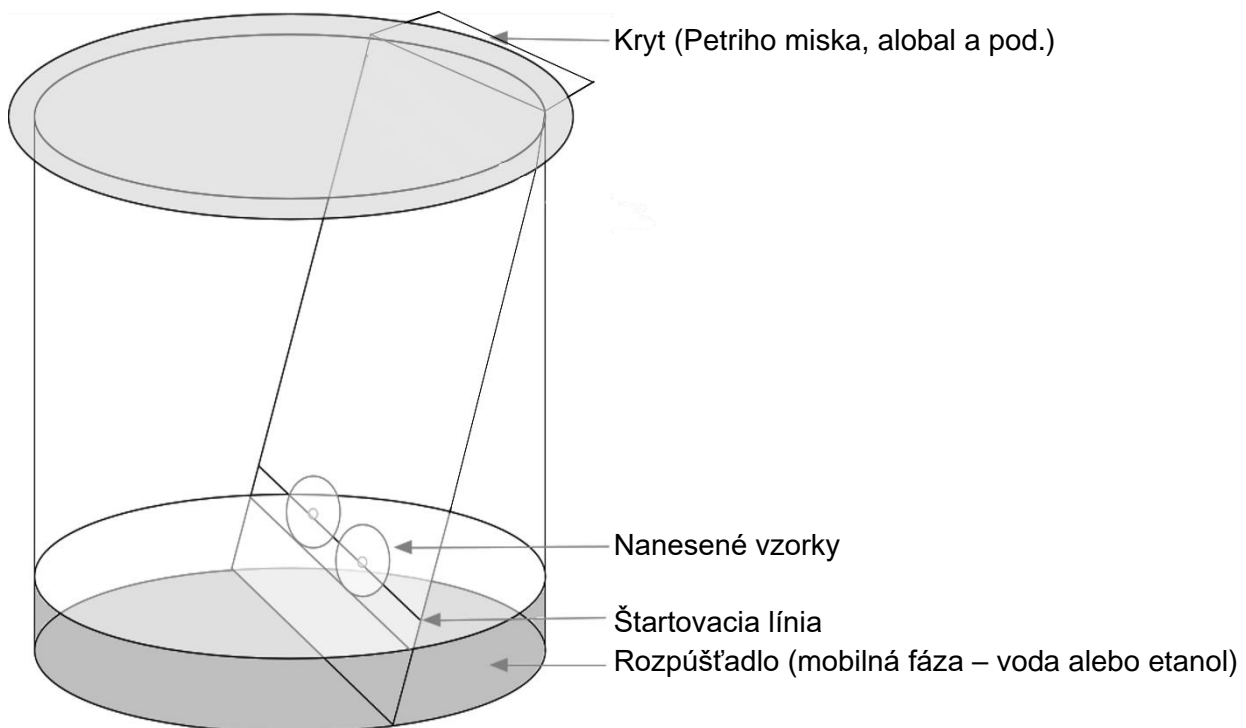
#### **Pomôcky:**

Listy brečtanu popínavého (*Hedera helix*) A - vystavené priamemu slnku, B – rastúce v tieni, 25 ml 96 % etanolu, 20 ml vody, 2 kadičky, Pasteurova pipeta (stačí do dvojice), filtračný papier (polovica A4), 2 špáradlá, ceruzka, pravítko, vrchnák/pokryvka na kadičku (Petriho miska, alobal a pod.), nožnice (stačí do dvojice), 2 nádoby na drvenie listov (skúmavky/kyvety/prípadne viečka z fľaše dostatočne nízke aby sa dalo dosiahnuť špáradlom na dno), nástroj na podrvenie listov (pinzeta, špajdľa a pod.)

#### **Postup:**

1. Na začiatku pripravte papier na chromatografiu. Z filtračného papiera vystrihnite 2 obdĺžniky široké 5 cm a dlhé tak, aby sa pri vložení do kadičky dala ich vrchná časť (asi 1 cm) ohnúť o okraj kadičky a tak stabilizovať. Na spodnej časti oboch obdĺžnikov, vo vzdialenosti 1,5 cm od okraja vyznačte ceruzkou štartovaciu líniu (obr. 1.).

2. Na štartovacej línii si na každom papieri naznačte 2 body (A a B), ktoré budú od bližšieho okraja vzdialené asi 1,5 cm.
3. Listy A aj B nastrihajte na čo najmenšie kúsky (aspoň 0,5 x 0,5 cm) a nasypťte ich do príslušnej skúmavky. Pasreurovou pipetou pridajte približne 0,5 - 1 ml 96 % etanolu. V prípade že máte väčšie množstvo rastlinného materiálu, môžete použiť viac etanolu, je však lepšie získať čo najkoncentrovanejší extrakt. Následne kúsky listov pomiešajte a podrvtte pinzetou či špajdlou, aby sa z nich uvoľnili pigmenty.
4. Pomocou špáradla naneste roztok s pigmentami z vašich vzoriek na vyznačené body na štartovacej línii na oboch chromatografických papieroch. Vzorky nanášajte postupne, priebežne ich osušujte fúkaním, aby sa príliš nerozpili a vznikla dostatočne koncentrovaná škvrna. Optimálne je nanášať vzorky A a B striedavo, aby druhá vzorka stihla zaschnúť. Naneste vždy dostatočné množstvo vzorky (približne 15x opakujte prenášanie špáradlom). Vyvarujte sa prenášaniam zvyškov listov. Po skončení nanášania nechajte filtračný papier asi 5 minút úplne uschnúť.
5. Do kadičky 1 nalejte 96 % etanol a do kadičky 2 čistú vodu. Použite také množstvo mobilnej fázy, aby bola hladina vo výške asi 0,5 - 0,8 cm. Následne ich prikryte alobalom alebo Petriho miskou, aby nedochádzalo k odparovaniu. Po vyschnutí nanesených vzoriek opatrne položte jeden papier zvislo do každej kadičky tak, aby štartovacia línia nebola ponorená v rozpúšťadle a prečnievajúci vrchol papiera ohnite cez okraj nádoby (obr.1). Kadičku opäť prikryte a nechajte vyvíjať asi 5 - 10 minút dovtedy, kým rozpúšťadlo nevystúpi aspoň 4 cm nad štartovaciu líniu. Potom papier vytiahnite a nechajte vysušiť.
6. Chromatogramy podpíšte, označte číslom kadičky a na konci odovzdajte vedúcemu úlohy.



Obr.1

## Výsledky:

1. Akú farbu majú dve najvýraznejšie škvrny pri každej vzorky na jednotlivých chromatogramoch? Uvedte ich v poradí v akom sa nachádzajú od štartovacej línie. Pokúste sa identifikovať aké farbivo je dominantnou zložkou jednotlivých škvŕn. Vyberajte pritom z nasledujúcich pigmentov: fykobilín, chlorofyl, karotén, melanín, antokyán, xantofyl.

### Kadička 1 – mobilná fáza etanol

**Vzorka A** farba pigment

Škvŕna č.1

Škvŕna č.2

**Vzorka B** farba pigment

Škvŕna č.1

Škvŕna č.2

### Kadička 2 – mobilná fáza voda

**Vzorka A** farba pigment

Škvŕna č.1

Škvŕna č.2

**Vzorka B** farba pigment

Škvŕna č.1

Škvŕna č.2

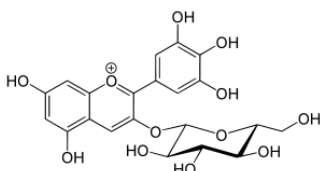
2. Pri vzorkách A a B by sa mala výrazne líšiť intenzita farby niektorých škvŕn, čo je spôsobené rozdielom v obsahu jedného z pigmentov. O aké farbivo sa jedná? Vysvetlite, čo je za to pravdepodobne zodpovedné.

3. Jednotlivé pigmenty sa separujú na základe ich rozdielnej afinity k mobilnej resp. stacionárnej fáze. To pritom do veľkej miery závisí aj na ich polarite.

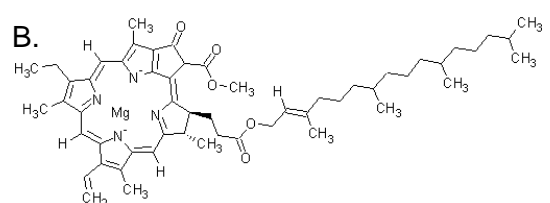
I. Určite ktorý z pigmentov, ktoré na chromatogramoch vidíte je polárnejší a vysvetlite, podľa čoho tak usudzujete.

II. Zoradte nasledujúce pigmenty na základe ich polarity od najmenej polárneho. Vyberte ktorý štruktúrny vzorec by mohol patriť pigmentu z otázky 3.I. (podčiarknite ho).

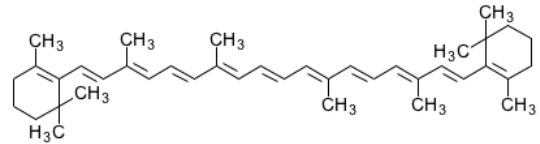
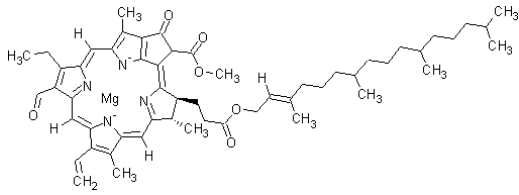
A.



B.



C.

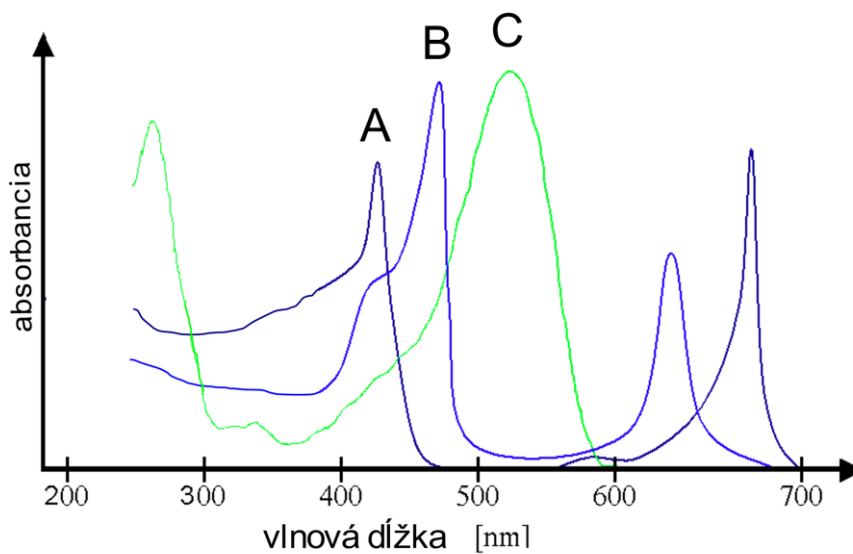


**Doplňujúce otázky:**

1. O tom akú má pigment funkciu nám často môže veľa napovedať aj jeho absorbanca pri rôznych vlnových dĺžkach, t.j. absorpčné spektrum. Na obrázku nižšie vidíte absorpčné spektrum troch rôznych pigmentov. Priradte k nim ich hlavnú funkciu v rastlinných bunkách.

I fotosyntéza

II ochrana pred UV žiarením / lákanie opeľovačov



2. Vzhľadom na rozdielnu funkciu sa od seba jednotlivé pigmenty často líšia aj lokalizáciou v bunke.

I. Priradte k nasledujúcim pigmentom časť bunky, kde sa vyskytuje v najväčšom množstve.

Chlorofyl a

Chlorofyl b

Antokyány

a) cytoplazma

b) jadro

c) endoplazmatické retikulum

d) vakuola

e) stróma chloroplastu

f) mitochondria

g) tylakoidná membrána chloroplastu

h) cytoplazmatická membrána

II. Ktorý z pigmentov sa nachádza v reakčnom centre:

- a) fotosystému I
- b) fotosystému II

**3.** Fotosyntéza je komplexný sled viacerých reakcií. Okrem pigmentov sa jej však zúčastňujú aj mnohé iné látky. Jedným z jej najvýznamnejších limitujúcich faktorov je pri súčasnom zložení atmosféry fotorespirácia. Obzvlášť závažným problémom je v teplých oblastiach, kde majú rastliny v listoch veľmi nízku relatívnu koncentráciu CO<sub>2</sub>.

**I.** Ktorý enzým je zodpovedný za fotorespiráciu a k čomu pri nej vlastne dochádza?

**II.** V ktorých organelách dochádza pri fotorespirácii k spracovaniu vzniknutého medziproduktu?

**III.** Ako sa rastliny dokážu vysporiadať s týmto problémom?

a) Niektoré tropické trávy CO<sub>2</sub> fixujú priamo pomocou špecifickejšieho enzýmu (PEP-karboxyláza). Tá už N<sub>2</sub> na ribulóza-1,5-bisfosfát nenaviaže takmer vôbec a takéto rastliny tak majú výrazne zníženú mieru fotorespirácie.

b) Niektoré rastliny najskôr fixujú CO<sub>2</sub> pomocou enzýmu bez oxygenázovej aktivity. Následne oxid uhličitý uvoľní v špecializovaných bunkách izolovaných od okolia, kde je potom veľmi nízka relatívna koncentrácia kyslíka a pôvodná karboxyláza tu môže CO<sub>2</sub> naviazať bez problémov.

c) Mnohé sukulenty majú prieduchy otvorené iba cez noc, kedy nedochádza k tak veľkým stratám vody transpiráciou. Špecifickejší enzým bez oxygenázovej aktivity vtedy zabuduje CO<sub>2</sub> z okolia. Ten je potom v bunkách týchto rastlín uvoľnený cez deň, kedy ho finálne zafixuje pôvodná karboxyláza.

d) Vodné rastliny získavajú CO<sub>2</sub> oxidáciou metánu vznikajúceho v anoxickom bahne, kde zasahujú ich korene. Zvýšia si tak koncentráciu CO<sub>2</sub> v stonkách, kde potom môže dochádzať k fotosyntéze aj bez prístupu kyslíku.

Autor: Lukáš Janošík

Recenzia: Mgr. Ján Kováč