

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.03>

ROZDZIAŁ III. **KOMÓRKA ROŚLINNA**
JAKO UKŁAD OSMOTYCZNY

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Wymiana wody między komórką roślinną a środowiskiem zewnętrznym odbywa się zgodnie z prawami dyfuzji, osmozy i pęcznienia. Według teorii termodynamicznej u podstawy tych zjawisk leży dążenie do przyjęcia przez dany układ stanu mającego możliwie najniższą energię swobodną. Jeśli obok siebie znajdują się dwa układy różniące się energią swobodną, to nastąpi przenikanie wody z układu o wyższej energii swobodnej do układu o niższej energii swobodnej, aż do uzyskania stanu równowagi. Energia swobodna w odniesieniu do 1 mola jakiegokolwiek związku chemicznego w roztworze określana jest jako potencjał chemiczny tego związku. Potencjał chemiczny wody określa się skrótowo jako **potencjał wody** (Ψ). Jest on definiowany jako energia swobodna (zdolność do wykonania pracy użytecznej) wnoszona do układu przez 1 mol wody i mierzona w stosunku do wzorca, którym jest czysta woda pod ciśnieniem jednej atmosfery i w temperaturze 298 K. Potencjał wody stanowi więc różnicę między potencjałem chemicznym wody w układzie (w roztworze) (μ_w) a potencjałem chemicznym czystej wody (μ_w°), który przy ciśnieniu atmosferycznym ma wartość zero:

$$\Psi = \frac{\mu_w - \mu_w^\circ}{\bar{V}_w}$$

gdzie:

\bar{V}_w – molowa objętość wody ($18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$).

Rozpuszczenie jakiegokolwiek substancji w roztworze powoduje obniżenie jego potencjału wody. Potencjał wody przyjmuje zwykle wartości ujemne i wyrażany jest w jednostkach ciśnienia: Pa ($1 \text{ Pa} = 1 \text{ N m}^{-2}$) lub jego wielokrotności: MPa (10^6 Pa).

O stosunkach wodnych w komórce roślinnej oraz możliwości oddania lub pobrania wody przez komórkę decydują głównie dwa czynniki: (1) potencjał wody soku komórkowego w wakuoli, który przyjmuje zawsze wartości ujemne i zależy od stężenia substancji osmotycznie czynnych w wakuoli, oraz (2) potencjał turgorowy, odzwierciedlający ciśnienie wywierane przez ścianę komórkową na protoplast, równe co do wartości ciśnieniu wywieranemu przez protoplast na ścianę komórkową. W jądrowej komórce (stan turgoscencji) potencjał turgorowy przyjmuje wartości dodatnie, a w przypadku utraty turgoru jest równy zeru. Zależności te charakteryzuje pojęcie **potencjału wody komórki** (Ψ_k):

$$\Psi_k = \Psi_s + \Psi_t$$

gdzie:

Ψ_s – potencjał wody soku komórkowego (potencjał osmotyczny),

Ψ_t – potencjał turgorowy (potencjał ciśnienia).

Jeżeli potencjał wody w komórce będzie mniejszy (bardziej ujemny) od potencjału wody w otoczeniu, to woda będzie wnikała do komórki, jeśli zaś będzie większy (mniej ujemny) od potencjału wody w otoczeniu, woda będzie wypływała z komórki na zewnątrz. **Woda przemieszcza się zawsze w kierunku od wyższego potencjału wody do niższego.**

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Charakterystyka stosunków wodnych w komórce roślinnej poprzez oznaczenie potencjału wody soku komórkowego i potencjału wody komórki.

Doświadczenie I

Oznaczanie potencjału wody soku komórkowego metodą plazmolizy granicznej (De Vriesa)

Zasada metody

Punkt, w którym błona komórkowa pozostaje w kontakcie ze ścianą komórkową, ale nie jest wytwarzany potencjał turgorowy,

określa się jako punkt początkowy plazmolizy. W chwili zaniku potencjału turgorowego, czyli gdy $\Psi_t = 0$, potencjał wody komórki jest równy potencjałowi soku komórkowego ($\Psi_k = \Psi_s$). W fizjologii roślin przyjmuje się, że warunek taki jest spełniony w tkance, w której około 50% komórek znajduje się w punkcie początkowym plazmolizy (tzw. plazmoliza graniczna). Metoda polega na znalezieniu takiego roztworu, który wywołuje w badanej tkance plazmolizę graniczną. Potencjał wody takiego roztworu (Ψ) jest równy potencjałowi wody soku komórkowego (Ψ_s).

Materiał

cebula cebuli

Odczynniki

roztwór sacharozy o stężeniu 1 M

Sprzęt laboratoryjny

statyw z 9 probówkami, pipety (0,1–10 cm³), bagietka, skalpel, igła preparacyjna, 9 szkiełek podstawowych i nakrywkowych, 5 szalek Petriego, mikroskop świetlny

Wykonanie doświadczenia

Z wyjściowego roztworu sacharozy o stężeniu 1 M przygotować metodą rozcieńczeń po 10 cm³ roztworów o następujących stężeniach: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 M. Na czyste, odpowiednio opisane szkiełka podstawowe nanieść bagietką po kilka kropli przygotowanych roztworów. Bagietkę należy każdorazowo umyć i wytrzeć do sucha. Z wklęsłej strony zgrubiałych łusek wewnętrznych cebuli wycinać skalpelem skórkę o powierzchni mniej więcej 5 × 5 mm i przenosić igłą preparacyjną do roztworu na szkiełkach podstawowych. Następnie nakryć je szkiełkiem nakrywkowym. Wszystkie preparaty powinny pochodzić z jednego fragmentu cebuli. Tak przygotowane preparaty przykryć szalkami Petriego i pozostawić na około 30 minut. Po tym czasie obserwować pod mikroskopem (powiększenie obiektywu 10× lub 20×) różne stadia plazmolizy, zaczynając od największego stężenia sacharozy. Określić stężenie roztworu sacharozy, w którym tylko niektóre protoplasty komórek wykazują zmniejszenie objętości, widoczne jako oderwanie od ściany komórkowej w narożach (plazmoliza graniczna).

Opracowanie wyników

1. Narysować komórkę skórki cebuli w stanie zaawansowanej plazmolizy i plazmolizy granicznej.
2. Obliczyć potencjał wody roztworu sacharozy wywołującego plazmolizę graniczną.

Potencjał wody soku komórkowego będzie liczbowo w przybliżeniu równy potencjałowi wody roztworu sacharozy wywołującego plazmolizę graniczną. Można go wyliczyć, stosując równanie van't Hoffa:

$$\Psi = -iCRT$$

gdzie:

Ψ – potencjał wody roztworu sacharozy wywołującego plazmolizę graniczną [MPa],

C – stężenie roztworu wywołującego plazmolizę graniczną [M],

R – stała gazowa ($8,31 \text{ Nm K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$),

T – temperatura bezwzględna [K],

i – współczynnik izotoniczny dla substancji dysocjujących:

$$i = 1 + \alpha(n - 1)$$

gdzie:

α – stopień dysocjacji,

n – liczba jonów powstających przy dysocjacji (dla cząsteczek niezjonizowanych, takich jak sacharoza czy mannitol, $i = 1$).

Doświadczenie II

Oznaczenie potencjału wody komórki roślinnej

O możliwości pobrania lub oddania wody przez komórkę roślinną decyduje potencjał wody komórki (Ψ_k). Umieszczając tkankę w roztworach o różnym potencjale wody (seria rozcieńczeń), można oznaczyć Ψ_k poprzez znalezienie takiego roztworu, w którym komórka (tkanka) nie będzie ani pobierać, ani tracić wody. Oznacza to, że tkanka i roztwór znajdują się w stanie równowagi i potencjał wody tkanki jest równy potencjałowi wody roztworu. Badać można zarówno zmiany stężenia roztworu, w którym umieszczono tkankę, jak i zmiany objętości (masy) tkanki.

II.A. OZNACZANIE POTENCJAŁU WODY KOMÓREK ROŚLINNYCH NA PODSTAWIE ZMIANY STĘŻENIA ROZTWORU METODĄ SZARDAKOWA

Zasada metody

Potencjał wody komórki (tkanki) można oznaczyć poprzez ustalenie zmiany potencjału wody roztworu, w którym inkubowano tkankę. Jeżeli potencjał wody roztworu obniży się (stężenie roztworu wzrośnie), to znaczy, że tkanka pobrała wodę. Jeżeli zaś potencjał wody roztworu wzrośnie (stężenie obniży się) – tkanka oddała wodę. Kierunek przepływu wody każdorazowo jest zgodny z gradientem potencjału wody między komórką i roztworem zewnętrznym. W wyniku zmiany potencjału wody roztworu zmienia się również jego ciężar właściwy. Porównując ciężary właściwe roztworów wyjściowych i roztworów po inkubacji tkanki roślinnej, można wskazać roztwór, którego ciężar właściwy nie zmienił się wskutek przebywania w nim tkanki roślinnej. Potencjał wody takiego roztworu jest liczbowo równy potencjałowi wody komórki.

Materiał

liście roślin (begonia, cyklamen, pelargonja)

Odczynniki

0,5 M CaCl_2 , błękit metylenowy

Sprzęt laboratoryjny

statyw z 14 probówkami, pipety (0,1–10 cm³), pipety kapilarne, bagietka, korkobor, igła preparacyjna

Wykonanie doświadczenia

Z wyjściowego roztworu CaCl_2 o stężeniu 0,5 M przygotować po 10 cm³ roztworów o stężeniach: 0,03; 0,05; 0,08; 0,1; 0,13; 0,15; 0,20 M. Probówki z powyższymi roztworami (odpowiednio opisane) umieścić w pierwszym rzędzie statywu. Następnie z każdej probówki przenieść po 0,5 cm³ roztworu do probówki stojącej za nią w drugim rzędzie statywu. Z liści roślin wyciąć korkoborem krążki o średnicy 0,8–1 cm i wrzucić po 3–5 do każdej z probówek drugiego rzędu. Bagietką usunąć pęcherzyki powietrza i pozostawić próby na 30 minut, kilkakrotnie delikatnie mieszając w tym czasie. Po upływie czasu inkubacji krążki wyjąć igłą preparacyjną, a roztwór,

w którym się inkubowały, zabarwić błękitem metylenowym, wrzucając do każdej probówki po kilka kryształków barwnika. Pipetą kapilarną nabrać małą kroplę barwnego płynu z pierwszej probówki, w której inkubowała się tkanka, i przenieść do probówki stojącej przed nią w pierwszym rzędzie, zanurzając pipetę kapilarną do połowy wysokości roztworu i wypuszczając powoli barwny płyn. Czynność powtórzyć dla wszystkich badanych roztworów. Obserwować przemieszczanie się barwnej smugi. Jeśli kolorowa kropla pozostaje na powierzchni cieczy, oznacza to, że po inkubacji tkanki roztwór stał się bardziej rozcieńczony wskutek oddawania wody przez tkankę, a tym samym jego ciężar właściwy się zmniejszył. Natomiast opadanie kropli na dno wskazuje, że ciężar właściwy roztworu po inkubacji tkanki się zwiększył (tkanka pobrała wodę). Jeżeli kropla dyfunduje równomiernie we wszystkich kierunkach, ciężar właściwy roztworu nie uległ zmianie.

Opracowanie wyników

1. Obliczyć potencjał wody komórki, korzystając z równania van't Hoffa (por. Doświadczenie I) i danych dotyczących stopnia dysocjacji CaCl_2 (tabela 3.1). Potencjał wody komórki jest liczbowo równy potencjałowi wody roztworu, w którym obserwowano równomierną dyfuzję barwnej kropli, świadcząca o stanie równowagi między tkanką a środowiskiem zewnętrznym.
2. Przeprowadzić analizę zależności potencjału wody komórki i roztworu CaCl_2 w przypadku, gdy: (a) barwna kropla unosiła się ku górze i (b) barwna kropla opadała na dno.

α dla CaCl_2	Stężenie CaCl_2 [M]
0,88	0,01
0,82	0,03
0,77	0,05
0,75	0,08
0,74	0,10
0,71	0,15
0,68	0,20

Tabela 3.1. Stopień dysocjacji (α) CaCl_2

II.B. OZNACZANIE POTENCJAŁU WODY KOMÓREK ROŚLINNYCH NA PODSTAWIE ZMIANY OBJĘTOŚCI I MASY TKANKI METODĄ URSPRUNGA

Zasada metody

Fragmety tkanki roślinnej umieszcza się w roztworach o różnych stężeniach substancji osmotycznie czynnej w celu znalezienia takiego roztworu, w którym objętość (masa) tkanki nie ulegnie zmianie, czyli tkanka nie będzie ani pobierać, ani tracić wody. Wówczas Ψ roztworu jest równe Ψ tkanki. Jeśli Ψ roztworu zewnętrznego będzie mniejszy (bardziej ujemny) od Ψ tkanki, to tkanka będzie oddawała wodę i jej objętość się zmniejszy. Przy wyższym Ψ roztworu zewnętrznego tkanka pobierze wodę i jej objętość wzrośnie. Zmianie objętości towarzyszyć będzie proporcjonalna zmiana masy tkanki.

Materiał

bulwy ziemniaka

Odczynniki

roztwór sacharozy o stężeniu 1 M

Sprzęt laboratoryjny

statyw z 9 probówkami, korkobor, pipety (0,1–10 cm³), waga laboratoryjna, linijka

Wykonanie doświadczenia

Z wyjściowego roztworu sacharozy o stężeniu 1 M metodą rozcieńczeń przygotować w probówkach po 10 cm³ roztworów o stężeniach: 0; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 M. Z bulw ziemniaka wyciąć korkoborem 9 walców o średnicy 7–9 mm i długości 5–6 cm. Po dokładnym zmierzeniu linijką ich długości i zważeniu umieścić je w przygotowanych probówkach. Po upływie 90 minut walce wyjąć z roztworów, osuszyć delikatnie na bibule oraz ponownie zmierzyć ich długość i zważyć. Porównać wyniki z pomiarami wyjściowymi. Wyniki umieścić w tabeli 3.2.

Stężenie roztworu sacharozy [M]	0,0	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Długość początkowa [mm]									
Długość końcowa [mm]									
Zmiana długości [mm]									
Masa początkowa [g]									
Masa końcowa [g]									
Zmiana masy [g]									
Stan turgoru tkanek									

Opracowanie wyników

1. Znaleźć stężenie roztworu, w którym objętość (masa) tkanek nie uległa zmianie, i na tej podstawie, korzystając z równania van't Hoffa (por. Doświadczenie I), obliczyć potencjał wody komórek bulwy ziemniaka.
2. Określić stan turgoru tkanek ziemniaka po wyjęciu ich z roztworów sacharozy. Zaobserwowane zmiany wyjaśnić w oparciu o analizę zależności potencjału wody komórek bulwy ziemniaka i roztworu sacharozy.

Tabela 3.2. Zależność masy i objętości tkanek bulwy ziemniaka od stężenia roztworu sacharozy

Literatura

- Kopcewicz J., *Podstawy biologii roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.
- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Kozłowska M. (red.), *Fizjologia roślin. Od teorii do nauk stosowanych*, PWRiL, Warszawa 2007.
- Szweykowska A., *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2002.