

## Vježba br. 1. ČELIJA KAO OSMOTSKI SAMOREGULATIVNI SISTEM

Radi nesmetanog obavljanja ćelijskih funkcija za biljku je kao i za sva druga živa bića od najvećeg značaja održavanje stabilne unutrašnje sredine u ćelijama. Ćelije stoga moraju biti izolovane i dobro zaštićene od promjena u svojoj okolini. Ali s druge strane ćelije moraju neprekidno da primaju ili izlučuju vodu, gasove, mineralne soli i drugo, tako da na izvjestan način moraju biti i otvorene prema spoljašnjoj sredini.

Svaka biljna ćelija je od spoljašnje sredine odvojena **ćelijskim zidom** i citoplazminom membranom, **plazmalemom**. U višećelijskom organizmu zidovi svih ćelija se nastavljaju jedan na drugi i čine ne prekinutu cjelinu koja se zove **apoplast**. Jasno je da sve supstance iz spoljašnje sredine moraju prvo da uđu u apoplast i da samo preko njega mogu da dopru u unutrašnjost ćelije. Apoplast je slobodno propustljiv za vodu i rastvorene supstance.

Plazmaleme svih ćelija naliježu sa unutrašnje strane na ćelijske zidove. Na zidovima se obično nalaze mnogobrojne pore, kroz koje se pružaju plazmodezme. To su produžeci citoplazme, takođe obavijeni plazmalemom, koji predstavljaju fine kanale i povezuju susjedne ćelije. Na taj način protoplasti susjednih ćelija u jednom tkivu takođe čine jedinstvenu cjelinu koja se zove **simplast**. Kretanje mnogih materija, naročito na manja udaljenja, može se obaviti putem simplasta.

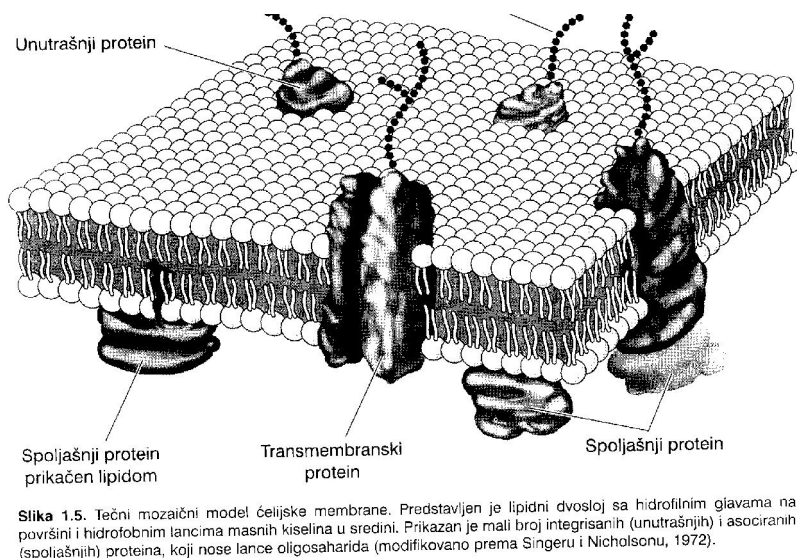
### Struktura i propustljivost ćelijskih membrana

**Plazmalema** reguliše razmjenu materija između ćelije i njene okoline, što znači da od njene propustljivosti ili **permeabiliteta** zavisi koje će supstance iz apoplasta ući u unutrašnjost ćelije ili izaći iz nje. Plazmalema ima svojstvo **selektivne propustljivosti**. Druga selektivno propustljiva membrana je **tonoplast** nalazi se oko vakuole koju na taj način odvaja od citoplazme.

**Diferencijalno propustljivim** se zovu one membrane, koje usljed svojih fizičkih i hemijskih svojstava izvjesne supstance propuštaju a izvjesne zadržavaju. Postoje vještačke membrane, kao što je sloj bakarheksacijanoferata (II) i crijevo za dijalizu, koje imaju svojstvo semipermeabilnosti; one imaju pore određene veličine i propustljive su za rastvorene čestice čiji je prečnik manji od prečnika pore.

Po hemijskom sastavu sve membrane imaju izvjesne zajedničke osobine. One sadrže **lipide, proteine i vodu**. Manja količina **ugljenih hidrata** nalazi se u njihovom sastavu. **Lipidi** čine 30-70% suve mase membrana, što zavisi od vrste membrane i njene aktivnosti. U plazmalemi odnos, lipida prema proteinima je 1: 1, dok je udio proteina veći u membranama koje imaju značajne enzimske funkcije. Glavni lipidi ćelijskih membrana su **fosfolipidi, glukolipidi i steroli**. Karakteristično je za molekule lipida je da su **amfipatični** tj. Imaju izrazito polaran karakter, usled toga što jedan kraj molekula nosi hidrofilne a drugi hidrofobne grupe. Hidrofilni kraj ili "glava" molekula čine koru na površini lipidnog dvosloja uz koju je vezan nepokretan sloj vode. Kora sadrži znatan broj negativno naelektrisanih grupa za koje se vezuju katjoni, a među njima dvovalentni Ca ima posban značaj za učvršćivanje i stabilnost membrane. Na hidrofobnom kraju nalaze se ostaci masnih kiselina koje izgledaju kao slobodni kraci različite dužine. Proteini

određuju specifične funkcije membrana. Proteini takođe imaju polarne hidrofilne i nepolarne hidrofobne grupe. Amfipatične osobine ovih molekula su od posebne važnosti jer određuju njihov položaj i orijentaciju u membrani. Svi membranski proteini po obliku su globularni i manje više utopljeni u lipidni matriks membrane. Na osnovu ovih podataka **Singer i Nicholson** su predložili model ćelijske membrane koji je danas generalno prihvaćen. Prema današnjim shvatanjima molekuli proteina su uvijeni na taj način da su hidrofobni djelovi sa svojim apolarnim grupama u centru globule gdje su skriveni od dodira sa vodom. Hidrofilne polarne grupe se nalaze na površini i grade ispupčenja na membrani. Prema tome proteini liče na mozaik u jednoličnom lipidnom sloju, zbog čega se model Singera i Nicholsona zove **tečni mozaični model membrane**.



Molekuli lipida i bjelančevina su u stalnom pokretu. Ali, mogu se kretati samo paralelno sa membranom i ovaj proces se naziva **lateralna difuzija**. Kretanje od jedne do druge strane membrane se naziva **poprečna difuzija** i ona je veoma spor proces. Membrane su **asimetrične**. Prisustvo različitih proteina obrazuje mjesta raspoznavanja – orijentacija membrana. Jedna membrana može da se spoji sa drugom (npr. dvije mitoohondrije mogu da se spoje, dvije vakuole, ali ne mogu da se spoje membrana vakuole i plazmalema).

Uzimajući u obzir izvore energije, kao i specifične učesnike u transportu može se razlikovati u principu, najmanje pet načina pomoću kojih različite supstance prolaze kroz membranu.

- spontani ili pasivni transport
- **aktivni transport**

- **endocitoza** ili transport pomoću membranskih transformacija
- transport **putem razmjene** preko **translokatora**
- transport jona povezan sa aktivnošću **redoks sistema**

Pod **pasivnim transportom** se podrazumjeva kretanje materija koje je izazvano razlikama u koncentraciji na dvijema stranama membrane. Ovo kretanje se obavlja spontano bez ulaganja energije. Pasivan transport ili kretanje čestica u jednom prostoru usled gradijenta u koncentraciji označeno je kao **difuzija**. Posebni vidovi difuzije su **osmoza i imbibicija**. Ove tri pojave imaju velikog značaja za primanje i odavanje vode, gasova i izvjesnih drugih supstanci u biljnim ćelijama.

**Difuzija** je definisana kao neto kretanje čestica iz mjesta sa visokom koncentracijom ka mjestu sa niskom koncentracijom, odnosno to je sposobnost molekula gasova ili tečnosti da se miješaju do izjednačenja koncentracije u određenom prostoru (npr. kristali  $\text{CuSO}_4$  u vodi). Difuzija gasova je znatno brža od difuzije tečnosti, zbog veće kinetičke energije molekula gasa. Za tečnosti difuzija je spor proces i ima značaja samo za transport na mala udaljenja.

**Osmoza** – ako se difuzija odvija između rastvora, ali kroz membranu. U biljnim ćelijama su obično dva rastvora, ili voda i rastvor razdvojeni nekom biomembranom. Kada postoji razlika u vodnom potencijalu na dvijema stranama membrane, voda će difundovati kroz membranu i ta pojava zove se osmoza.

Modeli od vještačkih membrana korisni su za upoznavanje sa osmozom, ali samo djelimično mogu da ilustruju pojave u živoj ćeliji.

## Vještačke diferencijalno propustljive membrane

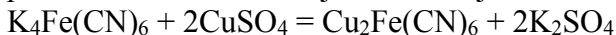
### Zadatak

Proučiti i opisati propustljivost vještačkih membrana, primjeri difuzije i osmoze.

### 1. Membrana od bakar-heksacijanoferata (II)

#### Uvod

Sloj bakar-heksacijanoferata (II) ima svojstvo diferencijalno propustljive membrane, jer propušta vodu, a zadržava u njoj rastvorene soli. Takav sloj obrazuje se na dodirnim površinama rastvora kalijum-heksacijanoferata (II) i bakar-sulfata, prema jednačini:



#### Materijal

- kristali kalijum-heksacijanoferata (II)
- 4% rastvor bakar-sulfata.

#### Tok rada

Sipati u čašu nekoliko ml rastvora  $\text{CuSO}_4$  i ubaciti kristal  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ . Ne pomjerati čašu i posmatrati obrazovanje i rast “vještačke ćelije”.

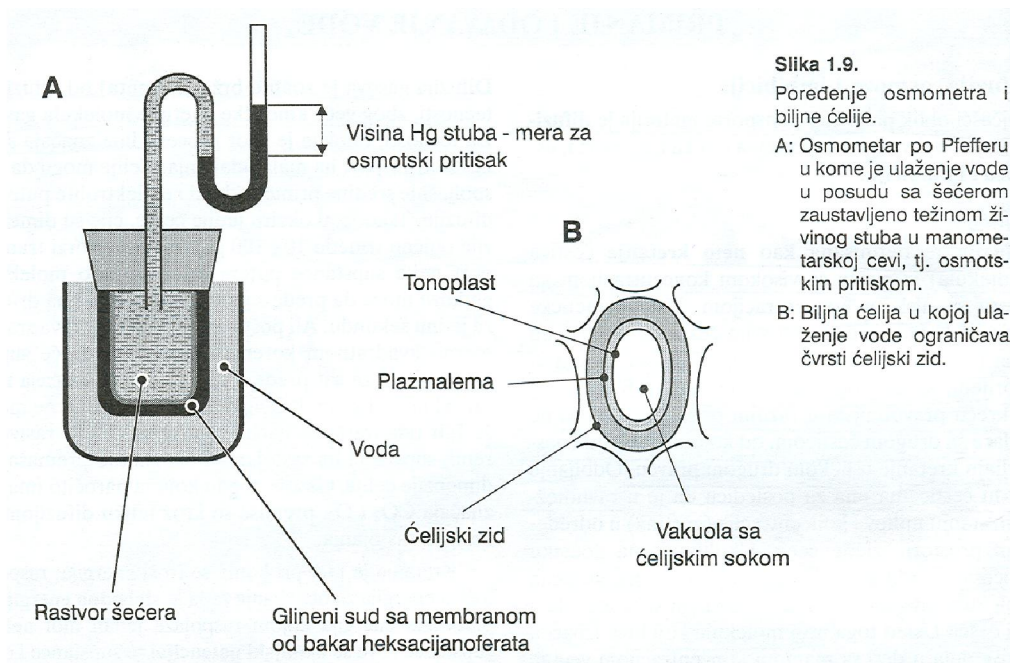
### Očekivani rezultati

Kristal  $K_4Fe(CN)_6$  se rastvara i oko ovog rastvora se obrazuje granični sloj  $Cu_2Fe(CN)_6$ . U početku je rastvor u “ćeliji” više koncentrovan nego što je rastvor  $CuSO_4$ , to jest, potencijal vode u “ćeliji” je niži, pa stoga voda ulazi u “ćeliju” usljed osmoze. “Ćelija” puca i njen sadržaj se izliva napolje, ali se odmah na površini izgradi novi sloj  $Cu_2Fe(CN)_6$ . Proces rastenja osmotske “ćelije” će trajati sve dok se osmotski potencijali rastvora sa obje strane membrane približno ne izjednače.

## 2. Osmometar

### Uvod

Kao model za demonstraciju osmoze koja se odvija u prirodnim biljnim ćelijama, često se koristi Pfefferova ćelija ili osmometar. Osmometar se sastoji od dvije posude uronjene jedna u drugu, čiji sadržaji mogu da komuniciraju kroz semipermeabilnu membranu (u originalnoj Pfefferovoj ćeliji to je bila membrana od bakar-heksacijanoferata II u porama glinene posude). Ako se u jednoj posudi nalazi rastvor šećera a u drugoj čista voda, dolazi do difuzije vode kroz mebranu u rastvor šećera, to jest, do osmoze. Zapremina rastvora se povećava, ali pošto je posuda nerastegljiva, rastvor se penje u kapilaru koja je na vrhu posude. U kapilari se uočava promjena zapremine.



Slika 1.9.

Poređenje osmometra i biljne ćelije.

A: Osmometar po Pfefferu u kome je ulaženje vode u posudu sa šećerom zaustavljeno težinom živinog stuba u manometarskoj cevi, tj. osmotskim pritiskom.

B: Biljna ćelija u kojoj ulaženje vode ograničava čvrsti ćelijski zid.

### Materijal

- cilindar (staklena cijev)
- čaša
- gumeni čep (sa otvorom)
- kapilara
- stativ

- životinjsko crijevo (mjehur) ili parče celofana
- konac
- 0,6 M saharoza uz dodatak boje; dest. voda

### **Tok rada**

Na jednom kraju cilindra vezati celofan; usuti rastvor saharoze; na drugi kraj staviti čep sa kapilarom. Cilindar uroniti u čašu sa vodom. Obilježiti početni nivo rastvora saharoze u kapilari. Posmatrati promjene nivoa tečnosti u kapilari.

### **Očekivani rezultati**

Osmotskim putem voda će prodrijeti u cilindar sa rtvorom šećera, u pravcu smanjenog potencijala vode. Zapremina rastvora u cilindru će se povećavati sve dok hidrostatski protivpritisak vodenog stuba u cilindru iznad nivoa vode, ne bude jednak osmotskom pritisku.

## **PROPUSTLJIVOST CITOPLAZMATIČNIH MEMBRANA**

### **Vježba br. 2. Permeabilitet živih i mrtvih ćelija**

#### **Uvod**

Citoplazma biljne ćelije je ograničena sa spoljašnje strane **plazmalemom**, a od vakuole je odvojena **tonoplastom**. Ove dvije membrane regulišu razmjenu materija između ćelije i spoljašnje sredine, odnosno između citoplazme i vakuole.

Propustljivost ovih membrana zavisi od mnogih činilaca. Pošto su proteini i lipidi glavni sastojci ovih membrana, svi činioci koji remete strukturu proteina ili kompaktnost lipidnog sloja, smanjuju ili sasvim ukidaju selektivnu propustljivost membrana tako da one više ne sprječavaju izlaženje raznih jedinjenja iz ćelije.

Mnoge biljne ćelije sadrže u vakuolama pigmente antocijanin ili betacijanin, za koje su tonoplast i plazmalema nepropustljivi. Ako se ove membrane oštete, ili se ćelije ubiju, pigmenti ističu iz tkiva u okolnu vodu. Koncentracija pigmenta u vodi mjera je za oštećenost membrana.

#### **Zadatak**

Utvrditi faktore koji utiču na propustljivost membrana ćelija cvekle.

#### **Materijal**

- korjen cvekle (35 kockica + 5 zamrznutih kockica)
- voda zagrijana na 40 – 70 °C
- sirćetna kiselina
- organski rastvarač (hloroform, metanol, aceton ili benzol)
- gaza i konac (8 kompleta), nož
- 8 epruveta

#### **Tok rada**

- iz korjena cvekle izrezati kocke stranice 5 mm. Isprati pod česmom
- napraviti 7 kesica od gaze zavezanih dugačkim koncem, sa po 5 kockica cvekle u svakoj kesici
- isprati kesice sa parčićima cvekle tekućom vodom od pigmenta betacijanina, koji je iscurio iz povrijeđenih ćelija
- držeći za konac, uroniti kesicu sa odsječcima u vodeno kupatilo zagrijano na 40 °C i držati tačno 1 minut
- izvaditi kesicu i uroniti je u epruvetu sa 5 ml destilovane vode. Zabilježiti vrijeme
- ponoviti postupak sa temperaturom od 50, 60 i 70 °C
- jednu kesicu direktno uroniti u 5 ml destilovane vode, bez prethodnog izlaganja povišenoj temperaturi (kontrola)

- preostale dvije kesice uroniti, jednu u 5 ml organskog rastvarača, a drugu u 5ml sirćetne kiseline
- iz cvekle koja je bila preko noći zamrznuta napraviti 5 kockica, staviti u kesicu i spustiti u epruvetu sa destilovanom vodom. U ovom slučaju ispiranje vodom pred potapanje vršiti veoma kratko
- u svih 8 slučajeva, 30 minuta nakon potapanja, izvaditi kesice sa odsječcima cvekle i arbitrarno odrediti obojenost rastvora u epruveti (Količina pigmenta koja je iscurila može se precizno odrediti mjerenjem apsorbancije pomoću kolorimetra, na talasnoj dužini 525 nm. Apsorbancija se mjeri u odnosu na vodu ili odgovarajući rastvarač)

### Očekivani rezultati

Količina pigmenta koja je iscurila iz tkiva srazmjerna je broju oštećenih ćelija. Povišena temperatura dovodi do denaturacije proteina, a organski rastvarači rastvaraju lipidnu komponentu membrane, pa u oba slučaja membrane »cure«. Iz ćelija koje su ubijene zamrzavanjem i na druge načine, pigment takođe brzo izlazi.

## Vježba br. 3. Permeabilitet ćelija za slabe i jake kiseline i baze

### Uvod

Promjena boje antocijanina u zavisnosti od koncentracije vodonikovih jona (pH) omogućava lako praćenje prodiranje kiselina, odnosno baza u vakuole onih ćelija koje sadrže antocijanin.

**Potkiseljavanje** sredine preobraća plavi antocijanin u crveni i obratno, **alkalizacija** sredine preobraća crveni antocijanin u plavi.

Istovremeno, više disosovane supstance (**jake kiseline i jake baze**) teže prolaze kroz ćelijske membrane nego one koje slabije disosuju (**slabe kiseline i baze**).

### Zadatak

Utvrditi vrijeme prodiranja  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$  i  $\text{KOH}$  kroz tonoplast.

### Materijal

- epidermis luka *Allium cepa*
- sahatno staklo (6kom)
- 0,05 N  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- 0,05 N  $\text{HCl}$
- 0,05 N  $\text{NH}_4\text{OH}$
- 0,05 N  $\text{KOH}$
- destilovana voda

- štoperica

**Tok rada**

- odvojiti epidermis luka i isjeći ga na 10 komadića veličine  $5 \text{ mm}^2$  i staviti ih u destilovanu vodu u sahatnom staklu
- u preostala sahatna stakla staviti jednake zapremine rastvora  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{HCl}$ ; ispod svakog sahatnog stakla staviti bijeli papir sa oznakom rastvora koji se u njemu nalazi
- u sahatna stakla sa  $\text{NH}_4\text{OH}$  i  $\text{KOH}$  staviti po 4 komada epidermisa i zabilježiti vrijeme postavljanja
- preostala 2 komada epidermisa ostaviti u sahatnom staklu sa destilovanom vodom kao kontrolu
- odrediti vrijeme koje je potrebno da presjeci u oba rastvora poplave
- pošto su površinski presjeci epidermisa u  $\text{NH}_4\text{OH}$  poplavili, treba ih brzo izvaditi, oprati u destilovanoj vodi i po dva komada staviti u sahatna stakla sa  $\text{CH}_3\text{COOH}$  i  $\text{HCl}$  i zabilježiti vrijeme
- odrediti vrijeme potrebno da presjeci pocrvene

**Očekivani rezultati**

Iako su rastvori iste koncentracije (0,05 N), rezultat ogleda treba da pokaže da presjeci brže poplave u  $\text{NH}_4\text{OH}$  nego u  $\text{KOH}$ , odnosno da brže pocrvene u  $\text{CH}_3\text{COOH}$  nego u  $\text{HCl}$ .

**Vježba br.4.****PLAZMOLIZA**

Plazmalema i druge celijske membrane su veoma propustljive za vodu, tako da voda veoma brzo ulazi u celiju i izlazi iz nje.

Kada se celije nadju u hipertoničnoj sredini, koja sadrži veću koncentraciju osmotskih aktivnih celija, pa ima nizi potencijal vode, nego rastvor u vakuoli, onda voda iz vacuole difunduje kroz membrane napolje u spoljašnji rastvor. Usljed toga zapremina vakuole se smanjuje i cio protoplast se skuplja i zauzima samo dio prostora koji je obuhvaćen celijskim zidom. Ova pojava se naziva PLAZMOLIZA. Prostor između celijskog zida i plazmoliziranog protoplasta ispunjava plazmolitikum, rastvor pomoću koga je izazvana plazmoliza.

Plazmoliza je reverzibilna pojava. Kada se plazmolizirane celije stave u vodu ili hipotoničan rastvor, voda se vraća u vakuolu, usljed čega se protoplast ponovo širi i na kraju nalegne na celijski zid. Ova pojava se zove DEPLAZMOLIZA.

**POSMATRANJE TOKA PLAZMOLIZE I DEPLAZMOLIZE**Materijal

- epidermis crnog luka *Allium cepa* L.
- 1M saharoza
- predmetna i pokrovnna stakla
- filter papir, zilet

Nacin rada

- isjeci dio epidermisa crnog luka, čije celije sadrže antocijanin
- staviti ih u vodu, pa predmetno staklo i pokriti pokrovnim staklom
- izabrati vidno polje koje sadrži veći broj celija sa crvenim celijskim sokom
- nacrtati seriju celija u svim fazama plazmolize
- sa jedne strane pokrovnog stakla izvlaciti vodu a sa druge dodati saharozu
- posmatrati i nacrtati plazmolizirane celije
- kada završi plazmoliza, zamijeniti rastvor saharoze vodom
- posmatrati deplazmolizu
- nacrtati seriju crteža u svim fazama deplazmolize

**Ocekivani rezultati**

- u toku približno pola sata sve žive celije u jednom tkivu mogu plazmolizirati i zatim se vratiti u normalno stanje

## **Vježba br. 5. Određivanje osmotskog potencijala ćelijskog soka metodom plazmolize**

### **Uvod**

Ćelijski sok predstavlja vodeni rastvor različitih organskih i neorganskih materija. Osmotski potencijal ( $\psi_{\pi}$ ) ćelijskog soka zavisi od broja čestica koje se nalaze u tom rastvoru tj. od koncentracije i stepena disocijacije rastvorenih molekula

Određivanje osmotskog potencijala u ćelijama pomoću plazmolize zasniva se na sledećem principu:

- što je manji osmotski potencijal spoljašnjeg rastvora od osmotskog potencijala ćelijskog soka, to se jače odvaja protoplast od ćelijskog zida i obratno, što je njegovo odvajanje manje, s tim je manja razlika između ovih parametara
- ako je koncentracija spoljašnjeg rastvora pri kojoj se odvajanje protoplasta od ćelijskog zida jedva zapaža (ugaona plazmoliza) u tom slučaju se može smatrati da je koncentracija tog rastvora skoro ista sa koncentracijom ćelijskog soka----takav rastvor se naziva **izotoničan**

Smanjenjem osmotskog potencijala ćelijskog soka pri suši ukazuje na obezvodnjenost biljaka, a time i na neophodnost za zalivanjem. Zahvaljujući tome ovaj pokazatelj može da posluži za određivanje momenta navodnjavanja.

### **Zadatak**

Izmjeriti osmotski potencijal ćelijskog soka plazmolitičkim metodom.

### **Materijal**

- epidermis luka *Allium cepa* L.
- 1 mol/l saharoza
- 7 posuda
- predmetna i pokrovna stakla
- mikroskop

### **Tok rada**

- pripremiti seriju rastvora saharoze 0,1-0,7 mol/l, korišćenjem 1 mol/l rastvora saharoze i destilovane vode; po 10ml rastvora staviti u određene posude
- u intervalu od po 3 minuta staviti po 3 parčića epidermisa luka u ove rastvore
- radi sprečavanja isparavanja posude sa preparatom treba poklopiti
- posjeje 30-40 minuta stajanja u rastvoru preparati se posmatraju pod mikroskopom, i to u kapi rastvora u kome se nalazio preparat
- mikroskopskim posmatranjem odrediti stepen plazmolize ćelija u svakom rastvoru

| Konc. sah.<br>(mol/l) | Na 10 ml rastvora<br>1mol/l sah<br>(ml) | voda<br>(ml) | Vrijeme<br>potapanja | Vrijeme<br>vađenja | Plazmolizirane<br>ćelije<br>(%) | Konc. sah pri<br>kojoj<br>plazmolizira<br>50% ćelija |
|-----------------------|-----------------------------------------|--------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------|
| 0,2                   | 2                                       | 8            |                      |                    |                                 |                                                      |
| 0,3                   | 3                                       | 7            |                      |                    |                                 |                                                      |
| 0,4                   | 4                                       | 6            |                      |                    |                                 |                                                      |
| 0,5                   | 5                                       | 5            |                      |                    |                                 |                                                      |
| 0,6                   | 6                                       | 4            |                      |                    |                                 |                                                      |
| 0,7                   | 7                                       | 3            |                      |                    |                                 |                                                      |
| 1                     | 10                                      | 0            |                      |                    |                                 |                                                      |

### Očekivani rezultati

- koncentracija onog rastvora u kojem se u oko 50% ćelija primjećuje uglovna plazmoliza ima približno istu osmotsku vrijednost kao i ćelijski sok, pa time i isti osmotski potencijal
- pošto traženi rastvor ne mora biti ni jedan od upotrebljenih, već se može nalaziti negdje između njih, pravu vrijednost treba pročitati iz grafikona, na sledeći način:
  - na apscisu treba nanijeti koncentracije upotrebljenih rastvora, a na ordinatu procenat plazmoliziranih ćelija
  - unijeti eksperimentalne podatke i nacrtati dobijenu eksperimentalnu krivu
  - od tačke na ordinati koja predstavlja 50% plazmoliziranih ćelija, povući paralelnu liniju sa apscisom
  - iz presjeka ove prave sa dobijenom eksperimentalnom krivom povući paralelnu liniju sa ordinatom koja će na apscisi pokazati koncentraciju rastvora koji izaziva 50% plazmolize

Izračunavanje:

- veličina osmotskog potencijala se izračunava po formuli

$$\psi_{\pi} = - R T C i$$

**R** - gasna konstanta **8,314 kPa dm<sup>3</sup> K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>**

**T** - apsolutna temperatura sredine u kojoj se izvodi eksperiment

**(K)**(273,15 + temp.u °C)

**C** – koncentracija rastvora u **mol/dm<sup>3</sup>**

**i** – Van t Hoffov koeficijent čija je vrijednost za neelektrolite (saharozu)=1, a za elektrolite (soli NaCl, KCl)=1,5

## ***Vježba br 6. Određivanje vodnog potencijala biljnog tkiva metodom isječka***

### **Uvod**

Količina vode koju ćelija može da primi iz spoljašnje sredine zavisi od potencijala vode. Hemijski potencijal zove se još i vodni potencijal i obilježava se sa  $\psi_w$ . Da bi se voda kretala sa jednog mjesta na drugo, mora da postoji između tih mjesta razlika u hemijskom potencijalu ( $\Delta\psi$ ). Po usvojenoj konvenciji, kod čiste vode  $\psi = 0$ . Kada se čista voda izloži pritisku ili visokoj temperaturi, vodni potencijal se povećava, tj. postaje pozitivan. Rastvaranje neke supstance u vodi smanjuje potencijal vode; vodni potencijal u određenoj zapremini rastvora uvijek je manji od potencijala čiste vode. On je prema tome negativan, manji od nule i ima negativnu vrijednost ( $\psi < 0$ ), koja je srazmjerna količini rastvorene supstance.

Vodni potencijal predstavlja razliku između hemijskog potencijala vode u celiji ( $\mu$ ) i hemijskog potencijala čiste vode ( $\mu_0$ ) stavljene u odnos prema parcijalnoj zapremini vode u ćeliji ( $V$ ), i može se predstaviti sledećom jednačinom:

$$\psi_w (S) = \mu - \mu^0 / V \quad (J/cm^3 \quad Pa)$$

Vodnim potencijalom karakteriše se usisavajuća sila biljnog tkiva, i može da ukaže na pojavu vodnog deficita u biljkama kao i pravovremeno određivanje momenta zalivanja.

Cjelokupni  $\psi (S)$  u biljnoj ćeliji **zavisi od** djelovanja sila raznog porijekla:

- sila bubrenja i kapilarnosti (**potencijal matriksa  $\psi_\tau$** )
- **hidrostatičkog pritiska ( $\psi_P$ )**
- sile koje potiču od rastvorenih jedinjenja – **osmotski potencijal ( $\psi_\pi$ )**
- **potencijal matriksa –  $\psi_\tau$**  - ograničen je na ćelijski zid i citoplazmu, a javlja se kao posljedica vezivanja molekula vode usljed kapilarnih i adsorpcionih sila i hidratacije ( kapilarne pojave u ćelijskom zidu uslovljene su stvaranjem celuloznih mikrokanala u kojima se voda kreće uz pomoć površinskog napona, dok se voda u citoplazmi apsorbira na različite makromolekule i koloide)
- **hidrostatički pritisak –  $\psi_P$**  - kada se ćelije nađu u vodi—usljed dobre propustljivosti protoplazme za vodu a nepropustljivosti za materije rastvorene u ćelijskom soku---usvajaju vodu iz okolne sredine i ćelijski sok uvećava svoju zapreminu---protoplazma se rasteže i predaje svoj pritisak ćelijskoj membrani---takođe i **ćelijski zid vrši pritisak na protoplazmu**-----taj hidrostatički pritisak se naziva **turgorov pritisak** – postaje sve veći ulaskom vode u ćeliju i djeluje na dalje osmotsko usvajanje vode kroz plazmalemu
- **osmotski potencijal -  $\psi_\pi$**  - je određen koncentracijom osmotski aktivne supstance u vakuoli i jednak je osmotskom pritisku vakuolarnog soka, ali ima negativnu vrijednost ( $\psi_\pi = -RTC_i$ )

$$\psi_w = \psi_\pi + \psi_P + \psi_\tau \quad \psi_\tau \text{ teži nuli, pa je } \psi_w = \psi_\pi + \psi_P$$

(-)    (-)    (+)

Treba voditi računa da  $\psi_w$  i  $\psi_\pi$  imaju negativne vrijednosti jer je po definiciji potencijal čiste vode jednak nuli. Sa druge strane,  $\psi_P$  je suprotnog znaka, dakle pozitivna veličina, jer predstavlja silu kojom se ćelijski zid suprotstavlja povećanju zapremine biljne ćelije. Zbog prisustva osmotskog potencijala voda će ulaziti iz hipotonične sredine sve dok to dopušta rastegljivost ćelijskog zida. Ćelija će biti u ravnoteži sa spoljašnjom sredinom kada je  $\psi_\pi = \psi_P$  i nema više promjene zapremine ćelije.

Potencijal vode može se mjeriti promjenom volumena ili svježe mase biljnog tkiva, pošto se ona stave u rastvore različitih koncentracija. Kada su u pitanju rastvori, potencijal pritiska ne postoji, pa je njihov osmotski potencijal jednak potencijalu vode, a oba zavise od koncentracije rastvorene supstance.

Kada se tkivo stavi u rastvor čiji je potencijal vode viši (hipotoničan rastvor), onda će voda ulaziti u tkivo i ono će povećavati svoju zapreminu i svježu masu. Ako je tkivo u rastvoru sa nižim potencijalom vode (hipertoničan rastvor) ono će gubiti vodu i njegova zapremina i svježa masa tkiva će se smanjivati. Do promjene neće doći u rastvoru čiji je potencijal vode jednak potencijalu vode tkiva.-----znajući potencijal vode tj. osmotski potencijal tog rastvora, znamo i potencijal vode tkiva.

### **Zadatak**

Izmjeriti potencijal vode biljnog tkiva metodom isječka.

### **Materijal**

- krtola krompira
- 1 mol/l saharoza
- bušač
- 7 posuda

### **Tok rada**

- pripremiti seriju rastvora saharoze korišćenjem 1 mol/l saharoza i dest. Vodu; po 10 ml rastvora staviti u odgovarajuće posude
- bušačem izvaditi iz krtole krompira cilindre i žiletim praviti tanke presjeke
- izmjeriti im prečnike i po 3-5 staviti u već pripremljene rastvore
- sve treba raditi vrlo brzo, da bi se spriječilo isparavanje vode sa presječenih površina
- poslije 40-60 minuta ponovo mjeriti prečnike diskova

Tabela 1. Prikaz rezultata pri određivanju vodnog potencijala biljnog tkiva

| Konc. sah.<br>(mol/l) | Na 10 ml rastvora  |              | Prečnik diska u mm            |         | Konc. pri kojoj<br>se prečnik nije<br>izmijenio (mol/l) |
|-----------------------|--------------------|--------------|-------------------------------|---------|---------------------------------------------------------|
|                       | 1mol/l sah<br>(ml) | voda<br>(ml) | prije<br>stavljanja u rastvor | poslije |                                                         |
| 1                     | 10                 | 0            |                               |         |                                                         |
| 0,7                   | 7                  | 3            |                               |         |                                                         |
| 0,6                   | 6                  | 4            |                               |         |                                                         |
| 0,5                   | 5                  | 5            |                               |         |                                                         |
| 0,4                   | 4                  | 6            |                               |         |                                                         |
| 0,3                   | 3                  | 7            |                               |         |                                                         |
| 0,2                   | 2                  | 8            |                               |         |                                                         |

**Očekivani rezultati**

- rezultate mjerenja promjene prečnika diska predstaviti grafički (na apscisu koncentracija saharoze a na ordinatu srednji prirast)
- u rastvorima nižih koncentracija zapremina tkiva će se povećavati, a u rastvorima većih koncentracija smanjivati
- rastvor u kome se prečnik diska nije promijenim ima jednak potencijal vode sa tkivom i računa se po formuli:

$$\psi_w = \psi_\pi = - R T C i$$

## Vježba br. 7

### Vodni režim biljaka

#### a) Odredjivanje % vode i suve materije biljaka

Sušenjem biljne mase voda ispari, a zaostaje suva supstanca koja se sastoji iz organskih i neorganskih jedinjenja. Odnos vode i suve supstance je različit za razne biljne vrste, kao i za razne organe iste biljne vrste, za istu biljku u raznim ekološkim uslovima, u raznim fazama razvića, itd. Jako mnogo vode imaju sočni plodovi, vodene alge i listovi, a manje drvo i sjemenje.

Materijal:

- biljni materijal (spanać, blitva, kopriva)
- termostat,
- vaga,
- posude,
- eksikator,
- vlagomjer,
- laboratorijska kliješta.

Tok rada:

Izmjeri se masa posude (c); zatim masa posude + biljni materijal (d) - 5 (10)g. Posuda sa materijalom se stavi u termostat na 105° C radi isušenja (T ne smije da prele 120° C jer bi u tom slučaju došlo do sagorijevanja suve materije).

Biljni materijal se isušuje dok ne prestane gubiti na masi, što znači da je sva voda isparila. Materijal se povremeno vaga radi provjere mase.

Ako nekoliko uzastopnih mjerenja pokaže istu masu, materijal je sasvim isušen. Pošto je vruću posudu sa materijalom nezgodno mjeriti, a ako je hladimo na vazduhu materijal će upiti vlagu iz vazduha, moramo je staviti u eksikator ( sa kalcijum hloridom, silica gelom ili tehničkom sumpornom kis. Koji upijaju vodu) dok se ne ohladi nakon čega se osušeni materijal izvaga

$$\% \text{H}_2\text{O} = \frac{a \times 100}{p}$$

a - razlika između mase posude prije i poslije sušenja

p - odmjereni količina uzorka

Ako radimo sa vlagomjerom (aparatus za mjerenje % H<sub>2</sub>O) - da se masa stabilizovala vidimo po tome što se kazaljka umirila. Materijal ne treba opet vagati jer se % H<sub>2</sub>O očitava sa skale (na primjer: izvagali smo 10 g biljnog materijala; ako vlagomjer pokaže 25 % vlage ⇒ 2,5g vode; 7,5 g (75%) je ostalo, org. i neorg. materije).

## b) Određjivanje % mineralnih materija

Pod pojmom mineralne materije podrazumijeva se dio koji ostaje poslije razaranja organskih materija na višim T (u žarnim pećima na 450-850<sup>0</sup> C). Naime, organske materije sagorijevaju u vidu gasova: CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, a ostaju nesagorivi minerali koji se nazivaju pepeo.

Materijal:

- biljni materijal ( koristiti vazdušno suvi materijal - duvan)
- žarna peć,
- vaga,
- eksikator,
- laboratorijska kliješta,
- posude,
- amonijum nitrat ili alkohol

Način rada:

U prethodno žarenu, zatim u eksikatoru ohladjenu i izmjerenu šoljicu izmjeriti na analitičkoj vagi 2-5 gr biljnog materijala ( vazdušno suv bilj.mat. , a ako to nije treba ga sagorjevati na rešou do ugljenisanja).

Staviti u žarnu peć na 450-850 C dok se ne dobije bijeli pepeo (u zavisnosti od materijala, taj proces traje od 60-90 minuta). Ako pepeo poslije ovoga sadrži crne tačkice, koje potiču od nesagorelih organskih materija, onda se šolja vadi iz peći, stavlja u eksikator radi hladjenja, a nakon toga joj se dodaje nekoliko kristala amonijum nitrata ili nekoliko kapi alkohola. Dužina trajanja hladjenja zavisi od broja šoljica u eksikatoru. Mjerenje vršimo brzo, najduže za 1 minut jer je pepeo higroskopan. Razlika u masi šoljice prije i poslije žarenja predstavlja količinu pepela. Sadržaj pepela se uvijek obračunava na suhu materiju.

- masa prazne šolje (c)
- masa šolje sa uzorkom (d)
- izmjerena supstanca (p);  $p = d - c$
- masa šolje + pepeo (poslije žarenja) - (e)
- masa pepela (a) =  $e - c$

---


$$\% \text{ pepela} = \frac{a \times 100}{p}$$

## c) Određjivanje organske materije

Pod pojmom organske materije podrazumijevamo sadržaj svih organskih jedinjenja u biljnoj materiji. Izračunava se u % od apsolutno suve materije.

$$\% \text{ org. mater.} = 100 - \% \text{ pepela}$$

↙  
↘  
apsolutno suva materija

u apsolutno suvoj materiji

$$\% \text{ higroskopne vlage} = 10\%$$

$$\Rightarrow \% \text{ pepela u aps. suvoj supst.} = \frac{\% \text{ pepela u vazd. suvoj supst.} \times 100}{100 - \% \text{ hig.vl.}}$$

## Vježba br.8. Dokazivanje K, P, Mg, Ca i Fe u pepelu

### Postupak:

Uzeti 2-3g pepela duvana i rastvoriti ga u 1-5% HCl (pepela trba uzeti toliko da njegova zapremina u menzuri bude 4 puta manja od zapremine rastvora tj. u odnosu 1:4)

Ovako dobijeni rastvor lagano promućkati i profiltrirati preko filter papira.

Dobijeni filtrat služi za dokazivanje K, P, Mg, Ca i Fe – na čisto i suvo predmetno staklo nanese staklenim štapićem kap ispitivanog rastvora (filtrata pepela) i kap odgovarajućeg reagensa. Zatim se te dvije kapi pažljivo spoje staklenim štapićem, a smiješane kapljice poklope pokrovnim stakalcetom. Poslije nekoliko minuta (oko 2-3) posmatrati kristale pod mikroskopom. (nacrtati ih).

#### a. Dokazivanje K

Kao reagens koristi se 15% perhlorna kiselina ( $\text{HClO}_4$ )

Kao rezultat djelovanja reagensa sa kalijum-hloridom iz pepela pojaviće se bezbojni kristali kalijum-perhlorata ( $\text{KClO}_4$ ), najčešće u obliku oktaedra

#### b. Dokazivanje Ca

Kao reagens koristi 1% sumporna kiselina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

Kao rezultat reakcije soli Ca ( $\text{CaCl}_2$ ) i sumporne kiseline najčešće se pojavljuju karakteristični igličasti kristali gipsa ( $\text{CaSO}_4$ ), sniježno bijele boje.

#### c. Dokazivanje Mg

Reagens je amonijum –hidroksid ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) i natrijum fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

Ako je u pepelu prisutan Mg pojavit će se kristali amonijum-magnezijum fosfata ( $\text{NH}_4\text{MgPO}_4$ ) – u obliku pahuljice.

#### d. Dokazivanje P

Reagens je 1% amonijum-molibdat rastvoren u 1% azotnoj kiselini

Postupak je isti kao u prethodnim slučajevima, samo što se pažljivim zagrijavanjem predmetnog stakla može ubrzati kristalizacija. Kristali su obično oblika kocke ili oktaedra. (amonijum-fosfo-molibdat)

#### e. Dokazivanje Fe

U 5 kapi filtrata dodati 3 kapi kalijum-rodanida ( $\text{KSCN}$ )

Formirana crvena boja je indikator prisustva Fe u pepelu.

**Vježba br.9.****SAHARAZA****Dobijanje saharaze**

Saharaza ili invertaza je enzim koji razlaže saharozu na glukozu i fruktozu. Može se lako dobiti iz kvasca.

Oko 5g kvasca se izmacerira sa malo kvarcnog pjeska, prelije sa 15-20ml destilovane vode zagrijanje na 40°C i ostavi da ostoji 30 minuta, nakon čega se filtrira. Ako je filtrat mutan, filtrira se ponovo dok se tečnost ne izbistri. U filtratu se nalazi enzim saharaza, koji se upotrebljava za sledeće oglede.

**Dejstvo saharaze na saharozu**

U dvije epruvete staviti po 10ml 20% rastvora saharoze, zatim u prvu dodati 1ml prokuvanog ekstrakta saharaze, a u drugu istu količinu ne prokuvanog ekstrakta. Obadvije epruvete držati 30min u vodenom kupatilu na 40°C. Sa sadržajem obadvije epruvete izvršiti Feling-ovu reakciju. Pozitivan rezultat u epruveti br.2. tj. u epruveti u kojoj se nalazi aktivan enzim, ukazuje da je došlo do razlaganja saharoze i da su se pojavili monosaharidi.

**Uticaj temperature i reakcije sredine na dejstvo saharaze**

U 6 epruveta se stavi po 10ml 20% rastvora saharoze. U epruvete 1,2,3, dodati 4ml dest.vode; u epruvetu 4. 3ml dest.vode i 1ml 1,5% sirćetne kiseline; u epruvetu br.5. 4ml 1,5% sirćetne kiseline, a u epruvetu 6. 4ml 0,1N NaOH- tako da se u svim epruvetama finalno dobije 14ml rastvora. Zatim se epruvete stave u vodeno kupatilo na 40C, izuzev epruvete br.1 koja se ostavi na sobnoj temperaturi.

U sve epruvete se istovremeno stavi po 1ml ekstrakta saharaze, izuzev u epruvetu br.2 u koju se u isto vrijeme stavlja 1ml prethodno prokuvanog ekstrakta. U vodenom kupatilu epruvete ostaju 30min, posle čega se stavlja u hladnu vodu da bi se zadržalo dalje razlaganje.

Epruveta br.1 se od epruvete 3 razlikuje samo po temperaturi, pa se poredjenjem razlaganja saharoze u ovim epruvetama može zaključiti o dejstvu temperature na taj proces. S druge strane poredjenjem epruveta 3,4,5 i 6 koje medjusobno razlikuju po kiselosti sredine, može se zaključiti kako pH utiče na aktivnost enzima.

Aktivnost enzima mjeri se na sledeći način: u 6 numerisanih epruveta stavlja se 4ml Feling-ovog reagensa i 4ml dest.vode, zagrijeva se do ključanja, pa se pipetom dodaje kap po kap rastvora koji se ispituje. Kapi se u svakoj probi broje do momenta kad Feling-ov rastvor od jedne kapi počinje da menja boju. Aktivnost enzima je obrnuto srazmjerna broju kapi koji je potreban da dodje do promjene boje Feling-ovog rastvora.

## Vježba br.10. **Odredjivanje lisne površine**

**Razlikujemo nekoliko metoda za odredjivanje lisne površine:**

- **metod lisnih parametara**
- **metod kontura lista na hartiji**
- **metod kružnih isječaka lista**
- **metod odnosa površine i mase cijelog lista**
- **metod polarnog planimetra**
- **metod milimetarske kordinativne mreže**

### ♦ **Metod kontura lista na hartiji**

**Pribor i materijal:** analitička vaga, hartija, makaze, olovka, listovi biljaka.

Za odredjivanje lisne površine ovom metodom koristi se obična pisaća hartija, pravilnog pravougaonog ili kvadratnog oblika. Najprije se izmjeri dužina i širina hartije i izračuna površina(**P**) a zatim odredi njena masa na analitičkoj vagi(**G**).Potom se skine list sa biljke , stavi na hartiju I olovkom ocrtavaju po ivici njegove konture. Ograničena površina lista na hartiji se isječe pomoću makaza i odredi njena masa (**G<sub>1</sub>**).Pošto su vrijednosti P, G i G<sub>1</sub> poznate, onda se može ozračunati nepoznata površina lista (**P<sub>1</sub>**) po obrascu:

$$\frac{P}{P_1} = \frac{G}{G_1} \quad \text{odakle je: } P_1 = \frac{G_1 * P}{G}$$

### ♦ **Metod kružnih isječaka iz lista**

**Pribor i materijal:** metalni prstenovi, analitička vaga, listovi biljaka

Ovaj metod lisne površine sa posebno preporučuje kod listova sa naboranom površinom i nepravilnim oblikom, kao na primjer kod šećerne repe, vinove loze, suncokreta, i dr. Prvo se izmjeri masa cijelog lista (**G**), a zatim se pomoću metalnog prstena, poznatog prečnika uzima što je moguće veći broj isječaka i odredi njihova masa(**G<sub>1</sub>**). Na osnovu broja isječaka i prečnika izračuna se njihova ukupna površina (**P<sub>1</sub>**), a potom pristupa izračunavanju površine lista(**P**).

Ako se kao i u slučaju kod metode kontura lista na listu hartije, uzme da je odnos **G:G<sub>1</sub>** isti kao i **P:P<sub>1</sub>** tada se pomoću obrasca:

$$P = \frac{G * P_1}{G_1} \text{ , može izračunati površina lista}$$

### ♦ Metod milimetarske kordinatne mreže

**Pribor i materijal:** milimetarska hartija, olovka, hartija za pisanje, listovi biljaka

List čiju površinu želimo da odredimo sa stavlja i pričvrsti na milimetarsku mrežu koja je izdijeljena horizontalnim i vertikalnim pojasevima. Zatim se određuje prekrivena površina tako što se očitavaju vrijednosti gornje i donje ivice po pojasevima na mjestu presjeka i vrijednosti zapisuju u odgovarajuću tabelu, posle čega se vrši izračunavanje.

Izračunavanje :

Ako se početak lijeve strane milimetarske mreže koju prekriva list označi simbolom  $A_0$  a kraj ivice na desnoj strani simbolom  $A_n$  i širina pojasa sa  $V$ , onda se površina lista ( $P$ ) može izračunati po sledećem obrascu:

$$P = V \left( \frac{A_0 + A_n}{2} + A_1 + \dots + A_{n-1} \right)$$

Treba imati u vidu da je formula utoliko tačnija ukoliko je širina pojaseva manja. Kod listova sa većom površinom, na primjer , šećerne repe, iznosi 10mm, a za manje listove kod trava 5mm.

Ova metoda spada u grupu nedestruktivnih metoda, ekonomična je dosta tačna ali relativno spora. Najbolje je da rad obavljaju dva lica: jedno lice očitava i diktira vrijednosti , a drugo zapisuje vrijednosti u odgovarajuću tabelu.

Primjer:

| Pojasevi | Gornja ivica | Donja ivica | Razlika |
|----------|--------------|-------------|---------|
| 0        | 85           | 75          | 10      |
| 1        | 142          | 52          | 90      |
| 2        | 169          | 42          | 127     |
| 3        | 192          | 25          | 167     |
| 4        | 219          | 22          | 197     |
| 5        | 232          | 27          | 205     |
| 6        | 243          | 38          | 205     |
| 7        | 250          | 30          | 220     |
| 8        | 250          | 28          | 222     |
| 9        | 242          | 37          | 205     |
| 10       | 238          | 26          | 212     |
| 11       | 241          | 22          | 219     |
| 12       | 236          | 22          | 214     |
| 13       | 215          | 27          | 188     |
| 14       | 189          | 36          | 153     |
| 15       | 161          | 45          | 116     |