Deci, în cele ce urmează, voi expune pe larg principalele metode de analiză cu aplicabilitate la evaluarea secundară a germoplasmei vegetale conservată în instituţia noastră.

Principalele metode de analiză utilizate la determinarea compoziţiei chimice a materialului vegetal:

Metoda Kjeldahl pentru determinarea conţinutului de proteină

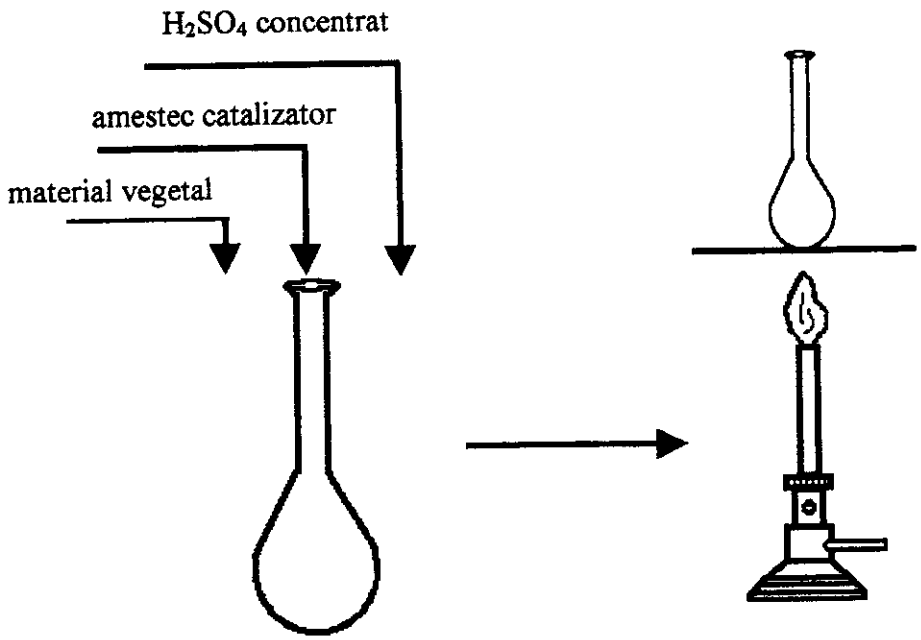
Reactivi necesari:

- amestec catalizator ce conţine K_2SO_4 sau Na_2SO_4 în amestec cu oxid galben de mercur şi are rol de accelerare a procesului de mineralizare;
- soluţie NaOH – $Na_2S_2O_3$;
- soluţie acid boric – indicator (roşu de metil în amestec cu verde de bromcrezol);
- soluţie H_2SO_4 0,02 n;
- acid sulfuric concentrat.

Mod de lucru

Metoda cuprinde trei etape distincte: mineralizarea probei de material vegetal, operaţia de distilare şi titrarea filtratului obţinut. Schematic acestea pot fi reprezentate astfel:

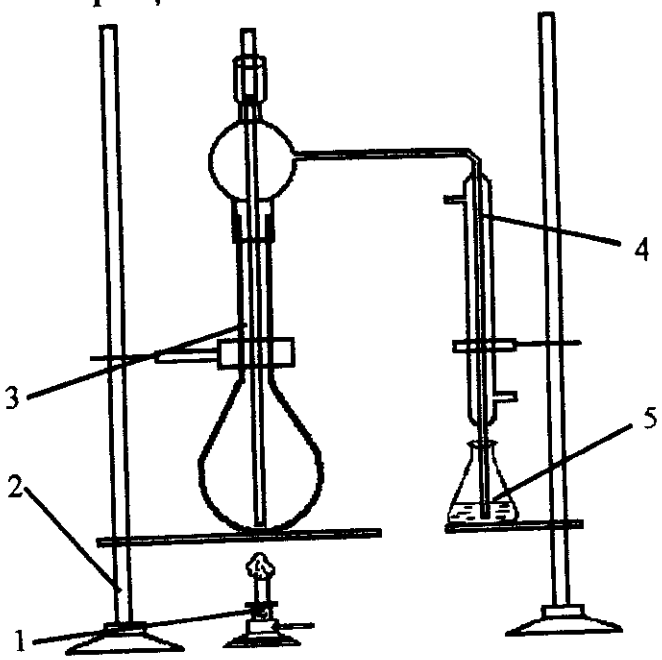
MINERALIZAREA MATERIALULUI VEGETAL



Balon Kjeldahl **Mineralizare**

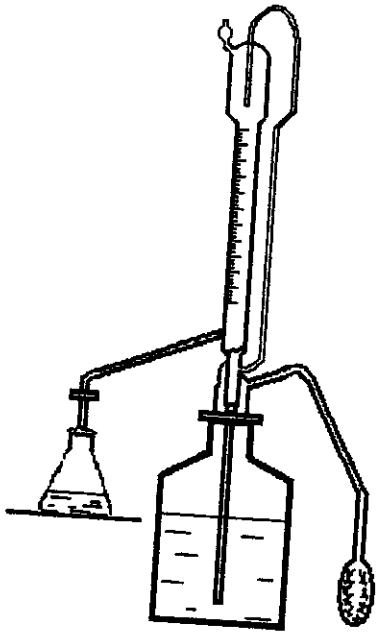
După încheierea mineralizării, proba de analizat se răceşte, se dizolvă în apă şi se introduce în aparatul de distilat. În aparat se mai adaugă soluţie NaOH – $Na_2S_2O_3$, se clăteşte balonul Kjeldahl cu apă, se toarnă şi această apă în aparat şi se începe operaţia de distilare. Filtratul se culege întru-un pahar Berzelius sau Erlenmeyer cu amestec acid boric – indicator.

Operaţia de distilare poate fi schematizată astfel:



1 – sursă de încălzire;
2 – stativ;
3 – aparat Parnas – Wagner
4 – refrigerent;
5 – pahar Erlenmeyer pentru culegerea filtratului.

După încheierea distilării şi culegerea filtratului în soluţie de acid boric cu indicator, amoniacul rezultat se titrează cu H_2SO_4 de concentraţie 0,02 n, cu ajutorul unei biurete automate.



REPREZENTAREA SCHEMATICĂ A OPERAȚIEI DE TITRARE

Se citeşte numărul de mililitri de acid sulfuric consumat la titrare şi se efectuează calculul cantității de proteină, exprimat în procente şi raportat la substanța uscată:

$$\%\text{proteina} = \frac{(V - V_0) \cdot 0{,}28 \cdot 6{,}25}{\text{s.u.}}$$

în care:

V – numărul de mililitri de H_2SO_4 folosiți la titrarea probei de analizat;

V_0 – numărul de mililitri de H_2SO_4 folosiți la titrarea probei martor;

6,25 – cantitatea de substanțe proteice corespunzătoare la un gram de azot;

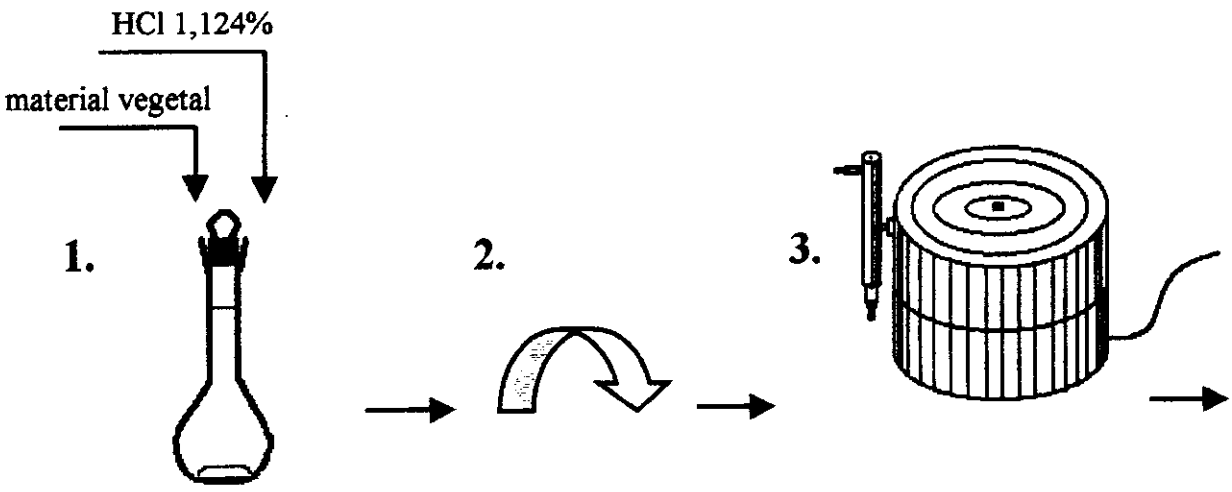
s.u. – substanța uscată.

Metoda Ewers – Grossfeld pentru determinarea conţinutului de amidon din materialul vegetal

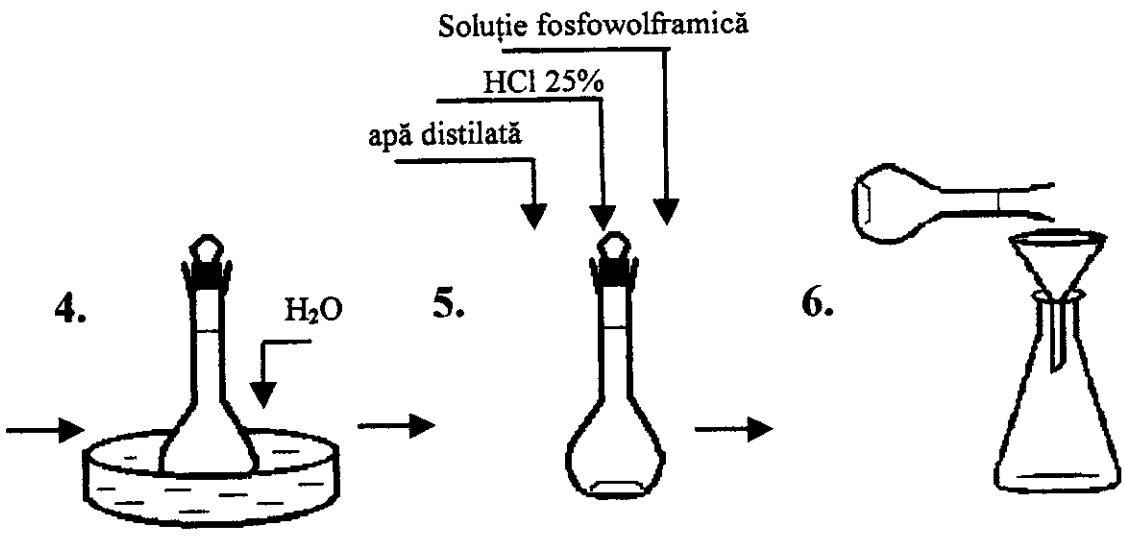
Reactivi necesari:

- HCl 1,124 %;
- HCl 25 %;
- Soluţie fosfowolframică, ce conţine wolframat de sodiu şi fosfat disodic cristalizat.

Mod de lucru:



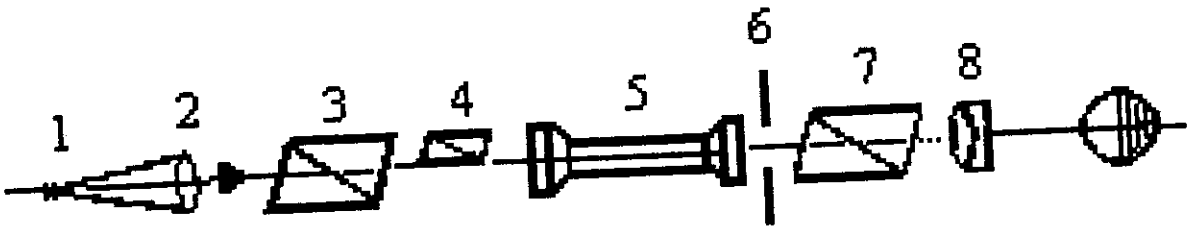
Balon cotat 100 ml | **Agitare** | **Baie de apă la fierbere 15 minute cu agitare în primele 3 minute**



Răcire rapidă în jet de apă | **Filtrare (primii 10 ml se aruncă)**

Filtratul limpede se polarimetrează într-un tub de 20 cm. Schema de construcţie

a unui polarimetru este arătată în figura următoare:



Schema polarimetrului

1 – sursă de lumină; 2 – lentilă; 3 – polarizor; 4 – semiprismă; 5 – tub polarimetru; 6 – diafragmă; 7 – analizor; 8 – lentilă convergentă.

Câmpul vizual al polarimetrului este împărțit în 2 sectoare ce se întunecă şi se luminează alternativ în timpul rotației. Poziția în care cele două jumătăți ale câmpului vizual sunt la fel de întunecate, reprezintă poziția zero a analizorului. La introducerea soluției de analizat în tub, câmpul vizual va fi luminat neuniform, iar pentru a ajunge la starea inițială, analizorul trebuie rotit cu acelaşi unghi cu care substanța a rotit planul de polarizare. Unghiul de rotație al analizorului se citeşte pe discul polarimetrului.

Cantitatea de amidon brut conținută în produsul cântărit, exprimată în grame, este dată de relația:

$$A = \frac{100 \cdot \alpha_p}{L \cdot \alpha_D^{20}} = \frac{100 \cdot \alpha_p}{2 \cdot 183,7} = 0,2722 \cdot \alpha_p$$

în care: α_p – gradele polarimetrice citite;

L – lungimea tubului polarimetrului, în decimetri;

α_D^{20} – deviația polarimetrică specifică a amidonului, care în cazul soluțiilor obținute prin metoda descrisă anterior are, pentru diferite feluri de amidon, valoarea medie de +183,7.

Metoda Soxhlet pentru determinarea conţinutului de grăsimi din materialul vegetal

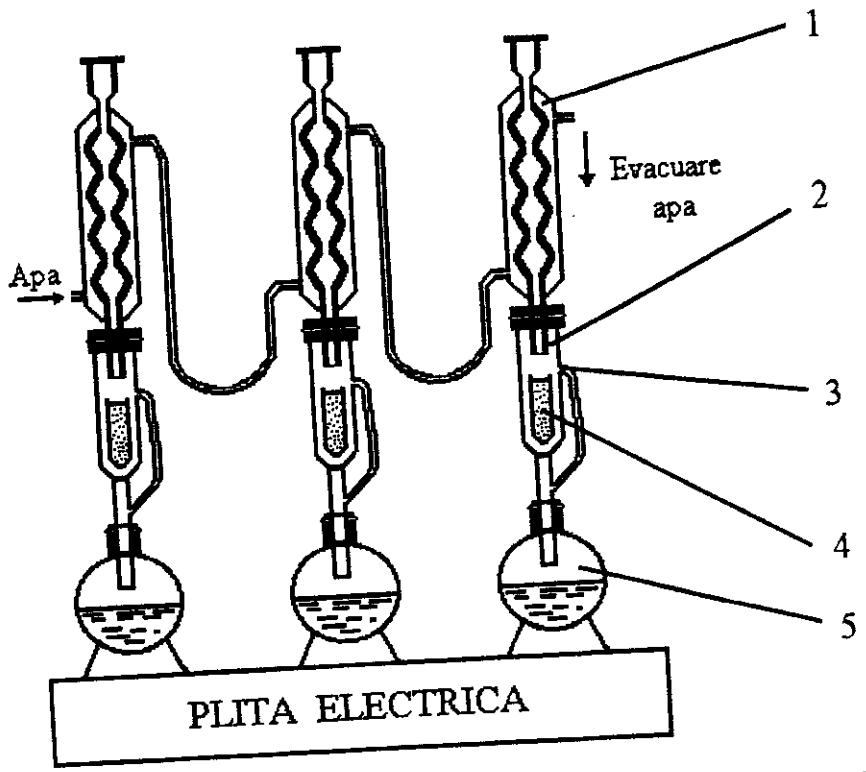
Reactivi necesari:

- eter de petrol.

Mod de lucru:

Metoda are la bază extracţia continuă a substanţei din faza solidă prin concentrarea continuă a extractului şi regenerarea dizolvantului. Cel mai utilizat tip de extractoare este extractorul Soxhlet format din: un balon, un extractor şi un refrigerent cu bule.

Schematic o instalaţie alcătuită din trei extractoare legate în serie, folosită la Banca de Resurse Genetice Vegetale Suceava poate fi reprezentată astfel:



Instalaţie pentru extracţia continuă a grăsimilor din material vegetal

1 – refrigerent cu bule; 2 – extractor; 3 – sifonul extractorului; 4 – cartuş cu material vegetal supus extracţiei; 5 – balon.

Aparatul se montează deasupra unei băi de apă sau a unei plite electrice, fixându-se refrigerentul şi gâtul balonului cu ajutorul unor cleme de un stativ. Cartuşul cu materialul solid fin măcinat se introduce în extractor, se montează refrigerentul, se

introduce dizolvantul pe la partea superioară a refrigerentului, astfel încât să îmbibe cartuşul şi materialul supus extracţiei. Se încălzeşte lichidul din balon prin punerea în funcţiune a băii de apă sau plitei electrice. Vaporii dizolvantului în fierbere trec din tubul lateral al extractorului şi apoi în refrigerentul răcit cu apă, unde se condensează. Condensatul se scurge picătură cu picătură în extractor, peste substanţa din cartuş, extrăgând componentul solubil. Când lichidul ajunge la nivelul sifonului, acesta se amorsează şi-l trece automat în balon. Extractul care ajunge în balon se îmbogăţeşte continuu în componentul de extras, extracţia efectuându-se numai cu dizolvant pur.

Operaţia se consideră terminată când lichidul din extractor nu-şi mai modifică coloraţia datorită componentului extras, respectiv grăsime. Se opreşte încălzirea, se lasă aparatul să se răcească, se ridică refrigerentul fără a fi demontat din stativ, se scoate extractorul din balon şi se scurge restul de dizolvant. Apoi se scoate cartuşul cu substanţa şi se usucă la aer, iar baloanele se usucă etuvă la 105°C, timp de 2 ore. După uscare, baloanele se răcesc în exicator şi se cântăresc. Conţinutul de grăsimi în cantitatea de material vegetal luat spre analiză va fi egală cu diferenţa dintre greutatea balonului cu grăsimi şi greutatea balonului gol.

3.6. Tehnici moleculare în conservarea şi utilizarea resurselor genetice vegetale (Mirela Popa)

3.6.1. Necesitatea cunoaşterii germoplasmei vegetale din punct de vedere genetic

Atât managerii băncilor de gene cât şi cercetătorii preocupaţi de conservarea "in situ" şi "ex situ" încearcă să asigure o varietate genetică cât mai cuprinzătoare a tuturor speciilor cu care lucrează. Realizarea eficientă a acestui obiectiv depinde de informaţia genetică disponibilă asupra germoplasmei vegetale supuse conservării. Marcherii moleculari furnizează informaţii genetice de mare valoare atât în domeniul conservării "ex situ" cât şi a celei "in situ".

Astfel, pentru conservarea "ex situ" marcherii moleculari pot fi utilizaţi la:

- **Achiziţionare**. Datele asupra diversităţii colecţiilor existente pot fi utilizate la planificarea misiunilor de colectare şi la stabilirea strategiilor în ceea ce priveşte