

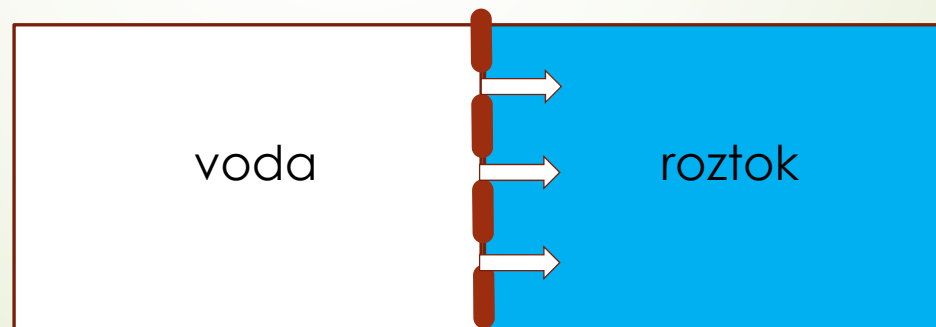
Cvičení z fyziologie rostlin



2. Osmotický a vodní potenciál

Vodní režim rostlin

- ▶ Nutnost přijímat vodu jako:
 - ▶ „látku“ - základní složka cytoplazmy buněk, substrát pro fotolýzu vody během fotosyntézy
 - ▶ „rozpuštědlo, nosné médium“ - příjem živin z půdy, transport látek v rostlině, vše ve formě vodných roztoků
- ▶ Hnací síla toku vody - osmóza



polopropustná
membrána

Vodní potenciál

➤ Veličina pro popis a kvantifikaci transportu vody v rostlině

➤ $\Psi = p - \pi$ [Pa]

➤ Ψ = vodní potenciál

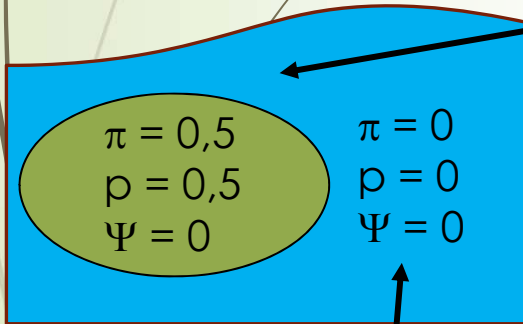
➤ p = hydrostatický tlak

➤ π = osmotický tlak

Předpoklad: pevná buněčná stěna!

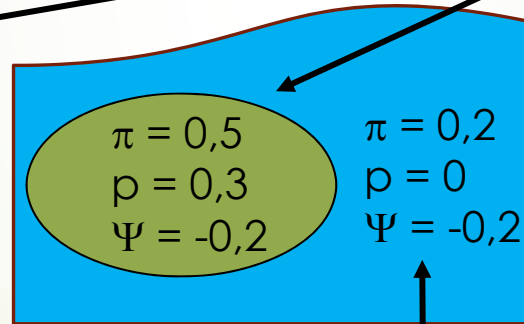
Buňka
před
pokusem
(hodnoty
v MPa)

$\pi = 0,5$
 $p = 0$
 $\Psi = -0,5$



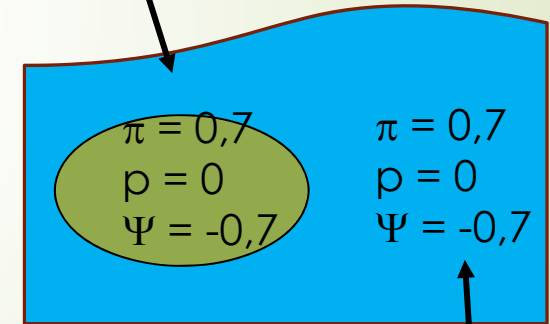
Ponoření do **čisté vody**

Tok vody **do buňky**,
maximální vodní
potenciál ($\Psi = 0$),
maximální turgor buňky



Ponoření do
slabého roztoku
(hypotonický roztok)

Vyrovňání vodních
potenciálů částečným
tokem vody **do buňky**,
turgor buňky mírně snížený



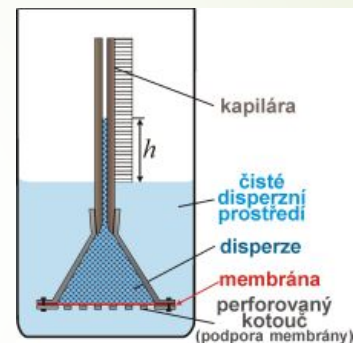
Ponoření do
konzentrovaného roztoku
(hypertonický roztok)

Tok vody **z buňky**, pokles
vodního potenciálu, ztráta
turgoru -> **plazmolýza**

Metody stanovení vodního potenciálu

- Nepřímé stanovení – stanovení osmotického potenciálu π (zanedbání vlivu tlakové složky „p“)

- Metoda hraniční plazmolýzy
- Refraktometrická metoda
- Osmometrie
 - parní, zmrazovací...



- Přímé stanovení

- Tlaková metoda
- Psychrometrie

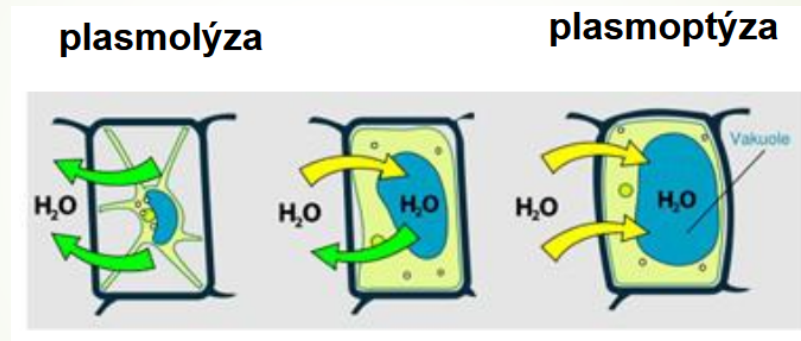


Stanovení osmotického potenciálu π

- Osmotický tlak = tlak, který musí působit na roztok, aby se zabránilo pronikání molekul vody do roztoku (vyvolá zastavení osmózy)
- Osmotický potenciál = potenciál buňky/pletiva vykázaný za ideálních podmínek osmotický tlak
- Osmotický potenciál buňky/pletiva závisí na obsahu osmoticky aktivních látek v cytoplazmě (kompatibilní osmotika (např. cukry, aminokyseliny) a vakuole (např. anorg. ionty K^+ , Mg^{2+} , NO_3^-))

Metoda hraniční plazmolýzy

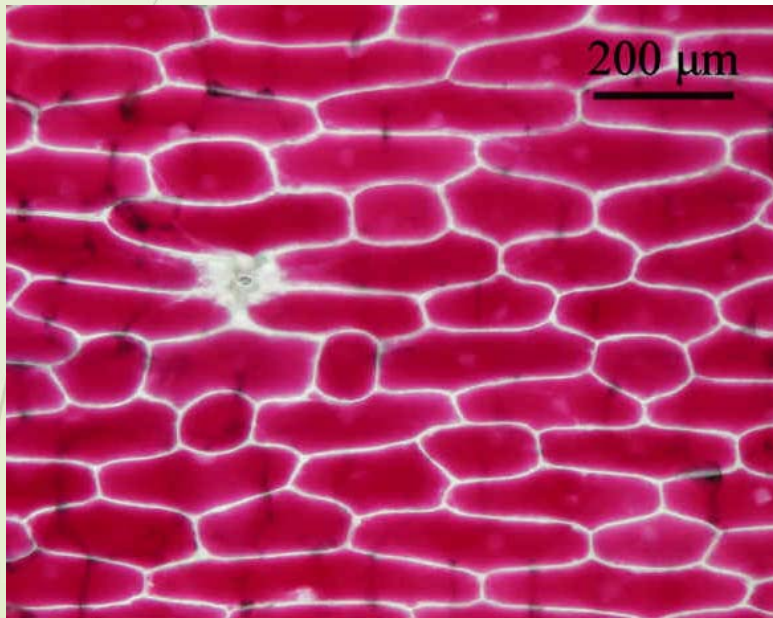
- Inkubace vzorků pletiva v koncentrační řadě roztoků s osmoticky aktivní látkou (např. sacharózou)
 - Vakuoly a celé protoplasty buněk reagují na osmotické vlastnosti roztoku okolo nich příjmem nebo výdejem vody



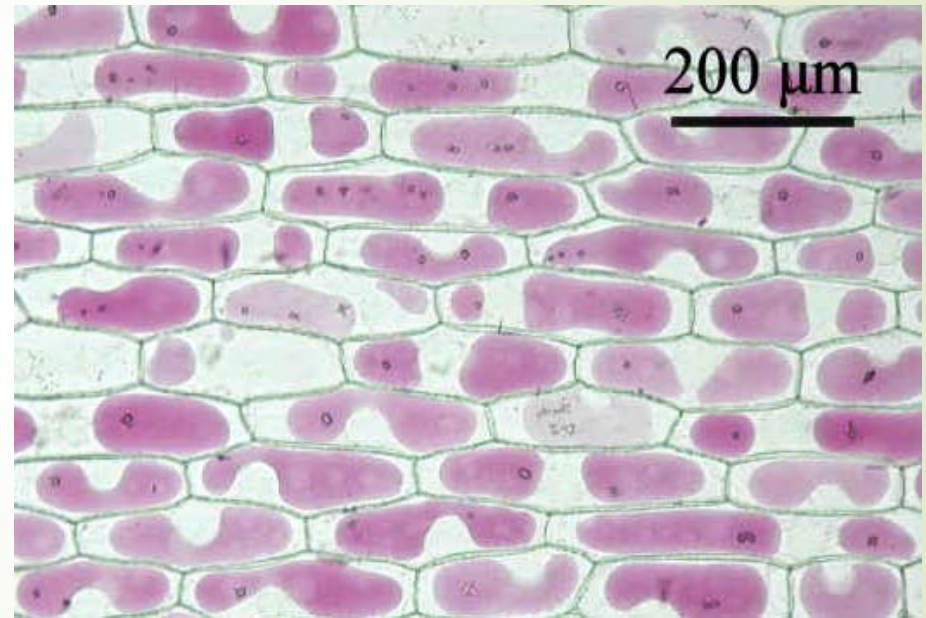
- Pozorování podílu „plazmolyzovaných“ buněk
- Hledání koncentrace osmotika, při níž je právě 50% buněk plazmolyzovaných
- Přepočítání odpovídající koncentrace osmotika na hodnotu osmotického potenciálu.

Plazmolýza rostlinných buněk

Allium cepa (česnek cibule) – pokožka dužnaté suknice



Hypo-/izotonický roztok

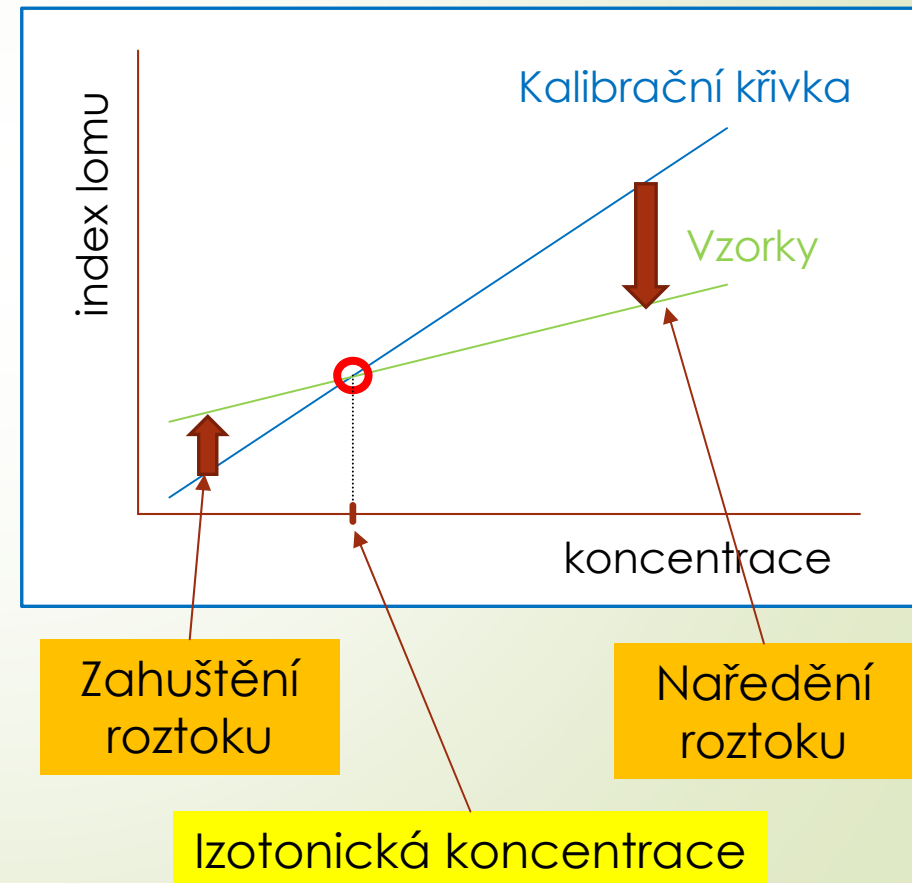


Hypertonický roztok

Refraktometrická metoda

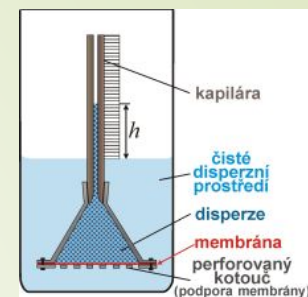


- Inkubace vzorků pletiva v koncentrační řadě roztoků s osmoticky aktivní látkou (sacharózou)
- Pozorování změny koncentrace osmotika v inkubačním roztoku pomocí refraktometru
- Porovnání hodnot z řady vzorků s kalibrační řadou původních roztoků
- Hledání izotonické koncentrace
- Přepočet odpovídající koncentrace na osmotický potenciál



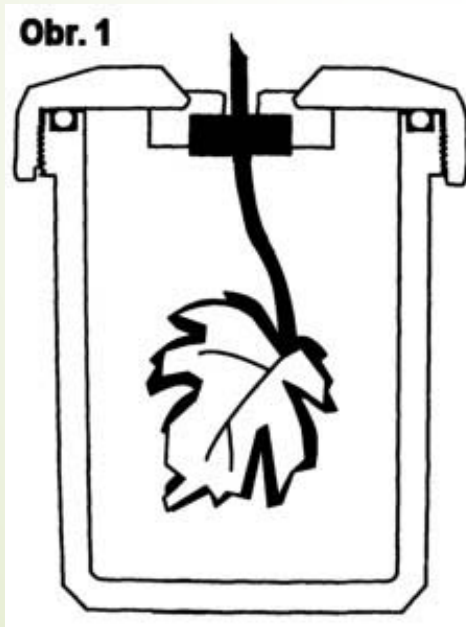
Osmometrie

- Základní osmometrie – sledování osmózy jako zvýšení/snížení hladiny kapaliny v kapiláře osmometru naplněném zkoumaným roztokem.
- Parní osmometrie – sledování osmózy vody z vodní páry do kapky zkoumaného roztoku na základě změny jeho teploty (ohřátí = příjem vody koncentrovaným roztokem)
- Zmrazovací osmometrie – stanovení osmotického potenciálu roztoku podle přesné teploty tuhnutí



Přímé stanovení – tlaková metoda

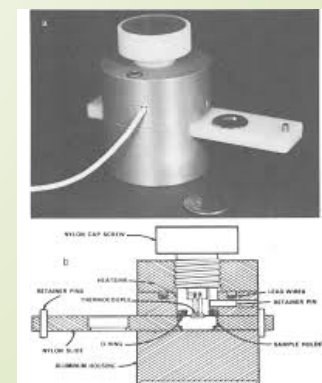
- Princip - působením vnějšího tlaku dojde k překonání osmotického tlaku a vytlačení vody z buněk do xylému
- Balanční tlak = číselně vodní potenciál



Přímé stanovení - psychrometrie



- Princip – stanovení teploty rosného bodu (teploty při maximálním nasycení vzduchu vodní párou, tj. při 100% relativní vzdušné vlhkosti)
- Ve vzduchotěsné měřicí komoře se nad vzorkem pletiva/půdy ustaví rovnováha mezi vodou ve vzorku a vodní párou v komoře, tlak vodní páry odpovídá vodnímu potenciálu vzorku





Praktické návody

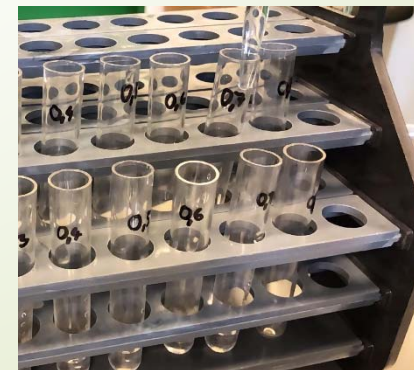
1. Refraktometrická metoda

- Princip:
 - Změna koncentrace osmoticky aktivní látky (sacharózy) v roztoku po inkubaci se vzorkem rostlinného pletiva detekovaná opticky
- Pomůcky a potřeby:
 - Rostlinný materiál – hlízy brambor
 - Příprava vzorků – korkovrt, nůž, pravítko
 - Inkubační roztoky – koncentrát 1M sacharóza
koncentrační řada 0,1 M; 0,2 M; 0,3 M; 0,9 M; (1,0 M)
kontrola (0 M) – čistá voda
 - Pomůcky – sada zkumavek 10mL, kádinky, pipety (1, 5 a 10 mL), refraktometr



1. Refraktometrická metoda

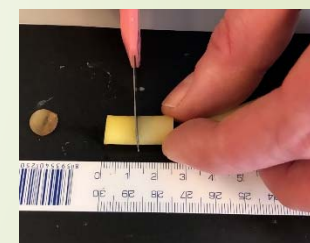
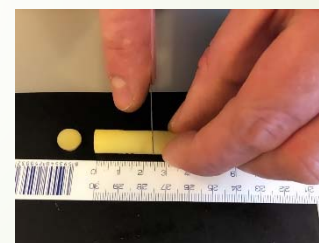
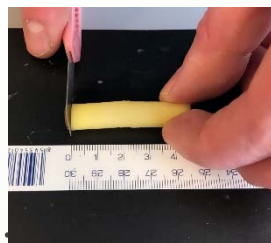
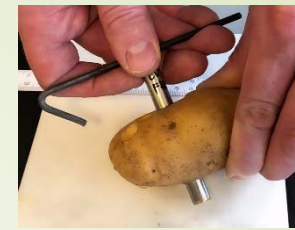
- Provedení (1):
 - Označit kádinky a zkumavky (1 kádinka a 2-3 zkumavky na jednu koncentraci).
- Připravit koncentrační řadu roztoků, od každé koncentrace 10 (resp. 20) mL.
- Do všech zkumavek (2 sady se vzorky, 1 sada kalibrační) napipetovat roztok podle koncentrace v objemu 1 mL



1. Refraktometrická metoda

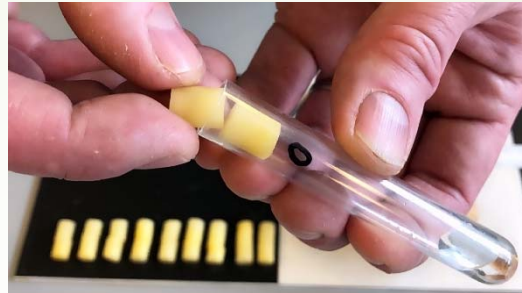
➤ Provedení (2):

- Připravit vzorky z bramborových hlíz:
- Pomocí korkovrtu vyvrtat válečky dřeně
- Odkrojit okraj válečku se slupkou, zarovnat řeznou plochu
- Rozdělit váleček na přesně 2,5 cm dlouhé špalíky a ty rozříznout napůl.
- Menší kusy válečků z odkrojků lze složit k sobě do celkové délky 2,5 cm.

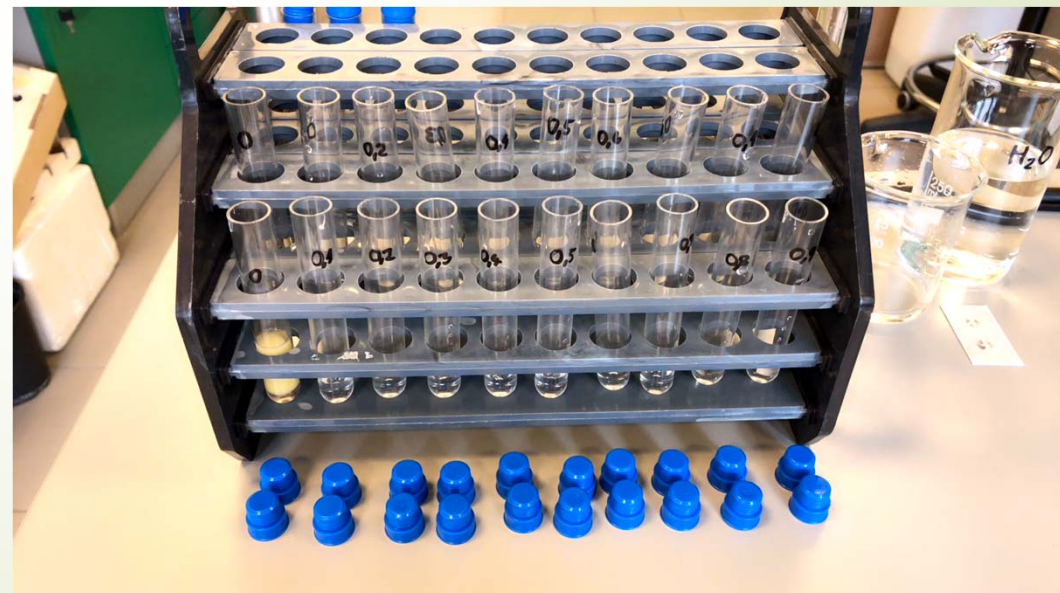


1. Refraktometrická metoda

- Provedení (3):
 - Do dvou sad zkumavek umístit špalíky dřeně, jednu sadu zkumavek ponechat prázdnou (kalibrační řada)
 - Zkumavky uzavřít víčkem a nechat za občasného protřepání inkubovat minimálně 30 minut.



Ilustrativní video



1. Refraktometrická metoda

- Měření (1):
- Připravit refraktometr – sejmout hranol, očistit čistou vodou hranol i čočku, ubrouskem utřít do sucha
- Změřit kalibrační sadu (bez vzorků dřeně), začít od nejvyšší koncentrace
 - Na čočku refraktometru nanést tyčinkou kapku roztoku
 - Přiklopit hranol
 - Upravit zaostření okuláru refraktometru, najít stupnici a odečíst co nejpřesněji hodnotu indexu lomu na viditelném rozhraní světla a stínu
 - Sejmout hranol a očistit čočku i hranol



1. Refraktometrická metoda

Ilustrativní video měření pomocí refraktometru



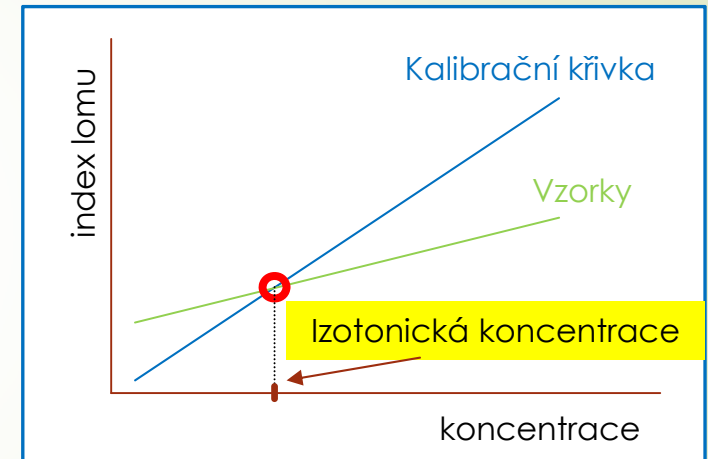
1. Refraktometrická metoda

- Měření (2):
 - Změřit kalibrační sadu (bez vzorků dřeně), začít od nejvyšší koncentrace
 - Změřit sady inkubačních roztoků se vzorky dřeně
- Podle potřeby zopakovat měření kalibrační sady i vzorkových sad
- **Zaznamenat si teplotu prostředí během měření !!**



1. Refraktometrická metoda

- ▶ Vyhodnocení (1):
 - ▶ Zprůměrovat případně opakovaně měřené hodnoty
 - ▶ Vynést data do grafu (typ BODOVÝ, s číselnými osami) jako **závislost indexu lomu** (osa Y) **na koncentraci sacharózy** (osa X), řady tvoří kalibrační sada a zprůměrovaná sada ze vzorků,
 - ▶ Datovými body proložit lineární spojnice trendu („přímky“)
 - ▶ Podle polohy průsečíku přímek z grafu odečíst (nebo z rovnic přímek vypočítat) hodnotu izotonické koncentrace osmotika.



1. Refraktometrická metoda

- Vyhodnocení (2):

- Získanou hodnotu dosadit za „c“ do Van't Hoffova vzorce pro výpočet osmotického potenciálu

$$\pi = - R \cdot T \cdot c \cdot i \text{ [MPa]}, \text{ kde:}$$

- R= univerzální plynová konstanta
0,00831447 MPa mol⁻¹ K⁻¹
- T= absolutní teplota v době měření
(273,15 K + t[°C])
- c= izotonická koncentrace (mol/L)
- i= koeficient disociace osmotika, pro sacharózu je roven 1

2. Tlaková metoda



► Princip

► Tlakem plynu vytlačit z pletiva vodu, hodnota tlaku odpovídá přímo hodnotě vodního potenciálu pletiva

► Experiment

► Porovnání vodního potenciálu a jeho změn v čase u listů ze zalévané a nezalévané rostliny pelargonie

► Pomůcky a potřeby

► Rostlinný materiál – listy s řapíky nebo celé stonky rostlin (např. pelargonie, zalévané a nezalévané rostliny)

► Pomůcky - měřící aparatura, tlaková nádoba s plynem (vzduch, dusík ...), žiletka, lupa, těsnící hmota



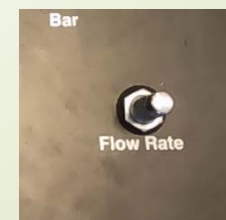
2. Tlaková metoda

- Provedení (1):
 - Odebrat rostlinný materiál (list s řapíkem, celý stonek)
 - Připravit měřící aparaturu
 - Otevřít přívod plynu
 - Ventil tlakové komory přepnout do polohy „Vent chamber“
 - Pomocí zátky s vhodným průměrem otvoru upevnit list (stonek) zespodu do víka tlakové komory
 - List (stonek) vložit do tlakové komory a víko těsně našroubovat na tlakovou komoru. Pozor, zamezit mechanickému poškození vloženého listu (stonku)!



2. Tlaková metoda

- Provedení (2):
 - Řeznou plochu na řapíku seříznout šikmo pod úhlem přibližně 45°
 - Ventil tlakové komory přepnout do polohy „Fill Chamber“.
 - Sluchem zkontrolovat napouštění komory a zejména případné netěsnosti kolem zátky (intenzivní syčení). V případě potřeby přepnout ventil zpět na „Vent Chamber“, odšroubovat víko, vyjmout zátku s listem a přetěsnit pomocí těsnicí hmoty.
 - Pokud zátka těsní, jehlovým ventilem „Flow rate“ podle potřeby regulovat rychlost napouštění komory.



2. Tlaková metoda

- Měření (1):
 - Pokud zátka a víko těsní a tlakoměr ukazuje zvyšující se hodnotu tlaku v komoře, sledovat přítomnost vody na řezné ploše řapíku (stonku) – když řezná plocha **zvlhne** a objeví se **kapka vody**, okamžitě **zastavit napouštění** komory přeplnutím ventilu do polohy „Off“
 - Na tlakoměru odečíst hodnotu dosaženého tlaku plynu.



2. Tlaková metoda

- Měření (2):
- Ukončení měření
 - Pomalu přepnout ventil tlakové komory do polohy „Vent Chamber“ (hlasitě uniká stlačený plyn)
 - Po vypuštění komory sešroubovat víko a šetrně vyjmout zátku s vloženým listem (stonkem)
 - Měření opakovat s dalším listem (stonkem)





2. Tlaková metoda

- Vyhodnocení

- Podle designu experimentu např. opakovaně měřit 2-3 listy ze zalévané a nezalévané rostliny v 10-15 min intervalech
- Dosažené hodnoty tlaků přepočítat z jednotky bar na MPa a zapsat do tabulky
- Porovnat získané hodnoty a jejich změny v jednotlivých měřících intervalech.