

Xylémová šťáva jako zdroj informací

Xylémová šťáva může sloužit jako důležitý zdroj informací o fyziologickém stavu rostlin i o jejich reakcích na podmínky vnějšího prostředí. Odběr provádíme nejčastěji z nadzemní části, ale je možné ho provádět i z kořenového systému. K odběru používáme nejčastěji tlakové komory, nebo centrifugaci, ale někdy je možné využít i samovolné vytékání šťávy z odříznutého kořenového systému.

Cíl: zjistit vliv dostupnosti minerálních živin v médiu na chemické složení xylémové šťávy a rychlost transportu (delivery rate) nitrátových iontů z kořenů do nadzemní části.

Příprava rostlinného materiálu: rostliny slunečnice a hrachu zasadíme do vodních kultur v Hoaglandově živném roztoku. Pěstujeme je zhruba 2-4 týdny, tak aby rostliny dosáhly přibližně velikosti nadzemní části cca 15-25cm. Pět dnů před odběrem rozdělíme rostliny do dvou variant (samostatných kultivačních nádob) s různou dostupností dusičnanů v živném roztoku 0.4 a 10 mM.

Před odběrem:

Nejméně hodinu před odběrem umístíme několik rostlin (4-5) z každé varianty do nádobek s příslušným roztokem. Nádobky s rostlinami zvážíme a zaznamenáme čas. Před vlastním odběrem zvážíme nádobky s rostlinami znovu a zapíšeme čas. Po skončení vzorkování stanovíme listovou plochu každé rostliny pomocí scanneru. Z hodnot vypočteme rychlost transpirace (na jednu rostlinu i na plochu).

Provedení odběru:

Odběr provedeme z odříznuté nadzemní části rostliny. Nejprve vybereme a instalujeme těsnění vhodného průměru ve víku tlakové komory – podle průměru stonku použitých rostlin. Stonek vybrané rostliny potom ve vhodném místě omotáme tenkou vrstvou parafilmu. Odříznutá část by se měla bez potíží vejít do komory a cca 3cm stonku budou vyčnívat z víka komory ven. Vrstva parafilmu pak bude v místě těsnění. Ostrou žiletkou odřízneme stonek 3-4cm pod parafilmem a stonek instalujeme do komory. Pomocí destilované vody a ubrousku opatrně opláchneme řeznou plochu na stonku vyčnívajícím z komory od nečistot. Po pečlivém uzavření začneme v komoře pomalu zvyšovat tlak a sledujeme lupou řeznou plochu. Pracujeme s ochrannými brýlemi!

Jakmile se na řezu objeví kapka tekutiny, zaznamenáme tlak – odpovídá vodnímu potenciálu stonku. Tlak v komoře postupně pomalu dále zvyšujeme tak, aby šťáva ze stonku plynule vytékala. První kapku opatrně odsajeme ubrouskem a další kapky sbíráme pomocí pipety do popsané mikrozkuřavky. Nasbíráme cca 50 – 100 mikrolitrů šťávy a vzorkování ukončíme uvolněním tlaku v komoře. Pro každou variantu výživy provedeme odběr alespoň ze tří rostlin. Vzorky xylémové šťávy uložíme před analýzou v ledničce.

Analýza vzorků

Nejprve změříme pH šťávy přímo v mikrozkumavce pomocí pH mikroelektrody. Při měření vzorkem opatrně mícháme, abychom elektrodu nepoškodili.

Koncentraci nitrátů ve šťávě zjistíme spektrofotometricky po reakci s k. sulfosalicylovou (viz. níže). Stanovení provedeme ve dvou opakováních pro každý vzorek.

Z hodnot koncentrace NO_3^- a rychlosti transpirace vypočtete delivery rate NO_3^- pro každou rostlinu: $\text{DR} = c(\text{NO}_3) * \text{TR}$ (umol h^{-1})

DR – delivery rate

$c(\text{NO}_3)$ – koncentrace NO_3 v xylémové šťávě

TR – rychlost transpirace na rostlinu ($\text{ml} * \text{h}^{-1}$)

Prezentace výsledků:

Všechna naměřená data uveďte do souhrnné tabulky. Do tabulky také запиšte vypočtené výsledky pro každou rostlinu a průměrné hodnoty ze všech opakování pro jednotlivé varianty.

Srovnajte rozdíly mezi variantami v pH a koncentraci nitrátů a delivery rate ve sloupcových grafech. Rozdíly mezi variantami v jednotlivých parametrech popište a diskutujte v závěru.

Měření koncentrace nitrátových iontů v roztoku

Kolorimetrické stanovení

Tento způsob analýzy je výhodný zejména pokud potřebujeme přesně analyzovat roztoky s nízkou koncentrací NO_3^- nebo máme-li k dispozici pouze malé množství vzorku.

1. Připravíme čerstvá reakční činidla. Činidlo A - 5 g k. salicylové rozpustíme v 96% H_2SO_4 a doplníme na 100 ml 96% k. sírovou. Činidlo B - rozpustíme 40 g NaOH v dest. vodě a doplníme na 500 ml dest. vodou.
2. Připravíme kalibrační řadu z koncentrátu (0,0680 g NaNO_3 rozpustíme ve 100 ml dest. vody = 8mM) ředíme na 0 - 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 4,0 - 6,0 mM do 50 ml odměrek.
3. Provedeme reakci v označených 1,5 ml mikrozkumavkách : 40 μl činidla A přidáme k 10 μl vzorku nebo standardu, promícháme, rychle centrifugujeme (cca 20 sec.) a necháme inkubovat 20 min. při pokojové teplotě. Potom přidáme 1 ml činidla B, promícháme a necháme vychladnout na pokojovou teplotu. Absorbanci vzorků měříme při 410 nm.