

## Vliv kyseliny abscisové (ABA) a sucha na transpiraci a teplotu listu.

### Úvod - teorie.

#### Voda v rostlině - kyselina abscisová (ABA) - průduchy a jejich funkce- transpirace

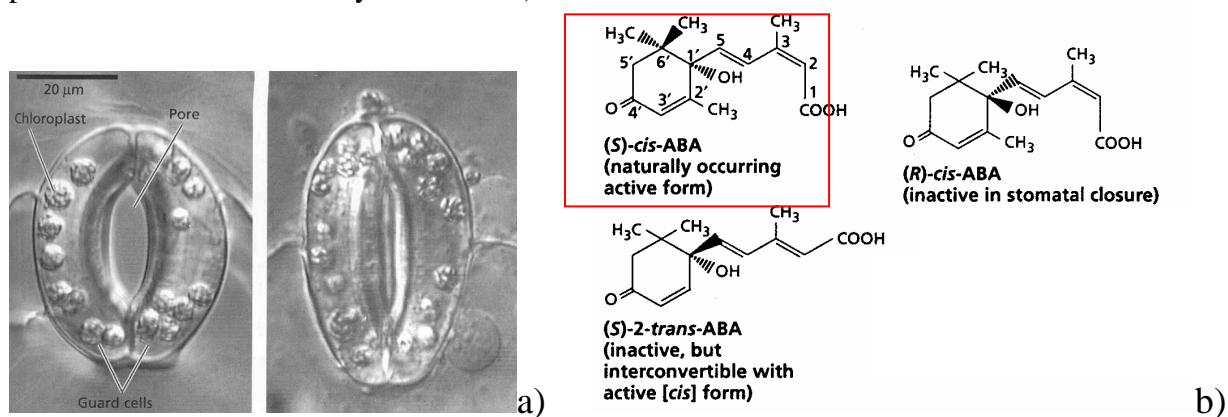
Regulace vodního režimu rostliny je asi nejdůležitější funkcí kyseliny abscisové (ABA). Při nedostatku vody v půdě stoupá biosyntéza ABA v kořenech a zvyšuje se její transport xylémem do nadzemních částí rostliny. Příjemcem signálu o nedostatku vody v rostlině a o nutnosti omezit její výdej jsou svěrací buňky průduchů. Účinek ABA v těchto buňkách spočívá ve zvýšení výtoku draslíkových iontů ze svěracích buněk a tím v redukcii turgoru a v zavírání průduchů. Průduchy reagují na signál ABA velmi citlivě. Zavírají se již po několika minutách od zvýšení koncentrace ABA, proto k zavírání průduchů a ke snížení transpirace dochází dříve, než rostliny začnou vadnout. Omezí se tak výdej vody, kterou rostlina k životu nezbytně potřebuje, ale zároveň se to projeví na dostupnosti CO<sub>2</sub>, který se do listu dostává právě průduchy, což vede ke snížení jeho asimilace uvnitř listu (snížení fotosyntézy, produkce sušiny).

Z hlediska cesty, kterou je voda z rostliny transpirována, rozlišujeme **transpiraci stomatární** (výdej vody štěrbinami průduchů) a **kutikulární** (výdej přes kutikulární vrstvu epidermis). Za podmínek dostatečného osvětlení rostlin (neplatí pro CAM rostliny) a jejich dostatečné saturace vodou intenzita stomatární transpirace obvykle několikanásobně převyšuje intenzitu kutikulární transpirace. Podíl kutikulární transpirace bývá vyšší u mladých listů a u listů rostlin pěstovaných ve stínu.

Transpiraci rostliny (listu) i rychlost fotosyntézy je možno měřit pomocí **gazometrie** (přístroj LICOR 6400 -viz úloha č.5).

Intenzitu transpirace můžeme stanovit také jednoduše gravimetrickou - váhovou metodou na intaktních rostlinách nebo metodou podle Ivanova-zjišťování úbytku hmotnosti odříznuté části rostliny v několika málo minutách po odříznutí), stav průduchů můžeme měřit přímým mikroskopickým měřením pomocí okulárového mikrometru. Spíše počet a tvar průduchů lze zjistit mikroreliefovou - otiskovou metodou (otisk do vrstvičky laku na nehty - negativ, nebo dentální hmoty s následným otisknutím do laku - pozitiv listu).

Loydova fixační metoda se dá použít k přímému měření otevřenosti (apertury) průduchu (stáhnutí pokožky listu a rychlé ponoření do absolutního alkoholu), pozorování s použitím imerse, proměřování mikrometrickým okulárem).



Obr. 3 a) Otevřený a zavřený průduch, b) chemická struktura kyseliny abscisové

### Metody: Stanovení rychlosti transpirace rostlin gravimetricky.

#### Princip:

Jedná se o metodu, kdy vážíme buď intaktní rostliny, nebo pouze odstřižené listy (Ivanovova metoda). V případě Ivanovovy metody se vychází z faktu, že v prvních minutách po odstřížení transpirují listy stejně jako na celistvé rostlině. Teprve po delší době (zhruba desítky minut; silně druhově a ekologicky specifické) dochází k uzavírání průduchů a rostliny dále transpirují pouze přes kutikulu (kutikulární transpirace).

U některých rostlin se krátce po odstrižení může vyskytnout přechodné zvýšení intenzity transpirace. Tento jev nazýváme Ivanovovým skokem. Dochází k němu v důsledku přerušení kohezních sloupců vody v cévách nebo otevřením průduchů, původně hydro pasivně přivřených.

## Teorie měření teploty ( infračerveného záření) IR kamerou

### Trocha historie

**Objev IR záření**-1800 William Herschel (skleněný hranol, rtuťový teploměr v inkoustem začerněné baňce). „tmavé teplo“.

1830-Melloni- krystaly NaCl –termoelektrická baterie- (do r.1930-syntetické krystaly)

1829-Nobili-termočlánek

1840-John Herschel-první termograf

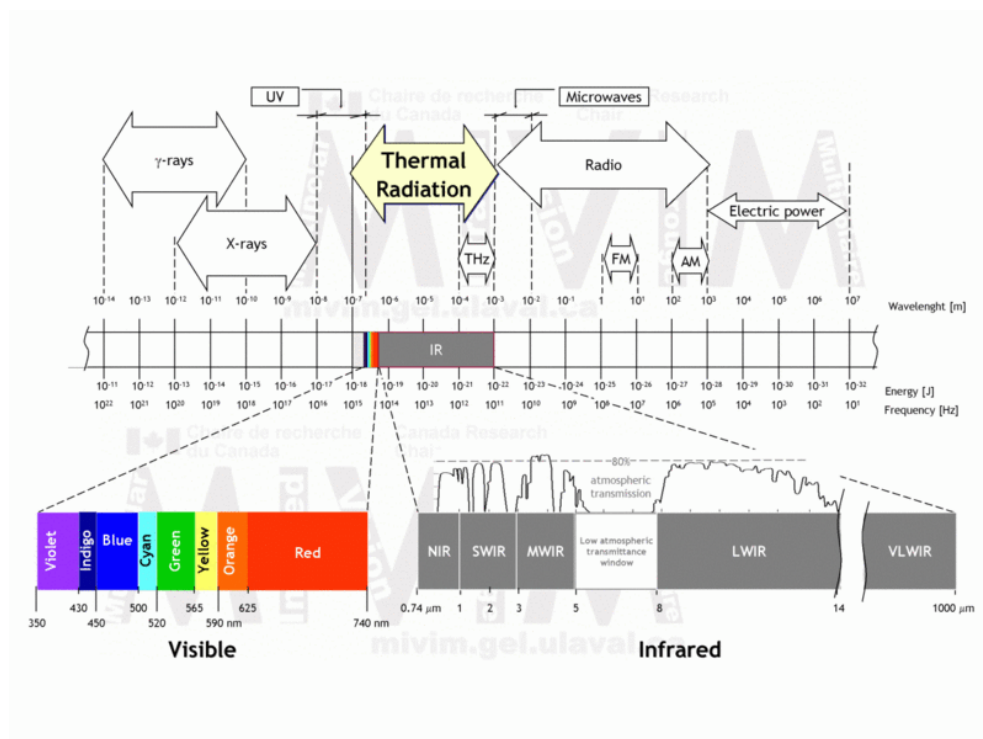
1880-Langley- bolometr

Dewar-kapalný dusík

Vojenské využití-aktivní a pasivní vyhledávací IR systémy-konvertor obrazu, fotonový detektor (první světová válka)

Až do 50.let tato technika podléhala utajení

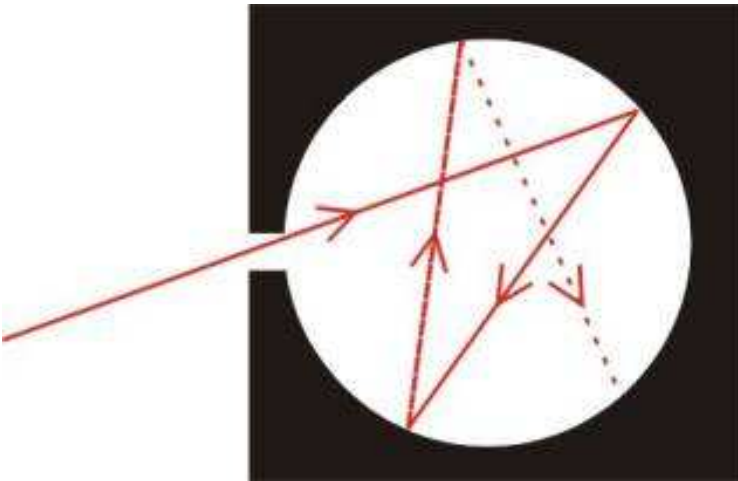
### Co to vlastně měříme?



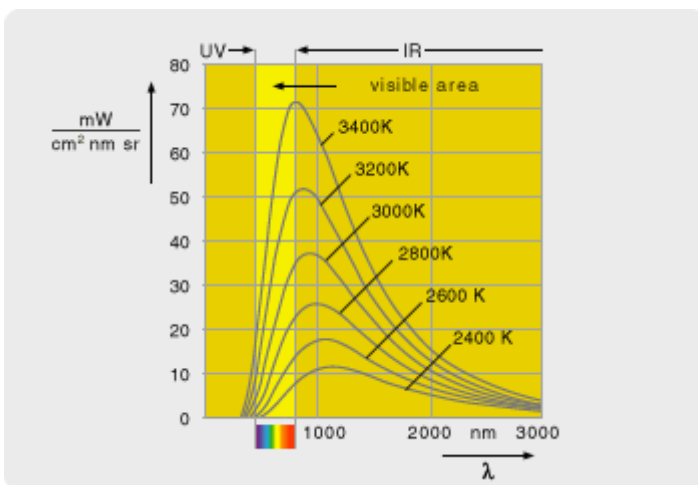
Vlnové délky se obvykle pohybují v infračervené oblasti spektra v intervalech od 10000  $\text{\AA}$  (1  $\mu\text{m}$ -1000 nm) do 0,1mm-100 $\mu\text{m}$ ..

### Černé těleso-Kirchhoffův zákon

- Pohlcuje veškerou dopadající energii. Vlastní energii vyzařuje v závislosti na teplotě. Protože nedochází k odrazu, při nízkých teplotách se těleso jeví jako dokonale černé.
- Dodání energie (např. elektrické) – zvýšení intenzity pohybu molekul – kmity a vibrace
- Při vzájemných srážkách přechod na nižší vibračně- rotační energetické hladiny
- Přebytečná energie vyzářena do okolního prostředí (v IČ oblasti)
- Tělesa „horká“ – vysoká vnitřní energie, proto se vyzáří i vysokoenergetické záření (VIS) – nad 525  $^{\circ}\text{C}$
- Tělesa „studená“ – nízká vnitřní energie – vyzáří se nízkoenergetické záření (IR)



Max Planck



**Spektrální hustota vyzařování**

$$H = f(\lambda, T)$$

**Wienův posunovací zákon**

$$\lambda_{\max} T = b \quad (b=3000)$$

**Stefanův-Boltzmannův zákon intenzita vyzařování (šedé těleso)**

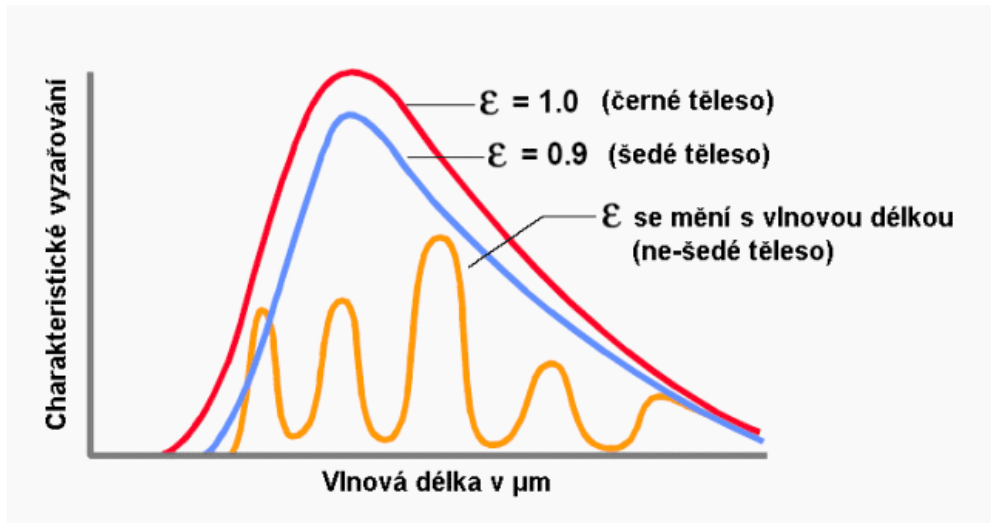
$$I = \varepsilon \sigma T^4 \quad (\text{W m}^2)$$

$\varepsilon$  = emisivita

$\sigma$  = Stefan-Boltzmannova konstanta

**Emisivita  $\varepsilon$**

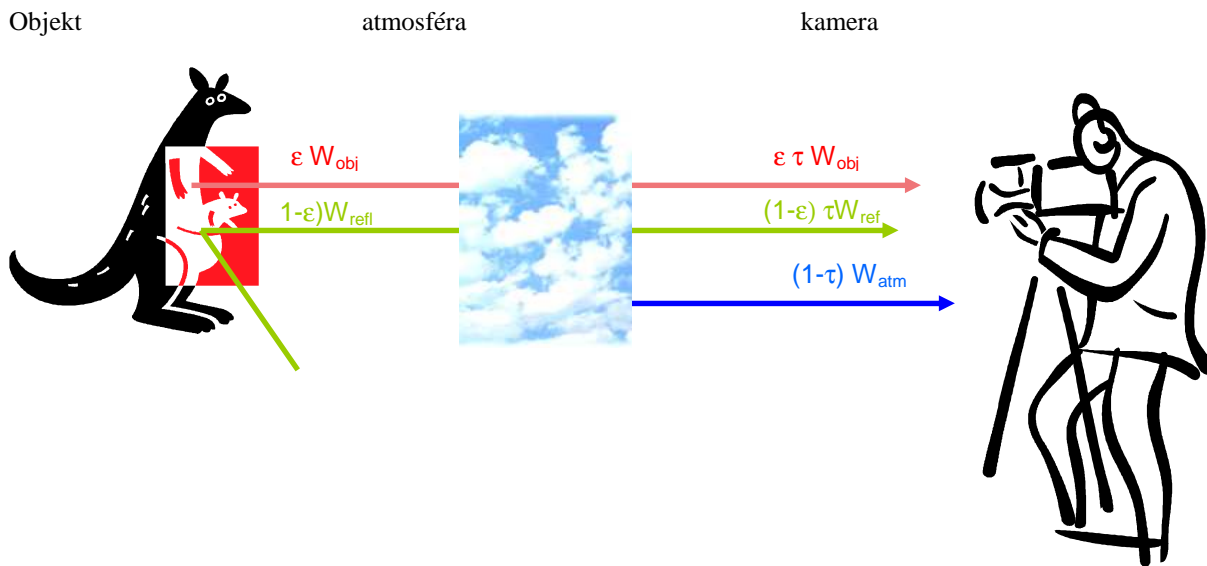
- Schopnost látek vyzařovat elektromagnetické záření
- Poměr energie vyzařované objektem při jeho dané teplotě k energii vyzařované černým tělesem při stejné teplotě, nabývá tedy hodnot 0.0 – 1.0
- Emisivita závisí na vlnové délce, teplotě a stavu povrchu měřeného tělesa



Lidská pokožka 0,97-0,98, list 0,96 – 0,98  
 vyleštěné povrchy 0,1 černé těleso 1,0

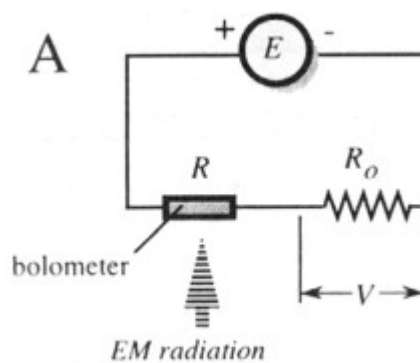
**Záření skutečně snímané kamerou**

Co naše měření ovlivňuje?



Parametry objektu

- Emisivita
- Odražená teplota
- Teplota a vlhkost atmosféry
- Vzdálenost objektu

**IR kamera FLIR P660 - technické parametry**

- Výrobce: FLIR System
- Germaniový objektiv 40 mm a makroobjektiv  $f = 76.5$  mm
- Detektor – mikrobolometr, rozlišení: 640 x 480 pixelů
- Teplotní rozsah - 40 až 120 °C
- 8x digitální zoom
- 1 GB SD karta

**Detektor-mikrobolometr**

**Úkol 1.****Vliv kyseliny abscisové na rychlost transpirace a teplotu listu slunečnice (*Helianthus annuus*)**

- 1) 2 listy (slunečnice) odřízneme pod vodou (tj. aby řapík zůstal ponořený pod vodou), umístíme do Ehrlenmayerových baněk s čistou vodou. Hladinu převrstvíme olejem, abychom zamezili vypařování vody, nebo baňku zakryjeme parafilmem. Obě baňky s listy postavíme pod světelný panel.
- 2) Obě baňky zvážíme. Výchozí hodnoty si zapíšeme do připravené tabulky. Uložíme si do kamery IR snímek, případně obrázek uspořádání pokusu. Po 10 minutách znovu zvážíme a uložíme další IR snímek, počkáme až se na světle průduchy otevřou, měli bychom mít dva listy se srovnatelnou teplotou.
- 3) Do jedné z baněk přidáme tolik zásobního roztoku kyseliny abscisové- ABA ( $10^{-1}M$ ), aby výsledná koncentrace roztoku byla  $2 \cdot 10^{-5} M$  ABA.
- 4) Opět celé zvážíme a každých 10 minut vážení opakujeme, zjišťujeme úbytek hmotnosti po dobu jedné hodiny ( 5-6 měření). Zapisujeme do tabulky.
- 5) Po každém vážení snímáme a ukládáme infračervené obrazy listů pomocí kamery FLIR P660 , která zobrazuje rozložení teploty na povrchu listu. Na závěr infračervené obrazy vyhodnotíme pomocí softwaru ThermaCAM Reporter 9 Professional. Zvolíme několik bodů na každém listu, zjistíme jejich teploty v průběhu pokusu (porovnáme za sebou jdoucí snímky), průměrné teploty celých listů, zapíšeme do tabulky a výsledky znázorníme v grafu (změna teploty v čase). Nezapomeňte vyznačit okamžik, kdy byla přidána ABA
- 6) Množství vytranspirované vody přepočteme na plochu listu, kterou stanovíme planimetricky (plochy listu překreslené na čtverečkový papír) nebo gravimetricky (překreslené nebo zkopírované plochy listu vystříháme a zvážíme). Vytvoříme si čtverec o známe ploše např. o straně 10 cm z papíru o stejné gramáži). Ten zvážíme. Plochu vypočteme jako  $P=100 b/a$  (a =hmotnost čtverce o ploše  $100 \text{ cm}^2$ , b= hmotnost kopie listu). Plochu listu lze určit i pomocí analyzátoru obrazu nebo listy naskenovat, obrázky uložit a plochu určit pomocí vhodného programu pro analýzu obrazu např. Image J.
- 7) Průměrnou rychlost transpirace vypočteme z rozdílu (úbytku vody) vždy ve dvou po sobě následujících váženích a vyjádříme v obvyklých hodnotách ( $\text{mmol} (\text{H}_2\text{O}) \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).
- 8) Porovnáme rychlost transpirace s teplotou listů měřenou pomocí IR kamery ( ve  $^{\circ}\text{C}$ ) v průběhu pokusu. Výsledky a závěry z obou měření uvedeme do protokolu formou tabulky a grafu.

**Měření IR kamerou:**

1. Nabití a vložení baterie.
2. Zapnutí kamery
3. Nastavení parametrů
4. Zaostření na objekt
5. Snímání IR obrazů a fotografií objektů
6. Prohlížení obrázků na LCD
7. Přenesení obrázků do počítače
8. Vyhodnocení- body, objekty- stanovení teploty
9. Vytvoření jednoduché zprávy pomocí software Therma Cam Reporter 9.0 v Microsoft Word.
10. Přenesení dat do Excelu, teplotní grafy

**Úkol 2.****Stanovení rychlosti transpirace na odříznutých listech ječmene (Ivanovova metoda), vliv sucha.**

Odřízneme po 1 listu z každé varianty ječmene (2 odrůdy- Jersey ( citlivá k suchu) a Tadmor (odolná k suchu), varianty kontrolní a stresované suchem) a zjišťujeme pokles jeho hmotnosti v pravidelných 3 min intervalech (Ivanovova metoda)- zpočátku, později v 10 min intervalech- po dobu 1 hodiny, zapisujeme do tabulky, plochu listů určíme jako v předcházející úloze planimetricky či

gravimetricky. Vypočteme vývoj průměrné rychlosti transpirace (v  $\text{mmol (H}_2\text{O) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), a vyneseme do spojnicového grafu.

Je rozdíl mezi oběma odrůdami a mezi kontrolními a suchem stresovanými rostlinami?

### Úkol 3.

#### Mikroreliefová (otisková) metoda pozorování průduchů.

Na konci předcházejících pokusů otiskneme povrch obou stran listů (slunečnice a ječmene) do bezbarvého laku na nehty.

Na povrch listu z obou stran nanese jemnou vrstvičku bezbarvého laku na nehty a necháme dobře zaschnout. Zaslou plošku přelepíme bezbarvou izolepou, dobře palcem přitlačíme a pinzetou stáhneme. Otisk přilepíme spolu s izolepou na označené podložní sklo, opět dobře přitlačíme. Pozorujeme tvar a uspořádání průduchů mikroskopicky, zvlášť na adaxiální a abaxiální straně listu.

Do protokolu přiložíme obrázky povrchu listů slunečnice a ječmene (náčrty nebo fotografie). Povrchy různých listů in vivo můžeme pozorovat také pomocí USB mikroskopu Fonolite nebo se pokusit stáhnout si epidermis z abaxiální strany listu.

Zapišeme, jak se liší průduchy u rostlin jednoděložných a dvouděložných? Liší se počet průduchů na jednotlivých stranách listu?

#### Do protokolu:

#### Uveďte výsledky a interpretaci měření z úloh 1 a 2, obrázky z úlohy 3.

1. Vyneseme časový průběh rychlosti transpirace do spojnicového grafu (osa x - časový interval [min], osa y - rychlost transpirace jednotlivých druhů [ $\text{mmol (H}_2\text{O) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ]), a to pro všechny varianty (kontrolní list a list s ABAou pro slunečnici- úloha 1, obě odrůdy ječmene dobře zásobené vodou a stresované suchem- 4 křivky- úloha 2).
2. Porovnáme zjištěné rozdíly v rychlosti transpirace. Jaký má vliv aplikace kys. abscisové na transpiraci a otevřenost průduchů? Jaký je vliv nedostatku vody za sucha na list a na celou rostlinu?
3. Jak se mění teplota listu? Vyneseme změny teplot listů do spojnicového grafu časové závislosti. O čem svědčí změny teploty listu a jaké jsou důsledky pro rostlinu?
4. Porovnejte uspořádání, tvar, počty a velikosti průduchů u rostlin dvouděložných (slunečnice) a jednoděložných (ječmen). Co jsou rostliny amfistomatické a hypostomatické.

#### K případnému dalšímu studiu:

#### Výpočet parametru $I_G$ (Jones et al.2002), proporcionálního k listové vodivosti pro vodní páru $g_{lw}$ .

#### Postup:

Listová růžice Arabidopsis thaliana pěstovaná v hydroponii (v Hoaglandově roztoku), teplota listů je snímána IR kamerou, 1 list je zvlhčen vodou – jeho teplota je  $T_{wet}$ - vlhká referenční plocha, jiný natřen vazelínou- netranspirující povrch-  $T_{dry}$ - suchá referenční plocha, nativní listy mají teplotu  $T_1$ .

$$I_G = (T_{dry} - T_1) / (T_1 - T_{wet}) = g_{lw} (r_{aw} + (s/\gamma)r_{HR})$$

$g_{lw}$ = vodivost listu pro vodu

$r_{aw}$ = odpor hraniční vrstvy pro vodní páru

$r_{HR}$ = paralelní odpor pro teplo a přenos záření

$\gamma$ = psychrometrická konstanta

s= sklon přímky závislosti nasyceného tlaku vodní páry na teplotě

Výpočet hodnot  $I_G$  pro neovlivněné listy a listy ovlivněné ABA (aplikace na list).

#### Literatura:

Jones H.G., Stoll M., Santos T., de Sousa C., Chaves M.M., Grant O.M. (2002) Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. Journal of Experimental Botany: 53(378), 2249-2260.