

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

Úvod - teorie.

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

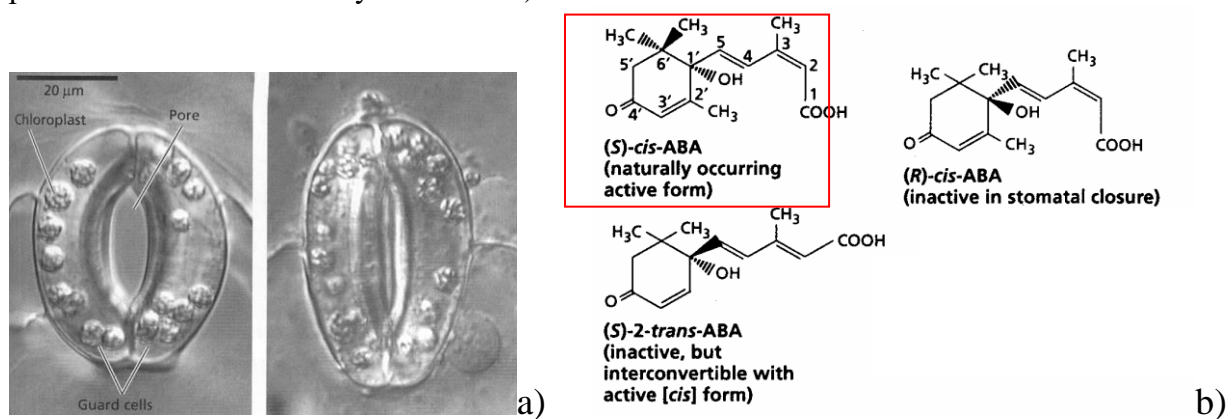
Regulace vodního režimu rostliny je asi nejdůležitější funkcí kyseliny abscisové (ABA). Při nedostatku vody v půdě stoupá biosyntéza ABA v kořenech a zvyšuje se její transport xylémem do nadzemních částí rostliny. Příjemcem signálu o nedostatku vody v rostlině a o nutnosti omezit její výdej jsou svěrací 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 CO₂, 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 odříznutí 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 hydrospasivně 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

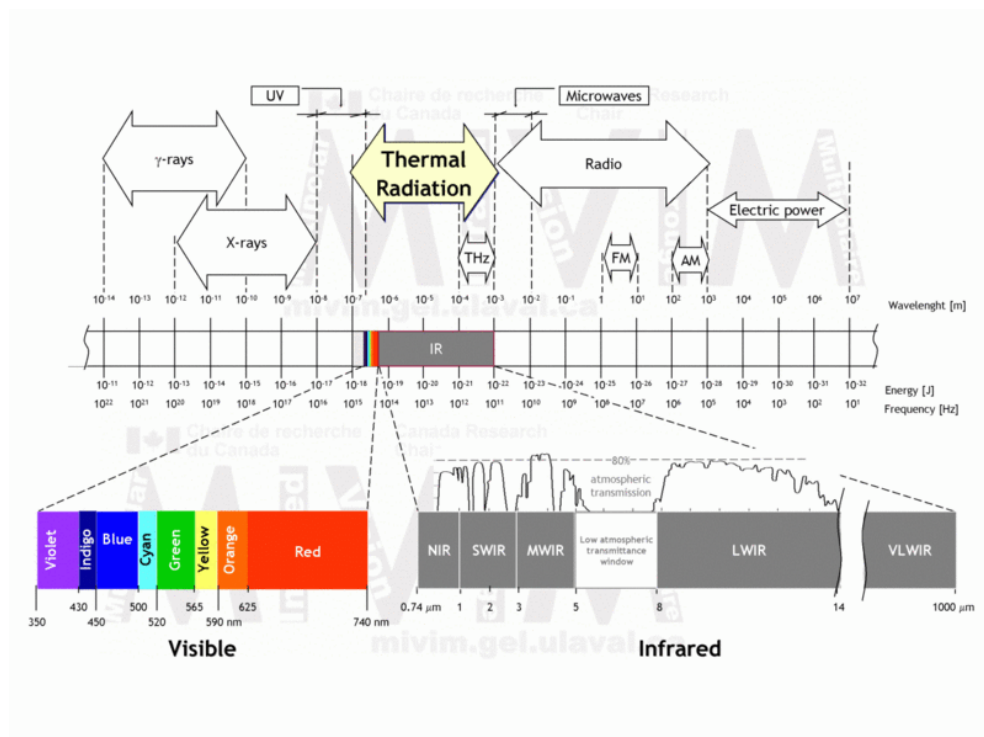
1880-Langley- bolometr

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

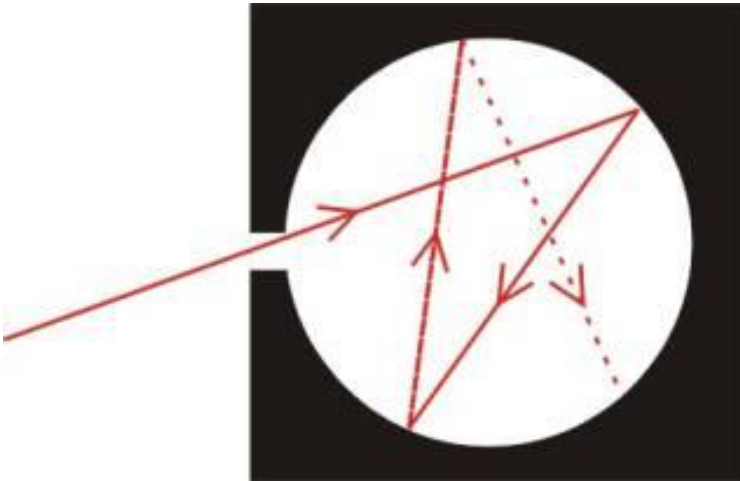
Co to vlastně měříme?



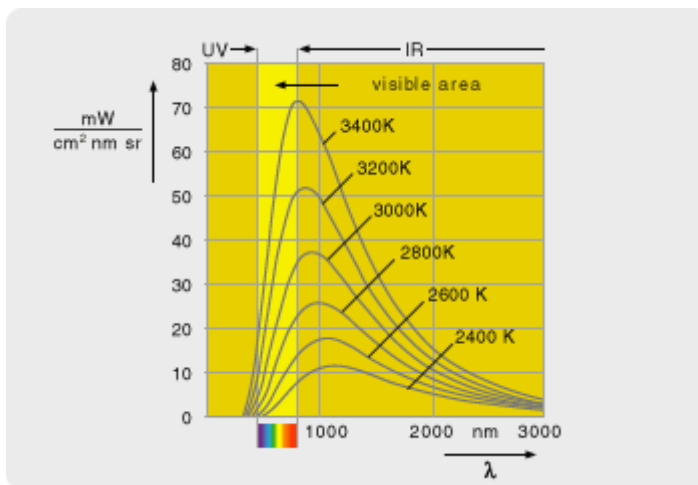
Vlnové délky se obvykle pohybují v infračervené oblasti spektra v intervalech od 10000 Å (1 μm-1000 nm) do 0,1mm-100μm..

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 °C
- Tělesa „studená“ – nízká vnitřní energie – vyzáří se nízkoenergetické záření (IR)



Max Planck



Spektrální hustota vyzářování

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

Wienův posunovací zákon

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

Stefanův-Boltzmannův zákon intenzita vyzářování (šedé těleso)

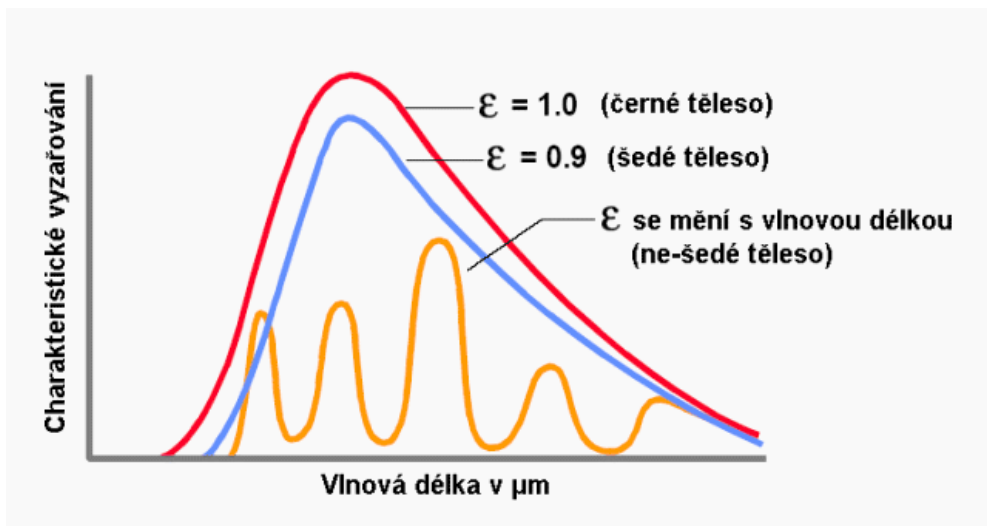
$$I = \varepsilon \sigma T^4 \quad (\text{W m}^2)$$

ε = emisivita

σ = Stefan-Boltzmannova konstanta

Emisivita ε

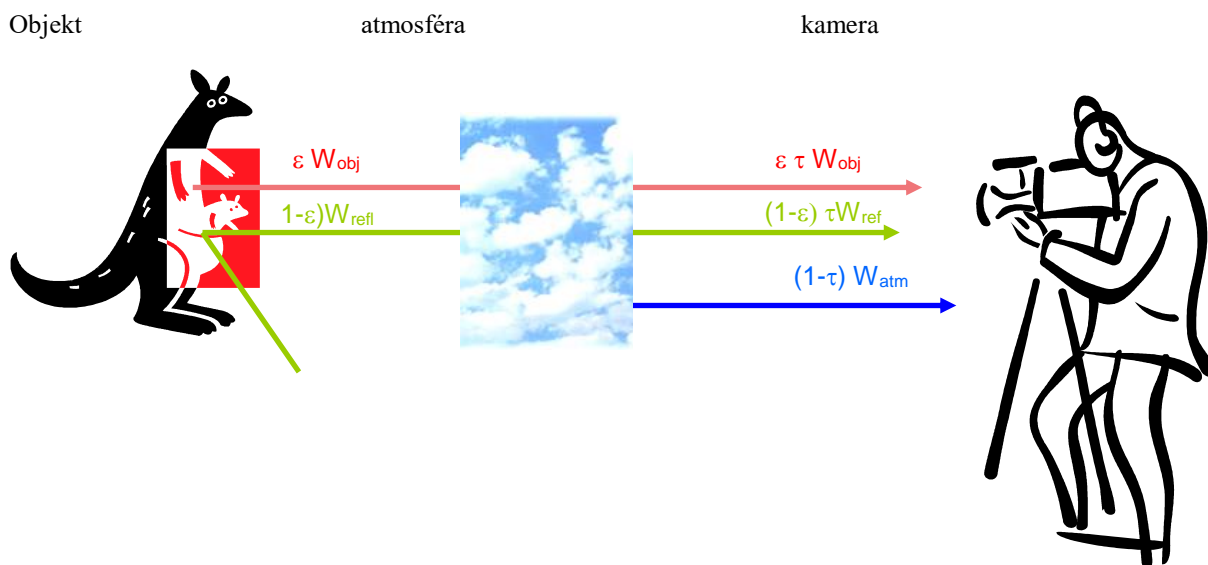
- Schopnost látek vyzářovat elektromagnetické záření
- Poměr energie vyzářované objektem při jeho dané teplotě k energii vyzářované černým tělesem při stejné teplotě, nabývá tedy hodnot 0.0 – 1.0
- Emisivita závisí na vlnové délce, teplotě a stavu povrchu měřeného tělesa



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

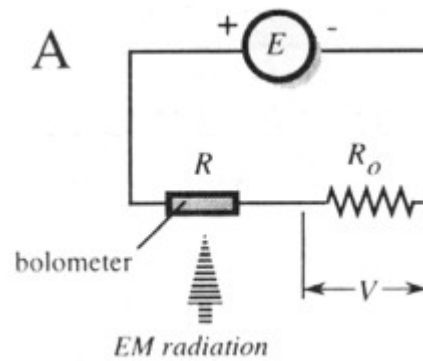
Záření skutečně snímané kamerou

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*) a ukázka vlivu sucha na listu ječmene (*Hordeum vulgare*).**

- 1) Zde pro urychlení procesu měření použijeme namísto intaktní rostliny pouze 2 listy slunečnice. Odřízneme je pod vodou (tj. aby řapík zůstal ponořený pod vodou), aby nedošlo k přerušení vodivých drah kavitací a umístíme je do Ehrlenmayerových baněk s čistou vodou. Každou baňku zakryjeme parafilmem (nebo můžeme hladinu převstvit olejem) abychom zamezili vypařování vody z povrchu. Obě baňky s listy postavíme pod světelný panel.
- 2) Vážíme celé baňky s listy. 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 (zvýší se transpirace a sníží teplota listů), měli bychom mít dva listy se srovnatelnou teplotou a podobnou rychlostí transpirace.
- 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. Ukážeme si, jak lze stanovit plochu listu. Je několik možností: planimetricky (plochy listu překreslíme na čtverečkový papír) nebo gravimetricky (překreslené nebo zkopírované plochy listu vystříhneme a zvážíme). Vytvoříme si čtverec o známe ploše např. o straně 10 cm (plocha 100 cm^2 z papíru o stejné gramáži). Vše zvážíme. Plochu vypočteme jako $P=100 \text{ b/a}$ (a = hmotnost čtverce o ploše 100 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 ($\text{mmol (H}_2\text{O) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).
- 8) Porovnáme rychlost transpirace s teplotou listů měřenou pomocí IR kamery (ve $^{\circ}\text{C}$) v průběhu pokusu.
- 9) Změříme IR kamerou teploty listů ječmene dobře zalévaného a stresovaného suchem a výsledky porovnáme.

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 softwaru Therma Cam Reporter 9.0 v Microsoft Word.
10. Přenesení dat do Excelu, teplotní grafy

Úkol 2.**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, zvláště na adaxiální a abaxiální straně listu.

Povrchy různých listů in vivo můžeme pozorovat také pomocí USB mikroskopu Fonolite nebo se pokusit stáhnout epidermis z abaxiální strany listu podeňky (Tradescantia).

Jak se liší průduchy u rostlin jednoděložných a dvouděložných? Liší se počet průduchů na jednotlivých stranách listu? Co je adaxiální a co abaxiální strana listu, jak se liší hypostomatické a amfistomatické listy?

Otázky, o nichž budeme přemýšlet a které byste měli být schopni zodpovědět po absolvování úlohy.

1. Co je transpirace a jak lze rychlost transpirace měřit? Spočítat rychlost transpirace [$\text{mmol}(\text{H}_2\text{O}) \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], určené gravimetricky a srovnat rozdíl mezi kontrolním listem a listem ovlivněným ABAou
2. Jak souvisí aplikace kyseliny abscisové (ABA) se suchem? Jaký je mechanismus otvírání a zavírání průduchů, jak je řízeno, jak souvisí se světlem a dalšími faktory vnějšího prostředí, jimž jsou rostliny vystaveny? Jaký je vliv nedostatku vody za sucha na list a na celou rostlinu?
3. Jak se mění teplota listu po aplikaci ABA a jak ji lze změřit? O čem svědčí změny teploty listu, jak s transpirací a suchem souvisí a jaké jsou důsledky zavření průduchů a zvýšení teploty pro rostlinu?
4. Srovnat 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

γ = 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.