

Měření vodního potenciálu listů tlakovou bombou, stanovení osmotického potenciálu a modulu elasticity

Pro přežití jedince a druhu je důležité, aby si rostlina zachovala pozitivní tlak v buňkách – turgor. Jen tehdy totiž mohou buňky růst (zvětšovat plochu buněčných stěn a svůj objem). Rychlejší růst obvykle znamená více asimilátů v budoucnu, větší konkurenční schopnost a evoluční úspěch. Proto se vyvinuly fyziologické mechanismy jak turgor udržet (turgor maintenance). Jsou v podstatě dva hlavní. Fyzikální, založený na regulaci elasticity buněčné stěny, a biochemický – osmotické přizpůsobení (osmotic adjustment). Jak fungují?

Elasticita buněčných stěn

Představte si, že máte nafukovací balónek, který napouštíte vodou. Půjde to snadno, protože má pružné stěny a při vypuštění určitého objemu vody se vnitřní tlak zmenší jenom málo, balónek bude pořád pod tlakem. Pokud byste ale napumpovali vodou kopací míč, úbytek jen malého objemu vody by znamenal značný pokles tlaku v míči, protože kopačák má velmi pevné stěny. Stejně to funguje u rostlinných buněk. Buňka, která má elastické stěny, může ztratit relativně dost vody, aniž by to znamenalo ztrátu tlaku – turgoru. Pokud jsou buněčné stěny pevné, ztráta i relativně malého množství vody může vést k vadnutí, ztrátě turgoru. Více elastické stěny by se hodily rostlině, pokud žije v prostředí, kde rychle ztrácí vodu z buněk. Buňka by si tak zachovávala dlouho turgor a mohla růst i při deficitu vody. To se skutečně děje když např. mezofytní rostlina není dlouho zalita. Její stěny se stávají během té doby stále více elastické. Mechanismus „zelaštění“ je v přerušení vodíkových vazeb mezi celulózními mikrofibrilami. Velmi elastické jsou i stěny vodního pletiva CAM rostlin – sukulentů. Jinou evoluční strategii použily xerofytní rostliny. Buněčné stěny jejich listového pletiva naopak bývají rigidní (viz dále). Elasticita se ve fyzice měří a vyjadřuje pomocí tzv. modulu elasticity (ϵ) a v našem případě vyjadřuje změnu tlaku buněčných stěn (turgoru) na jednotku objemu buňky (buněčné vody). Čím větší je modul elasticity, tím je materiál (buněčná stěna) více rigidní čili méně pružný.

Osmotické přizpůsobení

Rostlina vystavená suchu nebo mrazu, tedy ztrátám kapalné vody z cytoplasmu, reaguje tím, že spustí syntézu osmoticky aktivních látek. Např. cukrů – hexózu ze škrobu, aminokyselin – prolinu. Roztoky osmoticky aktivních látek totiž mrznou při nižší teplotě než voda (proto se silnice v zimě solí). Tyto látky (osmoprotektanty, kryoprotektanty) sníží (v záporné hodnotě) osmotický potenciál cytoplasmu, a tím zvětší rozdíl vodního potenciálu proti vnějšímu prostředí buňky, tj. apoplastu, xylému a půdě. Tak se stane, že buňka může nasávat vodu z vnějšku větší silou. Rostlina (buňka) tak může nasát z půdy i vodu, která je zde vázána (má nízký vodní potenciál) a jinak by byla nedostupná. O schopnosti osmotického přizpůsobení informuje hodnota osmotického potenciálu buňky nebo tkáně Ψ_{π} při ztrátě tj. nulové hodnotě turgoru ($\Psi_{\pi(p=0)}$) nebo při plném nasycení tj. maximálním turgoru ($\Psi_{\pi(max)}$). Čím je zápornější osmotický potenciál při ztrátě turgoru, tím aktivnější má rostlina mechanismus osmotického přizpůsobení (tím účinněji se dokáže bránit suchu syntézou osmoticky aktivních látek a jejich hromaděním v cytoplasmě), dokáže tak využít půdní vodu vázanou o to zápornějším vodním potenciálem.

Přehled veličin, používaných jednotek a obvyklých/možných hodnot

Ψ [psí]	vodní potenciál (MPa, [0; $-\infty$], $\Psi = 0$ ve vodou plně nasycených pletivech)
Ψ_{π}	osmotický potenciál (MPa, [0; $-\infty$])
Ψ_p	tlakový potenciál (turgor, MPa, [0; jednotky MPa])
$\Psi_{\pi(p=0)}$	osmotický potenciál v bodě ztráty turgoru (jednotky MPa)
$\Psi_{\pi(\max)}$	osmotický potenciál při plném turgoru (kdy $\Psi = 0$, tj. maximální; jednotky MPa)
RWC	relativní obsah vody [0; 1]. RWC = 1 (100%) při $\Psi_p = \max$; RWC = 0 v sušině)
RWC _{p=0}	relativní obsah vody při ztrátě turgoru
ε [epsilon]	modul elasticity (jednotky až desítky MPa), vyjadřuje směrnici poklesu turgoru ($\delta\Psi_p / \delta RWC$) při plném nasycení
$1 \text{ MPa} = 1 \text{ MN m}^{-2} = 10 \text{ bar} = 9.869 \text{ atm} = 7501 \text{ Torr (mm Hg)} = 145 \text{ psi (pounds / sq. inch)}$	

Zjednodušeně, vztah mezi vodním, osmotickým a tlakovým potenciálem je následující:

$$\Psi = \Psi_{\pi} + \Psi_p$$

Na příkladu s balónkem to lze vysvětlit tak, že osmotický potenciál je tlak, kterým balónek nafukujete (tlak, jakým se voda tlačí do buňky, aby rozředila buněčný roztok). Tlakový potenciál je tlak plynu v balónku (tlak vody v buňce – turgor), jaký napíná stěnu balónku/buňky. Turgor působí proti Ψ_{π} , proto mají opačná znaménka. Při plném nasycení vodou je celkový Ψ buňky nulový (buňka je plně turgidní), voda z ní nevytéká (neodpařuje se) a tedy do ní ani nevstupuje. Podle konvence je Ψ (Ψ_{π}) destilované vody roven nule. Dojde-li ke ztrátě vody z buňky, Ψ klesá, a to proto, že klesá jednak turgor (rostlina vadne) i Ψ_{π} (buněčný roztok se zahušťuje). Když rostlina zvadne, zcela ztratí turgor a $\Psi = \Psi_{\pi}$.

Postup

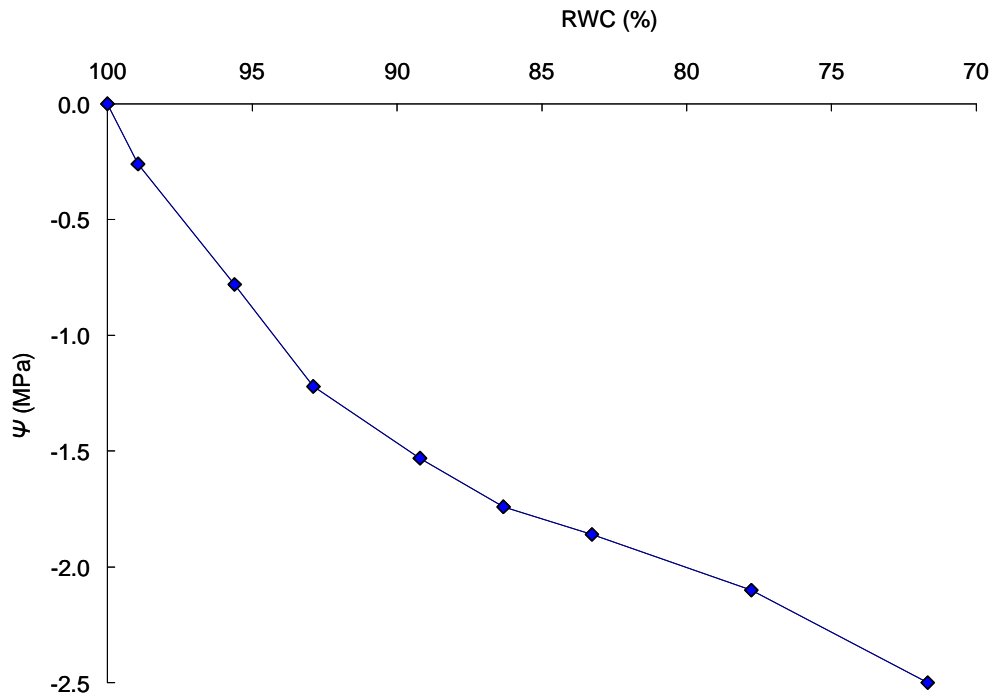
Budete opakovaně měřit vodní potenciál (Ψ) uříznuté větvičky nebo listu v průběhu jejího vadnutí a současně stanovovat váhový úbytek vody. Listy nebo větvičky byly před měřením alespoň 2 hodiny ve tmě ponořeny stonkem/řapíkem ve vodě aby se dosytily. Vodní potenciál se měří pomocí Schollanderovy tlakové bomby, úbytek hmotnosti vody na analytických vahách.

Princip Schollanderovy bomby je následující: do tlakového válce vzduchotěsně uzavřete list/větvičku tak, že vyčnívá jen řapík/báze větvičky. Když ve válci zvyšujete tlak plynu připoústěním např. dusíku z tlakové láhve, tlak plynu působí proti turgoru buněk a vytlačuje vodu do apoplastu buněčných stěn a zpět do xylému. V okamžiku, kdy dosáhnete takového tlaku, který odpovídá aktuálnímu vodnímu potenciálu listu, na řezu řapíkem/větvičkou, která vyčnívá z komory, se objeví kapička „vody“. V ten okamžik přestanete tlak zvyšovat a zaznamenáte jeho hodnotu. Plyn z válce vypustíte a ihned na to list/větvičku zvážíte, abyste vztáhli hodnotu naměřeného vodního potenciálu k aktuálnímu objemu vody v listech. List/větvičku necháte chvíli vysychat a postup opakujete. Naměřená hodnota tlaku v bombě odpovídá opačné hodnotě vodního potenciálu listu.

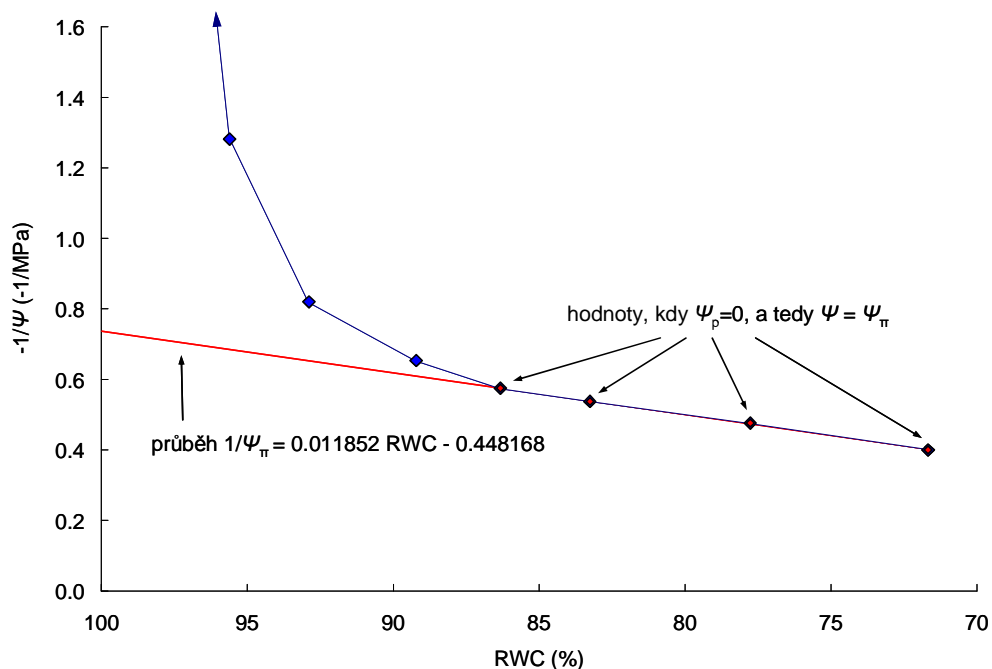
Z naměřených dat sestrojíte tzv. P - V křivku (P jako *pressure*, čili vodní potenciál vyneseny proti V jako *volume*, čili objemu vody v listu) – viz Obr. 2. Z P - V křivky odvodíte průběh osmotického potenciálu a turgoru během vysýchání listu a vypočtete hodnoty:

- (i) modulu elasticity (ε) při plném nasycení
- (ii) osmotického potenciálu listové tkáně při plném nasycení ($\Psi_{\pi(\max)}$)
- (iii) osmotického potenciálu při ztrátě turgoru ($\Psi_{\pi(p=0)}$)
- (iv) RWC při ztrátě turgoru (RWC_{p=0}).

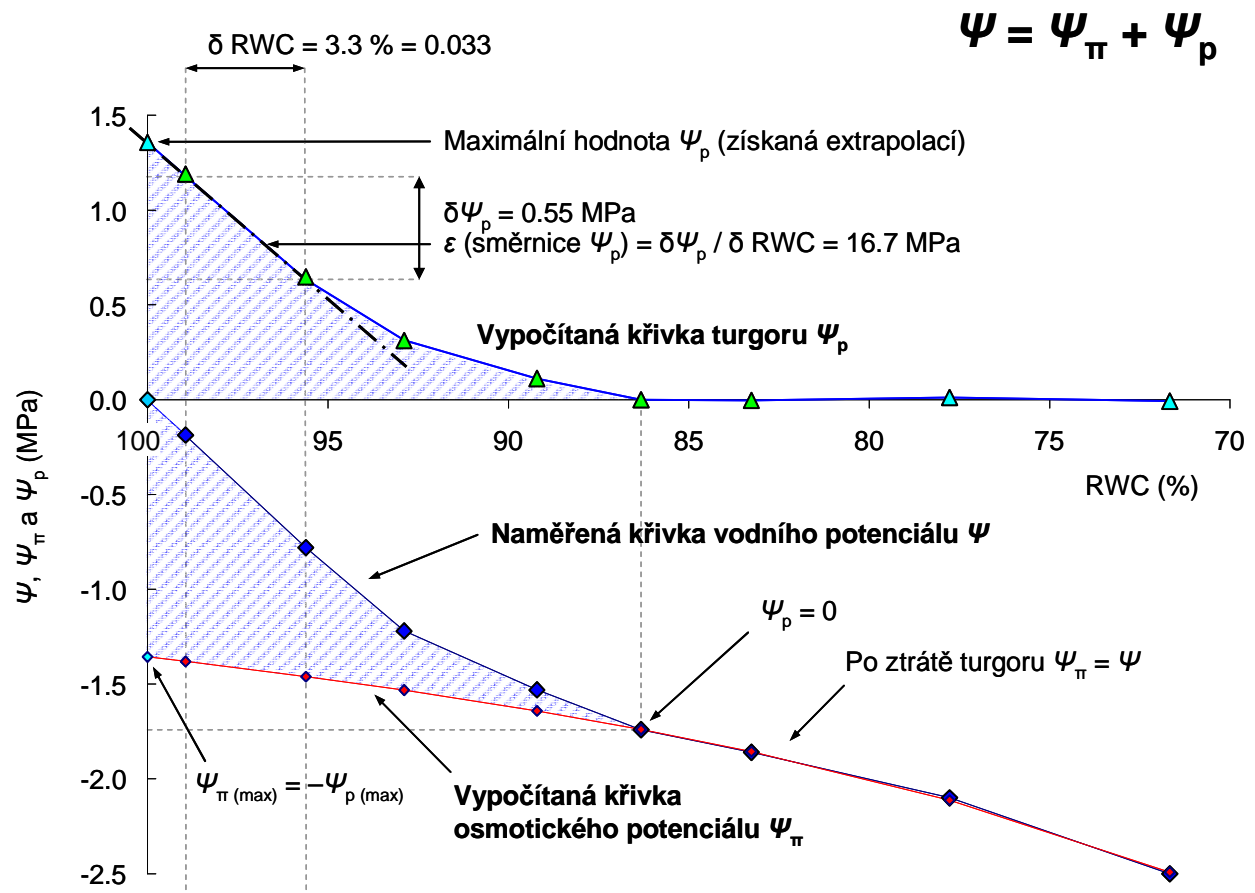
Všechny tyto parametry lze pak vyčíst a pochopit z grafu na Obr. 3.



Obr. 1. Vynesené hodnoty naměřeného vodního potenciálu (Ψ) v závislosti na relativním obsahu vody (RWC). Na první pohled tento graf nic neříká, proto abychom rozlišili osmotickou a tlakovou složku Ψ , vyneseme si jej jako převrácenou opačnou hodnotu ($-1/\Psi$) – viz. Obr. 2. Místo RWC budete zpočátku pracovat s hmotností větévky/listu a RWC se dopočítá později po stanovení sušiny listových čepelí.



Obr. 2. P - V diagram, ze kterého již lze rozlišit tlakovou složku (turgor, Ψ_p) a osmotickou složku vodního potenciálu (Ψ_π)., který má v diagramu lineární průběh. Extrapolací této lineární fáze P - V diagramu lze stanovit Ψ_π při plném turgoru. Pro názornost si vyneseme průběh Ψ a Ψ_π v nepřevrácených hodnotách (Obr. 3).



Obr. 3. Graf, který přehledně vynáší obě složky vodního potenciálu – turgor a osmotický potenciál. Osmotický potenciál má hyperbolický průběh – při nulovém obsahu vody je nekonečně velký (v záporné hodnotě). Proto jsme si jej v Obr. 2 linearizovali funkcí $1/\Psi_{\pi}$. Hodnoty modulu elasticity a Ψ_{π} , při plném turgoru a v bodě ztráty turgoru vypovídají o tom, jak je rostlina adaptována/aklimatizována na dostupnost vody v prostředí, ve kterém roste.

Hodnoty parametrů porovnáte a interpretujete rozdíly pro měřené druhy. Důležitá poznámka: mějte na paměti, že nebudete při svých měřeních znát RWC, protože to budete moci dopočítat a po zjištění suché hmotnosti vašich listů/větviček. Budete tedy nejdříve vynášet na ose x hmotnost listů/větviček a až (ode mne) získáte údaje o RWC, hodnoty přepočítáte (týká se zejména modulu elasticity). Další upozornění, počítejte s RWC nikoli v procentech, ale absolutních číslech (mezi 0 a 1), jedině tak získáte smysluplné hodnoty modulu elasticity.

Požadavky na protokol

Abychom se vyhnuli vzájemnému nekonečnému posílání protokolů ke mně ke schválení a vám zpět k opravě, tak jsem přistoupil k tomu, že definuji základní požadavky, bez jejichž splnění se nebudu protokolem zabývat. Ušetříme si tak spolu spoustu času (jasně, hlavně vy mě, ale většina požadavků na úpravu má obecně platný charakter, takže je mějte na paměti při psaní ostatních protokolů, diplomek atd.).

- Protokol musí obsahovat jméno autora, kód skupiny a název úlohy (na titulní stránce), stránky budou číslovány.
- Všechny veličiny budou mít jednotku. Veličina $-1/\Psi$ bude mít jednotku $-1/\text{MPa}$ a modul elasticity MPa.
- Hodnoty budou prezentovány s přesností na max. 4 platné číslice (jinak 3 bohatě stačí!), osy grafů na max. 2 platné číslice.
- Součástí odevzdaného protokolu budou grafy podle Obr. 2 a 3. Princip $P-V$ diagramu bude někde vysvětlen.
- V grafech nebudou chybět popisky os s jednotkami, u každého grafu bude vysvětlení, co zobrazuje, včetně vložených lineárních regresí.
- Všechny čtyři požadované parametry naměřené u všech druhů budou shrnuty do jediné přehledné tabulky.
- V závěru bude shrnutí a nějaká interpretace výsledků, nikoli výčet naměřených hodnot, ty jsou v té výše zmíněné tabulce.
- Protože pravidla hry požadují odevzdávání protokolů samostatně pro každého ze skupiny, protokoly nebudou – alespoň na první pohled – totožné.
- Protokol bude psán dobrou češtinou na úrovni maturanta (jednotná osoba, shoda podmětu s přísudkem... dyslektici mají slevu), případně srozumitelnou angličtinou.