STANOVENÍ VODNÍHO POTENCIÁLU REFRAKTOMETRICKY

VODNÍ POTENCIÁL A JEHO SLOŽKY

Termodynamický stav vody v buňce můžeme porovnávat se stavem čisté vody a rozdíl těchto stavů můžeme vyjádřit v jednotkách potenciální energie a charkterizovat veličinou zvanou **vodní potenciál**. Vodní potenciál (Ψ_ω) vyjadřuje celkovou specifickou volnou energii vody vztaženou k celkové specifické volné energii chemicky čisté vody v systému půda - rostlina - atmosféra. V rostlinné buňce má - zápornou hodnotu, protože je menší než vodní potenciál chemicky čisté vody. (Jinak řečeno je to rozdíl specifické Gibbsovy energie vody v buňce a specifické Gibbsovy energie čisté vody).

$$\Psi_\omega = \Psi_s + \Psi_m + \Psi_p \qquad [Pa]$$

Ψ_s = osmotický potenciál
Ψ_m = matriční potenciál
Ψ_p = tlakový potenciál

Osmotický potenciál je analogický osmotickému tlaku, v rostlinné buňce je však obvykle negativní, protože chemicky čistá voda má osmotický potenciál nulový. Osmotický tlak je tlak, který při izotermických podmínkách zabraňuje difůzi molekul rozpouštědla (např. čistá voda) přes semipermeabilní membránu do roztoku (např. roztok sacharózy).

Tlakový potenciál je turgorový (hydrostatický) tlak buněčné stěny, je větší než atmosférický tlak a proto jeho hodnoty jsou zpravidla + pozitivní (negativní hodnoty může mít např. v cévách). Je tím větší čím více je buňka rozpínána tlakem vakuoly a čím více se buněčná stěna blíží stavu maximální napjatosti (turgidity).

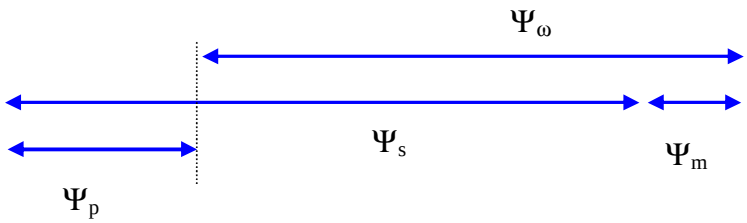
Matriční potenciál představuje složku specificky volné energie vody v koloidních a micelárních strukturách buněčných stěn a v koloidním systému cytoplazmy. Má - negativní hodnotu, protože obsah vody v matrici je vždy menší než ve vodě.

PŘÍJEM A PŘEMISŤOVÁNÍ VODY V BUŇCE

Vodní potenciál určuje o kolik je "aktivita" vody v buňce nižší než aktivita čisté vody. Jeho hodnota se mění během dne, v poledne se snižuje, později se zvyšuje. Buňky mladých listů mají vyšší vodní potenciál než buňky v listech plně asimilujících.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

"Aktivita" vody v buňce je snížena výše uvedenými složkami vodního potenciálu následovně:



Z fyzikálního hlediska představuje vodní potenciál hnací sílu příjmu a transportu vody. Vzhledem k tomu, že vodní potenciál protoplastu je nižší než vodní potenciál buněčných stěn, dochází k transportu vody ze stěny do protoplastu a následně do vakuoly. Na úrovni buňky a protoplastu se vodní potenciál mění v souvislosti s osmotickými jevy.

Tabulka změn veličin Y_w, Y_s, Y_p, objemu buňky a protoplastu buněk v různém hydratačním stavu

hydratace buňky	plazmolyzovaná buňka	hraniční plazmolýza	normální stav	plné nasycení
Y_w	maximální	= osmotickému	–	= 0
Y_s	maximální	–	–	minimální
Y_p	= 0	= 0	+	maximální
objem buňky	1	1	>1	>1
objem protoplastu	<1	1	>1	>1

VÝZNAM VODNÍHO POTENCIÁLU PRO ŽIVOT ROSTLIN

Pasivní transport vody z půdy do kořenů rostlin je určen gradientem (spádem, gradient - rozdíl na jednotku vzdálenosti) vodního potenciálu, přičemž dochází k toku vody z míst s vyšší hodnotou Ψ_ω (méně negativnější) do míst s nižší hodnotou Ψ_ω (více negativnější). Obdobně je tomu při radiálním pronikání vody kořenem, kdy jednotlivé vrstvy buněk snižují vodní potenciál až k endodermis, ve které se uplatňuje transport aktivní v důsledku náhlé změny (zvýšení) vodního potenciálu, tzv. **endodermálnímu skoku**, zajišťujícímu nemožnost zpětného toku vody z kořene do půdy, zvláště za podmínek sucha.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Vodní potenciál v buňkách primární kůry kořene

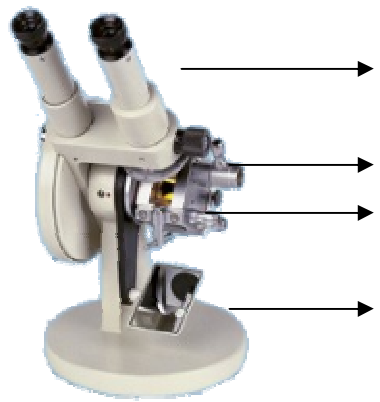
- buňka rhizodermis - 9 . 10^4 Pa
-1. buňka kor. parenchymu - 13 . 10^4 Pa
-3. buňka kor. parenchymu - 20 . 10^4 Pa
- 5 buňka kor. parenchymu - 32 . 10^4 Pa
- 7 buňka kor. parenchymu - 42 . 10^4 Pa
- buňka endodermis - 13 . 10^4 Pa

Hodnota vodního potenciálu určuje míru stresu rostlin vyvolanou suchem (tj. nedostupností vody). Při poklesu vodního potenciálu půdy musí klesat i vodní potenciál rostliny. Je-li vodní potenciál rostliny vyšší než půdy nemůže rostlina vodu přijímat. Na tento stav jsou citlivé procesy tvorby buněčné stěny, růstu, snižuje se turgor. Turgor zajišťuje mechanickou podporu těla rostlin, některé pohyby typu nastií. Obranný mechanismus k udržení turgoru představuje hromadění asimilátů v buňkách, což pak vede ke zvýšení turgoru prostřednictvím extrakce vody z okolních pletiv. U dobře zavlažovaných rostlin se hodnoty vodního potenciálu pohybují v rozmezí -0,2 až -0,6 MPa.

STANOVENÍ Ψ_ω REFRAKTOMETRICKY

Principem refraktometrického stanovení vodního potenciálu je zjištění **změny indexu lomu "n"** roztoku o známé koncentraci po expozici rostlinného pletiva v tomto roztoku. Expozice pletiva v různě koncentrovaných roztocích osmotika vyvolají osmotické vyrovnávání, přičemž roztoky, které jsou vůči pletivu hypotonické index lomu po expozici zvětšují, hypertonické snižují. V roztoku izotonickém nedochází ke změně indexu lomu (nedochází k osmotickému vyrovnávání).

Index lomu je veličina závislá nejenom na vlnové délce dopadajícího světla, tlaku skupenství a jakosti látky, ale také na okolní teplotě a proto musí být refraktometrický přístroj temperován. Dalšími předpoklady úspěšného refraktometrického stanovení vodního potenciálu je vyrovnaný poměr osmotika a pletiva exponovaného v něm. Za referenční hodnotu indexu lomu považujeme hodnotu naměřenou okamžitě po vložení pletiva do osmotika.



okuláry pro odečtení světelného rozhraní vzniklého lomem světla a hodnoty indexu lomu

vstupy pro temperování hranolu
hranol islandského vápence

zrcátko

Stolní Abbeho refraktometr

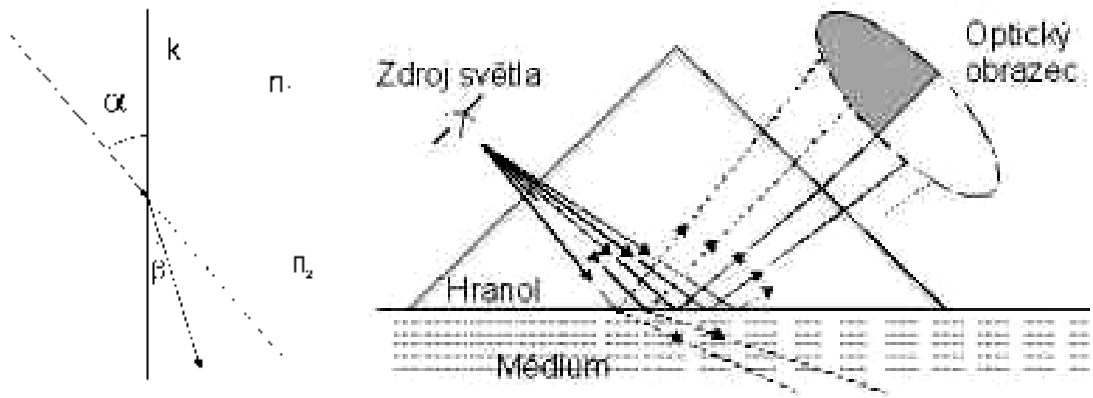
PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Stanovení osmotického potenciálu refraktometricky je obtížnější. Index lomu se měří ze šťávy vylisované z pletiva přes mlynářské hedvábí, neboť příměsi z homogenátu, barviva atd. mohou měření ovlivnit.

SVĚTELNÁ REFRAKCE

Světelná refrakce (lom světla) je odchylka světelného paprsku při průchodu světla z jednoho homogenního prostředí do druhého od původního směru (dráhy) světelného paprsku. Část světla se odráží, část prochází („láme se“). Při přechodu světla z prostředí opticky řidšího (n_1 – kapalina) do opticky hustšího (n_2 – hranol islandského vápence) se paprsek láme ke kolmici optického rozhraní. Podíl rychlostí pohybu paprsku v těchto dvou prostředích vyjadřuje Snellův zákon (index lomu).

Princip pozorování optického rozhraní při lomu světla hranolem



K refraktometrii se používá kvalitní dvojlomný islandský vápenec jako hranol – lomí jeden paprsek na řádný (ordinarius) a mimořádný (extraordinarius). V zorném poli dalekohledu (okuláru) se pak při zaostření mikrošroubem přístroje dosáhne nastavení obrazce optického rozhraní. Protínáli se toto rozhraní se středem kříže v zorném poli je možno ve druhém okuláru ze stupnice odečítat hodnotu indexu lomu.

VHODNOST REFRAKTOMETRICKÉ METODY

Refraktometrická metoda má nevýhodu v tom, že pro každý materiál se musí optimalizovat její použití. Výhodou je rychlost a jednoduchost měření. Je však používána pro orientační stanovení vodního potenciálu. Možnost opakování měření indexu lomu umožňuje zvýšení přesnosti při odhadu čtvrtého desetinného místa na stupnici indexu lomu zprůměrováním výsledků. Rostlinný materiál musí být čistý, z řezných ploch mohou do inkubačních roztoků přejít látky ovlivňující jeho koncentraci. Proto se doporučuje pro stanovení výchozí hodnoty indexu lomu měřit kapku osmotika po vložení rostlinného mateiálu a rychlém promíchání s inkubačním roztokem.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Praktické provedení úlohy

1. Pracovní postup

1. naředit 1M roztok sacharózy na sadu inkubačních roztoků od 0,05 M do koncentrace 0,65 M po 0,05 M, vždy 50 ml do předem popsaných kádinek (pomocí válečků a pipet)
2. nachystat zkumavky s 1 ml jednotlivých roztoků (popsat koncentraci)
3. korkovrtem vykrájet terčíky z čistých listů bergenie (přechovávat na zvlhčeném filtračním papíře, vhodnější ihned ponořit po 10 terčících do zkumavek do inkubačních roztoků)
4. inkubovat 2 hodiny zkumavky zavřené pryžovou zátkou, občas opatrně zamíchat (pozor - terčíky musí být ponořeny)
5. stanovit referenční hodnotu indexu lomu sacharózy pro danou koncentraci z připravených zásobních inkubačních roztoků (na hranol refraktometru se nanáší skleněnou tyčinkou cca 2 kapky, pipetou 250 – 300 µl), ve třech opakováních pro každou koncentraci
6. po 2 hodinách měřit index lomu inkubovaných roztoků ze zkumavek ve 2 -3 opakováních

2. Práce s refraktometrem

Na dvojlomný hranol se vynese (tyčinkou, pipetou, pastérkou aj.) dostatečné množství inkubačního roztoku a vhodným polohováním hranolu se hranol uzavře tak, že přebytečné množství tekutiny vykape postranním žlábkem.

Pohybem makrošroubu a zrcátka se nastaví průchod světla, při pohledu do okuláru se mikrošroubem nastaví světelné rozhraní. Světelné rozhraní se musí protínat ve středu kříže.

Ve druhém okuláru se za této situace ze stupnice odečítá hodnota indexu lomu, na 4 desetinná místa, čtvrté desetinné místo odhadem. Po té se hranol očistí do sucha, destilkou a nakonec lihem pro dokonalé vysušení hranolu.

! Problémy může způsobit malé množství tekutiny vynesené na hranol (nehomogenní optické prostředí se vzduchovými bublinami), absence krytky hranolu na refraktometru. Dávkovací tyčinku je nezbytné čistit, špičky a pastérky vyměňovat pro nové vzorky.

3. Záznam naměřených hodnot a grafická interpolace

Naměřené výchozí hodnoty indexu lomu a po inkubaci budou zaznamenány do tabulky ve všech opakováních (z těch bude odvozena průměrná hodnota). Bude vyjádřen rozdíl hodnot indexu lomu po a před expozicí pro jednotlivé koncentrace osmotika. Vynesením závislosti tohoto rozdílu na molaritě bude sestavena extrapolační přímka procházející mezi body. Izotonická koncentrace je pak na průsečíku přímky se souřadnicí nulové změny indexu lomu, z abscisy (osa „x“) pak odečteme koncentraci.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Hodnotu vodního potenciálu pak odečteme z tabulky pro osmotický potenciál vodných roztoků sacharózy.

Tabulka pro záznam hodnot změn indexu lomu

	výchozí hodnota			průměr	po inkubaci		průměr	rozdíl
c (mol)	I. měření	II. měř.	III. měř.		I. měření	II. měř.		
0,05								
0,1								
0,15								
0,2								
0,25								
0,3								
0,35								
0,4								
0,45								
0,5								
0,55								
0,6								
0,65								

Osmotický potenciál (- MPa) vodných roztoků sacharózy při 20 °C

mol	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	0,000	0,026	0,053	0,079	0,106	0,132	0,159	0,185	0,211	0,238
0,1	0,264	0,291	0,317	0,343	0,370	0,396	0,422	0,448	0,475	0,501
0,2	0,529	0,557	0,586	0,614	0,642	0,670	0,698	0,727	0,755	0,784
0,3	0,813	0,842	0,871	0,900	0,929	0,958	0,987	1,017	1,048	1,080
0,4	1,111	1,143	1,174	1,206	1,237	1,269	1,301	1,333	1,366	1,399
0,5	1,431	1,464	1,469	1,529	1,564	1,599	1,635	1,671	1,706	1,742
0,6	1,777	1,813	1,850	1,887	1,924	1,961	1,998	2,035	2,072	2,110
0,7	2,149	2,188	2,227	2,265	2,305	2,344	2,384	2,427	2,469	2,511
0,8	2,554	2,596	2,638	2,680	2,720	2,760	2,800	2,840	2,880	2,930
0,9	2,97	3,02	3,07	3,11	3,16	3,21	3,26	3,31	3,36	3,41
1,0	3,46	3,51	3,57	3,62	3,67	3,72	3,77	3,82	3,88	3,93

Zpracování výsledků a vypracování protokolu

V protokolu budou zaznamenány referenční a po dvouhodinové expozici naměřené hodnoty indexu lomu, grafická interpolace hodnoty hledané izotonické koncentrace a z tabulky odečtená hodnota osmotického potenciálu izotonického roztoku, která odpovídá vodnímu potenciálu pletiva. Protokol vypracuje každá pracovní dvojce studentů ze svých naměřených výsledků.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz