

LETNÍ ŠKOLA BIOFYZIKY 2024

ZMĚNA FYZIOLOGICKÝCH PARAMETRŮ ROSTLIN PŘI NEDOSTATKU VODY

A. ZADÁNÍ

1. Seznamte se se základními informacemi o působení nedostatku vody na rostliny a s metodami měření vybraných fyziologických parametrů, které se při tomto působení mění.
2. Na kontrolních rostlinách a na rostlinách (listech) stresovaných dlouhodobějším a akutním nedostatkem vody změřte a srovnajte:
 - a. vodní potenciál (psychrometrická a tlaková metoda)
 - b. teplotu (pomocí termokamery)
 - c. optické parametry SPAD a NDVI
 - d. fluorescenční parametr F_V/F_M
3. Diskutujte získané výsledky.

B. ROSTLINNÝ MATERIÁL, PŘÍSTROJE

Modelové rostliny (ječmen, tabák) – kontrolní (nestresované) a stresované (dlouhodoběji – stres suchem, akutní stres – zasychající oddělené listy). Rostliny z venkovního prostředí.

Přístroj HR-33T Dew Point Microvoltmeter a vzorkové komory C-52 (Wescor, USA), tlaková komora PMS 600 (PMS Instrument Company, USA), termokamera (Optris, Německo), chlorofylmetr SPAD (Konica Minolta, Japonsko), PlantPen (PSI, ČR), fluorescenční kamerový systém Fluorcam (PSI, ČR), LED panel.

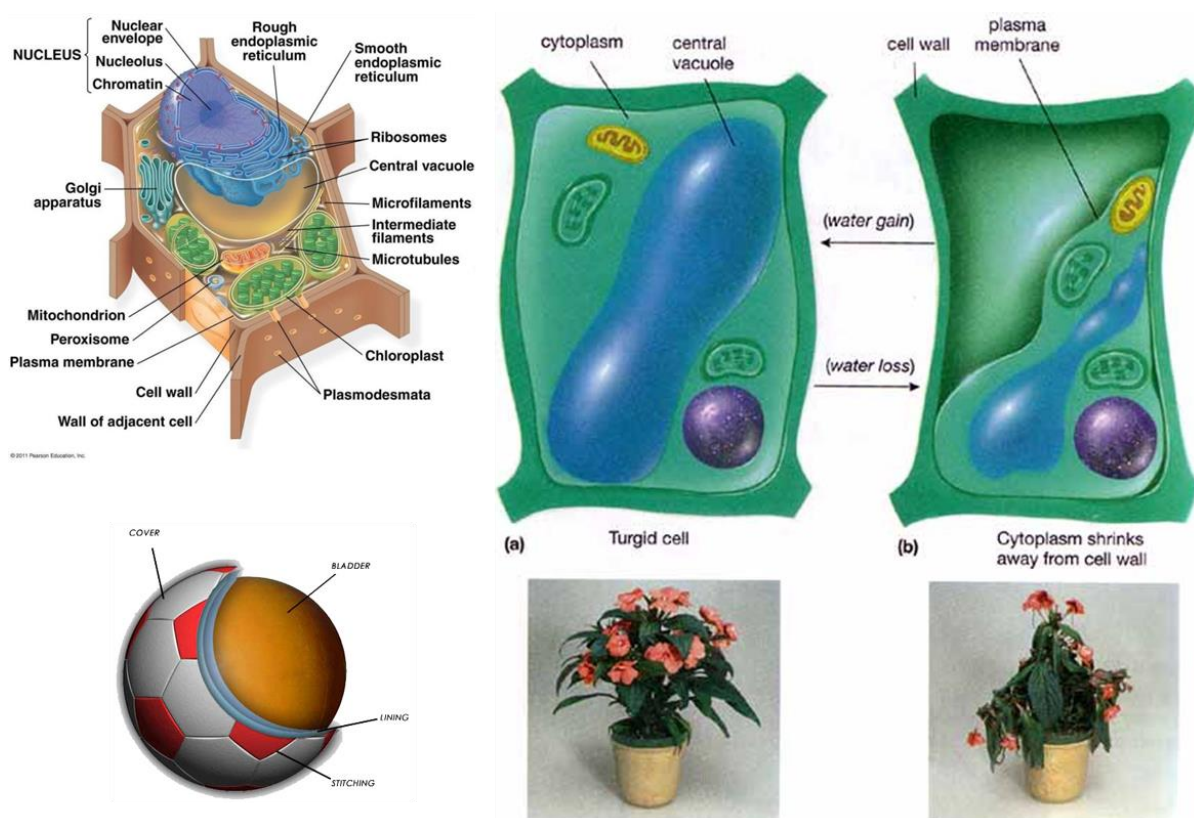
C. TEORIE

1. Význam vody v rostlině

Voda je základní podmínkou života na Zemi, většina organismů včetně rostlin je na ní existenciálně závislá. Jedním z hlavních problémů spojených s globální klimatickou změnou je častější výskyt sucha, při kterém se zastavuje růst a produkce rostlin. Pokud rostliny trpí nedostatkem vody, projeví se to v řadě fyziologických procesů, které v nich probíhají, přičemž různé procesy jsou k nedostatku vody různě citlivé.

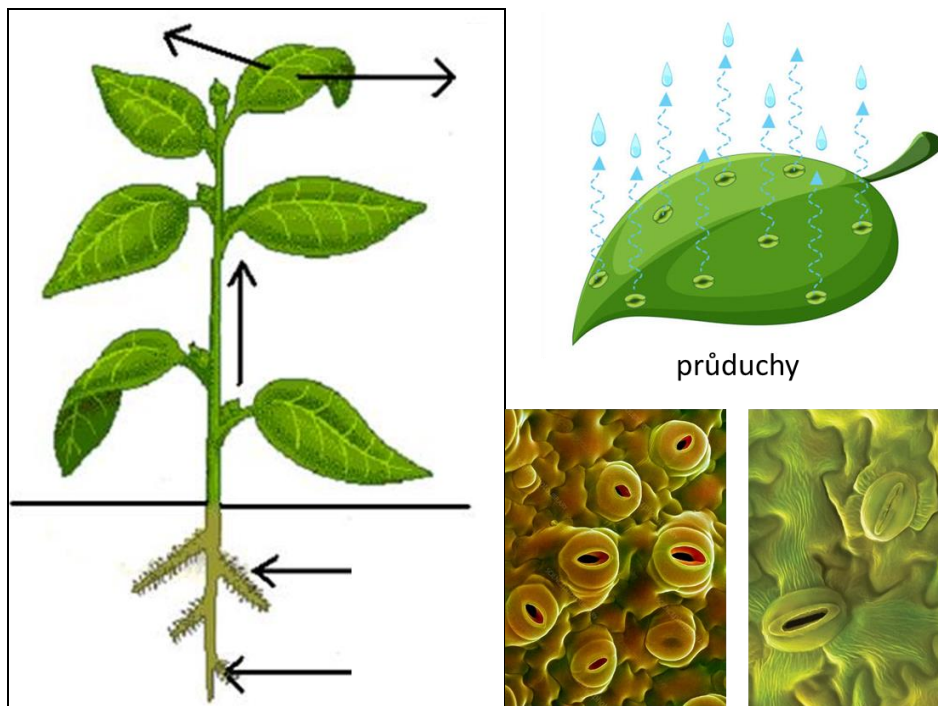
Aby v rostlině, listu nebo buňce mohly probíhat normální životní funkce, musejí být dostatečně hydratovány, tj. musí obsahovat dostatečné množství vody. Většina rostlin je tzv. homoiohydričtých, to znamená, že mohou žít v relativně úzkém rozmezí obsahu vody a při jeho poklesu pod přibližně 60 % u nich dochází k nevratnému poškození a uhynutí.

Voda v buňce spoluurčuje strukturu biomolekul (proteinů, lipidů), funguje jako transportní médium, rozpouštědlo i substrát v biochemických reakcích. U bylin a nezdřevnatělých částí dřevin dostatek vody zaručuje mechanickou stabilitu pletiv - pokud je vody v rostlině nedostatek, rostlina nebo její části vadnou (Obr. 1). Do určité míry je proces vadnutí vratný, po překročení této míry rostliny hynou.



Obr. 1 Rostlinná buňka je (na rozdíl od buňky živočišné) obklopena nejen plazmatickou membránou, ale také pevnou (a do určité míry pružnou) buněčnou stěnou. Můžeme ji přirovnat k fotbalovému míči, ve kterém je vnitřní tenká a pružná membrána (odpovídající plazmatické membráně buňky) a na povrchu pevnější kožená vrstva (odpovídající buněčné stěně). Pokud je v míči dostatek vzduchu, je pevný, pružný a drží tvar. Pokud je v něm vzduchu méně, ztrácí pružnost i tvar. V rostlinné buňce to funguje podobně, přičemž určující není obsah vzduchu, ale vody. Pokud je buňka dostatečně hydratována (neboli je turgidní), je v ní mírný přetlak – obsah cytoplazmy tlačí na buněčnou stěnu a ta vykonává protitlak na cytoplazmu. Hydratace buněk v pletivu pak zaručuje držení tvaru orgánů (listů) a rostliny jako celku. Pokud klesne obsah vody v buňkách pod určitou mez, tlak v buňkách vymizí a rostlina vadne.

Voda je rostlinou přijímána prostřednictvím kořenů, přes vodivá pletiva (xylém) je rozváděna do celého rostlinného těla a nepotřebovaná část (cca 99 %) je transpirací odpařována do okolní atmosféry (Obr. 2). Transpirace funguje jako sací čerpadlo, které umožňuje transportovat vodu i látky v ní rozpuštěné do potřebné (leckdy i překvapivě velké) výšky (Obr. 3). Transpirační tok vody je poháněn energií slunečního záření, které dopadá na listy a dodává teplo na odpar vody. Zároveň výdej vody transpirací snižuje teplotu listů. Většina transpirace probíhá přes průduchy (Obr. 2), jejichž otevřenost si rostlina reguluje podle podmínek okolí, zejména podle dostupnosti vody v půdě, teploty a relativní vlhkosti vzduchu v okolní atmosféře. Pokud rostlina zavře průduchy (typicky v reakci na nedostatek vody v půdě), sníží tak výdej vody, ale zároveň dojde k omezení vstupu oxidu uhličitého do listů a klesá rychlost fotosyntézy. Zavření průduchů také vede ke zvýšení teploty listu kvůli omezení transpirace (Obr. 4).



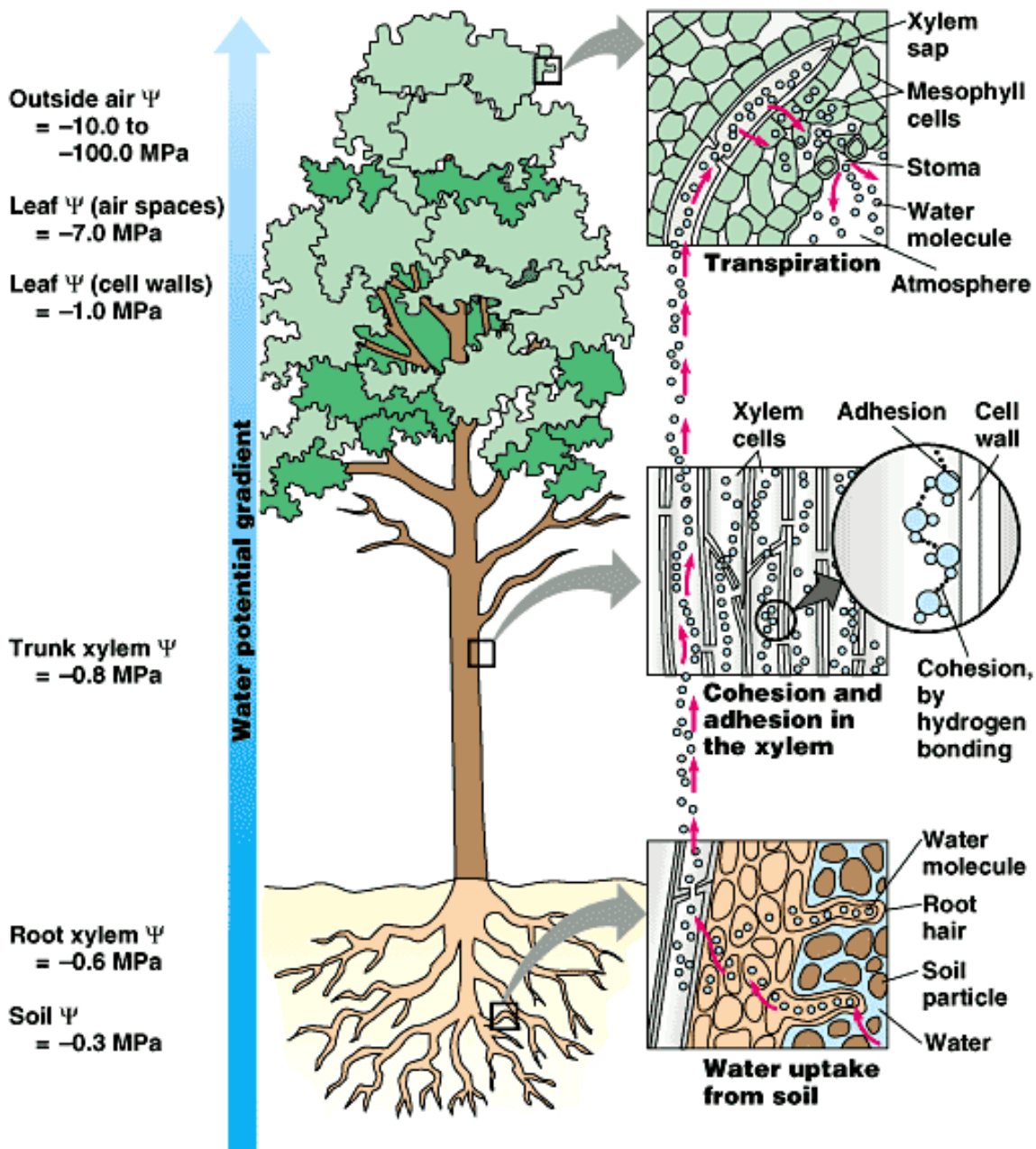
Obr. 2 Rostlina přijímá vodu z půdy přes kořeny, voda je pomocí vodivých pletiv (xylému) rozváděna do celé rostliny a transpirací je ve formě vodní páry vydávána do okolní atmosféry. Transpirace se uskutečňuje především přes průduchy, což jsou póry na povrchu listů obklopené tzv. svěracími buňkami. Rostlina je schopna regulovat otevřenost průduchů a tak do určité míry korigovat výdej vody transpirací zavřením průduchů. Na obrázku v pravém rohu je na snímku ze skenovacího elektronového mikroskopu vidět jeden zavřený a jeden otevřený průduch.

2. Vodní potenciál

Vazba vody na makromolekulární struktury a rozpuštěné látky snižuje její dostupnost pro chemické reakce a rozpouštění dalších látek. Pro biochemickou aktivitu protoplazmy je proto právě dostupnost vody důležitější než její celkové množství. Základní veličinou používanou pro určení vodního stavu rostliny nebo listu je *vodní potenciál* (Ψ). Vyjadřuje celkovou volnou energii vody v systému vztaženou k celkové volné energii vody v referenčním systému (čistá voda bez rozpuštěných látek, v nulové výšce nad povrchem Země a za atmosférického tlaku). Vodní potenciál se vyjadřuje v jednotkách energie vztažené na objem ($\text{J}\cdot\text{m}^{-3}$) nebo v jednotkách tlaku (MPa). Má zápornou hodnotu, případně se blíží nule (v referenčním systému je konvenčně zvolen rovný 0). Jeho hodnota (resp. rozdíl nebo gradient) určuje směr transportu vody (Obr. 3).

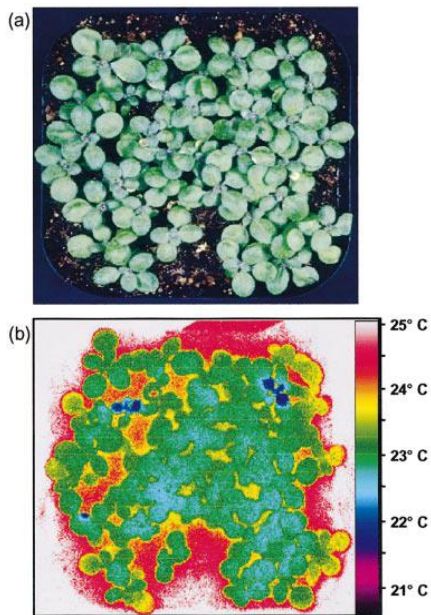
Vodní potenciál má dvě hlavní složky – osmotickou a tlakovou. Osmotická složka (též osmotický potenciál) je dána přítomností rozpuštěných látek. Osmotický potenciál má zápornou hodnotu – čím více je ve vodě rozpuštěných látek, tím zápornější je osmotický potenciál (resp. tím nižší je volná energie vody v daném systému). Tlaková složka vodního potenciálu (též tlakový potenciál nebo turgor) je dána rozdílem mezi vnitřním hydrostatickým tlakem vody (proti buněčné stěně) a referenčním tlakem (obvykle atmosférickým). V buňkách má kladnou hodnotu, v xylému je záporný. V některých případech (typicky u stromů) přispívá k celkovému vodnímu potenciálu další složka – tzv. gravitační potenciál. Tato složka má kladnou hodnotu a roste s rostoucí výškou. Příklady

hodnot jednotlivých složek vodního potenciálu v rámci systému půda-rostlina (strom)-atmosféra jsou uvedeny v Obr. 5.

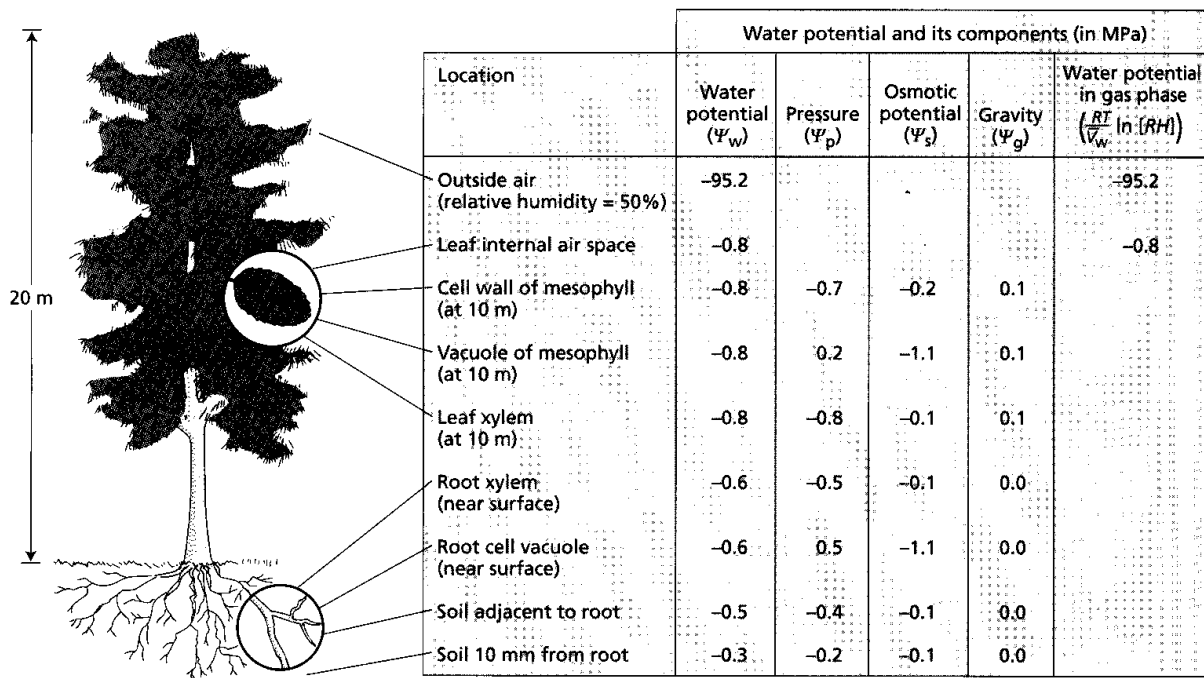


Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Obr. 3 Transport vody v rostlinách je založen na transpiračním toku. Voda se uvnitř listů odpařuje z mikrokapilárních prostor v buněčných stěnách mezofylových buněk. Díky velmi malému průměru těchto mikrokapilár (řádově 10 – 100 nm) vzniká v xylému při aktivní transpiraci velmi vysoký podtlak, který (pokud je zachována kontinuita vodního sloupce) je schopen vytáhnout vodu z kořenů i do korun těch nejvyšších stromů. Transpirační tok vody funguje také díky kohezním silám mezi molekulami vody a adzezi molekul vody k celulózovým buněčným stěnám xylémového „potrubí“. Transpirace je poháněna dodáváním tepelné energie pro odpar vody v listech. Transport vody v rostlině je ale jinak pasivní proces, který se uskutečňuje po spádu vodního potenciálu (jeho orientační hodnoty jsou uvedeny vlevo).



Obr. 4 vlevo – fotografie (a) a termosnímek (b) semenáčků huseníčku po třech dnech zastavené závlivky. Ve většině rostlin došlo vlivem nedostatku vody v substrátu k zavření průduchů, u dvou rostlin k zavření průduchů nedošlo kvůli mutaci způsobující neschopnost regulovat otevřenost průduchů. Tyto rostliny tedy dále transpirovaly, což snižovalo jejich teplotu (na termosnímku jsou modré). Převzato z Merlot et al. (2002).

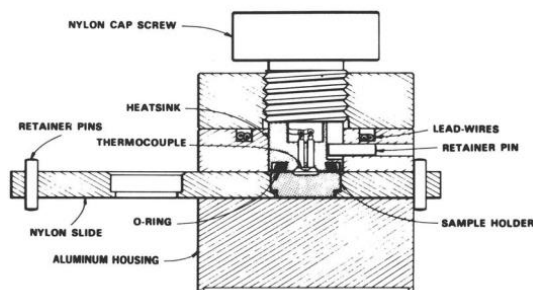


Obr. 5 Orientační hodnoty jednotlivých složek vodního potenciálu (v MPa) v rámci systému půda-rostlina (strom)-atmosféra. Převzato z Taiz a Zeiger (2002).

2.1 Psychrometrické metody měření vodního potenciálu

Psychrometrické metody měření vodního potenciálu jsou založeny na stanovení relativní vlhkosti vzduchu v uzavřené atmosféře komůrky psychrometru, která je v rovnováze se vzorkem (listem), jehož vodní potenciál se zjišťuje (Briscoe 1986). K dosažení této rovnováhy je třeba určitého času (rovnováha se ustaluje v klidné atmosféře difúzí).

Napěťový signál na výstupu psychrometru odpovídá rozdílu teplot měřených sensorickým (tzv. „vlhkým“) a referenčním (tzv. „suchým“) spojem. Metoda rosného bodu využívá k měření vodního potenciálu stanovení rosného bodu vzduchu v komoře psychrometru, tj. stanovení teploty, při které je parciální tlak vodní páry v komoře roven tlaku nasycené vodní páry. Po ustavení rovnováhy uvnitř komory je sensorický spoj termočlánek ochlazen pomocí Peltierova proudu pod teplotu rosného bodu vzduchu v komoře. Po přerušení Peltierova proudu teplota spoje roste až do teploty rosného bodu, při které je potom pomocí speciálního elektronického obvodu udržována. Příslušný napěťový signál je přímo úměrný vodnímu potenciálu měřeného vzorku. Převedení hodnoty napětí (μV) na hodnotu vodního potenciálu (MPa) se provádí pomocí kalibračních rovnic získaných z měření různě koncentrovaných roztoků NaCl o známém vodním potenciálu. K měření budeme používat přístroj HR-33T Dew Point Microvoltmeter a vzorkové komory C-52 (Wescor, USA) (Obr. 6).

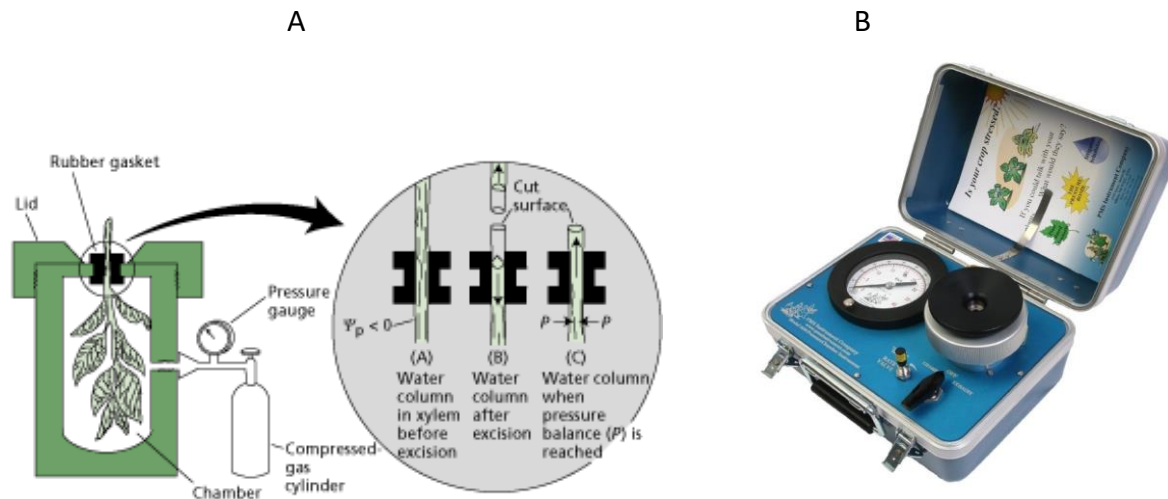


Obr. 6 Psychrometrická komůrka C-52 (Wescor, USA) pro měření vodního potenciálu listů.

2.2 Měření vodního potenciálu pomocí tlakové komory

Při měření vodního potenciálu tlakovou metodou je měřený orgán (nejčastěji list nebo větev) oddělen z rostliny a vložen do tlakové komory. Při oddělení dojde k přerušení kontinuálního vodního sloupce v xylému, voda z xylému přechází osmózou do okolních buněk a je tedy „odtažena“ z řezné plochy (Obr. 7A). Zvyšováním tlaku v komoře pomocí stlačeného plynu je voda vytlačena zpět na řeznou plochu. Okamžik objevení se vody na řezu (a potřebný tlak) je hodnocen vizuálně pomocí mikroskopu. Pokud je zamezeno transpiraci měřeného listu (např. umístěním listu do plastového sáčku), považuje se naměřená hodnota tlaku za hodnotu tlakového potenciálu xylému (vodní potenciál netranspirujícího listu je roven vodnímu potenciálu xylému, přičemž osmotická složka vodního potenciálu v xylému je malá

(> 0,1 MPa), takže se často zanedbává. Pro měření budeme používat tlakovou komoru PMS 600 (PMS Instrument Company, USA) (Obr. 7B) připojenou k tlakové láhvi s plynným dusíkem. Pro stanovení vodního potenciálu využijeme webkameru pro záznam tlakoměru a průmyslový mikroskop, kterým budeme sledovat řez listu.



Obr. 7. A - princip měření vodního potenciálu pomocí tlakové komory. Převzato z Taiz a Zeiger 2002. **B** - tlaková komora PMS 600 (PMS Instrument Company).

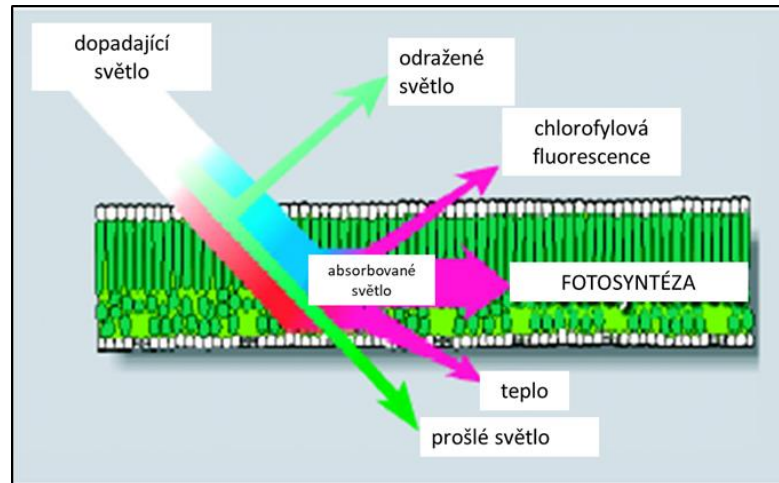
3. Optické parametry listu

Primární úlohou rostlinných listů je fotosyntéza. Za tímto účelem listy pomocí fotosyntetických barviv absorbují světelnou energii a to zejména v modré a červené oblasti spektra, což je dáno absorpčními vlastnostmi nejdůležitějších fotosyntetických pigmentů – chlorofylů. Absorbovaná energie je využita k syntéze cukrů a dalších látek potřebných k růstu rostliny. Část dopadajícího záření se od listu odráží a část listem prochází (Obr. 8), přičemž platí, že čím méně je určitá část spektra absorbována, tím více tohoto záření listem prochází nebo se od listu odráží. Ve viditelné části spektra je nejméně absorbovaná zelená složka, proto se nám listy jeví (jak v odraženém, tak v procházejícím světle) zelené.

Pokud změříme odrazivost (reflektanci) nebo propustnost (transmitanci) listu při určitých vlnových délkách (případně v určitém rozsahu vlnových délek), můžeme o listu získat řadu informací včetně obsahu pigmentů. Chlorofylmetr SPAD je založen na měření transmitance listu při vlnové délce 650 nm, ve které absorbují chlorofyly. Čím více chlorofylu list obsahuje, tím více je světlo této vlnové délky absorbováno a tím větší hodnotu SPAD přístroj ukáže (Obr. 9). Informace o obsahu chlorofylů je obsažena i v listové reflektanci. Část dopadajícího světla se totiž odráží nejen na vnějším povrchu listu, ale také na optických rozhraních uvnitř listu (Obr. 10), takže pokud změříme reflektanci v červené oblasti, můžeme stanovit např. index NDVI, který je úměrný obsahu chlorofylu (Obr. 11).

U rostlin, které jsou dlouhodoběji stresované nedostatkem vody, může docházet k urychlenému stárnutí listů (zpravidla těch nejstarších), což je doprovázeno jejich žloutnutím, tedy poklesem obsahu chlorofylu. Míra žloutnutí listů odráží míru stresu rostlin, a to nejenom stresu z nedostatku vody. U takových listů naměříme nižší hodnoty SPAD i NDVI.

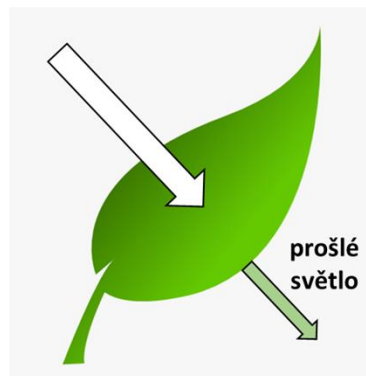
V některých případech však mohou být naměřené hodnoty SPAD i NDVI zkresleny změnami ve struktuře listu, které se projeví zdánlivými změnami obsahu chlorofylu, i když ten zůstává stejný. Tato situace může nastat u rychle zasychajících listů oddělených od rostliny.



Obr. 8 Schéma znázorňující využitou (zejména modrá a červená složka), odraženou (zejména zelená složka) a procházející (zejména zelená složka) část světelného záření v listech rostlin. Velmi malá část absorbované energie se vysvítí ve formě (červené) fluorescence a relativně velká část se přemění na teplo.

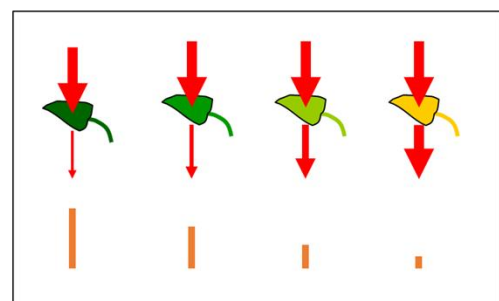
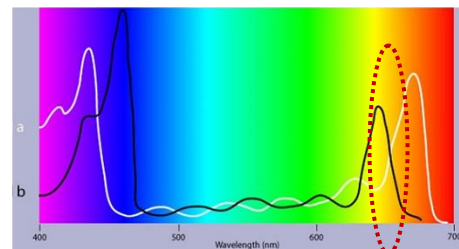


CHLOROFYLMETR SPAD

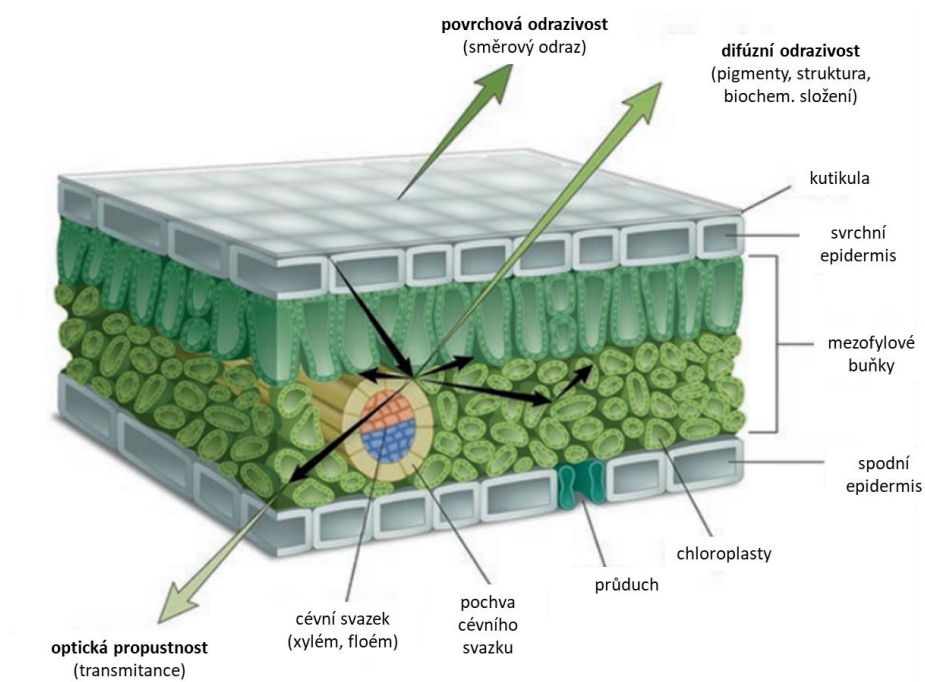


hodnota SPAD

absorpční spektrum chlorofylů



Obr. 9 Měření obsahu chlorofylu pomocí přístroje SPAD založené na stanovení optické propustnosti listu při vlnové délce 650 nm. Absorpční spektrum chlorofylu *a* a chlorofylu *b* udává míru absorpce záření těmito pigmenty v jednotlivých částech spektra. Ve spektru je tečkovanou elipsou naznačena vlnová délka, ve které je měřena optická propustnost přístrojem SPAD.



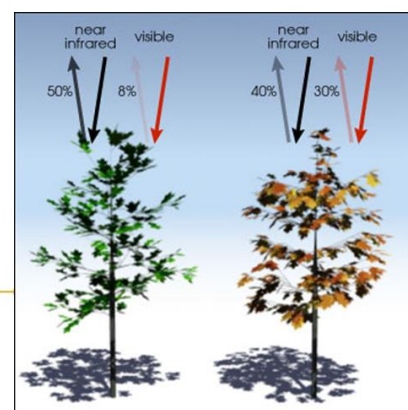
Obr. 10 Základní optické jevy v listu s popisem nejdůležitějších strukturálních složek listu. Převzato ze Serbin a Townsend (2020).



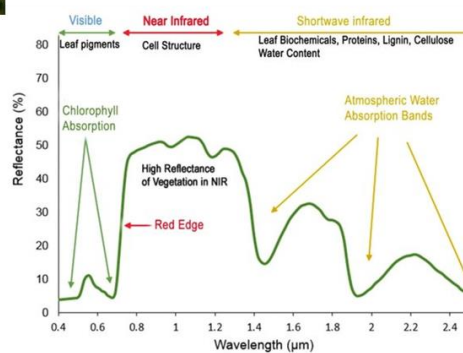
spektrum odrazivosti listu (porostu)



$$NDVI = \frac{R_{740nm} - R_{660nm}}{R_{740nm} + R_{660nm}}$$



$$\frac{(0.50 - 0.08)}{(0.50 + 0.08)} = 0.72 \quad \frac{(0.4 - 0.30)}{(0.4 + 0.30)} = 0.14$$



Obr. 11 Měření parametru NDVI (odrážejícího obsah chlorofylu) pomocí přístroje PlantPen založené na stanovení optické odrazivosti (R) listu při vlnové délce 660 nm a 740 nm. Vlnová délka 740 nm už leží v tzv. blízké infračervené oblasti spektra (NIR), kde už rostlinné pigmenty neabsorbují. Změny odrazivosti v této oblasti jsou způsobeny změnami ve struktuře listů (viz též spektrum odrazivosti listu v rozsahu vlnových délek 400 – 2500 nm s uvedením vlastností listu, které se ve spektru odrazivosti projevují).

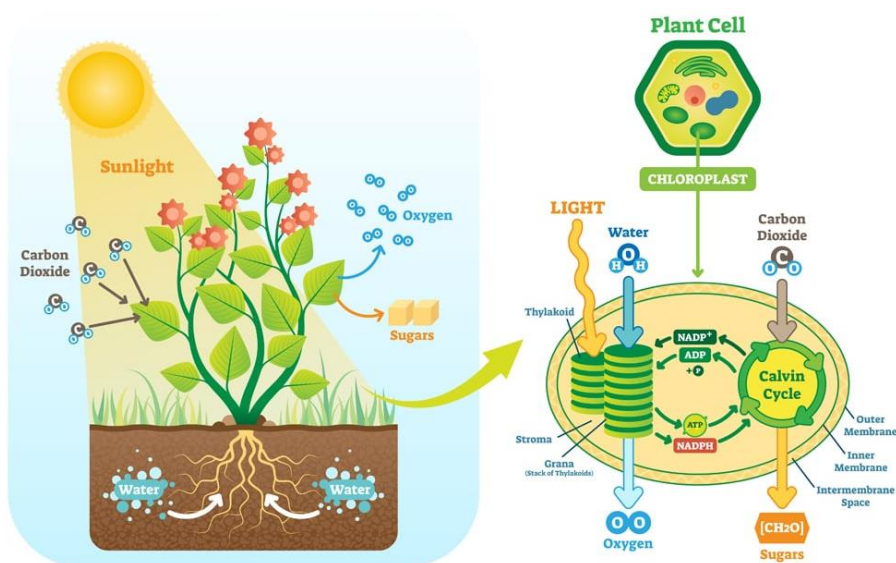
Při rychlém zasychání listů v řádu jednotek až desítek hodin zůstává zpravidla obsah chlorofylu zachován, ale dochází ke zmenšování plochy (případně objemu) listu, což vede k větší absorpci červeného záření a tedy k menší propustnosti i odrazivosti a hodnoty SPAD a NDVI mohou narůstat. V některých případech může během zasychání listů docházet ke kombinaci efektu zmenšování plochy (tedy nárůstu SPAD a NDVI – zpravidla v prvních fázích zasychání listů) a efektu poklesu obsahu chlorofylu (tedy pokles SPAD a NDVI – zpravidla v pozdější fázi zasychání).

4. Fotosyntéza a chlorofylová fluorescence

4.1 Fotosyntéza a její reakce na nedostatek vody

Fotosyntetické reakce rozdělujeme na primární (světelné, probíhající na tylakoidních membránách chloroplastů) a sekundární (též biochemická nebo temnotní fáze, probíhající ve stromatu chloroplastů). V rámci primárních reakcí je absorbována energie fotonů, která je využita k transportu elektronů a protonů a k syntéze ATP a NADPH. Tyto produkty jsou pak využity v sekundární fázi, ve které dochází k asimilaci oxidu uhličitého a k syntéze cukrů (Obr. 12).

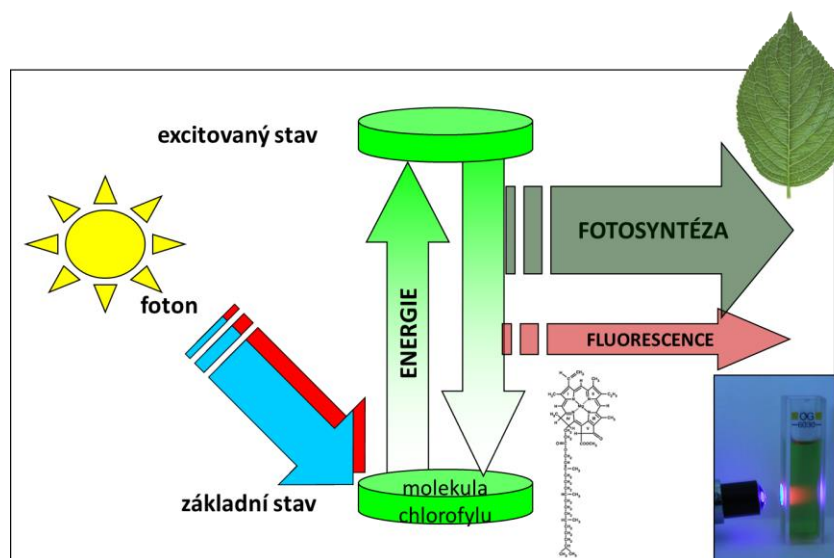
Jednou z prvních reakcí rostliny na nedostatek vody je zavření průduchů za účelem snížení ztráty vody transpirací. V důsledku toho je ale snížen přísun CO_2 do chloroplastů, což má za následek inhibici sekundární fáze fotosyntézy. K inhibici primárních reakcí pak dochází v důsledku snížené spotřeby ATP a NADPH ve zpomalených sekundárních reakcích. Spíše než o poškození se ale jedná o regulaci funkce, která naopak před poškozením chrání. Typickou reakcí při nedostatku vody je aktivace tzv. nefotochemických zhašecích procesů (viz dále). K přímému poškození na úrovni primárních fotosyntetických reakcí na tylakoidní membráně dochází až při výrazné desikaci listů.



Obr. 12 Rostlina při fotosyntéze využívá energii světelného záření, oxid uhličitý a vodu k tvorbě cukrů, které jsou následně využity k syntéze látek potřebných k růstu rostliny. Jako vedlejší produkt se v rámci světelné fáze uvolňuje molekulární kyslík. Fotosyntéza probíhá v chloroplastech, které jsou přítomny ve všech zelených částech rostliny, typicky v listech. Světelné reakce fotosyntézy probíhají na tylakoidních membránách, biochemická fáze (Calvinův cyklus) probíhá ve stromatu chloroplastů.

4.2 Fluorescence chlorofylu

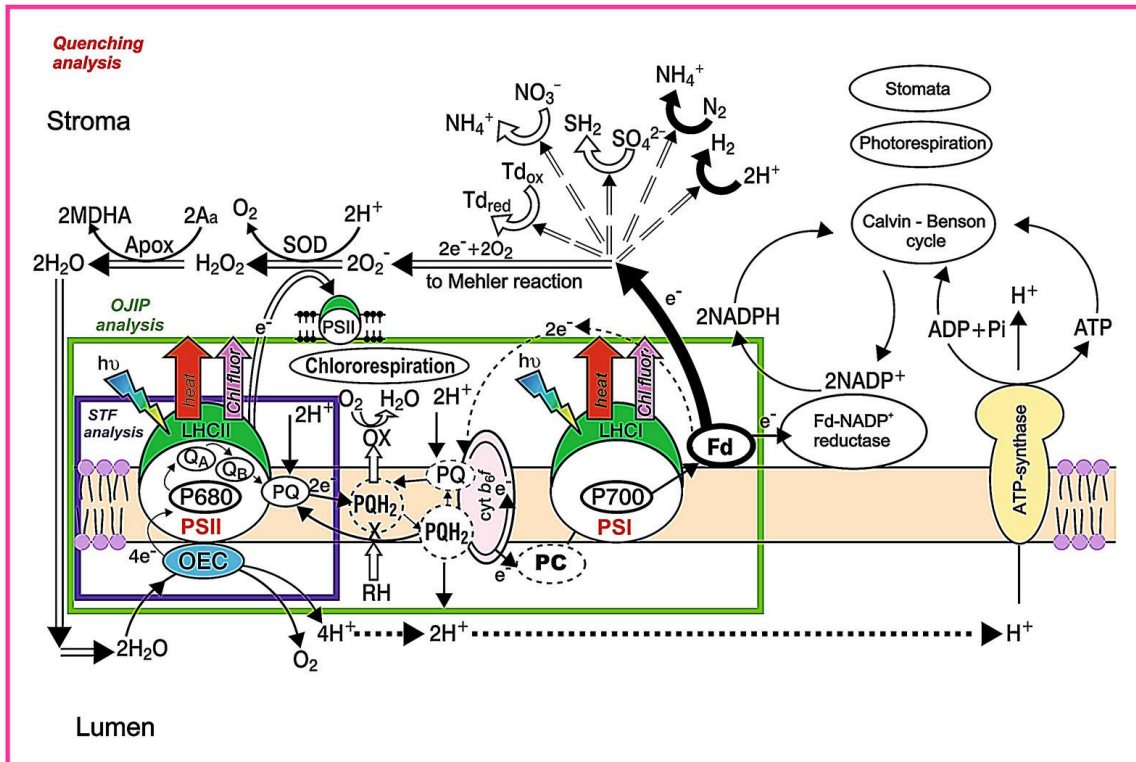
Emisi záření, ke které dochází při přechodu excitované molekuly do základního stavu, obecně označujeme jako luminiscenci. Pokud je excitace vyvolána absorpcí kvanta záření, nazýváme emitované záření fluorescencí. Emitované záření má větší vlnovou délku a nižší energii než záření excitační. U fotosyntetizujících organismů je molekulou emitující fluorescenci zejména chlorofyl *a* po excitaci viditelným nebo UV zářením (Obr. 13) nebo po příjmu excitace z chlorofylu *b*. Fluorescence chlorofylu je v podstatě konkurenčním procesem fotosyntézy (Obr. 8, Obr. 13), proto ji můžeme využít k monitorování jejího fungování. V zeleném listu je fluorescence emitována molekulami chlorofylu, které jsou zabudovány do tzv. světlosběrných antén; za pokojové teploty jde převážně o chlorofyly světlosběrných antén připojených k fotosystému II, ale dochází i k emisi z chlorofylů antén připojených k fotosystému I (Obr. 14).



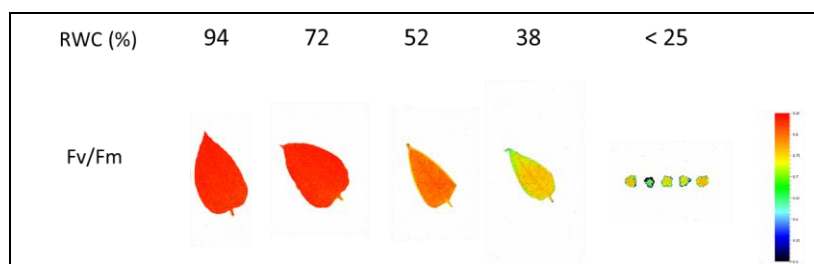
Obr. 13 Schéma excitace molekuly chlorofylu absorpcí modrého nebo červeného fotonu a využití excitační energie ve fotosyntéze nebo její vyzáření ve formě fluorescence.

Závislost intenzity fluorescence chlorofylu během náhlého osvětlení vzorku po jeho adaptaci na tmou se nazývá fluorescenční indukce (FI). Během FI dochází nejprve k rychlému nárůstu intenzity fluorescence (přibližně do 1s) a následně k pomalému poklesu (během desítek sekund až jednotek minut). Pokud změříme minimální fluorescenci (F_0) a maximální fluorescenci (F_M) ve vzorku adaptovaném na tmou, můžeme vypočítat poměr $(F_M - F_0)/F_M = F_V/F_M$ (kde F_V je variabilní fluorescence = $F_M - F_0$), který vyjadřuje tzv. maximální kvantový výtěžek fotochemických reakcí ve fotosystému II (PSII) a je mírou funkčnosti fotosystému II. Pokud se při stresu zhoršuje funkce fotosystému II, poměr F_V/F_M klesá. Tento parametr je nejčastěji používaným fluorescenčním parametrem při studiu změn fotosyntézy při stresu rostlin. Fotosystém II není na nedostatek vody v rostlině příliš citlivý, proto se pro monitorování vodního deficitu rostlin používají citlivější parametry jako je např. aktuální kvantový výtěžek fotosystému II (Φ_{PSII}), který se měří během osvětlování vzorku tzv.

aktinickým světlem a aplikací velmi intenzivních světelných pulzů. Dalším citlivým parametrem je tzv. nefotochemické zhašení (NPQ), které při mírném stresu narůstá z důvodů aktivace ochranných procesů a poté s rostoucí mírou stresu klesá.



Obr. 14 Schéma komponent fotosyntetického aparátu a fotosyntetických procesů, které se projevují v parametrech chlorofylové fluorescence. Převzato z Kalaji et al. (2014).



Obr. 15 Zobrazení parametru F_v/F_m měřeného během zasychání oddělených listů tabáku pomocí přístroje Fluorcam. S klesajícím relativním obsahem vody v listech (RWC, horní řádek) docházelo k postupnému poklesu F_v/F_m . (Špundová et al., nepublikované výsledky)

D. POSTUP

1. Měření vodního potenciálu

1.1 Změřte vodní potenciál čerstvého (právě odděleného) a povadlého listu metodou rosného bodu:

- a) Vzorek listu o velikosti cca 5x5 mm odebrat ve vzdálenosti asi 2 cm od špičky listu (co nejostřejší řez, pozor na poškození plochy listu) a co nejrychleji umístit do držáku vzorků.
- b) Po uzavření vzorku do komory počkat 15 minut na ustavení rovnováhy.
- c) Metodou rosného bodu změřit napěťový výstup mikrovoltmetru.
- d) Z kalibrační přímky příslušné komory vypočítat hodnotu vodního potenciálu listu.

1.2 Změřte vodní potenciál čerstvého (právě odděleného) a povadlého listu pomocí tlakové komory:

- a) Spustit notebook, průmyslový mikroskop a webkameru, které se používají k záznamu změn vyvolaných tlakem.
- b) Nastavit polohu kamery a mikroskopu tak, aby byl na monitoru vidět současně obraz z mikroskopu (na celé ploše) a obraz tlakoměru, zaostřit mikroskop na otvor v komoře (kotouč ostření je na krátkém tubusu mikroskopu).
- c) Vložit oddělený list do komory, komoru utěsnit a mikroskop zaostřit na řez listu.
- d) Spustit záznam, poté otočit hlavní přepínač komory do polohy CHAMBER a sledovat situaci na monitoru i v komůrce. Na měřidle by podle zvolené rychlosti měl narůstat tlak. Pokud je řapík (list) dobře utěsněn, není slyšet syčení, tlak plynule narůstá. Pokud je slyšet syčení, uchopením ze strany svrchní a spodní části víka komůrky do obou rukou postupně přivírat protipohybem (horní část po směru hodinových ručiček) těsnění tak, aby syčení ustalo nebo výrazně kleslo. Na obraze by měl být stále vidět řez (tedy nezastiňovat ho rukou). U zaschlého listu se obvykle tento úkon musí provést několikrát.
- e) Sledovat obraz řezu na monitoru. Nejdříve se objevují drobné bublinky vzduchu, které unikají z floému. Až poté se začne vytlačovat souvisle voda z některé části xylému. To je okamžik určení vodního potenciálu. Nechat tlak ještě trochu růst, až se protlačuje vodou vzduch a voda pění a prská. V tom okamžiku přepnout hlavní vypínač komůrky do polohy EXHAUST (prudce klesne tlak) a zastavit záznam.
- f) Ze záznamu určit hodnoty vodního potenciálu měřených listů.

1.3 Porovnejte hodnoty vodního potenciálu čerstvého a povadlého listu získané psychrometrem a tlakovou metodou. Diskutujte rozdíly.

2. Termoimaging listů

- a) Pomocí termokamery po určitý čas sledujte a porovnejte teplotu neoddělených listů u zalévaných a nezalévaných rostlin ječmene při normálním laboratorním světle a při osvětlení silným LED světlem.
- b) Po určité době sledování část listů snímaných termokamerou oddělte od rostliny a sledujte, zda a jak se po oddělení změní jejich teplota (opět proveďte na slabém a silném světle).
- c) Vysvětlete pozorované změny a rozdíly v teplotě listů.

3. Měření SPAD a NDVI

- a) Pomocí chlorofylmetru SPAD a přístroje PlantPen změřte a srovnajte hodnoty SPAD a NDVI u kontrolních, dlouhodobě zasychajících a akutně zasychajících listů modelových rostlin. Měřte vždy ze svrchní strany listu – pozor na orientaci listu v měřicí sorce přístrojů!
- b) Měření hodnot SPAD a NDVI proveďte opakovaně na několika místech listů a zhodnoťte heterogenitu v ploše měřených listů.
- c) Diskutujte možné příčiny pozorovaných rozdílů v parametrech SPAD a NDVI u různých variant listů.

4. Měření parametru F_v/F_M

- a) Zatemněte měřené rostliny nebo listy po dobu 25 min.
- b) Zapněte přístroj Fluorcam, spusťte ovládací program a nastavte měřicí protokol.
- c) Oddělte listy nebo jejich části a změřte parametr F_v/F_M .
- d) Vyhodnoťte a srovnajte parametr F_v/F_M u kontrolních a stresovaných listů. Zhodnoťte vliv nedostatku vody na tento parametr. Vysvětlete příčinu pozorovaných rozdílů mezi kontrolními a stresovanými listy.

E. LITERATURA

Briscoe R (1986) Thermocouple Psychrometers for Water Potential Measurement. In: Advanced Agricultural Instrumentation, Hensler WG (ed.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht

Kalaji HM et al. (2014) Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issues. Photosynth Res 122, 121-158.

Merlot S et al. (2002) Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation. Plant J 30, 601-609.

Serbin SP, Townsend PA (2020) Scaling Functional Traits from Leaves to Canopies. In: Remote Sensing of Plant Biodiversity, Cavender-Bares J et al. (Eds.), Springer

Šetlík I et al. (2004) Fyziologie rostlin, skripta JČU České Budějovice

Taiz L, Zeiger E (2002) Plant Physiology. Sinauer Associates, Sunderland, USA.

Manuál k přístroji HR-33T Dew Point Microvoltmeter a ke vzorkové komoře C-52 firmy WESCOR; návod k měření.

Návod k měření tlakovou metodou.

Manuál k přístroji SPAD-502L, Konica Minolta Sensing, Japonsko; návod k měření.

Návod k měření chlorofylové fluorescenční indukce.