دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده کشاورزی

گروه علوم و مهندسی خاک

رابطه آب خاک و گیاه

پتانسیل آب در گیاه

تهیه و تنظیم

حیدر غفاری

اندازه‌گیری پتانسیل آب در بافت‌های گیاهی به روش تعادل در مایع

مقدمه:

بهترین و مفیدترین روش برای تعیین وضعیت آب و تنش آب (Water stress) در گیاه، تعیین پتانسیل آب می‌باشد چرا که پتانسیل آب بهترین شاخص وضعیت آب در یک سیستم است. پتانسیل آب بیان‌کننده وضعیت آب از نظر انرژی آزاد بوده و از نظر واحد و بررسی ارتباط بر خلاف مقدار آب یا مقدار نسبی آب در تمامی سیستم‌ها (آب، خاک، گیاه، هوا و...) یکسان می‌باشد.

پتانسیل آب (Water potential) در یک سیستم (سلول گیاهی) توسط فرمول زیر بیان می‌شود:

$$\psi_w^{cell} = \psi_s^{cell} + \psi_p^{cell} + \psi_m^{cell} + \psi_g^{cell}$$

منظور از پتانسیل آب در سلول، پتانسیل آب در بخشی از سلول است که توسط غشاء سیتوپلاسمی احاطه شده است (بخش سیمپلاست، Symplast). پتانسیل ماتریک در اثر کلوییدهای داخل سلول یا فشار منفی کمتر از اتمسفر (خلاء) در آوندهای چوبی گیاهان سریع‌التعرق ایجاد می‌شود. در سلول‌های گیاهی بجز در بافت‌های بسیار خشک (که شرایط غیر اشباع دارند) یا سلول‌های دارای واکوئل‌های کوچک و یا در بخش آپوپلاست (Apoplast)، پتانسیل ماتریک در مقایسه با بقیه مؤلفه‌های پتانسیل آب ناچیز می‌باشد. پتانسیل ثقلی نیز بر پتانسیل شیمیایی (Chemical potential) آب اثر ندارد و یا به عبارت دیگر تعیین آن نیاز به وسیله خاصی ندارد. لذا مؤلفه‌های اسمزی و فشاری غالب پتانسیل آب سلول را تشکیل می‌دهند. برای آب داخل سلول (فضای سیمپلاست) می‌توان رابطه فوق را به صورت زیر ساده نمود:

$$\psi_w^{cell} = \psi_s^{cell} + \psi_p^{cell}$$

برای اندازه‌گیری پتانسیل آب در اندام‌های گیاهی روش‌های متعددی پیشنهاد شده است:

۱- روش تعادل در مایع (Liquid equilibration)

۲- روش تعادل در بخار (Vapor equilibration)

۳- روش سایکرومتر ترموکوپل (رطوبت‌سنج دماجفت) (Thermocouple psychrometer)

۴- روش تعادل در فشار یا محفظه یا بمب فشاری (Pressure equilibration or pressure chamber/bomb)

۵- روش غیرمستقیم: تخمین پتانسیل آب سلول با داشتن مقدار آماس نسبی و رابطه آن با پتانسیل آب سلول

روش تعادل در مایع:

روش تعادل در مایع، قدیمی‌ترین روش اندازه‌گیری پتانسیل آب گیاه می‌باشد. در این روش بافت گیاهی با محلول‌های بیرونی (Bathing solution) با پتانسیل‌های آب مختلف به تعادل می‌رسد. اگر پتانسیل آب بافت بیشتر از محلول بیرونی باشد، آب از بافت به سمت محلول بیرونی حرکت کرده و در صورتی که پتانسیل آب بافت کمتر از محلول بیرونی باشد، آب از محلول بیرونی به داخل بافت حرکت می‌کند. اگر تبادل آبی بین بافت و محلول بیرونی صورت نگیرد، پتانسیل آب گیاه مساوی پتانسیل آب محلول است. چون سلول گیاهی دارای غشاء سیتوپلاسمی است، لذا می‌توان گفت پتانسیل اسمزی نیز در اینجا مهم است. به بیان دیگر برای ساخت محلول بیرونی با پتانسیل‌های مشخص، می‌توان از یک ماده حل‌شونده استفاده کرد.

با توجه به مقدار پتانسیل آب محلول بیرونی در مقایسه با بافت گیاهی، سه واژه تعریف شده است:

۱- اگر پتانسیل آب محلول بیرونی مساوی پتانسیل آب سلول باشد، این محلول بیرونی را Isotonic solution گویند.

۲- اگر پتانسیل آب محلول بیرونی کمتر از پتانسیل آب سلول باشد، این محلول را Hypertonic solution گویند.

۳- اگر پتانسیل آب محلول بیشتر از پتانسیل آب سلول باشد، این محلول بیرونی را Hypotonic solution گویند.

برای ساخت محلول بیرونی می‌توان از حل‌شونده‌های (Solutes) مختلفی استفاده کرد. در بیشتر موارد از موادی همچون ساکارز (Sucrose)، مانیتول (Mannitol) (نوعی الکل متبلور شیرین) و پلی اتیلن گلایکول (Poly Ethylene Glycol, PEG) استفاده می‌شود.

سه ویژگی در انتخاب محلول بیرونی یا ماده حل‌شونده (Solute or Osmoticum) مهم است:

الف) نبایستی برای سلول‌های زنده گیاه ضرر داشته یا سمی باشد چرا که تراوایی غشاء پلاسمایی بستگی نزدیکی به انرژی متابولیکی دارد. موادی مانند اسیدها هر چند سبب خاصیت اسمزی می‌شوند ولی به دلیل اثر مضر بر سلول‌های گیاهی نبایستی مورد استفاده قرار گیرند. مواد بازدارنده تنفس که سبب کمبود اکسیژن و افزایش دی‌اکسیدکربن می‌شوند و دیگر مواد سمی که بر متابولیسم اثر دارند، سبب تغییر تراوایی غشاء شده و به عنوان اسموتیکوم نبایستی استفاده شوند.

ب) بایستی غشاء سلولی تقریباً نسبت به آن ماده ناتراوا باشد. در این رابطه تعریف واژه‌ای به نام ضریب انعکاس یا انتخاب (Reflection/selectivity coefficient) غشاء ضروری است. این واژه توسط Staverman (1951) پیشنهاد شده است و بیانگر نفوذپذیری یا تراوایی (Permeability) غشاء سلولی نسبت به مواد محلول می‌باشد.

مقدار آن عبارت است از نسبت اختلاف فشار مشاهده شده در دو طرف غشاء به مقدار تئوریکی یا اسمی فشار اسمزی محلول. اگر این ضریب مساوی ۱ باشد، غشاء نسبت به مواد محلول کاملاً ناتراواست. اگر مقدار آن مساوی صفر باشد، کاملاً تراوا و مقادیر بین ۰-۱ بیانگر تراوایی انتخابی غشاء می‌باشد. بافت گیاهی یک اسمزسنج (Osmometer) کامل نیست. به بیان دیگر، غشاء نیمه‌تراوا در اسمز سنج کامل آب را از خود عبور داده ولی املاح را عبور نمی‌دهد. ولی غشاء پلاسمایی علاوه بر آب، مقداری املاح را نیز از خود عبور می‌دهد. لذا غشاء سلولی یا هر غشایی که به برخی مواد (آب) اجازه عبور سریع‌تر از مواد دیگر (مواد محلول) را می‌دهد، غشاءهای با تراوایی افتراقی یا انتخابی (Differentially permeable membranes) یا به نادرست نیمه-تراوا (Semi-permeable membranes) گفته می‌شود. لذا باید ماده‌ای انتخاب شود که به میزان عبور آن از غشاء پلاسمایی کم باشد (ضریب انعکاس آن نزدیک یک باشد).

ج) توسط گیاه یا ریزجانداران جذب و وارد فرآیندهای سوخت و ساز نشود.

تمامی مواد ذکر شده دارای نقایصی در این رابطه هستند. ساکارز برای گیاه سمی نیست ولی ضریب انعکاس آن کمتر (۰/۷-۰/۶) از مانیتول (۰/۹-۰/۸) است. عیب دیگر ساکارز آن است که توسط موجودات زنده هیدرولیز می‌شود. مانیتول با وجودی که کمتر از غشاء پلاسمایی عبور می‌کند ولی توسط ریزجانداران تجزیه می‌شود و توسط گیاه نیز جذب و در گیاه جابجا می‌شود. از معایب دیگر آن، حلالیت کم آن در آب است که امکان ساخت محلول غلیظ آن را سلب می‌کند. پلی اتیلن گلایکول چون یک پلیمر است، جرم مولکولی بالایی دارد (200-20,000 gr/mol) لذا جذب گیاه نشده یا کم جذب می‌شود. مورد حمله ریزجانداران قرار نمی‌گیرد و در مورد سمیت آن برای گیاه نظر قطعی وجود ندارد. در این آزمایش از ساکارز استفاده می‌شود.

تغییرات ایجاد شده در بافت گیاهی در محلول‌های با پتانسیل‌های مختلف را می‌توان با اندازه‌گیری تغییر وزن، حجم، طول، سطح و ضخامت نمونه یا تغییر غلظت محلول بیرونی به روش‌های انکسارسنجی (Refractometric method) مورد بررسی قرار داد. روش وزنی (Gravimetric method) بیشتر برای بافت‌های توده‌ای و گوشتی گیاهانی مانند هویج، سیب زمینی و چغندر مناسب است. روش حجمی (Volumetric method) در برخی مواقع مناسب است. برای تعیین پتانسیل آب در نقطه شروع پلاسمولیز (جایی که پتانسیل فشاری صفر و پتانسیل اسمزی تقریباً برابر پتانسیل آب است) از روش حجمی یا اندازه‌گیری طول استفاده می‌شود. از تغییر غلظت محلول بیرونی نیز می‌توان برای بیان جذب آب توسط بافت یا از دست دادن آب استفاده نمود. وقتی آب از بافت گیاهی خارج می‌شود، محلول بیرونی رقیق‌تر می‌شود و اگر بافت آب جذب کند، محلول بیرونی غلیظ‌تر می‌شود. در این آزمایش از روش وزنی استفاده می‌شود.

در روش تعادل در مایع، تغییرات ایجاد شده در بافت گیاهی در برابر مقادیر پتانسیل آب محلول‌های بیرونی رسم می‌شود. پتانسیلی که تغییرات ایجاد شده در بافت گیاهی ناچیز باشد، بیانگر پتانسیل آب بافت گیاهی است.

در روش تعادل در مایع به دلیل برخی خطاهایی که وجود دارد، دقت اندازه‌گیری پتانسیل آب زیاد نیست. در این روش، ورود محلول بیرونی به فضای بین سلولی و دیواره سلولی (فضای آزاد، Free space) که حدود ۱۰ تا ۲۵ درصد آب بافت را در خود جای می‌دهد، سبب می‌شود که منحنی تغییرات وزن در مقابل پتانسیل به سمت جلو جابجا شود و پتانسیل آب بافت را منفی‌تر از میزان واقعی نشان دهد. چون غشاء پلاسمایی نسبت به مواد محلول کاملاً تراوا نیست، ورود ماده حل شونده به درون بافت گیاهی نیز سبب کاهش پتانسیل آن نسبت به مقدار واقعی می‌شود. از دیگر منابع خطا در این روش آن است که در محل بریدگی بافت، به دلیل آسیب‌دیدگی دیواره سلولی پتانسیل فشاری کاهش می‌یابد، در نتیجه سلول‌های حاشیه‌ای از سلول‌های مجاور یا داخلی‌تر آب جذب کرده و پتانسیل آب بافت در کل کمتر از مقدار واقعی خواهد شد.

روش کار:

۱- ۶۸۶ گرم ساکاروز ($C_{12}H_{22}O_{11}$) را در مقداری آب مقطر حل نموده و به حجم نهایی یک لیتر برسانید. این محلول دارای غلظتی برابر ۲ مولار است و فشار اسمزی آن حدود ۴۱/۶ بار می‌باشد. با استفاده از این محلول، محلول‌های دیگری به غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۰/۷۵، ۱/۰، ۱/۲۵، ۱/۵۰ و ۱/۷۵ مولار تهیه کرده و دمای آنها را نیز یادداشت کنید. فشار و پتانسیل اسمزی آنها را با استفاده از فرمول وانت هوف (Vant Hoff) محاسبه کنید.

۲- محلول های فوق را در پتری‌دیش‌های مجزا ریخته و آنها را علامت گذاری کنید.

۳- تعدادی سیب زمینی را به قطعات مکعبی شکل با ابعاد ۵ میلی‌متر بریده و ۱۰ تا ۱۰ تا وزن (وزن اولیه) نمایید. به تعداد پتری‌دیش‌ها، قطعات ده‌تایی تهیه کنید. هر گروه ده‌تایی از قطعات سیب زمینی را داخل پتری‌دیش‌های حاوی محلول‌ها قرار دهید و اجازه دهید برای مدت دو ساعت تعادل پتانسیل آب بین بافت‌ها و محلول‌ها برقرار گردد.

۴- پس از گذشت زمان مذکور، قطعات بافت سیب زمینی را از پتری‌دیش‌ها خارج کرده و پس از خشک کردن آب سطحی، آنها را وزن (وزن نهایی) نمایید.

۵- مشخصات محلول‌های ساکارز، وزن اولیه هر ۱۰ قطعه، وزن نهایی هر ۱۰ قطعه و تغییرات وزن را در جدول زیر تنظیم کنید.

۶- با ترسیم تغییرات وزن بافت گیاهی در برابر پتانسیل آب محلول بیرونی، پتانسیل آب بافت گیاهی را در جایی که تغییرات وزن بافت گیاهی صفر است بدست آورید. گزارشی مختصر و کامل ارائه کنید و در مورد منابع ایجاد خطا بحث کنید.

غلظت ساکارز (مولار)	فشار اسمزی محلول (بار)	پتانسیل اسمزی محلول (بار)	وزن اولیه بافت (گرم)	وزن نهایی بافت (گرم)	تغییرات وزن (گرم) افزایش (+) و کاهش (–)
۰					
۰/۲۵					
۰/۵۰					
۰/۷۵					
۱/۰					
۱/۲۵					
۱/۵۰					
۱/۷۵					
۲/۰					