



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Institutionen för växtproduktionsekologi

Effekt av torkstress på tillväxt hos annuella ogräs

Effect of drought stress on the growth of annual weeds

Mattias Persson

Institutionen för växtproduktionsekologi,

Agronomprogrammet

Ultuna

2013

Effekt av torkstress på tillväxt hos annuella ogräs

Effect of drought stress on the growth of annual weeds

Mattias Persson

Handledare: Lars Andersson och Liv Åkerblom Espeby. Institutionen för växtproduktionsekologi
SLU, Sveriges lantbruksuniversitet

Examinator: Martin Weih, Institutionen för växtproduktionsekologi
SLU, Sveriges lantbruksuniversitet

Omfattning: 30hp

Nivå och fördjupning: D, Huvudområde Biologi

Kurstitel: Självständigtarbete i biologi – masterarbete

Kurskod: EX0564

Program/utbildning: Agronomprogrammet

Utgivningsort: Ultuna

Utgivningsår: 2013

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Torkstress, Tillväxt

SLU, Sveriges lantbruksuniversitet

Swedish University of Agricultural Sciences

Institutionen för växtproduktionsekologi.

Förord

Det här examensarbetet är gjort på Institutionen för växtproduktionsekologi på Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala. Arbetet är gjort inom huvudämnet biologi på D-nivå och avslutar författarens agronomutbildning med inriktning mark och växt.

Handledare för examensarbetet var under den första delen, d.v.s. litteraturstudien och starten av växthustestet Lars Andersson och under andra delen av växthustestet samt odlingskammareförsöket Liv Åkerblom Espeby, båda vid Institutionen för växtproduktionsekologi.

Examensarbetet tillägnas min kära mor som stöttat mig under hela min studietid. Tack mamma!

Sammanfattning

En minskad herbicidanvändning är önskvärd ur flera aspekter. Bäst effekt på plantan ska fås från appliceringen om denna är i aktiv tillväxt. För att herbicider ska kunna användas framgångsrikt så är en avstannad tillväxt en förutsättning för en lyckad bekämpning. I arbetet har en frågeställning varit om det går att avgöra om växter avstannat i tillväxt, genom att utvärdera en växtfysiologisk metod. I experimentet har mätning av växtens fotosynteskapacitet, som kan mätas med klorofyllfluorescens valts som metod. För att mäta skillnader i tillväxtstatus, så ämnade vi skapa en mätbar förändring genom att ge plantorna olika tillväxtförhållanden. För att begränsa tillväxten och skapa en stress i plantorna valdes vattenstress som miljöfaktor. Plantorna skulle då få optimal-, reducerad- och helt avstannad tillväxt, genom olika tillgång på vatten, mätt från vattenmättnad. En metod har prövats för att undersöka om det går att finna ett samband mellan stress och en minskad fotosynteskapacitet. Till hjälp har en fluorescensmätare av modellen MINI-PAM använts. För att kunna mäta denna kapacitet var växterna först tvungna att utsättas för stress.

I arbetet har en litteraturstudie gjorts för att se vilka metoder, som använts för att i försök framkalla torkstress hos växter. Till experimenten valdes sedan att undanhålla plantorna olika mycket vatten för att framkalla stress. Det visade sig dock svårt att få en säkert avstannad tillväxt hos plantorna, då dessa aldrig helt slutade att växa. Mätningarna med fluorescensmätaren kunde endast i ett fall påvisa ett samband mellan god vattentillgång och en högre fotosynteskapacitet och då utan med statistisk signifikans.

Samband gick att finna genom att torkstressade plantor visade på lägre biomassa vid slutskörd jämfört med dem som haft full tillgång till näring.

Abstract

A reduced use of herbicides is desirable from several aspects. The best effect on the plant should be obtained from the application if the plant is actively growing. If herbicides are to be used successfully, it is a stunted growth is a prerequisite for successful control. In this work, an issue has been whether it is possible to determine whether plants stalled in growth, by evaluating a plant physiological method. In the experiment, the measurement of the plant's photosynthetic capacity, which can be measured with chlorophyll fluorescence selected as the method. To measure differences in growth status, we wanted to create a measurable change by giving the plants of different growth conditions. To limit growth and create stress in the plants were water-stressed by environmental factors. The plants would then be optimal, reduced or completely stunted growth, through different water availability, as measured by water saturation. A method has been tested to determine if it is possible to find a link between stress and a reduced photosynthetic capacity. To help with a fluorescence meter, MINI-PAM is used. In order to measure this capacity, the plants were first forced to be exposed to stress.

A literature study has been done to see which methods used in attempts to induce drought stress in plants. For further experiments were then chosen to withhold the plants different amounts of water to induce stress.

It proved difficult to get a safe stunted growth of the plants. The plants never stopped completely to grow. The measurements of fluorescence meter, only in one case showing a correlation between high water and a higher photosynthetic capacity. Without having statistical significance. Correlation could be found by drought stressed plants showed lower biomass at final harvest compared to those who had full access to nutrition.

Innehållsförteckning

1	Introduktion	7
1.1	Bakgrund	7
1.2	Beskrivning av examensarbetet	7
1.2.1	Litteraturstudie	8
1.2.2	Praktiska arbetet	8
2	Litteraturstudie över metoder att framkalla vattenstress	9
2.1	Osmotiskt aktiva ämnen	9
2.1.1	Mannitol	9
2.1.2	Natriumklorid	9
2.1.3	Polyetylenglykol (PEG)	9
2.2	Hydrauliska aktiviteten	11
2.3	Direkt undanhållande av vatten.....	12
3	Praktiska delen	13
4	Material och metoder	13
4.1	Vattenstressförsök	13
4.2	Fluorescensmätning	13
4.3	Växthuseförsök	14
4.3.1	Test inför val av kruktyp	14
4.3.2	Växthuseförsök med renkvale och raps	15
4.4	Försök i odlingskammaren	16
5	Resultat.....	18
5.1	Val av krukor	18
5.2	Vattenaktivitetsmätningar	18
5.3	Torkad biomassa hos försöksplantorna i växthus.....	19
5.4	Fluorescensmätning, Växthus	20
5.5	Torkad biomassa hos försöksplantorna i odlingskammaren	25

5.6	Fluorescensmätning, Odlingskammaren	26
6	Diskussion.....	28
7	Slutsats	30
8	Källförteckning.....	31

1 Introduktion

1.1 Bakgrund

Då en reducerad mängd herbicider är önskvärt samtidigt som största möjliga effekt fortfarande ska kunna fås av herbicidapplicering, är det viktigt att veta när olika ogräs är som mest mottagliga för besprutning av herbicider. Vid besprutning med många av de herbicider som idag används anges det att ogräset ska vara i aktiv tillväxt för bästa effekt. Tillväxt innebär en irreversibel förändring i massa och storlek. I detta projekt menas med ”aktiv tillväxt” en klart mätbar förändring i storlek över en tidsperiod.

Olika arter påverkas och stressas olika mycket av omgivningsfaktorer, som t ex varierande temperatur, vind, fukt, markstruktur och mängden solljus. Vilken stressfaktor det är som påverkar varierar beroende på fysiologiska förhållanden i plantan samt yttre omständigheter. Olika arter reagerar olika på olika herbicider då det varierar hur mottagliga de är beroende på utvecklingsstadium, tillväxtstatus och om de påverkas av kontakt-, och systemiskt verkande preparat, jordupptag eller bladupptag. Samtidigt är det många andra yttre faktorer som kan påverka resultatet av besprutningen. Är plantorna utsatta för torka eller å andra sidan för mycket vatten, som hindrar växten från att ta upp mer så kan önskat resultat från besprutningen utebli. Bristande transport i växten kan leda till att preparatets verksamma substanser inte transporteras till det tänkta verkningsstället i plantan och att då effekten helt uteblir. Det finns idag inget bra alternativ för att mäta och bedöma om en planta är i aktiv tillväxt vid en viss tidpunkt. Ofta använder man sig av omgivningsfaktorer som väderlek och markfukt för att bedöma om det är troligt att plantorna är i aktiv tillväxt när man tänkt sig att bespruta. Genom att direkt kunna kontrollera en plantas status och därmed säkrare välja den spruttidpunkt då ogräsplantan är som mest är mottaglig för aktuell herbicid, kommer herbiciden till så stor nytta som möjligt. Följden av detta blir att de miljömässigt negativa konsekvenserna kan minska. Samtidigt belastas ekonomin mindre och risken för resistens minskar.

I EUs direktiv 2009/128 står att ”Medlemsstaterna ska vidta alla nödvändiga åtgärder för att främja ett växtskydd med låg insats av bekämpningsmedel och så långt som möjlig ge företräde till icke kemiska metoder, så att yrkesmässiga användare byter till metoder eller produkter som är minst skadliga för människors hälsa och miljön bland de produkter som är tillgängliga för samma växtskyddsproblem”. Från den förste januari 2014 ska alla som använder växtskyddsmedel yrkesmässigt inom EU tillämpa integrerat växtskydd.

1.2 Beskrivning av examensarbetet

Avsikten med detta arbete var att det skulle ligga till grund för ytterligare studier av några ogräsarters tillväxtstatus relaterat till olika herbiciders dos-responskurva. De försök som redovisas i detta arbete var en del av ett större projekt med namn ”*Uppskattning av ogräsplantans tillväxtstatus som metod att förutsäga herbicideffekten – underlag för beslutsnyckel i IPM*”. Projektet, som finansierades av SLF, hade som mål att finna en metod för att mäta ogräsplantornas tillväxtstatus i ett givet ögonblick. Efter de grundläggande studierna av hur mätningen kan göras, planerades fältförsök och experiment för att relatera statusuppskattningarna till effekten av vissa herbicider. Resultatet var tänkt att ge ett underlag för rådgivare och lantbrukare i deras val av bekämpningsmängder och tidpunkt för herbicidbehandlingar. Projektet har hittills bara genomförts i sin första del.

Det här examensarbetet består av två delar. Den första delen utgörs av litteraturstudier för att finna de metoder, som är bäst lämpade för att framkalla torkstress hos plantor. Den andra delen, som tagit upp

mest tid, är det praktiska arbetet med att testa olika mätmetoder för att fastställa tillväxtstatus hos plantor med olika nivåer av torkstress.

1.2.1 Litteraturstudie

I ett inledande skede gjordes en litteraturstudie som i huvudsak behandlar olika torkstressmetoder som prövats i olika studier. Litteraturstudien berör andra mätmetoder, vilka inte grundligare redovisas i detta arbete. Ingen mer djupgående introduktion till i försök använda mätinstrument kommer redovisas då detta inte rymdes i arbetets tidsram, utan det hänvisas i huvudsak till respektive instruments instruktionsbeskrivning.

1.2.2 Praktiska arbetet

Syftet med den praktiska delen är att se om avstannad/reducerad tillväxt på grund av torkstress kan uppskattas genom att mäta klorofyllfluorescens med en "MINI-PAM". MINI-PAM är ett instrument som använder PAM-teknik (Pulse- Amplitude Modulation), vilket är en välbeprövad teknik (Burling et al, 2013).

Först gjordes en pilotstudie i växthus av metodiken för att framkalla torkstress. De två arter som användes i pilotstudien förekommer som ogräs i Sverige, allmänt eller lokalt: nämligen renkavle, *Alopecurus myosuroides* Huds. och raps, *Brassica napus* L. Dessa skiljer sig åt då raps är tvåhjärtbladig och (när det uppträder som ogräs) vårgroende och medan renkavle är ett höstgroende gräsogräs.

I en efterföljande studie i odlingskammare användes samma arter samt det vårgroende gräsogräset flyghavre (*Avena fatua* L.).

Hypoteserna för arbetet var:

- Hypotes 1: Mängden biomassa (g TS) vid slutskörd påverkas av fukthalten, det vill säga torkstress avgör tillväxten.
- Hypotes 2a: En planta med god vattentillgång har en högre fotosynteskapacitet än en planta vars tillväxt helt avstannat på grund av torkstress.
- Hypotes 2b: En planta med god vattentillgång har en högre fotosynteskapacitet än en planta som är torkstressad, men som ännu är i tillväxt.
- Hypotes 3: Det finns ett mätbart samband mellan tillväxten (mätt som mängden biomassa i slutskörden) och den fotosynteskapacitet som uppskattats då plantan har varit torkstressad.

Metoder som t ex att genom olika osmotiska ämnen som PEG framkalla stress i plantor har gett osäkra resultat, vilka redovisas närmare under avsnitt två. Det krävs dessutom ofta tidskrävande orienterande försök på den studerade arten, innan dessa metoder kan användas. Därför valdes metoden att utsätta plantorna för torkstress, genom att justera bevattningen utifrån krukans aktuella vikt. I pilotförsöket i växthus var målet att ge 80, 50 respektive 15 procent vattenhalt jämfört med vattenmättad vikt. Med 80 procent skulle plantorna få optimala tillväxtförhållanden med avseende till vatten. Plantorna med 50 procent vattenmättnad skulle få en reducerad tillväxt, med de med endast 15 procent helt skulle avstanna i tillväxten. I det efterföljande försöket i odlingskammare justerades mittennivån från 50 ned till 35 procent av vattenmättad vikt, för att få plantorna tydligare stressade.

2 Litteraturstudie över metoder att framkalla vattenstress

En omfattande litteraturstudie gjordes över metoder för att framkalla vattenstress. Flera olika metoder för att inducera torkstress hos växter har beskrivits i litteraturen. Dessa inkluderar metoder att direkt undanhålla växten vatten, reglering av genomträngligheten för vatten, den så kallade hydrauliska konduktiviteten, samt användning av olika osmotiska agenter var för sig eller i form av en blandning. Olika metoder har för- och nackdelar beroende på de försök som ska utföras och beroende på vilken art som ska studeras.

2.1 Osmotiskt aktiva ämnen

Många olika föreningar såsom polyetylenglykol, NaCl, sukros, mannos, Dextran och sorbitol har genom tiderna blivit använda som osmotiska agenter för att studera vattenstress hos växter (Krizek, 1985).

2.1.1 Mannitol

Mannitol har till försök ofta använts som ett osmotiskt aktivt ämne för att framkalla vattenstress hos växter (Manohar, 1966; Resnik, 1970; Thill med fler, 1979). Mannitol har bieffekten att det kan tas upp av växter (Lipavska och Vreugdenhil, 1996; Manohar, 1966, personlig kommentar Blum, 2010). Mannitol kan hämma upptaget och förflyttningen av fosfor i plantan (Resnik, 1970).

2.1.2 Natriumklorid

Natriumklorid (NaCl) har likt mannitol använts vid ett flertal försök som ett osmotiskt ämne (Krizek, 1985). Ett av de största problemen vid användandet av NaCl som ett osmotiskt ämne är att natriumet kan ha en toxisk effekt och därmed ge ett felaktigt resultat (Manohar, 1966). Effekten är beroende av vilken art som ska behandlas (Krizek, 1985).

2.1.3 Polyetylenglykol (PEG)

Polyetylenglykol (PEG) är det osmotiska ämne som mest frekvent använts för att inducera vattenstress hos växter. PEG är en inert, icke-jonisk, lång polymer som är löslig i vatten (Lawlor, 1970; Krizek, 1985). Polyetylenglykol finns tillgängligt i en rad olika molekylvikter, vilka kan variera från molekylvikt från 200 till 20000 (Lawlor, 1970; Jackson, 1962). Krizek (1985) varnar för att varje varuprov av PEG representerar en serie av molekylvikter och inte en enda ensam vikt, som ibland kan antyd. PEG används inom botaniken för att inducera vattenstress och osmotisk stress hos växter genom att minska vattenpotentialen (Lawlor, 1970; Kaufmann and Eckard, 1971; Anwer et al., 2004). Den tid det tar för PEG att inducera stress i växten är omkring 1-4 dagar (Krizek, 1985).

Anwer et al. (2004) visade att PEG (6000) orsakade en signifikant minskning av skott och rottillväxten hos vårbrodd, *Anthxanthum odoratum*. Försöket visade även att ju högre koncentration av PEG som användes, desto mer hämmades rottillväxten. Kaufmann & Eckard (1971) visade att PEG med högre molekylvikt fungerar bättre för att framkalla vattenstress hos växter än de med lägre molekylvikt, som PEG 400.

Verslues et al. (1998) rapporterade att hög viskositet hos PEG-lösningen begränsar rörelsen av syrgas vilket kan leda till syrebrist hos rötterna. Även vid relativt höga vattenpotentialer kan syretransporten till rötterna vara otillräckliga när PEG med en molekylvikt av 4000 eller mer används (Mexal et al., 1975).

PEG har visat sig kunna medföra problem i form av skadliga eller giftiga sidoeffekter (Lagerwerff et al., 1961; Emmert, 1973; Leshem, 1966; Resnik, 1970). Problemet med upptag av PEG i växten har studerats av bl.a. Lawlor (1970) som visade att PEG med högre molekylvikt än 1000 inte absorberades av växten förutom i de fall då rötterna var skadade. PEG med molekylvikt så låg som PEG-200 kunde däremot absorberas av växten även genom oskadade rötter. Slutsatsen bekräftades av Janes (1974) som visade att mindre molekyler gav en högre koncentration av PEG i bladen. När PEG med en molvikt av 4000 eller högre används kan även dessa innehålla giftiga föroreningar vilka troligtvis härstammar från tillverkningsprocessen. Dessa giftiga effekter kan enligt artikelförfattaren tas bort genom att låta lösningen passera genom en dejonisering eller en Sephadex kolonn (Janes, 1974).

Enligt Resnik (1970) hämmade PEG förflyttningen av fosfor i växten men inget tydde på att fosforupptaget minskade. Minskningen av fosfors förflyttning var inte permanent utan 24 timmar efter senaste behandling med PEG återhämtade sig plantan och värdena var samma som för kontrollplantan. Emmert (1974) visade dock att fosforupptaget hämmades när PEG togs upp av växten.

De fysiologiska effekterna av vattenstress på grund av PEG jämfört med de effekter som blir då vattenstress är inducerat genom att vatten undanhålls växten kan vara ganska annorlunda (Krizek, 1985).

Krizek (1985) rekommenderar, vid användning av PEG som ett aktivt osmotiskt ämne, att använda sig av växter som endast är stressade genom att vatten direkt undanhålls som kontroll. Därigenom blir det möjligt att utesluta att växtens stress är en effekt av giftiga ämnen utsöndrade av PEG.

Toxiska effekter av PEG har dock inte kunnat påvisas i alla studier (Lawlor, 1970; Kahn et al., 1982; Stockwell & Tingey, 1977). Carpita et al., 1979 visade att PEG med en större molekylvikt än 6000 inte kan tränga in genom växternas cellväggar. Enligt Verslues med fler (1998) så är det lättare att se en effekt som liknar jord som torkar om man använder PEG med högre molekylvikter. Detta beror på att PEG inte kan tränga in i växtens cell utan istället dras vatten tillbaka från cellen och cellväggen.

För att minimera de giftiga effekterna har olika metoder prövats för att rena eller hindra PEG att tränga in i växten. Plaut & Federman (1985) beskrev en metod att rensa bort de giftiga substanserna i PEG 6000 genom att återvinna lösningen efter att den fått passera två växtodlingar med flytande substrat.

Substansens renhet och ett eventuellt upptag av PEG i växten som ska utsättas för stress bör undersökas ifall PEG är ämnat att användas som ett osmotiskt aktivt ämne (personlig kommentar Blum, 2010; Krizek, 1985).

Semipermeabla membran

Vid användandet av PEG som ett osmotiskt ämne vid inducering av vattenstress, finns det som tidigare nämnts risk att detta har en toxisk effekt. Ett sätt att undvika den skadliga påverkan kan vara att använda ett semipermeabelt membran som skyddar rotsystemet. Denna metod presenterades första gången 1966 av Zur (1966), och därefter följde snabbt liknande försök (Painter, 1966; Cox och Boersma, 1967). Rötterna innesluts då av membranet medan de får växa i en näringslösning, som innehåller en osmotisk agent, som till exempel PEG. Membranet utesluter PEG från rötterna, men låter ändå vatten och näring sprida sig genom membranet till rötterna (Tingey & Stockwell, 1977; Sikurpajapathy et al., 1983). Flera försök har gjorts att utveckla olika metoder och system för att stänga in rotsystemet i ett semipermeabelt membran, för att därefter låta det växa i en näringslösning som innehåller PEG som ett osmotiskt ämne (Kidder och Behrens, 1991, Zur, 1966, Blum, 2010).

Stockwell och Tingey (1977) påvisade en ökning av fosforkoncentrationen i stam och blad hos bönor efter att ha använt ett semipermeabelt membran för att skilja PEG-lösningen från rötterna. I försöket användes Spectrapor 1 membran, som hade den minsta molviktsavstängningen (minimum mol wt cutoff), vilket uteslöt PEG 20M. En jämvikt mellan växten och näringslösningen inställde sig inom fyra dagar. Vid användandet av ett tjockare dialysmembran runt rötterna minskar innehållet av PEG i växten. Tingey och Stockwell (1977) visade dessutom att för varje ytterligare ökning av membranets tjocklek så minskade upptaget av PEG med ungefär 50 %. Mikrobiell nedbrytning av membranerna är vanlig efter 14-20 dagar (Krizek, 1985; Snow och Tingey, 1985; Painter, 1966).

Inducering av vattenstress med PEG

När PEG ska användas för att framkalla vattenstress bör man undersöka huruvida växten som ska stressas, tar upp PEG eller inte (personlig kommentar Blum, 2010). Olika arter reagerar olika på PEG och vissa tar lättare upp ämnet än andra. Då PEG upptas av växten kan detta problem reduceras genom att använda ett semipermeabelt membran. Vid all behandling och odling av plantorna är det mycket viktigt att de behandlas varsamt då skadade rötter betydligt lättare tar upp PEG än vad oskadade gör.

Ytterligare ett sätt att framkalla vattenstress med PEG är att använda sig av plaströr. Metoden beskrivs på www.plantstress.com (2010-02-27). Metoden innebär att botten på plaströren avlägsnas så att vatten och näring kan tas upp. I plaströret placeras ett semipermeabelt membran som fylls med sand, vermikulit eller annat önskat substrat som ska användas som odlingsmedium. För att det inte ska bli för svårt för lösningen att komma in till rötterna genom sanden bör inte provrörets diameter vara för stor. Detta måste vägas i relation till rötternas storlek då dessa lätt kan hämmas om utrymmet är för litet för att tillåta tillväxt.

Först får frön gro i behållarna i några dagar i endast vatten, med eller utan växtnäring, tills plantan kommit upp i lämplig storlek. Därefter induceras vattenstress genom att tillsätta PEG-lösningen i behållaren med provrören, alternativt föra över provrören till en lösning med PEG och önskat osmotisk tryck.

För att undvika att växten utsätts för osmotisk chock kan det vara bra att inte tillsätta PEG i för stora doser och inte för snabbt. För att undvika att det ackumuleras för mycket salt i lösningen kan det vara lämpligt att varje dag (Federman & Plaut, 1985) tillsätta destillerat vatten och att varje vecka helt byta ut lösningen (Krizek, 1985; Federman & Plaut, 1985). Vid användandet av semipermeabelt membran är risken för att chocka plantan med PEG inte lika stor och enligt artikelförfattaren är det då inte nödvändigt att öka doserna av PEG stegvis (www.plantstress.com, 2010-02-27).

2.2 Hydrauliska aktiviteten

Vid försök under en längre period (åtta veckor eller längre) kan det vara fördelaktigt att framkalla vattenstressen genom att reglera den hydrauliska konduktiviteten (Krizek, 1985). I en studie av Snow och Tingey (1985) framkallades vattenstress genom att höjden av en vattenkolonn och/eller den hydrauliska konduktiviteten i ett växtmedium i kolonnen ändrades. På detta sätt kunde man kontrollera hur hårt bundet vattnet skulle vara till partiklarna i mediet vid rotytan. Den bakomliggande orsaken till detta var att man ville undvika de nackdelar som kan uppstå vid användandet av osmotiska aktiva ämnen som till exempel PEG, samt nedbrytningen av de semipermeabla membranerna genom den mikrobiella aktiviteten (Tingey och Stockwell, 1977).

2.3 Direkt undanhållande av vatten

För att framkalla vattenstress hos växter är det enklaste sättet att i växthus eller odlingskammare reducera växtens tillgång på vatten från jorden eller substratet som det växer i. En av fördelarna med denna metod är att den är fri från föroreningar som skulle kunna finnas i det osmotiska ämnet (Krizek, 1985).

Substratet som växten ska växa i har stor betydelse för hur växten och vattnet kommer att reagera. Olika substrat håller eller tappar vatten olika fort, vilket gör att det är viktigt att välja ett substrat efter det man vill undersöka.

Att använda jord som substrat för rötterna att växa i har nackdelen att det kan vara komplicerat att få ett jämt vattenupptag och fördelning av vatten i jorden. När en mindre mängd vatten tillförs ovanifrån till en torr jord i en behållare så fuktas endast den övre delen av jorden medan den nedre delen förblir torr (Graham-Bryce, 1967; Krizek, 1985). Är substratet för grovt, som grov sand med lite organiskt material, finns det risk att jorden torkar ut alldeles för snabbt för att det ska kunna vara möjligt att utföra några meningsfulla mätningar. Är jorden däremot rikare på organiskt material eller på annat sätt har en högre vattenhållningskapacitet kan det istället ta alldeles för lång tid innan växten visar några symptom på vattenstress. Om substratet inte är poröst nog kan växten istället komma att lida av övervattnig då inte vattnet sjunker undan som det ska. Detta kan undvikas genom att blanda ut jorden med sand vilket ökar porositeten i substratet (Krizek, 1985).

En av de största utmaningarna med att använda sig av denna metod är att finna en kvantifierbar slutpunkt och bevara en likformig nivå av vattenbrist (Krizek, 1985).

3 Praktiska delen

Frågeställningarna i arbetet var huruvida det är möjligt att framkalla en kontrollerad vattenstress i växter och om detta i sådant fall går att mäta. De hypoteser vi arbetat utifrån är att plantor med full tillgång på vatten har en full fotosyntes medan den avtar med ökande vattenstress. Med hjälp av ett MINI-PAM instrument ska tre olika hypoteser prövas för att se om det på så vis går att mäta torkstress i plantor, som utsatts för olika fukthalt. MINI-PAM mäter förändringar i fotosyntesaktiviteten där friska plantor med bra rätt tillgång till näring och vatten ger en hög fotosyntes och därmed ett högre yeldvärde. De tre olika hypoteserna som den praktiska delen av arbetet utgår från är:

- Hypotes 1: Mängden biomassa (g TS) vid slutskörd påverkas av fukthalten, det vill säga torkstress avgör tillväxten.
- Hypotes 2a: En planta med god vattentillgång har en högre fotosynteskapacitet än en planta vars tillväxt helt avstannat på grund av torkstress.
- Hypotes 2b: En planta med god vattentillgång har en högre fotosynteskapacitet än en planta som är torkstressad, men som ännu är i tillväxt.

Fotosynteskapaciteten uppskattas i båda fallen ovan från mätning av fluorescensen. Se vidare under 2.4.2 Fluorescensmätning.

- Hypotes 3: Det finns ett mätbart samband mellan tillväxten (mätt som mängden biomassa i slutskörden) och den fotosynteskapacitet, som uppskattats då plantan varit torkstressad.

4 Material och metoder

Växter kommer att reagera olika beroende på vald metod. Det är väsentligt att välja den metod som är mest lik de förhållandena, som växterna kan komma bli utsatta för i fält eller annat habitat som kan vara aktuellt. Det är också viktigt att bestämma huruvida växter, som utsätts för vattenstress under en längre tid ska utsättas för stress stötvis eller i intervaller, då den lär reagera olika beroende på art och metod.

4.1 Vattenstressförsök

I detta projekt användes metoden att direkt undanhålla vatten som metod att framkalla en kontrollerad vattenstress hos försöksplantorna.

4.2 Fluorescensmätning

Finns det ett samband mellan fotosyntes och tillväxt för arter under stressade situationer så kan fotosynteskapaciteten användas som en fysiologisk markör (Ashraf och Harris 2013). Det finns flera mätare som mäter fotosynteskapacitet och som baseras på klorofyllfluorescens. Burling med fler (2013) skriver att fördelarna med fluorescensbaserade metoder är väl beskrivna som metod att utvärdera fysiologiska svar på stress hos plantor. I växternas celler finns en mängd kloroplaster. Dessa kloroplaster innehåller membran av lipider och proteiner och kallas tylakoider. I tylakoiderna finns hundratals klorofyllmolekyler, det så kallade fotosystemet, och det är där fotosyntesen sker. Det finns två fotosystem som kallas fotosystem ett (PSI) och fotosystem två (PSII). Fotosystemet består både av ljusabsorberande antenner samt ett reaktionscentrum. Antennerna fångar upp fotoner som avger energi till en elektron, som då får ett högre energivärde. Denna överflyttning av energi kallas excitation och

nu kallas elektronen för en exciton. I reaktionscentret binds sedan excitonen och samtidigt bildas en elektrisk ström som driver på den fotosystemiska reaktionen.

Klorofyllfluorescens är när klorofyllet i växten utstrålar ett särskilt ljus (fluorescens), då det fångar upp solljus. Ett avtagande i fluorescensen kan betyda att växten är skadad. Alla gröna växter innehåller klorofyll av typerna a och b. I vitt ljus framstår växterna som gröna eftersom klorofyllmolekylerna i första hand absorberar ljuset av de blå och röda regionerna av spektrat och sedan reflekterar ut grönt ljus. Ljusenergi som absorberats i antennkomplexen kan sedan gå åt tre olika vägar; avges som värme, användas i fotosyntesen eller återstrålas som rött ljus, så kallad fluorescens. Dessa tre sker i konkurrens med varandra och en effektökning av en process kommer att minska nivån av de andra två. Av den totala ljusenergin som absorberas avgår endast cirka 1-2 procent som klorofyllfluorescens. Ändå kan man använda fluorescenssignalen för att uppskatta nivån av fotosyntes och värmeavgång. Med MINI-PAM (se nedan) fås ett yieldvärde på den upplösning av klorofyllfluorescens som avgår, vilket är den ljusmängd som kan användas för fotosyntes. I mörker är alla reaktionscenter öppna och mottagliga för ljusabsorption och det är då den fotosyntetiska kapaciteten är som störst och når sitt högsta värde. Däremot nås aldrig riktigt 100 procent. Maxvärde i mörker är därför ungefär 82 procent, vilket verkar vara fallet för de flesta växter. I mätningar i starkt ljus är istället reaktionscentren mättade och därför stängda, och den fotosyntetiska kapaciteten blir därför noll.

I mätningar kan man få fram en kvot mellan maximal uppnådd fluorescens (F_m) och en variabel fluorescens (F_v) i PSII i ett blad, F_v/F_m . Kvoten mellan dessa ger inte ett mått på vilken fotosyntes som verkligen ägt rum utan ger ett mått på kapaciteten i PSII och därmed växtens förutsättning för fotosyntes. Görs upprepade mätningar kan kvoten F_v/F_m ge information om förändringar i kapaciteten hos PSII. Sänks kvoten mellan dessa indikerar detta värde att växten är utsatt för stress.

MINIPAM

I detta försök har mätningar gjorts med en fotosyntesmätare. Instrumentet var av modellen MINI-PAM, från WALZ Mess- und Reglertechnik i Tyskland. För mätningarna på bladen användes en clip-holder 2030B, vilken kopplades med en fiberoptikkabel till instrumentet.

Instrumentet sänder ut en kraftig men kortvarig ljusimpuls. Ljusimpulsen som sänds ut är så pass kraftig att alla öppna reaktionscentra i PSII mäts men inte för kraftig så att fotosyntesen startas. Direkt efterljusimpulsen registrerar instrumentet fluorescens som F_m , vilket är plantans maximala fluorescens. .

4.3 Växthusförsök

Utifrån litteraturstudien drog vi slutsatsen att de resultat man får efter att ha använt sig av olika osmotiska ämnen ofta kritiserats och ifrågasätts. Dessutom finns det risk för S_u upptag av ämnen i växten, vilket kan vara en alltför stor felkälla. Därför valde vi att inte använda osmotiska ämnen. Istället stressades plantorna genom att vatten undanhölls i olika utsträckning. Detta alternativ är även det som är mest lik de förhållanden som växter utsätts för under naturliga betingelser.

4.3.1 Test inför val av kruktyp

För att till försöket använda den bäst lämpade krukan testades sju krukor av olika storlek och form. Dessa fylldes med industrisand som vattenmättades. Krukorna vattenmättades med 50 % näringslösning och 50 % kranvatten för att inte ge en för hög koncentration av näringsämnen i lösningen. Även om inte några växter skulle planteras så användes näringslösning för att betingelserna inför kommande besök skulle vara så lika som möjligt. Samtliga krukor fylldes till samma höjd med

torr industrisand och vikten, inklusive krukans fat (petriskål + en större skål) justerades till 537,1 gram. Krukorna placerades, fullständigt randomiserade, i nordliggande växthus med belysning 16 timmar per dygn och 8 timmar mörker. Efter att sanden vattenmättats och vägts på nytt, fick krukorna stå orörda under en period av sju dagar. Den kruktyp som visat att dess vattenhalt minskat ner till de önskade 15 procenten, valdes sedan för de fortsatta experimenten. Dessa krukor hade en höjd av sju centimeter och en diameter av nio centimeter.

4.3.2 Växthusförsök med renkvale och raps

För försöket användes frön av renkvale, *Alopecurus myosuroides* insamlade i södra Skåne och av vårraps, *Brassica napus* av sorten Joplin från Svalöv Weibull.) Frön placerades i petriskålar på dubbla filterpapper, som fuktades med en kaliumnitratlösning (1 g l^{-1}) för att öka grobarheten. För renkvale, inkuberades 11 petriskålar med 50 frön i varje skål. Rapsfrön, vilka har en högre grobarhet, inkuberades i fem petriskålar. Petriskålarna förseglades med parafilm och placerades i en gröningsinkubator med en temperatur på 23°C , tills fröna börjat gro och fått en grodd på två till fem centimeter. Rapsfröna grodde redan efter fyra dygn medan det för renkvalefrön tog ytterligare några dygn att gro.

Nyligen grodda frön planterades två och två per kruka. De krukor som användes var de som tidigare (se 2.5.1) visat sig fungera bäst för ändamålet. Krukorna vattenmättades med 50 % näringslösning och 50 % kranvatten för att inte ge en för hög koncentration av näringsämnen i lösningen.. Samtliga omplanterade groddar överlevde och efter cirka en vecka rensades det mest avvikande exemplaret ut ur varje kruka (inklusive rotmassan), för att få plantor av likvärdig storlek. I resterande vattningar användes utspädd näringslösning.

Varje kruka vattnades upp till full vattenmättnad för att de planterade växterna skulle få en så stor chans som möjligt att gro. Efter två veckors tid när plantorna etablerat sig i krukorna, framkallades stress genom att gradvis undanhålla krukorna och växten vatten (med vatten menas detsamma som näringslösning). Som näring i hela försöket användes Blomstra (Cederroth 1 ml l^{-1} vatten;). Tre olika behandlingar användes: i) kontrollbehandling där växterna fick tillräcklig tillgång på vatten och näring (vattenhalt 80 % av vattenmättnad), ii) intermediär stress (vattenhalt 50 % av vattenmättnad), och iii) stor stress (vattenhalt 15 % av vattenmättnad). För att registrera vattenpotentialen i krukorna, efterhand som vatten reducerades, användes en nykalibrerad vattenaktivitetsmätare av modell HygroPalm AW1 (Rotronic; Basserdorf, Schweiz). Vattenpotentialen registrerades i speciellt för ändamålet preparerade krukor, delade för att kunna kontrollera vattenpotentialen i tre olika lager i krukorna.

Krukornas vattenhalt nedjusterades med 10 procent per dag tills dess att önskad vattenhalt uppnåts. Kontrollplantorna försågs med en konstant vattenhalt av 80 procent av vattenmättnad. Vikten justerades minst två gånger varje dag och vid varmt väder med tätare intervall. Tidpunkterna för detta noterades inte utan skedde regelbundet under dygnets ljusa timmar beroende på temperaturvariationen i växthuset, som påverkade avdunstningstakten. Därför vägdes varje enskild kruka flera gånger varje dag, för att hålla en önskad vikt och därmed önskad vattenmättnad. Vikt noterades inte efter varje vägning utan fokus låg istället på att varje kruka skulle ha den rätta vikten och därmed önskad vattenmättnad. Efter att krukorna nått och stabiliserats på önskad vattenhalt så startades mätningarna med fluoroscensmätaren. De krukor som skulle få en så låg vattenmättnad som 15 % hade i något fall svårt att sjunka exakt i önskad takt.

Vägning och vattning av krukorna skedde precis innan de skulle placeras i ett mörkt rum för mörkeradaptering. I det mörka rummet var den enda ljuskällan en lampa med grönt ljus, vilken

användes under själva mättillfället. Plantorna fick anpassa sig till mörkret i mellan en och två timmar innan mätningarna påbörjades. Mätningarna utfördes på samtliga plantor varje eftermiddag mellan klockan 14.00-16.30. De blad som användes var för varje planta det näst senaste och mätningarna utfördes på bladet en tredjedel in från bladspets. Mätning gjordes först i instrumentläget "SET" och sedan i läget "START". Endast SET-värdena kommer att redovisas och användas här. De mätningarna gjordes nämligen först på varje planta, som därmed inte tidigare utsatts för någon ljuspuls efter att de mörkeradapterats. Värdena från fluorescensmätaren fördes över till dator. Mätningarna utfördes under sju dygn, (19 – 25 maj) för renkavleplantorna och fyra dygn (19 – 22 maj) för rapsplantorna.

Renkavleplantorna skördades 4 juni, medan rapsplantorna förvuxit sig och inte skördades. Ovanjordisk biomassa skildes från underjordisk och sköljdes ren från sand. Båda fraktionerna torkades i en värmeugn i 105 C° i ett dygn innan vägning.

4.4 Försök i odlingskammaren

I steg två förlades försöket till mer kontrollerad miljö i odlingskammare. Miljön inne i odlingskammarna reglerades i den svala kammaren till 18 grader C för dygnets ljusa (klockan 04.00-22.00) och 12 grader C för dygnets mörka timmar (22.00 - 04.00). I den varma kammaren reglerades temperaturen till 22 grader C respektive 16 grader C för de ljusa och mörka timmarna på dygnet.

Till skillnad mot i växthusförsöket ersattes industrisand med en fin fraktion av pimpsten (Pumex SpA, Lipari, Italy). Detta för att på ett säkrare sätt kunna kontrollera vattenhalten i krukorna eftersom sanden har mycket liten buffringskapacitet när det gäller vatten.

Runda plastkrukor användes med en höjd av sju centimeter och en diameter på nio centimeter. För att undvika att pimpsten läckte ut ur de små hålen som i krukans botten så nålades en tunn väv fast i varje kruka. På så sätt kunde vatten sugas upp genom väven medan pimpsten hindrades från att rinna ut. Krukorna fylldes med pimpsten och placerades på en petriskål. Varje kruka med underliggande lock från en petriskål tillsammans med pimpsten vägdes in till en exakt vikt på 155,0 gram. Därefter vattenmätades pimpstenen med 50 procent näringslösning och 50 procent kranvatten för att inte ge en för hög koncentration av näringsämnen i lösningen. Som näring i hela försöket användes Blomstra (Cederroth; 1 ml l⁻¹ vatten). Den vattenmättade krukans vikt registrerades för varje enskild kruka.

Till försöket i odlingskammaren användes frön av arterna flyghavre, *Avena fatua*, renkavle, *Alopecurus myosuroides* och vårraps, *Brassica napus* av sorten Joplin. Frön från nämnda arter placerades i petriskålar på dubbla filterpapper vilka fuktats med en kaliumnitratlösning (1 g l⁻¹) för att öka grobarheten. Petriskålarna förseglades med parafilm och placerades i de odlingskammare, vilka de fortsatt skulle vara placerade i under försökets gång. I de fall där det uppstod mögel på filterpappren i petriskålarna med frön, lades fröna om i nya petriskålar med nya dubbla filterpapper och nygjord kaliumnitratlösning. När frön börjat gro och fått en grodd på två till fem millimeter så planterades två groddar i varje kruka. Efter några dagar rensades det mest avvikande exemplaret ut ur varje kruka med både över- och underjordisk biomassa bort. Därefter återstod endast en groddplanta per kruka. Efter åtta dagar hade samtliga planteringar gjorts i de vattenmättade krukorna.

Samtliga krukor som planterats vägdes och vattnades varje eftermiddag underifrån. Vikten kontrollerades så att vikten av vattnet samt den växande plantan inte understeg 80 procent av den ursprungliga vattenvikten (d v s den initiala totalvikten minus vikten för kruka, nålar, väv, pimpsten och petriskålslock). Plantorna nådde rätt stadium efter sex till 14 dagar beroende på art och vilken

kammare de stod i, se tabell 1. Rätt stadium var när rapsens tredje örtblad syntes och när det fjärde bladet syntes i gräset.

I varje kammare fanns 15 vagnar med krukor. Varje art hade tre vagnar med totalt 24 krukor. Dessa 24 krukor skulle mätas fluorescens på och utöver dessa fanns tre ekstrakrukor för mätning av vattenaktivitet. Av de 24 krukorna delades dessa upp i tre olika led. Led A hade 80 % vattenmängd jämfört med vattenmättnad, led B 35 % av vattenmättnad och led C med 15 % av vattenmättnad.

De krukor som skulle ha en vattenhalt på 35 respektive 15 procent neddjusterades från de initiala 80 procenten med 10 procent per dag tills dess att önskad vattenhalt uppnåts. Kontrollplantorna försågs med en konstant vattenhalt av 80 procent av vattenmättnad. Vikten justerades dagligen. Tre olika behandlingar användes:

- Kontrollbehandling där växterna fick tillräcklig tillgång på vatten och näring. Det vill säga att vattenhalten justerades till 80 % av vattenmättnad.
- Intermediär stress med vattenhalt på 35 % av vattenmättnad.
- Stor stress med en vattenhalt på 15 % av vattenmättnad).

Antalet dagar från det att samtliga krukor vattenmättats till 80 procent till att de uppnått rätt stadium och att de olika leden har uppnått den status i vattenmättnad de ska redovisas i tabell 1.

Tabell 1. De tre olika arterna placerades i två olika kammare. En kammare med varmare (V) temperatur (22°/16° C) och en med något kyligare (K) (18°/12° C), Siffran efter V/K anger respektive vagns id-nummer, tillsammans med nämnd bokstav. "Nått rätt stadium" anger antal dagar efter vattenmättnad de åtta krukorna nådde avsett stadium. Då när det fjärde bladet syntes i gräsen och för rapsen att det tredje örtbladet rapsens syntes.

Antalet dagar till olika inträffanden	Flyghavre			Raps						Renkavle								
	V1	V2	V3	K1	K2	K3	V4	V5	V6	K4	K5	K6	V7	V8	V9	K7	K8	K9
Nått rätt stadium	8	8	9	12	12	12	6	6	6	8	8	8	9	12	12	12	13	14
B-ledet har nåt 50 % från vattenmättnad	11	11	11	17	16	16	9	10	9	11	11	11	13	17	16	17		20
C-ledet har nåt 15 % från vattenmättnad	13	11	16				11	11	11	14	14	15	18	19	19			

Fluorescensmätningarna påbörjades när plantorna uppnått rätt stadium vilket var när fjärde bladet syntes i gräsen och rapsens femte blad, då tredje örtbladet syntes. Beroende på hur långt ogräset hunnit komma i de olika kamrarna, så utfördes olika många fluorescensmätningar. Avsikten var att göra nya mätningar var tredje till var fjärde dag. Till skillnad mot i växthusförsöket så gjordes mätningarna i ljus. Eftersom det omgivande ljuset i kammaren därmed hade betydelse, så stod personen som utförde mätningen alltid på samma ställe, för att eventuell skuggning skulle bli densamma.

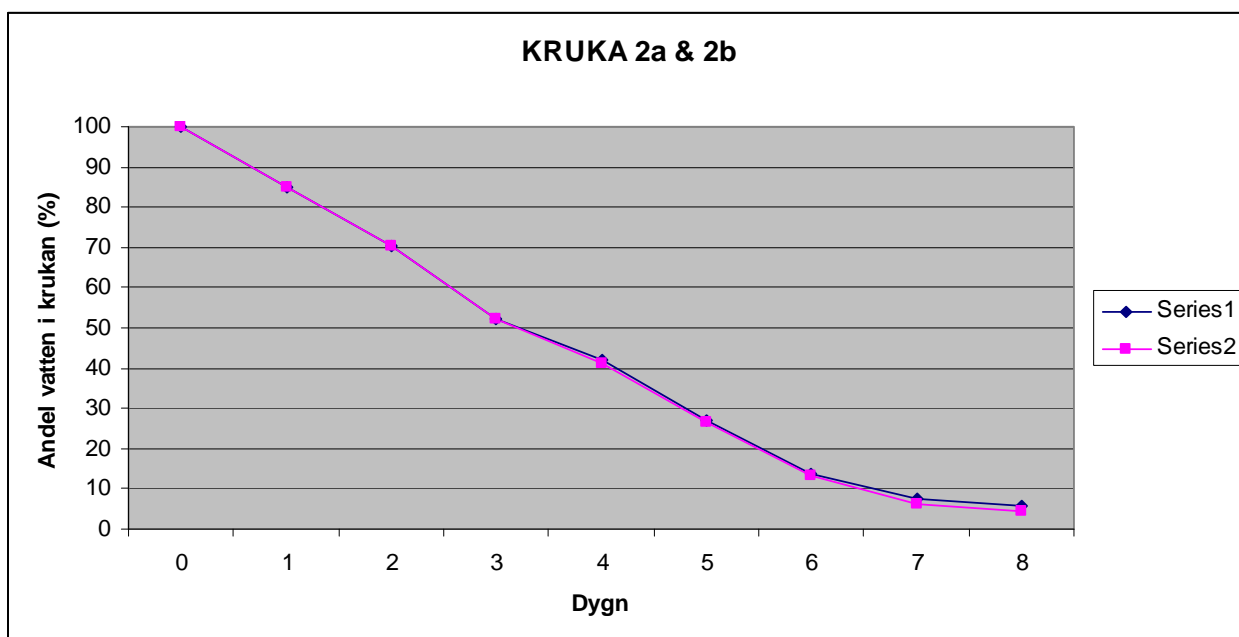
Samtliga mätningar utfördes på förmiddagarna medan vattningen alltid gjordes på eftermiddagar. De blad som användes var för varje planta det näst senaste och riktvärdet var att mätningarna skulle utföras på bladet en tredjedel in från bladspets. Värdena från fluorescensmätaren fördes över till dator och lades sedan över i Excel.

Precis innan skördetillfället vattnades krukorna upp till 100 procent i fem minuter. Detta med syfte att fukta upp rötterna så att det skulle bli lättare att skölja bort pimpstenen. Plantorna delades sedan upp i ovan- och underjordisk del och torkas i en värmeugn i 105 grader C i 24 timmar innan vägning för TS-vikt.

5 Resultat

5.1 Val av krukor

Till testet att ta fram den bäst lämpade krukans för försöket så valdes sju olika krukor ut. Dessa krukor hade olika form och storlek, se bilaga 1. Av varje kruksort togs två krukor. Avdunstningens hastighet för de krukor som senare användes i försöket redovisas i figur 1. Från att krukorna av denna kruktyp, var helt vattenmättade tog det sex dygn innan de avdunstat så att endast 15 procent av den vattenmättade vattenmängden återstod. Övriga krukor kändes ojämnare i sin avdunstning eller kändes onödigt stora. Samtliga krukor illustreras med bild och avdunstningsdiagram i bilaga 1.



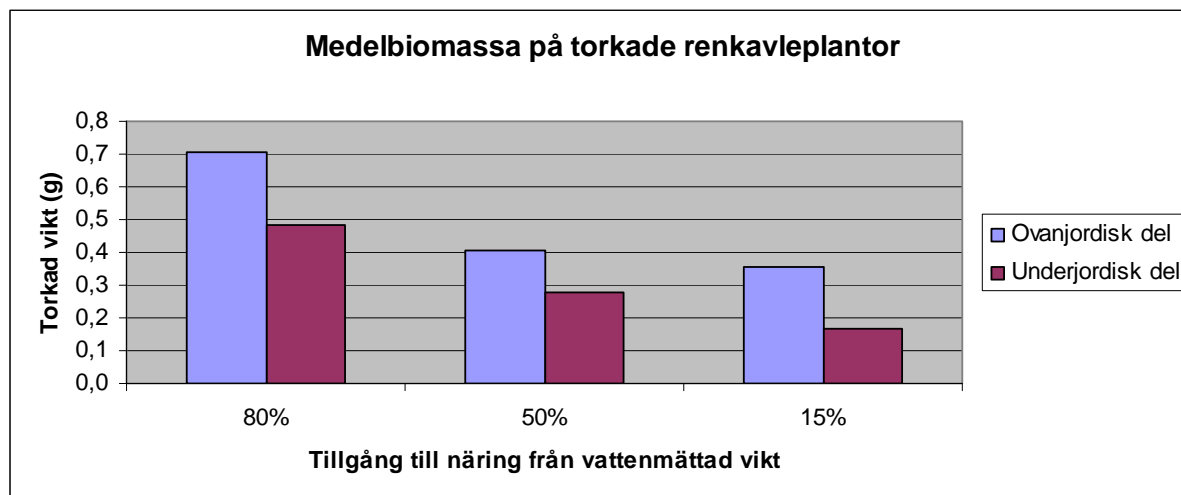
Figur 1. Avdunstningsdiagram för kommande försökskruka

5.2 Vattenaktivitetsmätningar

Då det regnade in i växthus kunde inga mätningar göras på vattenaktiviteten i de specialgjorda krukorna som delats i tre olika nivåer. Mätningarna fick avbrytas innan mätningarna kunde utföras.

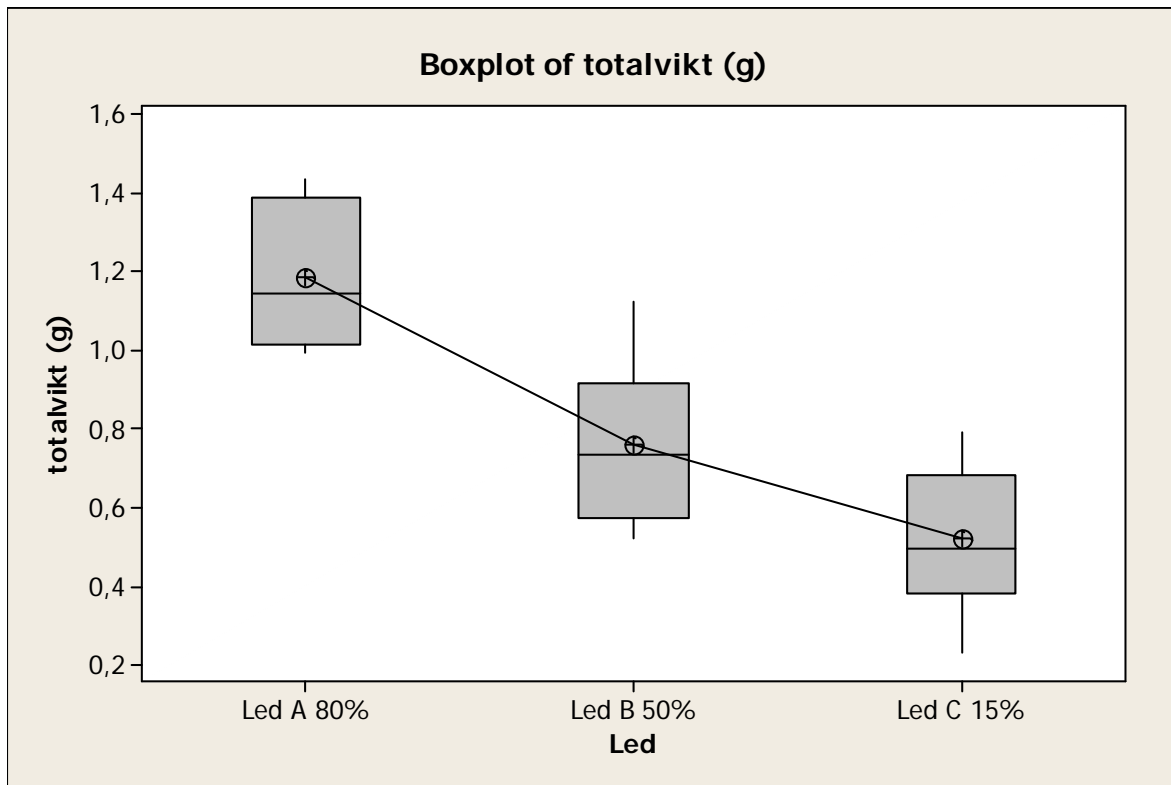
5.3 Torkad biomassa hos försöksplantorna i växthus

Plantorna var svåra att stressa i önskad takt och vid daglig visuell observation kunde tydligt ses att plantorna i samtliga led tillväxte. Rapsplantorna förväxte sig snabbt efter att fluorescensmätningar utförts kunde därför inte längre användas i försöket, utan istället skördades endast renkavleplantorna. Biomassan i slutskörden av renkavle minskade med minskad vattenhalt i krukorna. I figur 2 visas fördelningen mellan vikterna i de olika behandlingarna.



Figur 2. Torkad ovan- och underjordisk biomassa på renkavleplantor utsatta för olika behandling.

I växthusförsöket undersöktes sambandet mellan tillväxt och vattenstress (figur 3). Visuellt sågs att plantorna aldrig helt avstannade i tillväxt. För renkavle (som var den enda arten som skördades), så minskade biomassan med fukthaltsskylsen. Skillnaderna var statistiskt signifikanta mellan led A och de båda stressade leden, B och C, (Tukey 95 %).

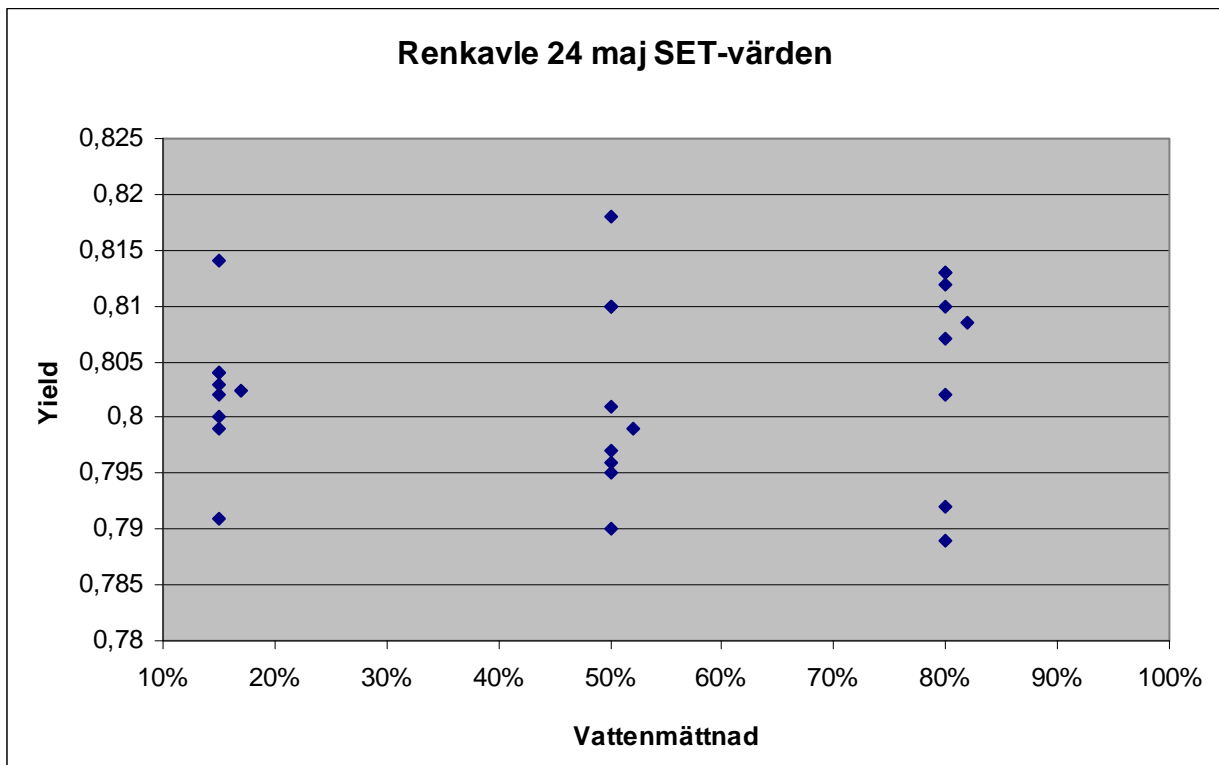


Figur 3. Renkavle i växthuset. Biomassa vid sluskörd per fukthaltsklass. Fukthalt i procent av vattenmättnad: A 80 %, B 50 %, C 15 %. $P=0,000$, $RSq = 66$ %. Led A är signifikant skild från B och C (Tukey 95 %).

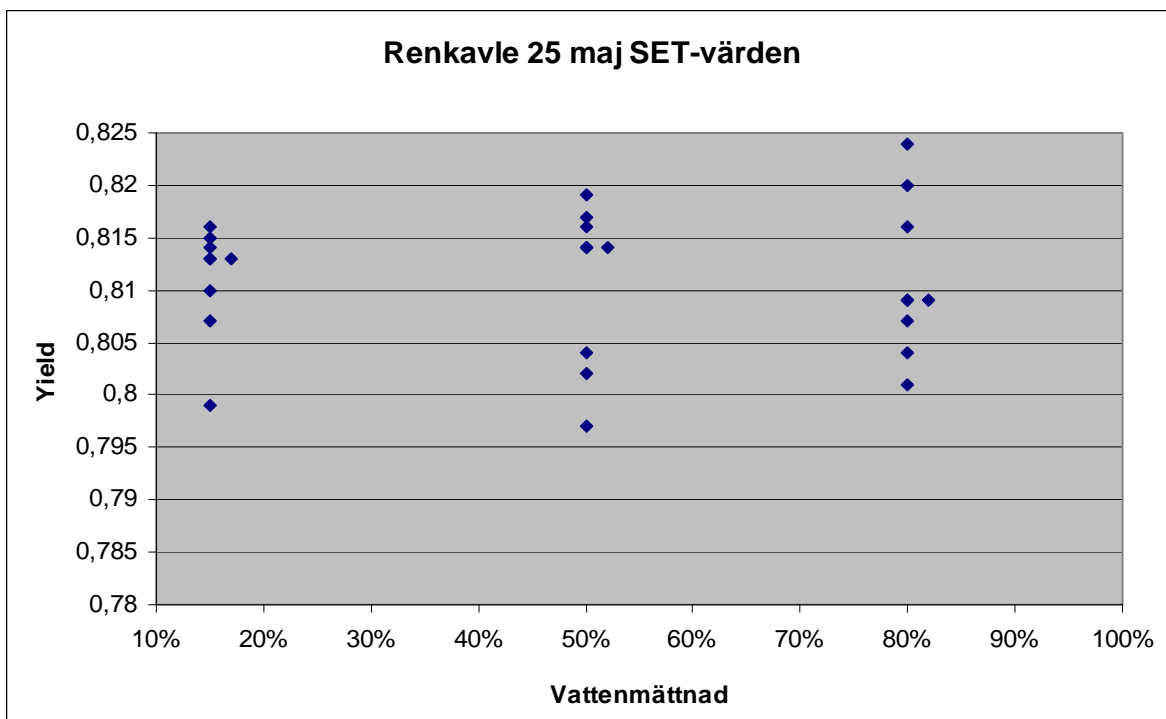
Biomassan mättes endast som sluskörd. Det var dock tydligt av visuella observationer under försökets gång att även om tillväxten var mycket långsam och starkt begränsad i led C, så avstannade den inte helt. Den lilla vattentillsats som dagligen gjordes för att kompensera krukans viktsförlust tycktes komma plantan tillgodo.

5.4 Fluorescensmätning, Växthus

Några statistiskt säkersställda skillnader mellan fukthalt och fluorescens var svårt att finna. För att få en överblick över resultaten har ett antal punktdiagram gjorts, se figur 4 och 5, samt i bilaga 2 för renkavle och i bilaga 3 visas 21-22 majs mätningar för raps. I graferna visas yieldvärdet för varje kruka i respektive vattenhaltsklass. Punkten som är förskjutet något till höger om de övriga visar på medianvärdet för varje led av vattenmättnad.



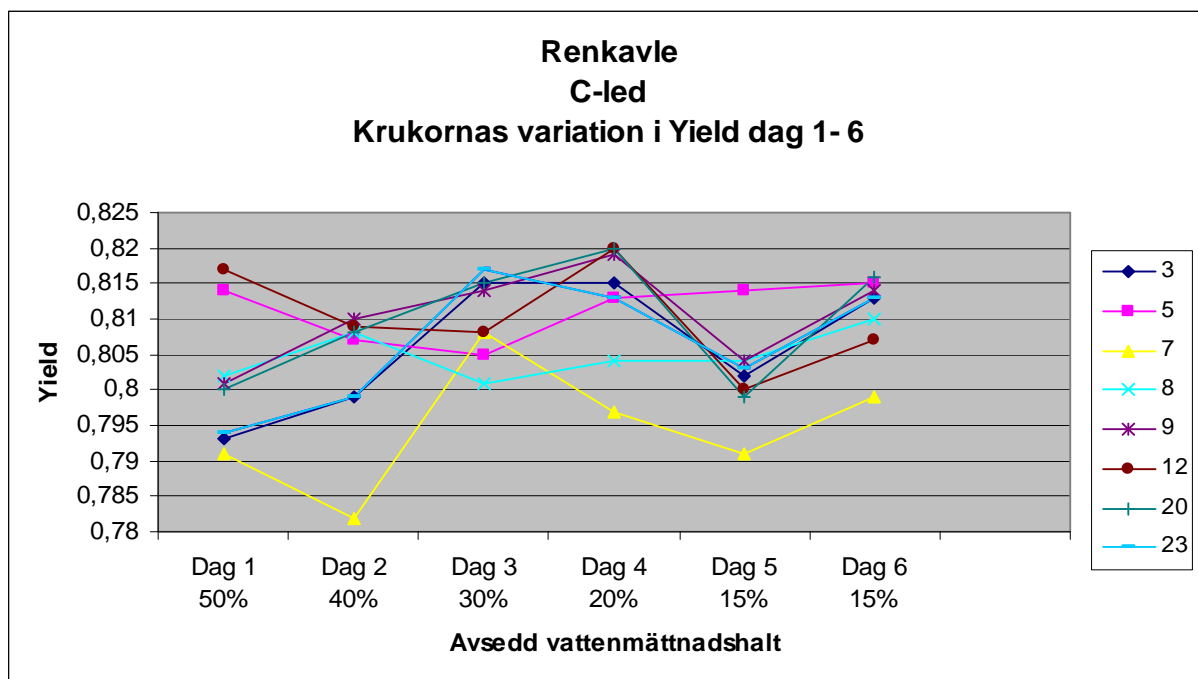
Figur 4. Yieldvärde för fluorescensmätningar i åtta krukor per vattenhaltsklass den 24 maj. Punkt till höger om varje grupp anger gruppens medelvärde. För C-ledet är det första dagen (stressdag ett), som plantan nått ner till 15 % vattenhalt från vattenmättnad. För B-ledet är det stressdag fyra.



Figur 5. Yieldvärde för fluorescensmätningar i åtta krukor per vattenhaltsklass den 25 maj. Punkt till höger om varje grupp anger gruppens medelvärde. För C-ledet är det andra dagen (stressdag två), som plantan nått ner till 15 % vattenhalt från vattenmättnad. För B-ledet är det stressdag fem.

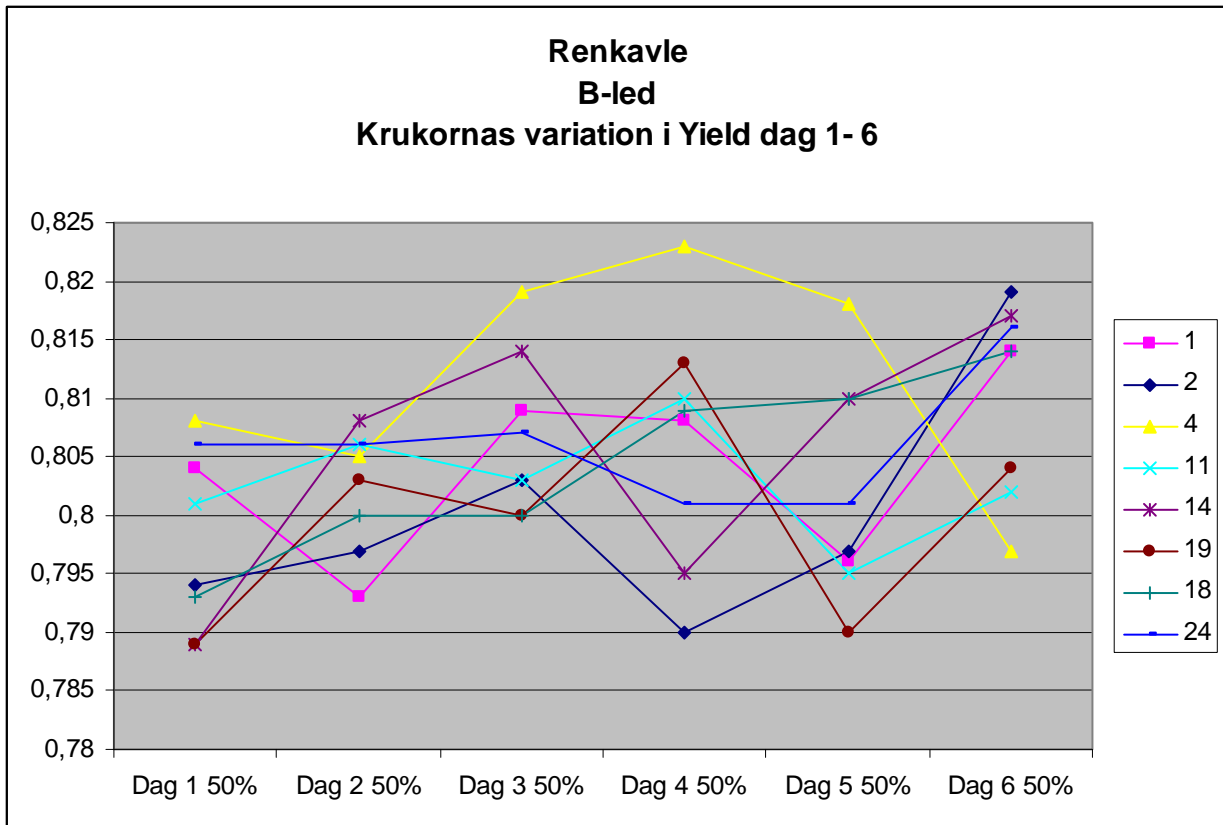
För att kunna se om varje enskild plantas yieldvärde förändrades som en funktion av vattenmättnad över tid så åskådliggjordes detta i olika grafer, se figur 6, 7 och 8. Varje kruka hade ett specifikt identitetsnummer. Detta identitetsnummer motsvarar i grafen en linje som visar en enskild krukans förändring av yield och vattenmättnadshalt över tid.

I figur 6 visas de olika plantorna i C-ledet, som blivit mest stressade, där intentionen varit att krukorna successivt skulle minska till 15 % från 50 % vattenmättnad under de sex dagarna. På grund av den svårkontrollerade miljön i växthus så kom inte alla krukor att sjunka till exakt önskad procenthalt per mättdag. Några tydliga mönster som skulle kunna påvisa ett samband mellan vattenmättnadshalt i en specifik planta och dess yieldvärde går inte att se.



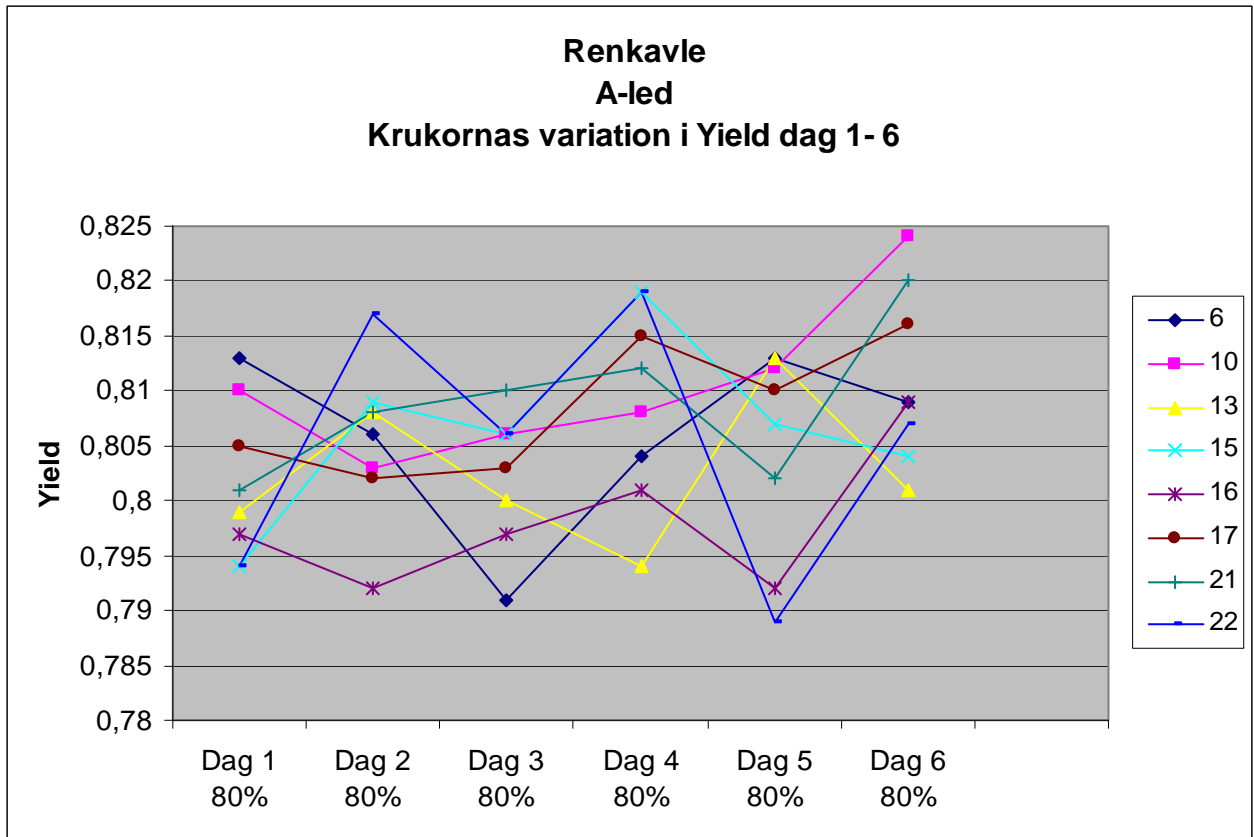
Figur 6. Yieldvärde för fluorescensmätningar mätt i mörker efter adaptering, 1-2 timmar. Yieldvärde som en funktion av tid och avsedd vattenmättnadshalt. Varje linje symboliserar en enskild kruka och hur dess yieldvärde, varierat över tiden då vattenmättnadshalten minskat från 50 procent ner till 15 procent.

I figur 7 nedan visas de olika ogräsplantorna i B-ledet där krukorna fått en vattenmättnadshalt på 50 % som de sedan fått behålla under samtliga mätningar (stressdag 1 → 6). Trots att samtliga krukor som visas i figuren haft samma vattenmättnadshalt så har yieldvärdet varierat kraftigt och jämfört med de uppmätta värdena i föregående figur (se figur 6). Inga skillnader kan ses då vattentillgången sänkts kraftigt.



I figur 7 visas yieldvärde för mätningar mätt i mörker efter adaptering, 1-2 timmar. Yieldvärde som en funktion av tid och avsedd vattenmättnadshalt. Varje linje symboliserar en enskild kruka och hur dess yieldvärde, varierat över tiden då vattenmättnadshalten legat konstant på 50 procent vattenhalt.

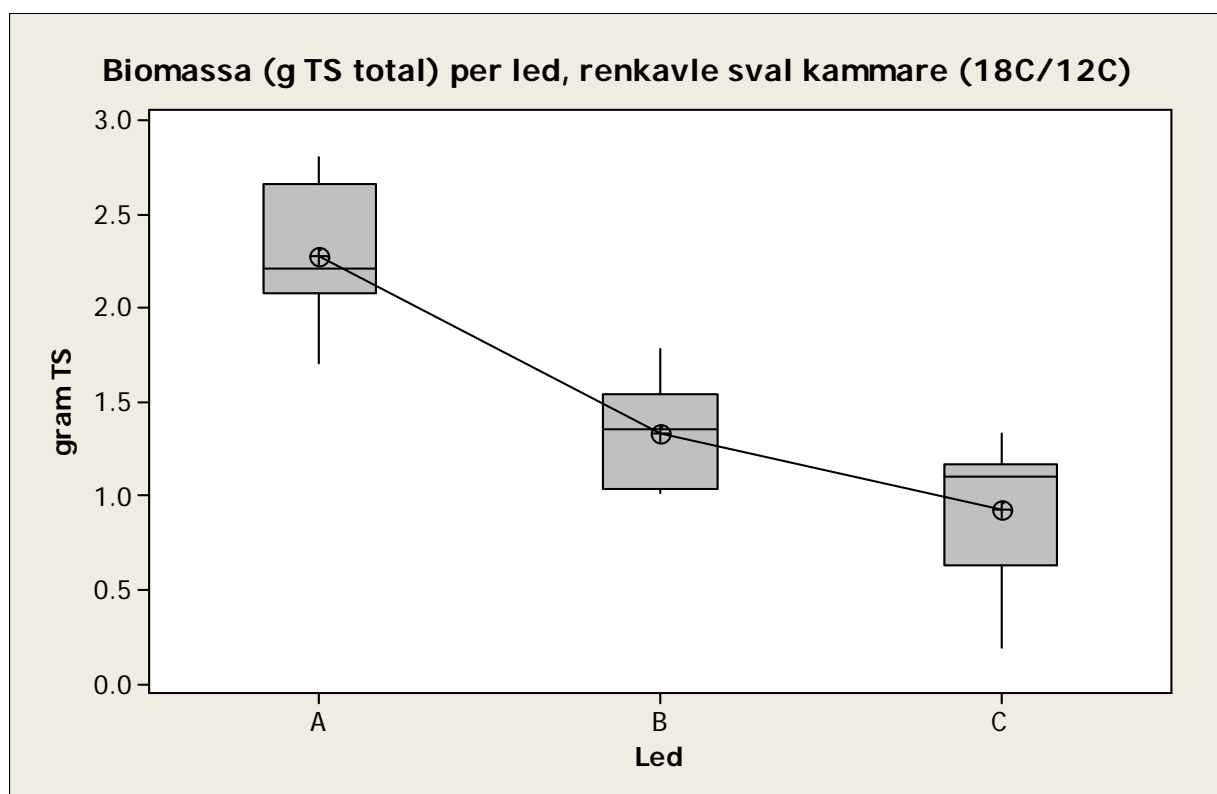
I figur 8 nedan visas de olika ogräsplantorna i A-ledet där krukorna fått rikligt med tillgång på vatten, med en vattenmättnadshalt på 80 %. Trots att samtliga krukor som visas i figuren haft samma rikliga vattenmättnadshalt, så har yieldvärdet varierat kraftigt.



Figur 8. Yieldvärde för mätningar mätt i mörker efter adaptering, 1-2 timmar. Yieldvärde som en funktion av tid och avsedd vattenmättnadshalt. Varje linje symboliserar en enskild kruka och hur dess yieldvärde, varierat över tiden medan vattenmättnadshalten legat konstant på 80 procent.

5.5 Torkad biomassa hos försöksplantorna i odlingskammaren

I odlingskammareförsöket undersöktes likt i växthuset sambandet mellan fluorescens, tillväxt och vattenstress. Även om resultatet var tydligare i växthuset så kunde man visuellt även i odlingskammaren se att plantorna aldrig helt avstannade i tillväxt. För alla de tre arterna (renkavle, flyghavre och raps) minskade biomassan med fukthaltsklassen, både i varm och sval kammare. Skillnaderna var statistiskt signifikanta mellan led A och C i samtliga fall (Tukey 95 %) men inte alltid mellan A och B och bara i ett fall (raps sval kammare) mellan led B och C (resultat visade enbart för renkavle i sval kammare, figur 9).



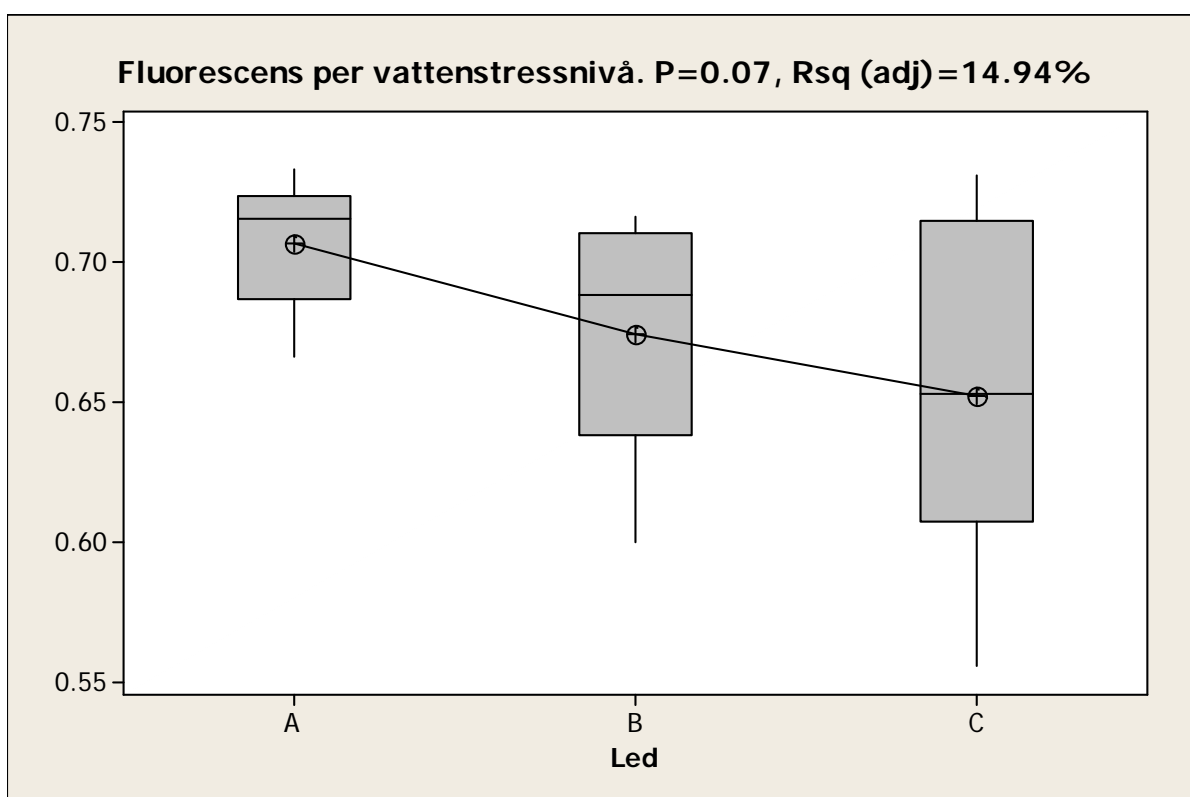
Figur 9. Renkavle i sval kammare. Biomassa vid slutskörd per fukthaltsklass. Fukthalt i procent av vattenmättnad: A 80 %, B 50 %, C 35 %. $P=0,000$, $RSq = 73$ %. Led A är signifikant skild från B och C (Tukey 95 %).

Biomassan mättes endast som slutskörd. Det var dock tydligt av observationer under försökets gång att även om tillväxten var mycket långsam och starkt begränsad i led C, så avstannade den inte helt. Den lilla vattentillsats som dagligen gjordes för att kompensera krukans viktsförlust tycktes komma plantan tillgodo.

5.6 Fluorescensmätning, Odlingskammaren

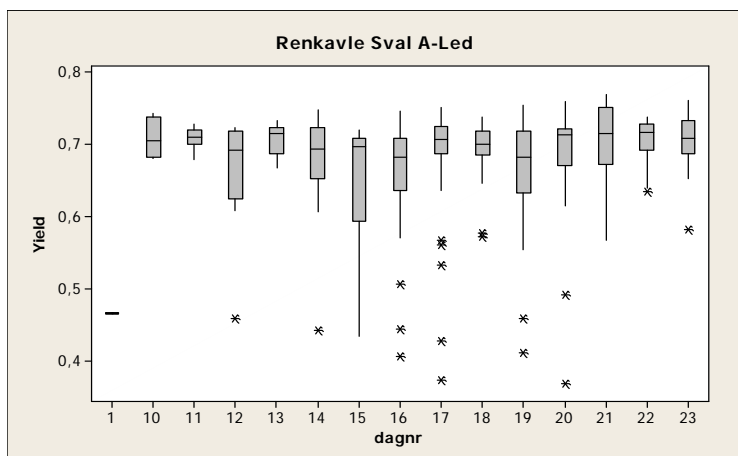
Renkavle var den art som växte mest jämt och dessa plantor hann aldrig omallokera sina resurser och skjuta strå. Rapsplantorna var mycket svåra att få jämna och förväxte sig snabbt. En del av flyhavreplantorna växte relativt fort och somliga hann skjuta strå och därmed börjat att allokera om sina resurser, och blev därför av mindre intresse. Särskilt i den svala kammaren visade flyghavren bristsymptom, trots näringsvattningen. I det följande koncentreras därför presentationen till renkavle, där mätvärden också fanns för flest dagar.

Figur 10 visar fluorescensmätningarna för renkavleplantorna i den svala odlingskammaren under stressdag ett (S1), alltså den första dag då krukorna nått ned till önskad fukthalt, kunde. Boxarnas storlek i figur 10 symboliserar spridningen av fluorescensens i de olika leden, där spridningen är mest variabel i det stressade C-ledet. Även om trenden är den förväntade, med sjunkande yieldvärden vid sjunkande vattentillgång, är resultaten inte statistiskt signifikanta (ANOVA).

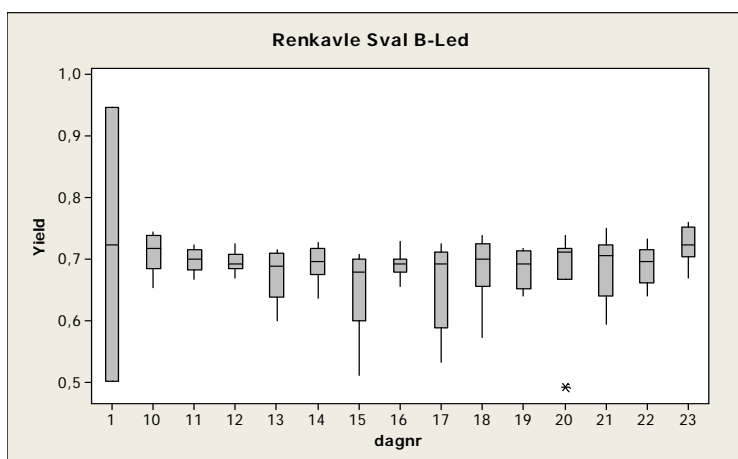


Figur 10. Fluorescensmätningar i renkavle i sval kammare (18°C/12°C) under första stressdagen, n=8 krukor för varje led. Led A motsvarar god vattentillgång (80% av initial vattenmättnad), led B 35 % och led C 15 %. På y-axeln visar yieldvärdet uppmätt med MINI-PAM. Ingen signifikant skillnad i fluorescens mellan leden kunde påvisas.

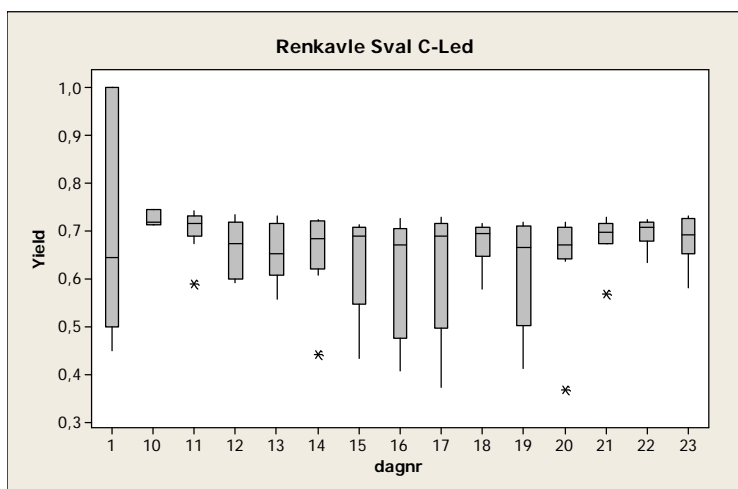
I figur 10b-d visas yieldvärdena per dag under testperioden, där dag 13 motsvarar den första stressdagen, S1. Skillnaden i yieldnivå mellan led A å ena sidan och led B och C å andra sidan är likartad under hela stressperioden. (Notera att y-axlens skala tyvärr skiljer sig något mellan graferna).



Figur 10b. Yieldvärdena per dag under testperioden, där dag 13 motsvarar den första stressdagen, S1. N=8. Led A motsvara 80 % av vattenmättnad.



Figur 10c. Yieldvärdena per dag under testperioden, där dag 13 motsvarar den första stressdagen, S1. N=8. Led B motsvara 50 % av vattenmättnad..



Figur 10d. Yieldvärdena per dag under testperioden, där dag 13 motsvarar den första stressdagen, S1. N=8. Led A motsvara 35 % av vattenmättnad

6 Diskussion

I den omfattande litteraturstudien framgår det att många olika metoder har prövats för att framkalla stress hos växter, de senaste decennierna. Många försök har visat ge tvetydiga resultat och det är svårt att se en särskild metod som lämpat sig bättre än andra. En del forskare förespråkar osmotiska ämnen och menar att det är den rätta vägen att gå. Samtidigt så visar resultaten vid andra försök att olika typer av problem uppstått. Det upplevdes osäkert huruvida olika växter tar upp de osmotiska ämnena eller inte (Krizek, 1985).

Ska denna metod användas så bör man först göra en förstudie om de arter som skulle undersökas. Detta för att innan se ifall växten tog upp det aktuella osmotiska ämnet eller inte (personlig kommentar Blum, 2010). Resultat vid försök med osmotiska ämnen har även ofta kritiserats och då en förstudie inte rymdes inom given tidsram så valdes metoden bort.

När en metod används på ett laboratorium, där man sedan även ska kunna gå att tillämpa samma metod i fält, så ställs extra höga krav. Man måste kunna jämföra de metoder som görs på laboratoriet med de förhållanden, som sedan kommer att råda i fält. Det är därför viktigt att de försök som genomförs även kan fungera i den andra miljön. Så för att undvika allt för konstgjorda regleringar för att stressa växten, ansågs att det bästa sättet att undanhålla den vatten (närlösning). Genom att undanhålla en planta vatten och näring, så kan man likna den stressituation som kan uppstå vid en torrperiod i fält.

I detta arbete utfördes försök i ett nordliggande växthus. Då försöken utfördes under årets absolut varmaste dagar var det en omöjlig uppgift att reglera temperaturen inne i växthuset. Krukornas vattenhalt sjönk kraftigt och det var ett mycket tidskrävande arbete att försöka hålla avsedd vattenhalt i krukorna. Avdunstningen gick väldigt snabbt under de varmaste timmarna och närlösningen fick fyllas på väldigt ofta.

Stressen har ändå haft en märkbar effekt, vilket framgår av resultaten på biomassan. De krukor som stressades med 15 % respektive 50 % tillgång på närlösning i växthuset och 15 % respektive 30 % i odlingskammaren skilde sig signifikant från ledet med optimal (80 %) tillgång på vatten. De stressade leden fick därmed en betydligt lägre vikt på biomassan jämfört med de plantor som hade tillgång till 80 % av närlösningen.

Närlösningen fylldes på underifrån med hjälp av en pipett där vattenhalten reglerades genom en bestämd vikt. På sandens översta lager bildades ett skorpliknande lager som i många fall blev segt och med ett grönfärgat algtäcke med en minskad porositet. Om detta påverkade resultatet eller inte är inte klart, men bör nämnas som en eventuell felkälla.

Vid mätningar med fluorescensmätare på blad av olika grader av tillväxt är det viktigt att man mäter på så lika blad som möjligt. Är mätningarna inte konsekvent utförda så kommer det med all sannolikhet ha inverkan på mätvärdena. I växthusförsöket gjordes fluorescensmätningarna på eftermiddagarna i ett mörkt rum med endast en grön lampa som enda ljuskälla. Att kunna urskilja det näst nyutvecklade bladet var tidskrävande. Det krävdes stor försiktighet i mörkret för att inte skada bladet under clippen. Efter att försöket flyttats från den svårkontrollerade miljön i växthuset så blev det något bättre i odlingskammarna. Antalet upprepningar ($n=8$) för varje led är dock fortfarande i minsta laget för att man ska kunna vara säker på sina resultat Cummin (2007). I renkavle kunde ett samband mellan fluorescens (yield) och vattenstress anas, men resultaten var inte statistiskt signifikanta. De höstgroende fröna från renkavle hade inte börjat flytta om sina resurser i växten, vilket kan så ha skett i fallet med flyghavreplantorna. Dessa hann växa till sig och vissa började skjuta strå. Rapsen växte

dock på samma sätt som i växthuset alldeles för fort och det gick därför inte att göra någon bra mätning på dessa plantor.

Hade tid funnits och det hade varit praktiskt möjligt så hade självklart ett större antal upprepningar varit att föredra. Hade fler mätningar gjorts så kunde mer data samlats in och därmed skulle boxarna i graferna kunnat visa på ett tydligare samband. Det hade med tanke på att till exempel rapsen var så snabb i tillväxten också varit en idé att vara snabbare med mätningarna i den arten.

Vid mer tid hade fler faktorer kunnat tas med och tagits hänsyn till vid utvärderingen av resultaten. Till exempel kunde bladlängder/bredd mätts på de olika plantorna samt att en utförligare visuell studie kunde ha gjorts mer frekvent genom projektets gång. Hade vi vid samtliga mätningar av fotosyntekapacitet mätt plantornas vikter kunde vi ha haft ett större statistiskt underlag. Med vikter vid mätningarna kunde en regressionsanalys ha gjorts, vilken kräver fler variabler än de vi nu hade tillgång till, men då vi kunnat få fram en funktion som bättre förklarar de data vi fått fram.

Det är inte heller alltid säkert att det är just torka som stressar en planta. Andra omgivningsfaktorer som värme, kyla, salthalt, ljus och näring kan också spela en stor roll i utvecklingen av en planta och dess förmåga till att fotosyntetisera (Ashraf och Harris, 2013). I detta arbete fanns inte tid att prova ytterligare stressfaktorer, utan torkstress som ansågs vara den vanligaste orsaken valdes som alternativ. Saltstress och höga temperaturer är dessutom faktorer som mer sällan påverkar växter i vårt klimat. Burling med fler (2013) beskriver även om flera rapporter som varnar för den kommande bristen på vatten för jordbruket på grund av klimatförändringarna.

Syftet med det mest torkstressade ledet, C, var att få tillväxten i arterna att avstanna helt. Enligt den visuella bedömning som gjordes under försökets gång lyckades inte detta, utan plantorna fortsatte en långsam, svag tillväxt trots den svåra torkstressen. Kanske hade man vid helt avstannad tillväxt kunna få en signifikant skillnad i fluorescens yield. Vissningspunkten (eng. wilting point) som först introducerades av Briggs och Schantz (1912), är ett koncept som beskriver den minskade fuktmängd som måste finnas i jorden för att inte växter ska vissna. Det går inte att säga från denna studie om det är praktiskt möjligt att helt avstanna tillväxten i en liten örtartad planta genom att undanhålla vatten, utan att döda den. En plantas vissningspunkt kommer även bero på hur jordtexturen ser ut samt hur den vattenhållande förmågan är hos substratet.

En minskad fotosyntesaktivitet hos en planta kan vara ett tecken på att växten är utsatt för stark stress, med minskad eller obefintlig tillväxtförmåga (Schreiber 2004). Inga tydliga skillnader gick dock att se i resultaten med fluorescensmätaren. Det är heller inte helt säkert att växter i svenskt klimat ens sänker sin fotosynteskapacitet vid torka, vilket kan vara fallet i torrare länder.

7 Slutsats

Att enbart använda fluorescensmätningar för att bestämma tillväxtstatus hos en planta känns med de resultat som arbetet visat på mycket osäkert.

Det är också svårt att avgöra huruvida en stressad planta verkligen kommer få ett lägre yieldvärde än en planta som inte upplevt stress. En planta som fått full tillgång till näring kan ha hunnit växa så pass mycket att den börjat omallokera sina resurser och därmed fått ett lägre mätvärde än en mindre planta vars fluorescensmängd ryms i en mindre plantvolym och då ger ett högre mätvärde.

Bedömning av de ursprungliga hypoteserna:

Hypotes 1, att mängden biomassa blev signifikant lägre i de torkstressade plantorna än för dem med god vattentillgång för renkvavle i sval kammare, kunde påvisas.

Hypotes 2a, att fluorescenskapaciteten skulle bli lägre för plantor med avstannad tillväxt, kunde inte testas då plantorna i experimentet aldrig helt slutade växa. .

Hypotes 2b: Vi kunde inte med statistisk signifikans visa att en planta med god vattentillgång har en högre fotosynteskapacitet än en planta som är torkstressad, men som ännu är i tillväxt. För renkvavle i sval kammare fanns dock en sådan tendens.

Hypotes 3: Det gick inte att påvisa ett statistiskt mätbart samband mellan tillväxten (mätt som mängden biomassa i slusksörden) och den fotosynteskapacitet, som uppskattats under försöket vid tidpunkter då plantan varit torkstressad.

8 Källförteckning

Anwer, M., McNeily, T. och Putwain, P.D. (2004) Effects of PEG on the growth of two populations of *Anthranthum odoratum*. *International journal of agriculture & biology*. University of Liverpool, England. S718-720.

Ashraf, M. och Harris, P.J.C. (2013) Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51 (2): 163-190, 2013.

Briggs, L.J och H. L. Shantz, H.L. (1912) The wilting coefficient for different plants and its indirect determination, *Bot. Gaz.* 53:20–37

Burling, K., Cerovic, Z.G., Cornic, G. Ducruet, J-M. Noga, G. (2013) Fluorescence-based sensing of drought-induced stress in the vegetative phase of four contrasting wheat genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 89 (2013) 51-59.

Carpita, N., Sabulase, D., Montezinos, S. och Delmer, D.P. (1979) Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science*. Vol 205. Nr 4411. S 1144-1147.

Cox, L.M. och Boersma, L. (1967) Transpiration as a function of soil temperature and soil water stress. *Plant physiology*. Vol 42. S550-556.

Cummin, G., Fidler, Fiona., Vaux, David L. (2007) Error bars in experimental biology. *The Journal of Cell Biology*, Vol 177, No1, April 9.

Janes, B.E. (1974) The effect of molecular size, concentration in nutrient solution and exposure time on the amount and distribution of PEG in pepper plant. *Plant physiology*. Vol 54. S 226-230.

Kaufmann M.R. och Eckard, A.N. (1971) Evaluation of water stress control with PEGs by analysis of guttation. *Plant physiology*. Vol 47. S 453-456.

Kidder, D.W. och Behrens, R. (1991) Control of plant water potential in water stress studies. *Weed science*. Vol 39. S91-96.

Krizek, D. T. (1985) *Methods of Inducing Water Stress in Plants*. Plant Stress Laboratory, Plant Physiology Institute, ARS/USDA, Beltsville, MD 20705. *HortScience*, Vol 20. Nr 6. S 1028-1038.

Lagerwerff, J., Ogata, G. och Eagle, H.E. (1961) Control of osmotic pressure of culture solutions with polyethylene glycol. *Science*. Vol 133. S1486.

Lawlor, D.W. (1970) Absorption of PEG by plants and their effects on plant growth. *New Phytology*. Vol 69. S501-503.

Lipavska, H. och Vreugdenhil, D. (1996) Uptake of mannitol from the media by in vitro grown plants. *Plant cell, tissue and organ culture*. *Nederländerna*. Nr 45. S 103-107.

Manohar, M.S. (1966) Effects of "osmotic" systems on germination of peas. *Planta*. Vol 71. S81-86

Plaut, Z. och Federman, E. (1985) A simple procedure to overcome PEG toxicity on whole plants. *Plant physiology*. Vol 79. S559-561.

Painter, L.I. (1966) Method of subjecting growing plants to a continuous soil moisture stress. *Agronomy journal*. Vol 58. S 459-460.

Resnik, M.E. (1970) Effect of mannitol and polyethylene glycol on phosphorus uptake by maize plants. *Annals of botany*. Vol 34. S 497-504

Schreiber, U. (2004) Pulsre-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and saturation pulse method: An overview. Papageorgiou C. & Govindjee. *Chlorophyll Fluorescence: A signature of photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers.

Snow, M.D. och Tingey, D.T. (1985) Evaluation of a system for the imposition of plant water stress. *Plant physiology*. Vol 77. S 602-607.

Thill, D.C., Schirman, R.D. och Appleby, A.P. (1979) Osmotic stability of mannitol and polyethylene glycol 20000 solutions used as seed germination media. *Agronomy journal*. Vol 71. S 105-108

Tingey, D.T. och Stockwell, C. (1977) Semipermeable membrane system for subjecting plants to water stress. United States Environmental Protection Agency, Corvallis Environmental Research Laboratory. *Plant Physiology*. S58-60.

Van der Weele., Spollen, W.G., Sharp, R.E. och Baskin, T.I. (2000) Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany*. Vol 51. Nr 350. S1555-1562.

Verslues, P.E., Ober, E.S. och Sharp, R.E. (1998) Root Growth and Oxygen Relations at Low Water Potentials. Impact of Oxygen Availability in Polyethylene Glycol Solutions. *Plant physiology*. Vol 116. S 1403-1412.

Zur, B. (1966) Osmotic control of the matric soil-water potential- I. soil-water system. *Soilscience*. Vol 102. Nr 6. S394-398.

Hemsida:

<http://www.dow.com/polyglycols/carbowax/products/peg.htm>, (2010-04-20)

www.plantstress.com (2010-02-27)

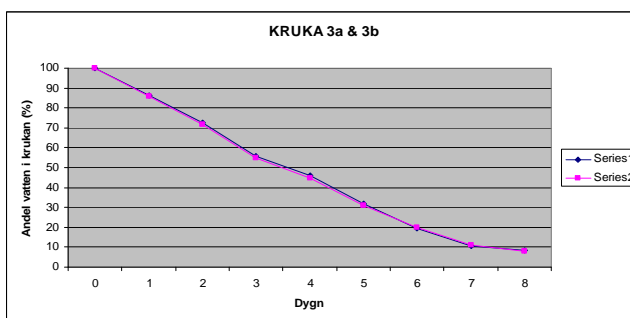
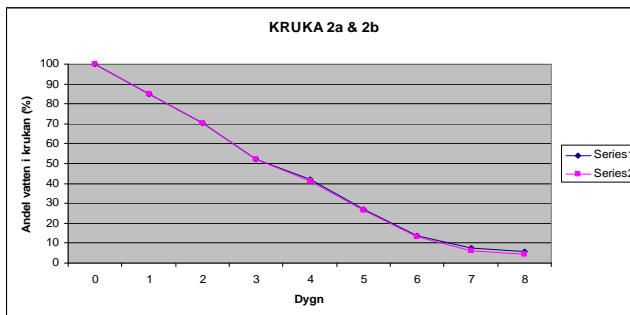
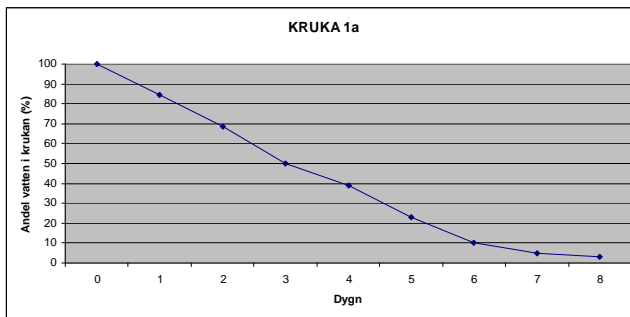
Personlig kontakt:

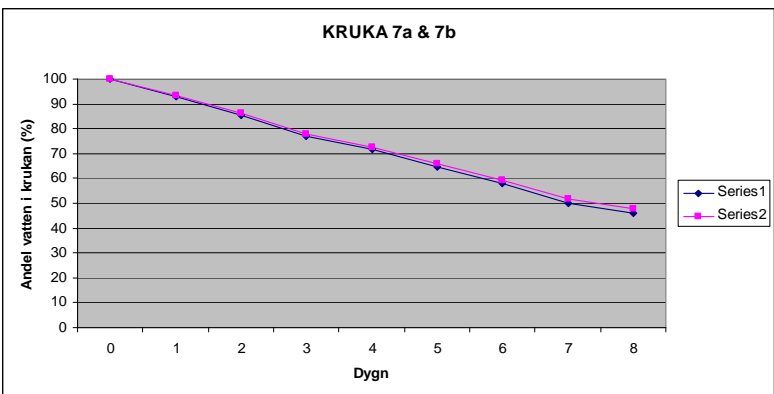
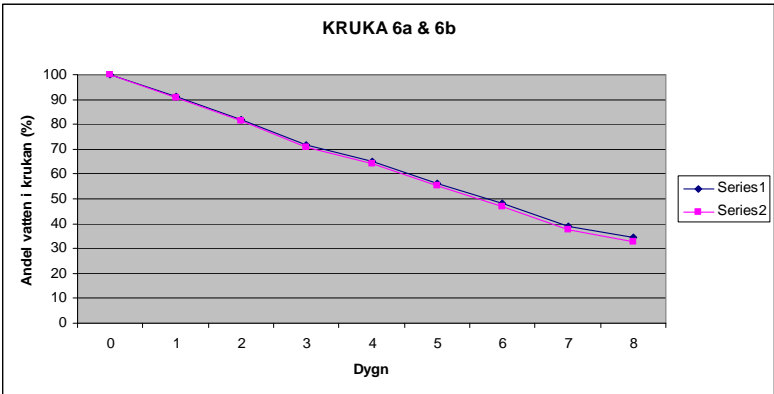
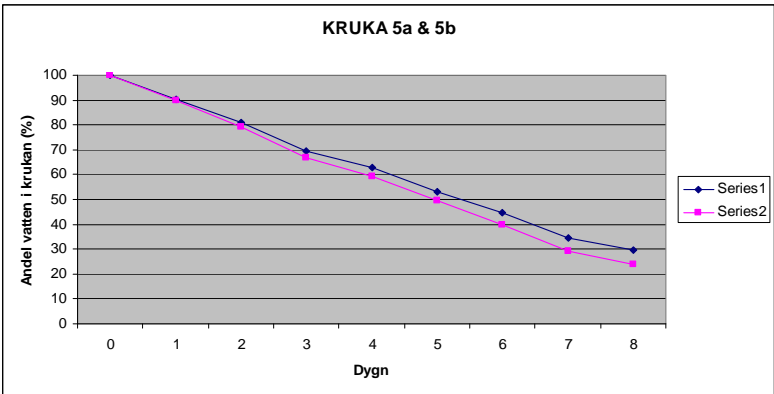
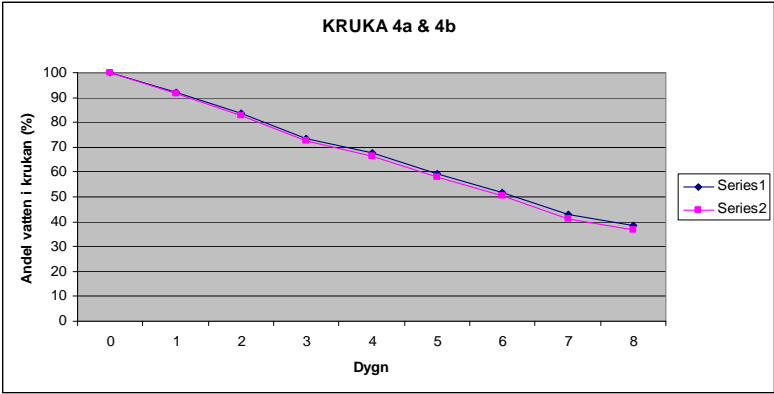
Dr Blum, A. Scientist Emeritus. The Volcani Center, Israel. (2010-03-11)

Bilaga 1. Test av kruktyper för växthusexperimentet



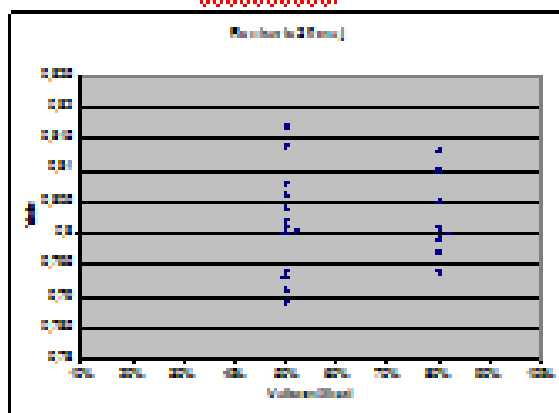
Kruka 1a närmast → Kruka 7b längst upp till vänster



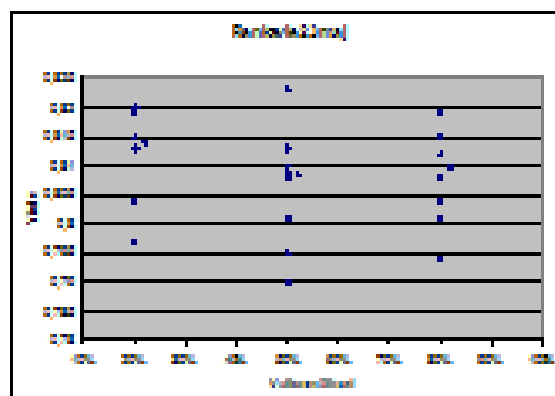


Bilaga 2. Renkavle i växthuset. Fluorescensmätningar i renkavle 20-25 maj.

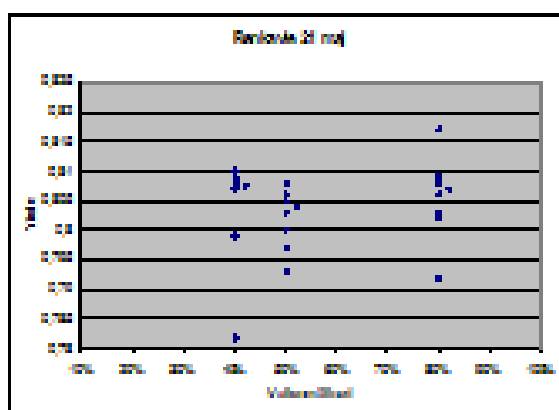
RENKAVLE Växthuset
20-25 maj
SET, Växten



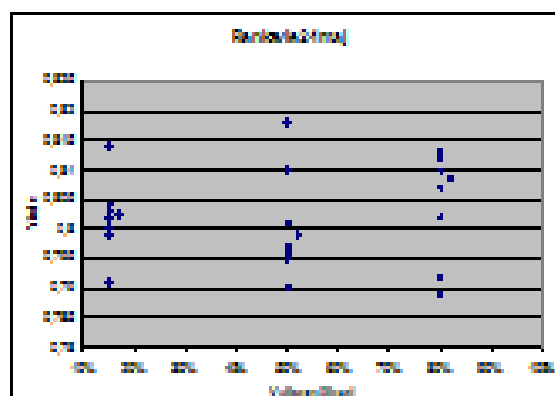
	Medel	Median	Max	Min
30%	0,800	0,801	0,817	0,789
60%	0,802	0,800	0,813	0,794



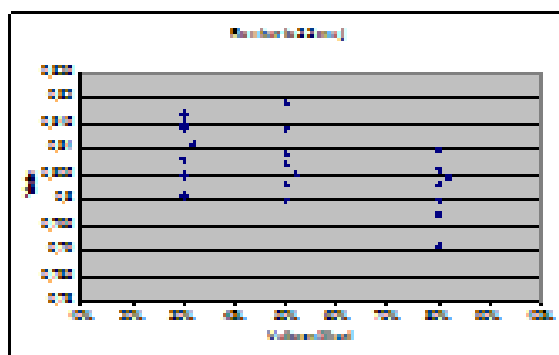
	Medel	Median	Max	Min
30%	0,813	0,814	0,820	0,797
50%	0,806	0,809	0,823	0,790
80%	0,809	0,810	0,819	0,794



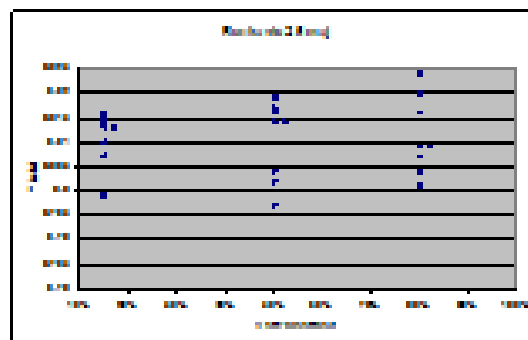
	Medel	Median	Max	Min
40%	0,803	0,808	0,810	0,782
50%	0,802	0,804	0,808	0,795
80%	0,806	0,807	0,817	0,792



	Medel	Median	Max	Min
15%	0,802	0,803	0,814	0,791
50%	0,802	0,799	0,818	0,790
80%	0,805	0,809	0,813	0,789



	Medel	Median	Max	Min
30%	0,810	0,811	0,817	0,801
50%	0,807	0,805	0,819	0,800
80%	0,802	0,805	0,810	0,791



	Medel	Median	Max	Min
15%	0,811	0,813	0,816	0,799
50%	0,810	0,814	0,819	0,797
80%	0,811	0,809	0,824	0,801

Bilaga 3. Raps i växthustest. Fluorescensmätningar i raps 21-22 maj.

