

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

Εργαστηριακές Ασκήσεις Φυσιολογίας Φυτών

Άρης Κυπαρίσσης

Ιωάννινα 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΣΚΗΣΗ 1 ^η – Φωτοσυνθετικές χρωστικές: απομόνωση, ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός	1
Εισαγωγή	1
Φωτοσυνθετικές χρωστικές	1
Οπτικές ιδιότητες των φωτοσυνθετικών χρωστικών	4
Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών	6
Πειραματικό μέρος	7
Ποιοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών	8
Πειραματικό μέρος	8
Ερωτήσεις	9
ΑΣΚΗΣΗ 2 ^η – Φωτοσύνθεση: ροή ηλεκτρονίων και αντίδραση Hill	10
Εισαγωγή	10
Πειραματικό μέρος	12
Ερωτήσεις	14
ΑΣΚΗΣΗ 3 ^η – Προσδιορισμός υδατικών παραμέτρων σε φυτικούς ιστούς	15
Εισαγωγή	15
Πειραματικό μέρος	19
Προσδιορισμός δυναμικού νερού	19
Προσδιορισμός ωσμωτικής πίεσης	20
Ερωτήσεις	21
ΑΣΚΗΣΗ 4 ^η – Στόματα και Διαπνοή	22
Εισαγωγή	22
Η κινητήριος δύναμη της διαπνοής είναι η κλίση συγκέντρωσης των υδρατμών μεταξύ φύλλου και ατμόσφαιρας	22
Η διαπνοή ρυθμίζεται από την αντίσταση διαχύσεως του φύλλου στους υδρατμούς	24
Πειραματικό μέρος	26
Κατασκευή εκμαγείων φύλλου	26
Μέτρηση αντίστασης διαχύσεως με χρήση πορομέτρου	26
Ερωτήσεις	27
ΑΣΚΗΣΗ 5 ^η – Βλάστηση σπερμάτων και επίδραση της φωτεινής ακτινοβολίας στην ανάπτυξη των αρτίβλαστων	30
Εισαγωγή	30
Πειραματικό μέρος	32
Ερωτήσεις	33
ΑΣΚΗΣΗ 6 ^η – Επίδραση κυτοκίνινης στην γήρανση των φύλλων	34
Εισαγωγή	34
Πειραματικό μέρος	35
Ερωτήσεις	36
ΑΣΚΗΣΗ 7 ^η – Τροφοπενία φωσφόρου σε συνθήκες υδροπονικής καλλιέργειας στο φυτό <i>Gossypium hirsutum</i> L. (βαμβάκι)	37
Εισαγωγή	37
Πειραματικό μέρος	38
Τροφοπενία φωσφόρου σε συνθήκες υδροπονικής καλλιέργειας	38
Ποσοτικός προσδιορισμός φωσφόρου	39
Ερωτήσεις	41
ΑΣΚΗΣΗ 8 ^η – Προσδιορισμός τροφοπενίας φωσφόρου μέσω ποιοτικής ανίχνευσης της δραστηριότητας φωσφατάσων στο <i>Gossypium hirsutum</i> L. (βαμβάκι)	42
Εισαγωγή	42
Πειραματικό μέρος	42
Ερωτήσεις	43
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44

ΑΣΚΗΣΗ 1^η – Φωτοσυνθετικές χρωστικές: απομόνωση, ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός

Εισαγωγή

Τα φυτά και τα κυανοβακτήρια είναι οι μοναδικοί οργανισμοί του πλανήτη που μπορούν να χρησιμοποιήσουν την ενέργεια της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας του ηλίου για τη σύνθεση οργανικών ενώσεων από απλά ανόργανα υλικά (CO₂, νιτρικά θειικά). Η ηλιακή ενέργεια χρησιμοποιείται για τη διάσπαση του νερού σε οξυγόνο και υδρογόνο και την παραγωγή αναγωγικής δύναμης (NADPH) και ενέργειας (ATP). Η διεργασία αυτή (φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης) πραγματοποιείται στις μεμβράνες των θυλακοειδών στο εσωτερικό των χλωροπλαστών. Στη συνέχεια το NADPH και το ATP χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση υδατανθράκων κατά τις σκοτεινές αντιδράσεις.

Στους χλωροπλάστες διακρίνονται δυο λειτουργικές μονάδες δέσμευσης της ηλιακής ενέργειας, τα φωτοσυστήματα I και II (PSI και PSII). Η απορροφούμενη ενέργεια χρησιμοποιείται για τη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά μήκος μιας σειράς οξειδοαναγωγικών ζευγών και, τελικά, για την αναγωγή του NADP⁺ σε NADPH. Ταυτόχρονα, δημιουργείται μια διαφορά συγκέντρωσης πρωτονίων εκατέρωθεν της μεμβράνης των θυλακοειδών, η οποία χρησιμοποιείται ως κινητήριος δύναμη για την παραγωγή ATP.

Η παραπάνω διεργασία της δέσμευσης και χρησιμοποίησης της ηλιακής ακτινοβολίας διεκπεριώνεται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές: πρόκειται για έγχρωμες οργανικές ενώσεις, οι οποίες παρουσιάζουν χαρακτηριστική απορρόφηση στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και σε αυτές οφείλονται τα χρώματα των διαφόρων φυτικών ιστών, όπως είναι τα φύλλα, οι βλαστοί, οι καρποί και τα άνθη.

Φωτοσυνθετικές χρωστικές

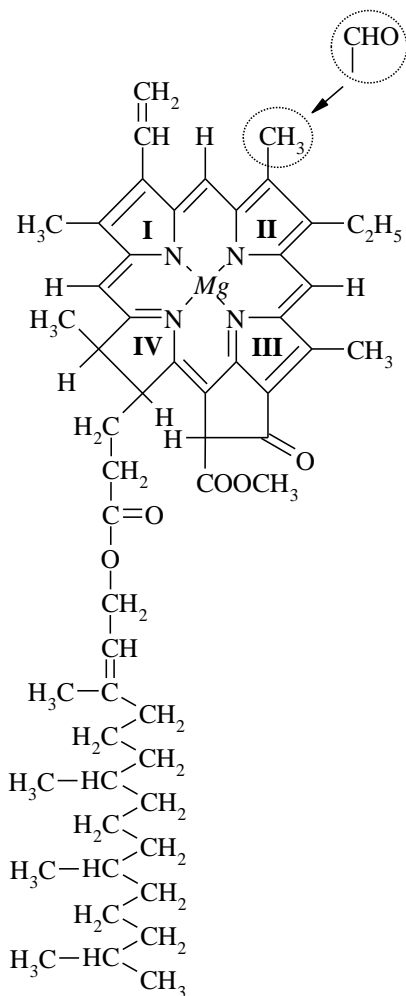
Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές, από άποψη χημικής δομής, διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: τις χλωροφύλλες, τα καροτενοειδή και τις φυκομπιλίνες. Οι φυκομπιλίνες είναι χρωστικές, οι οποίες συναντώνται στα κυανοπράσινα και ερυθρά φύκη και στις κρυπτομονάδες και δεν θα μας απασχολήσουν περαιτέρω.

Οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή βρίσκονται σε όλους σχεδόν τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των ανωτέρων φυτών, και η ενδοκυτταρική τους θέση εντοπίζεται στις φωτοσυνθετικές μεμβράνες των χλωροπλαστών (θυλακοειδή στρώματος και grana). Είναι ουσίες λιποδιαλυτές και εκχυλίζονται από τους ιστούς με οργανικούς διαλύτες. Από λειτουργική άποψη οι

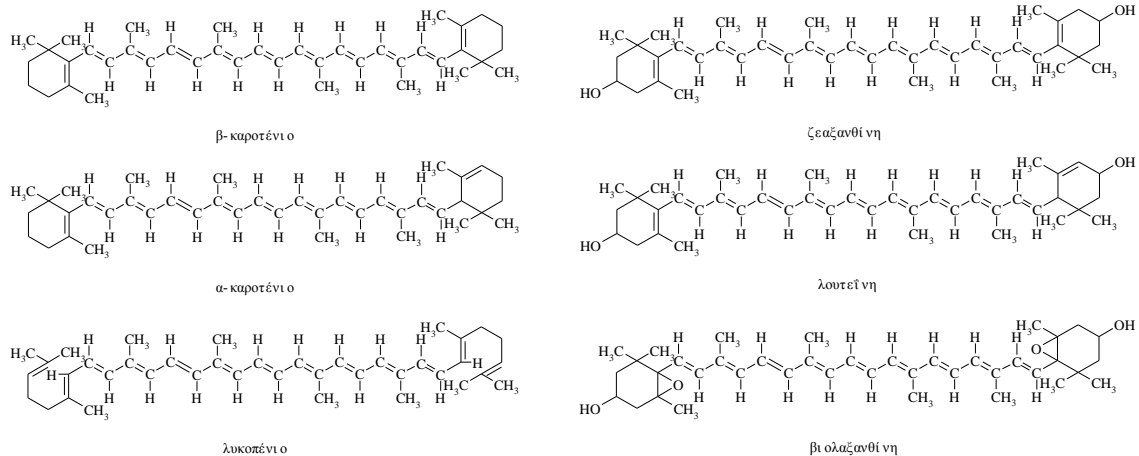
φωτοσυνθετικές χρωστικές χωρίζονται σε κύριες ή φωτοχημικά ενεργές και σε βοηθητικές. Ως **κύριες φωτοσυνθετικές χρωστικές** ορίζονται εκείνες, στις οποίες η απορρόφηση φωτός έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου. Η μεταφορά αυτή κινητοποιεί τη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων, η οποία καταλήγει στην παραγωγή αναγωγικής δύναμης (NADPH) και ενέργειας (ATP). Σύμφωνα με αυτό τον ορισμό, ως κύριες φωτοσυνθετικές χρωστικές χαρακτηρίζονται μόνο τα μόρια χλωροφύλλης a, που απαρτίζουν τα φωτοχημικά κέντρα των δυο φωτοσυστημάτων. **Βοηθητικές** είναι όλες οι άλλες φωτοσυνθετικές χρωστικές, συμπεριλαμβανομένων των μορίων χλωροφύλλης a που βρίσκονται εκτός των φωτοχημικών κέντρων και η κύρια λειτουργία τους έγκειται στην διοχέτευση της ενέργειας που απορροφούν προς τις κύριες φωτοσυνθετικές χρωστικές, μέσω μεταφοράς παλμού. Σημαντική θέση μεταξύ των χλωροφυλλών κατέχει η χλωροφύλλη a, που υπάρχει σε όλους τους

ευκαρυωτικούς φωτοσυνθετικούς οργανισμούς και τα κυανοβακτήρια. Εξ ίσου σημαντική είναι και η χλωροφύλλη b, η οποία απαντάται σε όλα τα ανώτερα φυτά, στις πτερίδες, στα πράσινα φύκη και στα βρύα. Η αναλογία χλωροφύλλης a:b στα φυτά είναι συνήθως 3:1. Σε ορισμένα είδη φυκών συναντώνται οι χλωροφύλλες c και d, αντί της χλωροφύλλης b. Τέλος, ειδικές μορφές χλωροφύλλης, που ονομάζονται βακτηριοχλωροφύλλες βρίσκονται στα φωτοσυνθετικά βακτήρια πλην των κυανοβακτηρίων.

Όλα τα είδη χλωροφύλλης χημικά κατατάσσονται στις πορφυρίνες. Το μόριό τους απαρτίζεται από έναν πορφυρινικό δακτύλιο, ο οποίος σχηματίζεται από την συνένωση τεσσάρων πυρρολικών δακτυλίων (Σχήμα 1.1). Τα τέσσερα άτομα N των πυρρολικών δακτυλίων συνδέονται με ένα άτομο μαγνησίου, το οποίο τοποθετείται στο κέντρο του μορίου. Μεταξύ τρίτου και τετάρτου πυρρολίου δημιουργείται ένας δακτύλιος κυκλοπεντανόνης, ενώ στον τέταρτο πυρρολικό δακτύλιο συνδέεται με εστερικό δεσμό μια πλευρική αλυσίδα από 20 άτομα άνθρακα, η **φυτόλη**, η οποία αποτελεί την λιπόφιλη «ουρά» του μορίου. Η φυτόλη είναι μία τερπενική αλκοόλη, που αποτελείται από 4



Σχήμα 1.1. Μοριακή δομή της χλωροφύλλης a. Με αντικατάσταση της μεθυλομάδα (-CH₃) στο δεύτερο πυρρολικό δακτύλιο από μία αλδεϋδομάδα (-CHO) προκύπτει η χλωροφύλλη b.



Σχήμα 1.2: Μοριακές δομές των περισσότερο διαδεδομένων καροτενοειδών στα ανώτερα φυτά. Αριστερά καροτένια, δεξιά ξανθοφύλλες.

μονάδες ισοπρενίου, η οποία φαίνεται ότι χρησιμεύει για τη σύνδεση και τον προσανατολισμό της χλωροφύλλης στις χλωροπλαστικές μεμβράνες. Η παρουσία διαφορετικών λειτουργικών ομάδων (υποκαταστάτες) στους πυρρολικούς δακτυλίους είναι εκείνη που χαρακτηρίζει τα διάφορα είδη χλωροφύλλης (Σχήμα 1.1). Η βιοσυνθετική πορεία των χλωροφυλλών και η χημική δομή τους παρουσιάζει πολλά κοινά με την αίμη των θηλαστικών.

Η δεύτερη μεγάλη ομάδα φωτοσυνθετικών χρωστικών είναι τα καροτενοειδή. Πρόκειται για τερπενοειδείς ενώσεις, αποτελούμενες από 8 ομάδες ισοπρενίου, 40 δηλαδή άτομα άνθρακα. Τα καροτενοειδή διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα καροτένια, τα οποία αποτελούνται από C και H (καθαροί υδρογονάνθρακες) και τις ξανθοφύλλες, οι οποίες αποτελούνται από C, H και O, αποτελούν δηλαδή οξειδωμένες μορφές καροτενίων.

In vivo, ο ρόλος των καροτενοειδών, εκτός από τη μεταφορά ενέργειας προς τα μόρια της χλωροφύλλης α των φωτοχημικών κέντρων, είναι και η προστασία των μορίων της χλωροφύλλης από φωτοοξείδωση: σε συνθήκες έντονου και παρατεταμένου φωτισμού, ορισμένα καροτενοειδή οξειδώνονται και έτσι αποφεύγεται η οξείδωση των χλωροφυλλών. Η αναλογία των καροτενοειδών προς χλωροφύλλες στα ανώτερα φυτά είναι περίπου 1:5. Το κυριότερο καροτένιο είναι το β -καροτένιο, ενώ από τις ξανθοφύλλες συνηθέστερες είναι η λουτεΐνη, η βιολαξανθίνη και η νεοξανθίνη (Σχήμα 1.2).

Τα περισσότερα καροτενοειδή είναι κίτρινα, πορτοκαλί ή κόκκινα, σπανιότερα δε συναντώνται καροτενοειδή που είναι ροζ ή πράσινα. Στην παρουσία καροτενοειδών οφείλεται το κίτρινο χρώμα των γερασμένων φύλλων. Αυτό συμβαίνει διότι κατά τη διαδικασία της γήρανσης η αποικοδόμηση των χλωροφυλλών προηγείται εκείνης των καροτενοειδών. Επίσης, καροτενοειδή υπάρχουν και στους χρωμοπλάστες και σε αυτά οφείλονται εν μέρει τα χρώματα των ανθέων και των καρπών. Στην περίπτωση αυτή όμως δεν χαρακτηρίζονται ως φωτοσυνθετικές χρωστικές.

Οπτικές ιδιότητες των φωτοσυνθετικών χρωστικών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η χρησιμότητα των φωτοσυνθετικών χρωστικών έγκειται στην ικανότητά τους να απορροφούν το ηλιακό φως και να χρησιμοποιούν την ενέργειά του για σύνθεση οργανικών ενώσεων. Επίσης, είναι γνωστό ότι το φως παρουσιάζει κυματικές και σωματιδιακές ιδιότητες. Έτσι, μεταδίδεται με ταχύτητα c υπό μορφή κυμάτων, τα οποία χαρακτηρίζονται από

- το μήκος τους λ (η απόσταση μεταξύ δυο διαδοχικών κορυφών ενός κύματος) και
- τη συχνότητά τους ν (ο αριθμός των κυμάτων που περνούν από ένα σημείο στη μονάδα του χρόνου).
- Τα τρία αυτά μεγέθη συνδέονται με τη σχέση $\nu = \frac{c}{\lambda}$.

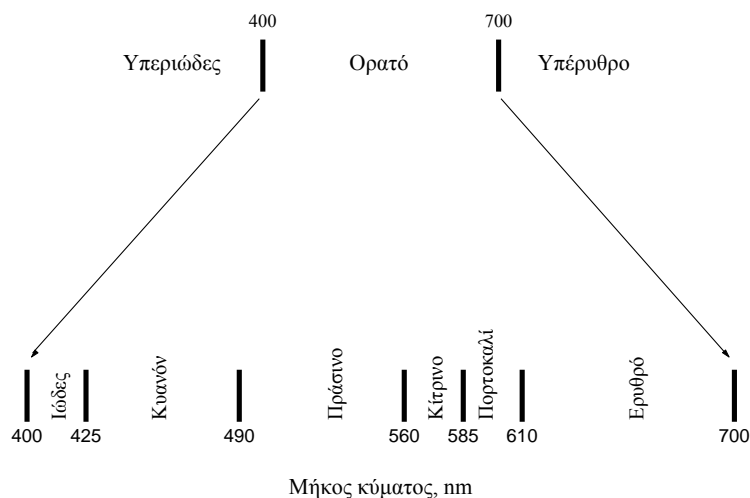
Επίσης, το φως εμφανίζει σωματιδιακές ιδιότητες και συμπεριφέρεται σαν να ήταν διαχωρισμένο σε επί μέρους μονάδες, που ονομάζονται φωτόνια. Η ενέργεια E ενός φωτονίου δίνεται από τη σχέση:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

όπου

h , η σταθερά του Plank.

Από τη συνολική ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία του ηλίου, το ανθρώπινο μάτι μπορεί να αντιληφθεί μόνο τα μήκη κύματος μεταξύ 400 και 700 nm (ορατό τμήμα του φάσματος), ενώ παρόμοια είναι η περιοχή του φάσματος που χρησιμοποιείται από τα φυτά στη διεργασία της φωτοσύνθεσης. Η περιοχή του ορατού διακρίνεται σε επί μέρους περιοχές όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.3. Με βάση τα παραπάνω, γίνεται φανερό ότι ένα φωτόνιο με μήκος κύματος 400 nm (ιώδες φως) έχει περίπου διπλάσια ενέργεια από ένα φωτόνιο 700 nm (ερυθρό φως).



Σχήμα 1.3. Οι επί μέρους περιοχές του ορατού τμήματος του φάσματος της ηλιακής ακτινοβολίας.

Όταν το μόριο μιας χρωστικής απορροφήσει την ενέργεια ενός φωτονίου, τότε ένα ηλεκτρόνιο της ουσίας αυτής διεγείρεται και ανέρχεται σε μία θέση ενεργειακώς υψηλότερη από την αρχική. Επειδή οι επιτρεπτές θέσεις (τροχιές) που μπορεί να καταλάβει ένα ηλεκτρόνιο είναι καθορισμένες, επόμενο είναι ότι το μόριο μιας δεδομένης ουσίας μπορεί να απορροφήσει συγκεκριμένη μόνο ενέργεια, τόση όση είναι η ενεργειακή διαφορά μεταξύ της διεγερμένης καταστάσεως και της βασικής. Με άλλα λόγια, το μόριο μιας ουσίας μπορεί να απορροφήσει φωτόνια ορισμένου μήκους κύματος (λ), αφού η ενέργεια του φωτονίου συνδέεται με το μήκος κύματος και μάλιστα με σχέση αντιστρόφως ανάλογη.

Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, μια χρωστική απορροφά περισσότερο σε κάποια μήκη κύματος και λιγότερο σε κάποια άλλα. Η γραφική παράσταση της απορρόφησης μιας ουσίας συναρτήσει του μήκους κύματος της ακτινοβολίας μας δίνει το **φάσμα απορρόφησής** της. Αυτό είναι χαρακτηριστικό για κάθε ουσία, αποτελεί δηλαδή ένα είδος «ταυτότητας», που μας επιτρέπει να την ταυτοποιήσουμε.

Οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή, εξ αιτίας του έντονου χρωματισμού τους, αποτελούν ιδανικά υλικά για μελέτες απορρόφησης. Σε αιθερικό διάλυμα, η χλωροφύλλη *a* παρουσιάζει 2 ζώνες απορρόφησης, μία στην κυανή περιοχή του φάσματος με αιχμή στα 430 nm και μία στην ερυθρή περιοχή με αιχμή στα 660 nm. Η χλωροφύλλη *b* παρουσιάζει επίσης 2 ζώνες απορρόφησης με μετατοπισμένα τα σημεία αιχμής, για μεν την κυανή περιοχή στα 455 nm για δε την ερυθρά στα 643 nm. Τα μέγιστα απορρόφησης μιας ουσίας εξαρτώνται άμεσα από τον διαλύτη, στον οποίο είναι διαλυμένη. Έτσι, τα φάσματα απορρόφησης, αναλόγως του διαλύτη, εμφανίζονται ελαφρώς μετατοπισμένα είτε προς τα δεξιά είτε προς τα αριστερά.

In vivo, η χλωροφύλλη βρίσκεται υπό μορφή συμπλόκων με πρωτεΐνες. Αυτό οδηγεί σε μία ετερογένεια των μορίων της χλωροφύλλης, τα οποία *in vivo* εμφανίζουν φάσματα ελαφρώς μετατοπισμένα προς μακρότερα μήκη κύματος, σε σχέση με τα *in vitro* φάσματα σε οργανικούς διαλύτες.

Τα καροτενοειδή απορροφούν ισχυρά στην κυανή περιοχή και λιγότερο στην πράσινη. Το φάσμα απορρόφησής τους καλύπτει το τμήμα του ορατού φωτός από 350-500 nm περίπου, παρουσιάζοντας 3 μέγιστα, η θέση των οποίων εξαρτάται τόσο από τον αριθμό των διπλών δεσμών, όσο και από το είδος των αντικαταστάσεων στον ανθρακικό σκελετό. Όπως αναφέραμε και για τις χλωροφύλλες, τα μέγιστα απορρόφησης *in vitro* επηρεάζονται από τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη, ενώ *in vivo* είναι μετατοπισμένα προς τα δεξιά εξ αιτίας των πρωτεϊνών με τις οποίες είναι συνδεδεμένα, αλλά και των μορίων γενικώς από τα οποία περιβάλλονται. Εάν παρατηρήσουμε τα φάσματα απορρόφησης των χλωροφυλλών και των καροτενοειδών, διαπιστώνουμε ότι αυτά παρουσιάζουν αλληλοεπικαλυπτόμενες περιοχές, γεγονός που ερμηνεύει την ικανότητα των βοηθητικών χρωστικών να μεταφέρουν την ενέργεια που απορροφούν προς τη χλωροφύλλη *a*, όταν τα μόριά τους βρίσκονται σε κατάλληλη

διευθέτηση.

Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών

Η απορρόφηση (A) ή οπτική πυκνότητα (O.D., optical density) μιας ουσίας σε διάλυμα μετράται με ειδικά όργανα που λέγονται φασματοφωτόμετρα και δίδεται από τον νόμο των Lambert-Beer:

$$A_{\lambda} = \log \frac{I_0}{I} = c b \epsilon_{\lambda}$$

όπου

A_{λ} , η απορρόφηση του διαλύματος της ουσίας σε μήκος κύματος λ

I_0 , η ένταση του φωτός που προσπίπτει στο διάλυμα της ουσίας

I , η ένταση του φωτός που διαπερνά το διάλυμα της ουσίας

c , η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα

b , η απόσταση που διανύει το φως μέσα στο διάλυμα της ουσίας

ϵ_{λ} , ο συντελεστής απορρόφησης σε μήκος κύματος λ (εξαρτάται από την ουσία και το είδος του διαλύτη).

Μέσω της παραπάνω εξίσωσης μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση μιας ουσίας σ' ένα διάλυμα, αφού οι υπόλοιποι παράγοντες είναι εύκολα μετρήσιμοι. Πρακτικώς, το A είναι η μέτρηση, την οποία παίρνουμε στην οθόνη του φασματοφωτόμετρου, ο συντελεστής ϵ_{λ} βρίσκεται από σχετικούς πίνακες και η απόσταση b προκύπτει από τις διαστάσεις της κυψελίδας του οργάνου.

Το θέμα είναι περισσότερο πολύπλοκο εάν έχουμε μίγμα ουσιών, π.χ. το συνολικό εκχύλισμα των φωτοσυνθετικών χρωστικών, των οποίων τα φάσματα απορρόφησης αλληλοεπικαλύπτονται. Σε αυτή την περίπτωση η απορρόφηση σ' ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος θ' αποτελεί το άθροισμα των απορροφήσεων των επί μέρους ουσιών και η επίλυση του τύπου των Lambert-Beer θα οδηγεί σε μία εξίσωση με περισσότερους του ενός αγνώστους. Έτσι, απαιτείται μέτρηση της O.D. σε περισσότερα μήκη κύματος, ώστε να δημιουργηθεί ένα σύστημα με τόσες εξισώσεις, όσες οι προς μέτρηση ουσίες του μίγματος. Τα μήκη κύματος που επιλέγουμε είναι αυτά, στα οποία η κάθε ουσία παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης.

Με βάση τέτοιους υπολογισμούς έχουν προκύψει οι εξισώσεις που ακολουθούν και οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν στο πειραματικό μέρος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης a, της χλωροφύλλης b και των καροτενοειδών:

$$\begin{aligned} c_a &= 12.21A_{663} - 2.81A_{646} \\ c_b &= 20.13A_{646} - 5.03A_{663} \\ c_{x+c} &= \frac{1000A_{470} - 3.27c_a - 104c_b}{229} \end{aligned}$$

όπου

A_{λ} , η απορρόφηση σε μήκος κύματος λ

c_a , η συγκέντρωση της χλωροφύλλης a, $\mu\text{g/ml}$ διαλύματος

c_b , η συγκέντρωση της χλωροφύλλης b , $\mu\text{g/ml}$ διαλύματος

c_{x+c} , η συγκέντρωση των συνολικών καροτενοειδών (ξανθοφύλλες + καροτένια), $\mu\text{g/ml}$ διαλύματος.

Οι παραπάνω εξισώσεις αφορούν διαλύματα 80% v/v ακετόνης. Είναι προφανές, ότι αναλόγως του διαλύτη θα μεταβάλλονται και οι εξισώσεις, αφού από την φύση του διαλύτη εξαρτάται ο συντελεστής απορρόφησης και η θέση των μεγίστων απορρόφησης.

Πειραματικό μέρος

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φωτοσυνθετικών χρωστικών μπορεί κανείς να επιλέξει οποιονδήποτε φωτοσυνθετικό ιστό (φύλλα ανωτέρων φυτών, πράσινα φύκη, βρύα), στην πράξη όμως χρησιμοποιούνται μαλακά φύλλα ανωτέρων φυτών, τα οποία λειοτριβούνται εύκολα (π.χ. σπανάκι). Εάν υπάρχει χρόνος, η άσκηση μπορεί να επεκταθεί σε ποσοτικές συγκρίσεις σκιοφύτων και ηλιοφύτων καθώς και αναπτυσσόμενων, ώριμων και υπό γήρανση φύλλων.

Η χημική δομή των ουσιών που θέλουμε να εκχυλίσουμε, μας καθορίζει και το είδος του διαλύτη που θα χρησιμοποιήσουμε. Επειδή οι φωτοσυνθετικές χρωστικές είναι λιπιδικής φύσεως, το μέσον εκχύλισης πρέπει να είναι ένας οργανικός διαλύτης (π.χ. βενζόλιο, αιθέρας, μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη). Επιλέγουμε την ακετόνη (διάλυμα 80% v/v) επειδή αναμιγνύεται καλά με το νερό των κυττάρων χωρίς να δημιουργεί γαλάκτωμα (σε αντίθεση με τον αιθέρα ή το βενζόλιο) και δεν είναι ιδιαίτερα επιβλαβής, όπως η μεθανόλη.

- Φύλλα βάρους 5 g κόβονται σε μικρά κομματάκια και τοποθετούνται σε γουδί πορσελάνης μαζί με μικρή ποσότητα (0.5 g) καθαρής άμμου και ανθρακικού ασβεστίου* (CaCO_3 , 0.1 g).
- Τα φύλλα εκχυλίζονται με 50 ml ακετόνης 80%, τα οποία προστίθενται σταδιακά (ανά 5 ml), ώστε να διευκολύνεται η ομογενοποίηση και να περιορίζονται οι απώλειες.
- Το εκχύλισμα μεταγγίζεται σε σωλήνα φυγοκέντρου.
- Το εκχύλισμα φυγοκεντρείται για 10 min στα 2500 g (4000 στροφές ανά λεπτό).
- Το διαυγές πράσινο υπερκείμενο χρησιμοποιείται ως δείγμα για την φασματοφωτομέτρηση, ενώ το ίζημα απορρίπτεται.
- Το υπερκείμενο μεταγγίζεται σε ογκομετρικό σωλήνα και ο όγκος του καταγράφεται.
- Το δείγμα φωτομετρείται στα 470, 646, 663 και 720 nm. Η απορρόφηση στα 720 nm οφείλεται σε πιθανό σκεδασμό και όχι στις φωτοσυνθετικές χρωστικές, οπότε η

* Η προσθήκη CaCO_3 αποτρέπει την οξίνιση του διαλύματος από τυχόν οξέα που περιέχουν τα φύλλα. Οξίνιση του διαλύματος θα είχε σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση του Mg από τα μόρια της χλωροφύλλης και τη δημιουργία φαιοφυτίνης, η οποία παρουσιάζει διαφορετικό φάσμα απορρόφησης.

τιμή αυτή αφαιρείται από τις υπόλοιπες μετρήσεις.

- Λαμβάνεται το συνολικό φάσμα απορρόφησης του δείγματος στην ορατή περιοχή (400-700 nm) με φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης. Υπενθυμίζεται ότι το δείγμα είναι μίγμα χλωροφύλλης a, χλωροφύλλης b και καροτενοειδών και επομένως το συνολικό φάσμα απορρόφησης προέρχεται από τη συνεισφορά της απορρόφησης κάθε μίας χρωστικής στο εκάστοτε μήκος κύματος.
- Με βάση τις εξισώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω και τις τιμές απορρόφησης στα συγκεκριμένα μήκη κύματος υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης a, της χλωροφύλλης b και των συνολικών καροτενοειδών. Υπενθυμίζεται ότι οι εξισώσεις δίνουν τα ποσά της χρωστικής σε mg/ml διαλύματος. Για να εκφραστούν τα ποσά κάθε χρωστικής ανά g νεπού βάρους, θα πρέπει να γίνουν οι απαραίτητες αναγωγές με βάση το βάρος των φύλλων που χρησιμοποιήθηκαν, τον όγκο του εκχυλίσματος καθώς και τυχόν αραιώσεις που έχουν γίνει.

Ποιοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών.

Για να πραγματοποιηθεί ποιοτικός προσδιορισμός οποιασδήποτε ουσίας θα πρέπει πρώτα να ληφθεί σε καθαρή μορφή. Έτσι, και οι φωτοσυνθετικές χρωστικές θα πρέπει να διαχωριστούν από το συνολικό εκχύλισμα που προέκυψε στην προηγούμενη διαδικασία. Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού ουσιών είναι η χρωματογραφία. Η χρωματογραφία σε χαρτί, την οποία θα χρησιμοποιήσουμε, είναι χρωματογραφία κατανομής και στηρίζεται στη διαφορετική διαλυτότητα των ουσιών στη λιπόφιλη κινούμενη φάση (υγρό ανάπτυξης) και στην υδρόφιλη σταθερή φάση. Η κυτταρίνη του χαρτιού απορροφά νερό από την ατμόσφαιρα και ως σταθερή φάση θεωρείται το σύμπλοκο κυτταρίνης-νερού. Στην πράξη, το μίγμα τοποθετείται επάνω στο χαρτί στο σημείο εκκίνησης ως κηλίδα. Το υγρό ανάπτυξης παρασύρει την κάθε ουσία σε διαφορετική απόσταση και η χρωματογραφία σταματά όταν το μέτωπο της κινούμενης φάσης φτάσει στο τέλος του χαρτιού. Η απόσταση κάθε ουσίας από το σημείο εκκινήσεως προς την απόσταση σημείου εκκινήσεως-μετώπου είναι χαρακτηριστική και ονομάζεται R_f . Πετυχημένες κηλίδες είναι αυτές που έχουν μικρή έκταση, ενώ συγχρόνως περιέχουν αρκετή ποσότητα των προς ανάλυση ουσιών, ώστε αυτές να είναι ευδιάκριτες μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος. Η αύξηση της συγκέντρωσης (συμπύκνωση) επιτυγχάνεται με τη μεταφορά του αρχικού υδατο-ακετονικού εκχυλίσματος σε αιθέρα με μικρότερο όγκο. Έτσι, εκτός από τη συμπύκνωση των χρωστικών, απομακρύνεται και το νερό, το οποίο συνεισφέρει στο «άπλωμα» της κηλίδας και στεγνώνει δύσκολα.

Πειραματικό μέρος

- 40 ml του υδατο-ακετονικού εκχυλίσματος τοποθετούνται σε διαχωριστική χοάνη και προστίθενται σιγά-σιγά από τα τοιχώματα 20 ml αιθέρα.

- Το μίγμα αναδεύεται ήπια ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία γαλακτώματος.
- Προστίθεται νερό (από τα τοιχώματα) με ήπια συνεχή ανάδευση μέχρι τη δημιουργία δύο φάσεων.
- Η αιθερική φάση, που περιέχει τις χρωστικές, συλλέγεται σε ποτήρι ζέσεως, ενώ η άχρωμη φάση νερού-ακετόνης απορρίπτεται.
- Μικρό μέρος από το αιθερικό διάλυμα τοποθετείται στο σημείο εκκινήσεως σε χαρτί χρωματογραφίας Whatman No 1 με τη βοήθεια μικροσιφωνίου.
- Εκτελείται ανερχόμενη χρωματογραφία με υγρό έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα: βενζόλιο:ακετόνη 40:10:5 (v/v).
- Μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος καταγράφονται οι διάφορες κηλίδες και υπολογίζονται τα R_f τους.
- Οι κηλίδες κάθε χρωστικής κόβονται, αναδιαλύονται σε 5 ml καθαρής ακετόνης και λαμβάνονται τα φάσματα απορρόφησής τους σε φασματοφωτόμετρο για την περιοχή μηκών κύματος από 400-700 nm.

Ερωτήσεις

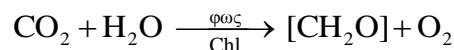
1. Υπολογίστε την συγκέντρωση της χλωροφύλλης a, της χλωροφύλλης b και των συνολικών καροτενοειδών ανά g νωπού βάρους φύλλου.
2. Αιτιολογήστε τα φάσματα απορρόφησης των απομονωμένων χρωστικών.
3. Υπολογίστε τα R_f της χλωροφύλλης a, της χλωροφύλλης b και του β-καροτενίου.

ΑΣΚΗΣΗ 2^η – Φωτοσύνθεση: ροή ηλεκτρονίων και αντίδραση Hill

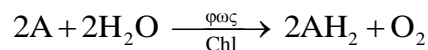
Εισαγωγή

Η φωτοσύνθεση είναι η διεργασία με την οποία τα φυτά καθιστούν την ηλιακή ενέργεια διαθέσιμη για όλους τους υπόλοιπους ζωντανούς οργανισμούς. Το πρωταρχικό βήμα της διεργασίας, όπως είδαμε στην προηγούμενη άσκηση, είναι η απορρόφηση του φωτός από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές των φυτών, τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Τα ειδικά μόρια χλωροφύλλης *a* που βρίσκονται στα κέντρα αντίδρασης των φωτοσυστημάτων I και II μετατρέπουν, στη συνέχεια, την φωτεινή ενέργεια σε ηλεκτρική (διέγερση ηλεκτρονίων) και τελικά σε χημική, υπό τη μορφή χημικών δεσμών στα μόρια του ATP και NADPH. Ένα μέρος της ενέργειας αυτής χρησιμοποιείται ακολούθως, για την ενζυμική μετατροπή του διοξειδίου του άνθρακα σε σάκχαρο. Παρόλο που η φωτοσύνθεση περιορίζεται στους οργανισμούς που περιέχουν χλωροφύλλη (φυτά, φύκη και κυανοβακτήρια) και ορισμένα βακτήρια, τα σάκχαρα που παράγονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν από όλους τους ζωντανούς οργανισμούς μέσω της γλυκόλυσης και της αναπνοής για την παροχή χημικής ενέργειας.

Η συνολική αντίδραση της φωτοσύνθεσης μπορεί να αποδοθεί από την εξίσωση:



Κατά τη δεκαετία του 1930, ο R. Hill και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η έκλυση οξυγόνου μπορεί να διαχωριστεί από την αναγωγή του CO₂ προς υδατάνθρακα. Βρήκαν ότι θραύσματα χλωροπλαστών (θυλακοειδή) που είχαν απομονωθεί από φύλλα, μπορούσαν να προκαλέσουν την έκλυση οξυγόνου παρουσία φωτός, εάν χορηγούσαν μια οξειδωμένη ένωση ικανή να δεχτεί ηλεκτρόνια. Η αντίδραση ονομάστηκε προς τιμήν του «αντίδραση Hill» και περιγράφεται από την εξίσωση:



όπου A είναι ο δέκτης ηλεκτρονίων (οξειδωμένη μορφή) και AH₂ η ανηγμένη του μορφή. Ως δέκτες e⁻ χρησιμοποιήθηκαν αρχικώς ενώσεις του τρισθενούς σιδήρου (που αναγόμενος γίνεται δισθενής), όπως το σιδηροκυανιούχο κάλιο, και στη συνέχεια διάφορες κινόνες και χρωστικές, που σήμερα είναι γνωστές ως «αντιδραστήρια Hill». Κατά την αντίδραση Hill δεν ήταν δυνατή η αναγωγή του CO₂ σε υδατάνθρακα, διότι, δεν χρησιμοποιήθηκαν άθικτοι χλωροπλάστες, αλλά τμήματα χλωροπλαστικών μεμβρανών.

Όπως γίνεται φανερό από τα παραπάνω, τα πειράματα του Hill απέδειξαν ότι η φωτοχημική έκλυση O₂ κατά τη φωτοσύνθεση δεν είναι άρρηκτα δεμένη με την αναγωγή του CO₂ (οι φωτεινές αντιδράσεις μπορούν να διαχωριστούν από τις σκοτεινές αντιδράσεις). Επιπροσθέτως, εισήγαγαν τη χρήση τεχνητών δεκτών e⁻ στην έρευνα της

φωτοσύνθεσης και αποδέσμευσαν τους ερευνητές από τη χρήση άθικτων φωτοσυνθετικών οργανισμών, αφού η έρευνα μπορούσε να γίνει και με συστήματα ελεύθερα κυττάρων. Τα ευρήματα αυτά, προώθησαν σημαντικά την έρευνα της φωτοσύνθεσης: τα επί μέρους στάδια των φωτεινών αντιδράσεων αποσαφηνίσθηκαν και τελικά προσδιορίστηκε ο φυσιολογικός δέκτης ηλεκτρονίων, το NADP.

Σήμερα είναι γνωστό ότι οι «φωτεινές» αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης αποτελούν μια πορεία, η οποία απαιτεί φως και κατά την οποία ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το H₂O (δότης e⁻) στο NADP (φυσιολογικός δέκτης e⁻). Η μεταφορά αυτή, η οποία σχηματικά παριστάνεται με το «σχήμα Z» της φωτοσύνθεσης, συμβαίνει από θετικότερο προς αρνητικότερο δυναμικό και επομένως είναι μία μη αυθόρμητη διαδικασία, η οποία απαιτεί ενέργεια. Την ενέργεια αυτή προμηθεύονται τα φυτά με την αποτελεσματική δέσμευση της ηλιακής ακτινοβολίας μέσω της χλωροφύλλης, η οποία οδηγεί σε ανύψωση των ηλεκτρονίων σε ανώτερο ενεργειακό επίπεδο.

Για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το H₂O στο NADP είναι απαραίτητες δύο φωτοχημικές αντιδράσεις (φωτοσύστημα II και I αντίστοιχα). Τα δραστικά κέντρα των δύο φωτοσυστημάτων αποτελούνται από διαφορετικούς τύπους χλωροφύλλης a, οι οποίοι παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 680 nm (PS II) και στα 700 nm (PS I). Το κάθε φωτοσύστημα είναι εφοδιασμένο με μια φωτοσυλλεκτική κεραία βοηθητικών χρωστικών. Η ροή των ηλεκτρονίων πραγματοποιείται μέσω μιας αλυσίδας ενώσεων-φορέων, οι οποίες διευθετούνται κατάλληλα στις χλωροπλαστικές μεμβράνες και λειτουργούν ως οξειδοαναγωγικά ζεύγη. Ο κατάλογος των ενώσεων αυτών συνεχώς εμπλουτίζεται με την ανακάλυψη νέων και περιλαμβάνει φαιοφυτίνες, κινόνες, κυτοχρώματα, σιδηροθειούχες και χαλκούχες πρωτεΐνες.

Η μεταφορά των ηλεκτρονίων από το H₂O στο NADP μέσω των δύο φωτοσυστημάτων (μη κυκλική ροή), έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική υπό μορφή αναγωγικής δύναμης (NADPH) και τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Τα προϊόντα αυτά θα καταναλωθούν στη συνέχεια στη «σκοτεινή» φάση κατά την αναγωγή του CO₂. Σε περιπτώσεις που οι απαιτήσεις του κυττάρου σε ATP είναι αυξημένες, τα ηλεκτρόνια μπορούν να ακολουθήσουν κυκλική ροή γύρω από το φωτοσύστημα I - αντί της συνήθους μη κυκλικής ροής - με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός επί πλέον μορίου ATP αντί του NADPH.

Όπως ήδη αναφέραμε, τα πειράματα του Hill άνοιξαν το δρόμο για τη χρήση ενώσεων, που συμπεριφέρονται είτε ως τεχνητοί δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων, είτε ως αναστολείς της ροής των ηλεκτρονίων. Τέτοιες ουσίες χρησιμοποιήθηκαν ευρύτατα σε απομονωμένους χλωροπλάστες για τη διευκρίνιση της πορείας των e⁻ καθώς και των φυσιολογικών ουσιών που εμπλέκονται σ' αυτήν. Η δυνατότητα χρήσεως μιας ουσίας με αυτές τις ιδιότητες καθορίζεται από το οξειδοαναγωγικό δυναμικό της και από το αν μπορεί να συνδεθεί σε συγκεκριμένη θέση της ηλεκτρονιακής αλυσίδας.

Η παρούσα άσκηση αποτελεί πειραματική εφαρμογή της «αντίδρασης Hill» και

αποσκοπεί στην εξοικείωση με τις φωτεινές αντιδράσεις και την απομόνωση χλωροπλαστών. Η αναγωγική δραστηριότητα των χλωροπλαστών θα δειχθεί ποιοτικά ως αναγωγή ενός τεχνητού δέκτη e^- , της διχλωροφαινόλης-ινδοφαινόλης (DCIP).

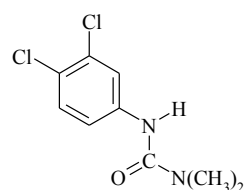
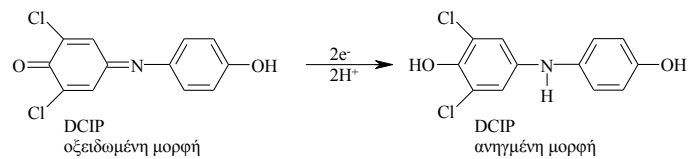
Πειραματικό μέρος

Η απομόνωση των χλωροπλαστικών μεμβρανών γίνεται με μια διαδικασία ήπιας λειοτρίβισης σε γουδί πορσελάνης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε φυτό, κατά προτίμηση με μαλακά φύλλα, ώστε η λειοτρίβιση να είναι εύκολη και ταχεία. Συνήθως χρησιμοποιούνται φύλλα σπανακιού, για τα οποία έχει δειχθεί ότι η μέθοδος έχει καλές αποδόσεις. Η όλη εργασία απομόνωσης-διατήρησης των χλωροπλαστικών μεμβρανών γίνεται με παγωμένα διαλύματα και γυαλικά. Όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή, η αναγωγική δραστηριότητα των χλωροπλαστικών μεμβρανών οι οποίες φωτίζονται, θα προσδιορισθεί ποιοτικά ως αναγωγή ενός τεχνητού δέκτη e^- , της διχλωροφαινόλης-ινδοφαινόλης (DCIP). Η διχλωροφαινόλη-ινδοφαινόλη είναι μια χρωστική, η οποία στην οξειδωμένη της μορφή απορροφά στο ορατό με μέγιστο στην ερυθρά περιοχή (605 nm), ενώ στην ανηγμένη της μορφή δεν απορροφά ορατό φως. Η οξειδωμένη μορφή του DCIP λειτουργεί ως

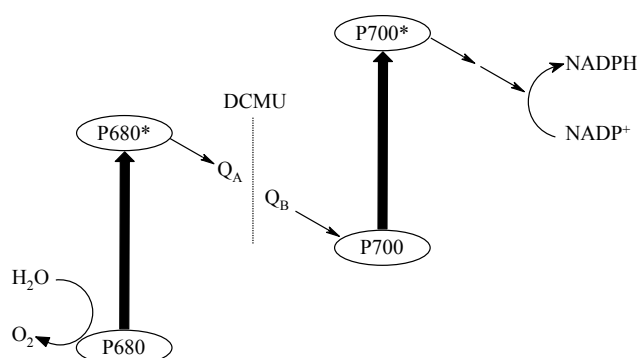
δέκτης ηλεκτρονίων από το φωτοσύστημα II, προσλαμβάνοντας e^- και H^+ από την πλαστοκινίνη, οπότε ανάγεται.

Πρακτικώς, η αναγωγή του DCIP

μετράται σε φασματοφωτόμετρο ως πτώση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 605 nm. Θεωρητικά, θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε και το φυσιολογικό δέκτη e^- , το NADP. Στην πράξη όμως προτιμώνται έγχρωμες ουσίες, οι οποίες αναγόμενες αλλάζουν χρώμα. Επί πλέον, η διαδικασία απομόνωσης των χλωροπλαστικών μεμβρανών που θα ακολουθήσουμε, προκαλεί αποχωρισμό διαφόρων φορέων της

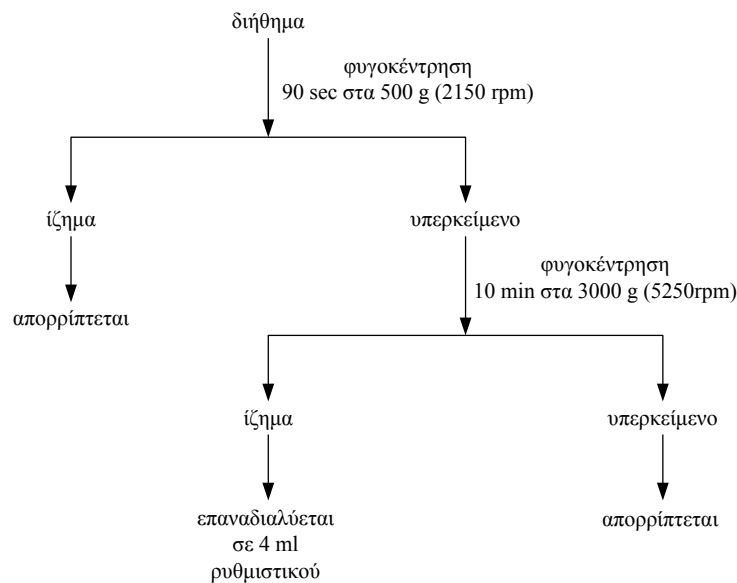


Η χημική δομή της διχλωροφαινυλ-διμεθυλουρίας (DCMU), και το σημείο στο οποίο αναστέλλει την φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων.



αλυσίδας ηλεκτρονίων. Μεταξύ των πρώτων ενώσεων που απομακρύνονται είναι η φερρεδοξίνη, με άμεση συνέπεια να μην υπάρχει τρόπος διοχέτευσης των ηλεκτρονίων στο NADP. Στην πειραματική διαδικασία θα χρησιμοποιηθεί και μια δεύτερη ένωση, η διχλωροφαινυλ-διμεθυλουρία (DCMU), η οποία δρα ως αναστολέας της φωτοσυνθετικής ροής e^- .

- 5 gr φύλλων σπανακιού, από τα οποία αφαιρούνται τα χοντρά νεύρα, κόβονται σε μικρά κομμάτια και ομογενοποιούνται σε γουδί πορσελάνης (χωρίς άμμο), παρουσία 30 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (Tris 50 mM), pH 7.5. Το ρυθμιστικό διάλυμα είναι απαραίτητο, για να διατηρείται το pH σταθερό σε τιμές που θεωρούνται φυσιολογικές για τις λειτουργίες του κυττάρου.
- Το ομογενοποίημα που προκύπτει, διηθείται μέσα από διπλό στρώμα φαρμακευτικής γάζας και το διήθημα τοποθετείται σε πλαστικό φυγοκεντρικό σωλήνα και φυγοκεντρείται 2 φορές κατά το ακόλουθο σχήμα:



- Το επαναδιαλυμένο ίζημα φυλάσσεται σε πάγο και σε χαμηλό φωτισμό (φωτισμός δωματίου) και αποτελεί το δείγμα των χλωροπλαστικών μεμβρανών.
- Σε 6 αριθμημένους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται τα διαλύματα σύμφωνα με τον Πίνακα που ακολουθεί:

ΣΩΛΗΝΑΣ	1	2	3	4	5	6
ΔΙΑΛΥΜΑ						
Tris – HCl	9.5	5.0	4.5	4.5	4.5	4.4
DCIP (0.11 mM)	-	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Χλωροπλάστες	0.5	-	0.5	0.5	0.5	0.5
DCMU* (3 mM)	-	-	-	-	-	0.1
Φως	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
Φωτομέτρηση στα 605 nm	Πριν και μετά το φωτισμό		Αμέσως	Μετά το φωτισμό		

* Το DCMU διαλύεται σε απόλυτη αιθανόλη

Για την επιτυχή έκβαση του πειράματος προσοχή πρέπει να δοθεί στα εξής:

- Οι σωλήνες 1 και 2 φωτομετρούνται πριν και μετά το φωτισμό.
- Ο σωλήνας 3 αντιστοιχεί στο σημείο εκκίνησης της αντίδρασης και φωτομετράται αμέσως. Το φως στον περιβάλλοντα χώρο πρέπει να είναι λιγότερο από $3-4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Εργαστηριακός χώρος με κουρτίνες και σβηστά φώτα καλύπτει αυτή την προϋπόθεση.
- Ο σωλήνας 4 καλύπτεται εξ αρχής με αλουμινόχαρτο ώστε να μην δέχεται καθόλου φως.
- Στο σωλήνα 6 οι χλωροπλαστικές μεμβράνες προστίθενται τελευταίες (μετά το DCMU).
- Ο φωτισμός διαρκεί 2 min και η απόσταση από την πηγή θα πρέπει να είναι ίδια για όλους τους σωλήνες. Για να αποφύγουμε τυχόν υπερθέρμανση των δειγμάτων, τοποθετούμε πλησίον των σωλήνων έναν ανεμιστήρα.

Ερωτήσεις

1. Πόσοι μάρτυρες υπάρχουν στο πείραμα και τι εκφράζει ο καθένας;
2. Εκφράστε την αναγωγική δραστηριότητα των χλωροπλαστικών μεμβρανών ως ΔΟ.Δ. στο φως, στο σκοτάδι και παρουσία αναστολέα της ροής των ηλεκτρονίων.

ΑΣΚΗΣΗ 3^η - Προσδιορισμός υδατικών παραμέτρων σε φυτικούς ιστούς

Εισαγωγή

Εάν εξαιρέσει κανείς τις συνθήκες εκείνες κατά τις οποίες μετατρέπεται σε πάγο, το νερό κινείται ακατάπαυστα. Κινείται κατά μήκος των ηπείρων μέσω των ποταμών και των ρυακιών, από το έδαφος προς την ατμόσφαιρα μέσω του σώματος των φυτών, μέσα και έξω από τα ζωντανά κύτταρα. Τόσο στα αβιοτικά όσο και στα βιοτικά συστήματα, το νερό κινείται από το ένα μέρος στο άλλο λόγω διαφορών της δυναμικής του ενέργειας. Η δυναμική ενέργεια ενός αντικειμένου – ή μιας ομάδας αντικειμένων, όπως τα μόρια του νερού – είναι η ενέργεια που κατέχει το αντικείμενο λόγω της θέσης του. Η δυναμική ενέργεια του νερού ανά μονάδα μάζας συνήθως αναφέρεται ως **δυναμικό νερού** (Ψ).

Το νερό κινείται από περιοχές υψηλού δυναμικού προς περιοχές χαμηλού δυναμικού, ανεξάρτητα από τα αίτια που προκαλούν τη διαφορά δυναμικού. Ένα απλό παράδειγμα αποτελεί το νερό που κυλά στην πλαγιά ενός λόφου ως απόκριση στην βαρύτητα. Το νερό στην κορυφή του λόφου έχει περισσότερη δυναμική ενέργεια (υψηλότερο δυναμικό νερού) από το νερό στην βάση. Καθώς το νερό κυλάει στην πλαγιά, η δυναμική του ενέργεια μετατρέπεται σε κινητική και αυτή μπορεί να μετατραπεί σε μηχανική, εάν για παράδειγμα παρεμβάλουμε έναν υδροτροχό στην πορεία του.

Η πίεση είναι μια ακόμα γενεσιουργός δύναμη του δυναμικού του νερού. Εάν γεμίσουμε ένα σταγονόμετρο με νερό και πιέσουμε την φούσκα, το νερό θα χυθεί έξω. Όπως και το νερό στην κορυφή του λόφου, το νερό αυτό έχει αποκτήσει υψηλότερο δυναμικό νερού και κινείται προς χαμηλότερο. Προφανώς, μπορούμε να εξαναγκάσουμε το νερό που κατεβαίνει το λόφο του προηγούμενου παραδείγματος να κινηθεί ανοδικά, εάν ασκήσουμε πίεση τέτοια, ώστε το δυναμικό νερού που προκαλείται από αυτή να υπερβαίνει το δυναμικό νερού που προκαλείται από τη βαρύτητα.

Σε διαλύματα, το δυναμικό νερού επηρεάζεται από την συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών. Καθώς η συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών αυξάνεται, το δυναμικό νερού μειώνεται και αντίστροφα. Απουσία άλλων παραγόντων (όπως η πίεση) που να επηρεάζουν το δυναμικό νερού, τα μόρια του νερού σε διαλύματα κινούνται από περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης διαλυμένων ουσιών (υψηλού δυναμικού νερού) προς περιοχές υψηλής συγκέντρωσης διαλυμένων ουσιών (χαμηλού δυναμικού νερού).

Η έννοια του δυναμικού του νερού είναι χρήσιμη διότι βοηθά τους φυσιολόγους να προβλέψουν την κατεύθυνση κίνησης του νερού κάτω από ποικίλες συνθήκες. Συνήθως μετριέται ως η υδροστατική πίεση που απαιτείται έτσι ώστε να σταματήσει η κίνηση του νερού κάτω από δεδομένες συνθήκες. Οι μονάδες που χρησιμοποιούνται για

να εκφράσουν την πίεση είναι το bar και το megapascal (MPa). Ένα bar είναι περίπου ίσο με την μέση πίεση του αέρα στην επιφάνεια της θάλασσας. Ένα megapascal είναι ίσο με 10 bar. Το δυναμικό νερού του καθαρού (απεσταγμένου) νερού υπό ατμοσφαιρική πίεση στην επιφάνεια της θάλασσας έχει αυθαίρετα ορισθεί ως μηδέν. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, το δυναμικό νερού ενός υδατικού διαλύματος θα έχει αρνητική τιμή, αφού υψηλότερη συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερο δυναμικό νερού.

Είδαμε λοιπόν ότι τρεις παράγοντες εμπλέκονται στον ορισμό του δυναμικού του νερού:

- η βαρύτητα
- η πίεση
- η συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών.

Όσον αφορά στα βιολογικά συστήματα – και πιο συγκεκριμένα στο φυτικό σώμα – η επίδραση της βαρύτητας είναι αμελητέα, καθότι οι κατακόρυφες αποστάσεις που καλούνται να διανύσουν τα μόρια του νερού είναι συνήθως μικρές. Επομένως, με εξαίρεση τα πολύ ψηλά δέντρα, η επίδραση της βαρύτητας μπορεί να αγνοηθεί.

Έτσι το δυναμικό του νερού (Ψ) δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\Psi = P - \pi \quad (1)$$

όπου

P , η υδροστατική πίεση υπέρ την ατμοσφαιρική και
 π , η ωσμωτική πίεση.

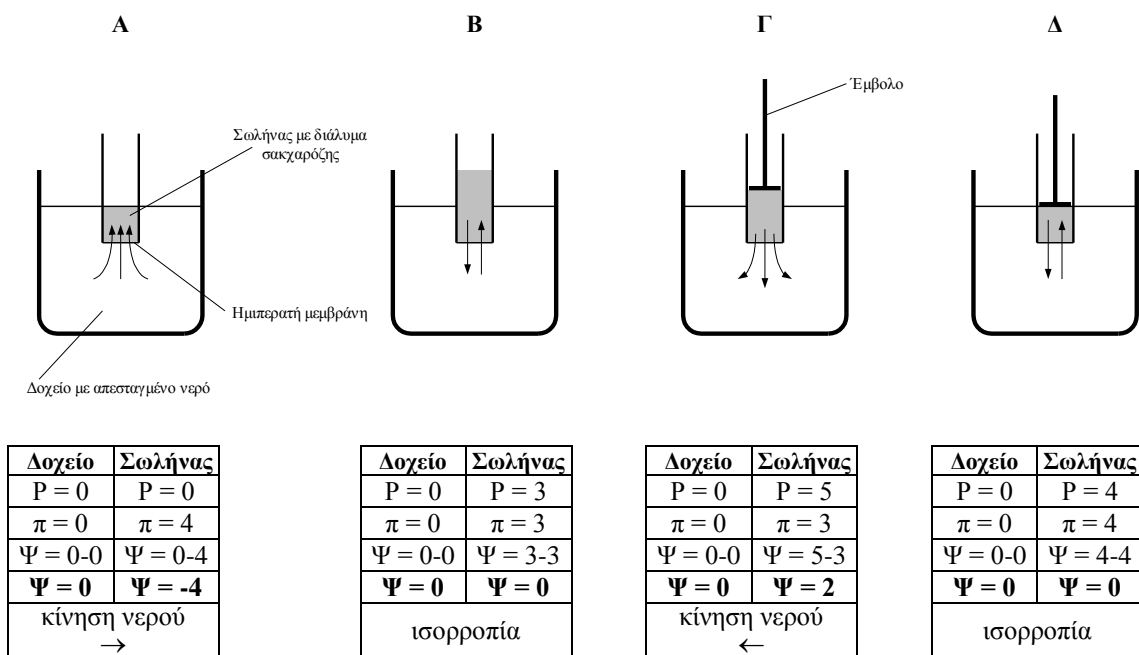
Ας εξετάσουμε όμως τους δύο αυτούς παράγοντες ξεχωριστά. Για να αντιληφθούμε την επίδραση της πίεσης, ας υποθέσουμε ότι έχουμε απεσταγμένο νερό (άρα $\pi = 0$) υπό ατμοσφαιρική πίεση στην επιφάνεια της θάλασσας (άρα και $P = 0$). Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, το νερό αυτό θα έχει $\Psi = 0$. Αν ασκήσουμε πίεση 1 MPa υπέρ την ατμοσφαιρική, προφανώς – σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση – το δυναμικό νερού θα γίνει $\Psi = P = 1$ MPa.

Για να αντιληφθούμε ποσοτικά την συνεισφορά της συγκέντρωσης διαλυμένων ουσιών στον προσδιορισμό του δυναμικού του νερού ας θεωρήσουμε το κλασικό παράδειγμα κίνησης του νερού μέσω ημιπερατής μεμβράνης, που απεικονίζεται στο Σχήμα 3.1. Το σύστημα βρίσκεται υπό ατμοσφαιρική πίεση και στην επιφάνεια της θάλασσας, επομένως το δυναμικό νερού του περιεχόμενου του δοχείου (απεσταγμένο νερό) είναι $\Psi = 0$. Επίσης, ο όγκος του δοχείου θεωρείται πολύ μεγάλος σε σχέση με αυτόν του σωλήνα έτσι, ώστε οποιαδήποτε κίνηση νερού να μην επιφέρει μεταβολή της στάθμης στο δοχείο. Ποιο είναι όμως το δυναμικό νερού του περιεχόμενου του σωλήνα (διάλυμα σακχαρόζης); Προφανώς, αφού ο σωλήνας περιέχει διάλυμα, θα είναι $\pi > 0$, οπότε από την εξίσωση (1) προκύπτει ότι το δυναμικό νερού του διαλύματος θα είναι χαμηλότερο του μηδενός, άρα αρνητικό. Αυτή η διαφορά δυναμικού θα προκαλέσει κίνηση του νερού από την περιοχή υψηλού δυναμικού προς την περιοχή χαμηλού

δυναμικού. Μόρια νερού θα διαπεράσουν την ημιπερατή μεμβράνη και θα εισέλθουν στον σωλήνα, προκαλώντας ανύψωση της στάθμης του διαλύματος μέσα σ' αυτόν, έως ότου η υδροστατική πίεση που αναπτύσσεται (λόγω ανύψωσης του διαλύματος) αντισταθμίσει την διαφορά δυναμικού μεταξύ δοχείου και σωλήνα. Στο σημείο αυτό, το δυναμικό νερού από τις δύο μεριές της μεμβράνης εξισώνεται και η κίνηση του νερού σταματά. Εάν στο ανοιχτό άκρο του σωλήνα ασκήσουμε με ένα έμβολο πίεση (P) ώστε οι στάθμες σωλήνα και δοχείου να εξισωθούν τότε θα καταλήξουμε πάλι σε μια κατάσταση ισορροπίας, κατά την οποία όλα τα μόρια νερού που εισήλθαν στον σωλήνα κατά την προηγούμενη φάση επανέρχονται στο δοχείο. Στην κατάσταση αυτή ισχύουν τα ακόλουθα:

- το δυναμικό νερού του δοχείου (Ψ_{Δ}) είναι ίσο με το δυναμικό νερού του σωλήνα (Ψ_{Σ}), αφού μόρια νερού δεν κινούνται προς καμία κατεύθυνση
- το Ψ_{Δ} είναι γνωστό και ίσο με μηδέν, άρα αφού $\Psi_{\Delta} = \Psi_{\Sigma}$ θα είναι και $\Psi_{\Sigma} = 0$
- αφού $\Psi_{\Sigma} = P - \pi$ και $\Psi_{\Sigma} = 0$ θα είναι $P - \pi = 0$ άρα και $\pi = P$

Επομένως, η πίεση που πρέπει να ασκήσουμε έτσι ώστε να αποτρέψουμε την κίνηση του νερού λόγω διαφοράς δυναμικού είναι ίση με την ωσμωτική πίεση του διαλύματος.



Σχήμα 3.1. Υδατικές κινήσεις μεταξύ διαλυμάτων. Το δοχείο περιέχει απεσταγμένο νερό και ο όγκος του θεωρείται πολύ μεγάλος έτσι ώστε η επίδραση οποιαδήποτε προσθήκης ή αφαίρεσης μορίων νερού να θεωρείται αμελητέα. Ο σωλήνας περιέχει διάλυμα σακχαρόζης και το κάτω άκρο του κλείνεται με ημιπερατή μεμβράνη: τα μόρια του νερού μπορούν να διέλθουν μέσω αυτής, ενώ τα μόρια της σακχαρόζης όχι. **A.** Ο σωλήνας τοποθετείται εντός του δοχείου και η κίνηση νερού λόγω διαφοράς δυναμικού μεταξύ δοχείου και σωλήνα ξεκινά. **B.** Η υδροστατική πίεση που αναπτύσσεται λόγω ανύψωσης της στάθμης του νερού στο σωλήνα αντισταθμίζει τη διαφορά δυναμικού μεταξύ δοχείου και σωλήνα: τα δυο δυναμικά εξισώνονται και η κίνηση νερού σταματά. **Γ.** Μέσω εμβόλου, ασκούμε πίεση στο πάνω μέρος του σωλήνα. Η πίεση αυτή προκαλεί αύξηση του δυναμικού του σωλήνα (το δυναμικό του διαλύματος στο σωλήνα γίνεται θετικό), άρα προκύπτει νέα κίνηση νερού κατ' αντίστροφη φορά. **Δ.** Όλα τα μόρια του νερού, που είχαν εισέλθει στο σωλήνα κατά τη φάση B, έχουν επανέλθει στο δοχείο. Το έμβολο συνεχίζει να ασκεί πίεση στο διάλυμα του σωλήνα, αντισταθμίζοντας τη διαφορά δυναμικού μεταξύ δοχείου και σωλήνα και διατηρώντας κατάσταση ισορροπίας.

Ας δούμε τώρα πως μεταφράζονται όλα τα παραπάνω εάν στην θέση του σωλήνα του παραδείγματος έχουμε ένα φυτικό κύτταρο. Δυο είναι τα χαρακτηριστικά των φυτικών κυττάρων, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Κατ' αρχήν, η ύπαρξη ημιπερατών μεμβρανών τους προσδίδει χαρακτηριστικά κλασσικού ωσμωτικού συστήματος, σαν αυτό που περιγράψαμε παραπάνω. Η ημιπερατή μεμβράνη επιτρέπει τη διατήρηση μέσα στον κυτταρικό χυμό συγκεντρώσεων διαλυμένων ουσιών διαφορετικών από εκείνες των εξωτερικών διαλυμάτων. Ως αποτέλεσμα, εάν τοποθετήσουμε ένα κύτταρο (ή μια ομάδα κυττάρων) σε καθαρό νερό, ή σε ένα διάλυμα χαμηλότερης ωσμωτικής πίεσης, θα απορροφήσει νερό. Αντίστροφα, εάν τοποθετήσουμε ένα κύτταρο σε ένα διάλυμα υψηλότερης ωσμωτικής πίεσης θα χάσει νερό και θα επακολουθήσει το φαινόμενο της πλασμόλυσης.

Τα παραπάνω ισχύουν όταν θέλουμε να προβλέψουμε την κίνηση του νερού μεταξύ φυτικών κυττάρων και κάποιου διαλύματος. Τα πράγματα γίνονται πιο περίπλοκα όταν η κίνηση αφορά δυο διαφορετικές περιοχές του φυτικού σώματος, ή το έδαφος και το φυτικό σώμα. Ας επανέλθουμε στην απλή περίπτωση κυττάρων μέσα σε καθαρό νερό, ή σε διάλυμα χαμηλότερης ωσμωτικής πίεσης. Όπως αναφέραμε ήδη, κάτω από αυτές τις συνθήκες, τα κύτταρα θα απορροφήσουν νερό. Ως αποτέλεσμα, θα αναπτύξουν εσωτερική υδροστατική πίεση, η οποία θα προκαλέσει διόγκωση του πρωτοπλάστη. Εντούτοις, τα κύτταρα δεν κινδυνεύουν από διάρρηξη και εδώ ακριβώς υπεισέρχεται η δεύτερη χαρακτηριστική ιδιότητα των φυτικών κυττάρων. Ως γνωστόν, τα φυτικά κύτταρα περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα, βασική ιδιότητα του οποίου είναι η ανελαστικότητα. Ακριβώς, λοιπόν, λόγω ύπαρξης του ανελαστικού κυτταρικού τοιχώματος ο διογκούμενος πρωτοπλάστης συναντά αντίσταση και η πρόσληψη νερού σταματά. Η υδροστατική πίεση που αναπτύσσεται εντός του κυττάρου λόγω πρόσληψης νερού αντισταθμίζεται από αντίρροπη πίεση την οποία ασκεί το άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα στον πρωτοπλάστη. Η υδροστατική πίεση που ασκεί ο πρωτοπλάστης στο κυτταρικό τοίχωμα ονομάζεται **πίεση σπαργής** (σπαργή = φούσκωμα). Στην πίεση αυτή οφείλεται το φούσκωμα των κυττάρων. Στα είδη εκείνα που δεν διαθέτουν έντονα διαμορφωμένο σκληροεγχυματικό ιστό η πίεση σπαργής αποτελεί τον βασικό παράγοντα με τη βοήθεια του οποίου επιτυγχάνεται η στήριξη και «ανόρθωση» του φυτικού σώματος. Τέτοια φυτά, αν υποστούν συνθήκες έλλειψης νερού, χάνουν την σπαργή τους, το σώμα τους χάνει την ικανότητα στήριξης και πέφτει, παρουσιάζοντας την κλασική εικόνα μαραμένου φυτού.

Επομένως, όταν πρόκειται για φυτικά κύτταρα, η εξίσωση (1) μπορεί να γραφεί ως:

$$\Psi = P - \pi$$

όπου

P, η πίεση σπαργής των κυττάρων

και π , η ωσμωτική πίεση του κυτταρικού χυμού.

Όπως είναι φανερό από την παραπάνω σχέση, η αύξηση της πίεσης σπαργής αυξάνει το δυναμικό νερού του κυττάρου, ενώ αντίθετα η αύξηση της ωσμωτικής πίεσης ελαττώνει το δυναμικό του νερού.

Η ωσμωτική πίεση ενός διαλύματος που περιέχει μια μόνο διαλυμένη ουσία, που δεν ιονίζεται, μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση:

$$\pi = c R T$$

όπου

c, η γραμμομοριακή συγκέντρωση (molality) της διαλυμένης ουσίας

R, η σταθερά των αερίων ($0.0083143 \text{ l MPa mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T, η απόλυτη θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C} + 273$).

Πειραματικό μέρος

Σκοπός της άσκησης είναι η εξοικείωση με τα μεγέθη που καθορίζουν την κατεύθυνση της κίνησης του νερού στα ωσμωτικά συστήματα (δυναμικό νερού, ωσμωτική πίεση, πίεση σπαργής).

Προσδιορισμός δυναμικού νερού

- Δίνεται διάλυμα σακχαρόζης 1 m (molality). Παρασκευάστε 100 ml από τα εξής διαλύματα: 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 m.
- Από κονδύλους πατάτας και με τη βοήθεια φελοτρυπητήρα προετοιμάστε 6 κυλινδρικά τεμάχια μήκους 3 cm και διαμέτρου 1 cm περίπου. Τα τεμάχια αυτά πρέπει να έχουν κατά το δυνατόν το ίδιο μήκος και διάμετρο και οι ακραίες εγκάρσιες τομές να είναι λείες και κάθετες.
- Τοποθετείστε τους κυλίνδρους μέσα σε τρυβλίο Petri. Οι παραπάνω εργασίες πρέπει να γίνουν κατά το δυνατόν γρηγορότερα για να αποφευχθεί η απώλεια υγρασίας.
- Ζυγίστε σε αναλυτικό ζυγό κάθε κύλινδρο με ακρίβεια mg. Αμέσως μετά τη ζύγιση τοποθετείστε από ένα κύλινδρο σε κάθε διάλυμα.
- Οι κύλινδροι θα παραμείνουν για εξισορρόπηση μέσα στα διαλύματα επί 2 ώρες.
- Μετά την πάροδο αυτού του χρόνου μεταφέρετε τους κυλίνδρους από κάθε διάλυμα σε διηθητικό χαρτί, στεγνώστε τους με ελαφριά επαφή στο χαρτί και ζυγίστε τους. Ακολουθήστε την ίδια χρονολογική σειρά ζυγίσεως όπως και κατά την αρχική ζύγιση.
- Μετρήστε τη θερμοκρασία περιβάλλοντος με προσέγγιση βαθμού.
- Παρουσιάστε τα δεδομένα σε πίνακα που θα δείχνει το αρχικό βάρος, το τελικό βάρος, την αλλαγή του βάρους και την επί % αλλαγή του βάρους.

Συγκέντρωση σακχαρόζης	Αρχικό βάρος	Τελικό βάρος	Αρχικό - Τελικό βάρος	% αλλαγή βάρους
0.10				
0.15				
0.20				
0.25				
0.30				
0.35				

- Κατασκευάστε γραφική παράσταση με την % αλλαγή του βάρους (+ ή -) στον κάθετο άξονα (ψ) και τη συγκέντρωση της σακχαρόζης στον οριζόντιο άξονα (χ).
- Από τη γραφική παράσταση υπολογίστε τη συγκέντρωση της σακχαρόζης, στην οποία δεν παρατηρείται αλλαγή βάρους.
- Υπολογίστε κατόπιν το δυναμικό του νερού σε διάλυμα με αυτήν τη συγκέντρωση, λαμβάνοντας υπόψη ότι $P = 0$ (ατμοσφαιρική πίεση).
- Ποιο συμπέρασμα εξάγεται για το δυναμικό του νερού στον ιστό που χρησιμοποιήσατε και βάσει ποιου συλλογισμού;

Προσδιορισμός ωσμωτικής πίεσης

Η ωσμωτική πίεση των κυττάρων του ιστού που χρησιμοποιείτε θα μετρηθεί αφού πρώτα εξαχθεί από τον ιστό καθαρός κυτταρικός χυμός με χρήση κατάλληλης συσκευής. Για την μέτρηση της ωσμωτικής πίεσης του κυτταρικού χυμού θα χρησιμοποιήσετε το σύστημα μέτρησης δυναμικού νερού Decagon SC10A. Θυμηθείτε ότι το δυναμικό του νερού (Ψ) ενός διαλύματος δίνεται από την σχέση:

$$\Psi = P - \pi$$

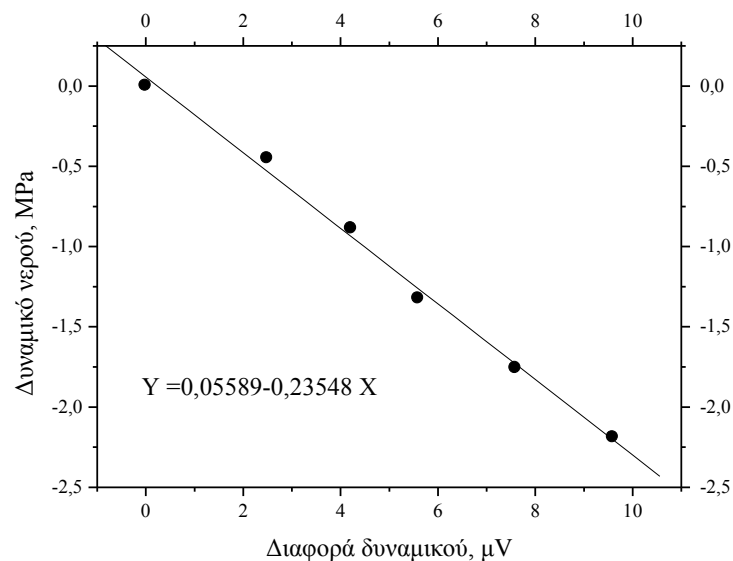
όπου

P , η υδροστατική πίεση υπέρ την ατμοσφαιρική και π , η ωσμωτική πίεση του διαλύματος.

Επειδή η μέτρησή σας αφορά διάλυμα στο οποίο δεν ασκείται πίεση υπέρ την ατμοσφαιρική θα είναι $P = 0$ και επομένως $\Psi = -\pi$. Άρα μετρώντας το δυναμικό νερού του διαλύματος γνωρίζετε και την ωσμωτική του πίεση.

Το όργανο που θα χρησιμοποιήσετε περιλαμβάνει ένα μικροβολτόμετρο, θαλάμους στους οποίους τοποθετούνται τα προς μέτρηση δείγματα και ένα θερμοζεύγος. Όταν το δείγμα τοποθετηθεί σε ένα θάλαμο και σφραγιστεί αεροστεγώς, τότε μετά από λίγα λεπτά αποκαθίσταται ισορροπία μεταξύ του περιεχόμενου νερού του δείγματος και των υδρατμών της κλειστής ατμόσφαιρας. Στην κατάσταση ισορροπίας το δυναμικό νερού του δείγματος θα είναι ίσο με το δυναμικό νερού των

υδρατμών. Στο θερμοζεύγος, που βρίσκεται στην κλειστή ατμόσφαιρα πάνω από το μετρούμενο δείγμα, δημιουργείται διαφορά (ηλεκτρικού) δυναμικού, η οποία είναι ανάλογη με την συγκέντρωση των υδρατμών της κλειστής ατμόσφαιρας. Αυτή η διαφορά δυναμικού μετριέται από το μικροβολτόμετρο. Στη συνέχεια με χρήση της πρότυπης καμπύλης του Σχήματος 3.2 από τη διαφορά δυναμικού υπολογίζετε το δυναμικό νερού. Η πρότυπη καμπύλη έχει κατασκευαστεί με διαλύματα γνωστών δυναμικών νερού.



Σχήμα 3.2. Πρότυπη καμπύλη μετατροπής της διαφοράς δυναμικού σε δυναμικό νερού για το Decagon SC10A.

Ερωτήσεις

1. Υπολογίστε την πίεση σπαργής των κυττάρων της πατάτας από τις τιμές του δυναμικού του νερού και της ωσμωτικής πίεσης που μετρήσατε πειραματικά.
2. Στους κυλίνδρους που κέρδισαν βάρος μετά την τοποθέτησή τους στα διαλύματα η πίεση σπαργής αυξήθηκε ή ελαττώθηκε; Σε τι οφείλεται η αύξηση αυτή του βάρους;
3. Αν ο όγκος του εξωτερικού διαλύματος είναι μικρός, τι λάθος υπεισέρχεται στον υπολογισμό του δυναμικού του νερού με τη μέθοδο που εφαρμόσατε; Η υπολογιζόμενη τιμή θα είναι μικρότερη ή μεγαλύτερη της πραγματικής;
4. Ποια η σχέση μεταξύ της ωσμωτικής πίεσης του κυτταρικού χυμού και της τελικής πίεσης σπαργής που θα αναπτυχθεί εάν τομές τοποθετηθούν σε απεσταγμένο νερό;

ΑΣΚΗΣΗ 4^η - Στόματα και Διαπνοή

Εισαγωγή

Ως διαπνοή ορίζεται η απώλεια νερού από τα υπέργεια μέρη των φυτών και κυρίως από τα φύλλα. Το φαινόμενο είναι σύνθετο και συντελείται σε δύο φάσεις. Αρχικά, το νερό από τα κύτταρα του μεσοφύλλου εξατμίζεται προς τους μεσοκυττάριους χώρους. Στη συνέχεια, οι υδρατμοί κινούνται από το εσωτερικό του φύλλου προς την εξωτερική ατμόσφαιρα μέσω διάχυσης.

Τόσο η κίνηση νερού μέσω της διαπνοής όσο και η κίνηση του νερού δια μέσου του φυτικού σώματος παρουσιάζουν μεγάλη αναλογία με την ροή ηλεκτρικού ρεύματος, όπως αυτή περιγράφεται από το νόμο του Ohm. Όπως η ροή ηλεκτρικού ρεύματος σε έναν ρευματοφόρο αγωγό είναι ανάλογη με τη διαφορά δυναμικού στα δύο άκρα του και αντιστρόφως ανάλογη προς την αντίστασή του, έτσι και η κίνηση του νερού είναι ανάλογη με τη διαφορά δυναμικού (νερού) που την προκαλεί και αντιστρόφως ανάλογη προς την αντίσταση που συναντά στην πορεία της.

Με βάση τα παραπάνω, η διαπνοή είναι συνάρτηση δύο παραμέτρων: (1) της κλίσης συγκέντρωσης των υδρατμών μεταξύ φύλλου και ατμόσφαιρας και (2) της αντίστασης που συναντούν οι υδρατμοί καθώς διαχέονται από το εσωτερικό του φύλλου προς την ατμόσφαιρα. Στη συνέχεια, θα εξετάσουμε τους δύο αυτούς παράγοντες ξεχωριστά.

Η κινητήριος δύναμη της διαπνοής είναι η κλίση συγκέντρωσης των υδρατμών μεταξύ φύλλου και ατμόσφαιρας

Για να εκτιμήσουμε την κλίση συγκέντρωσης των υδρατμών μεταξύ φύλλου και ατμόσφαιρας, θα πρέπει να γνωρίζουμε την συγκέντρωσή τους στην ατμόσφαιρα και στους μεσοκυττάριους χώρους του φύλλου. Η πρώτη παράμετρος μπορεί να μετρηθεί εύκολα, αλλά η συγκέντρωση των υδρατμών στους μεσοκυττάριους χώρους είναι δύσκολα μετρήσιμη. Μπορούμε να έχουμε μια εκτίμηση της τελευταίας παραμέτρου, θεωρώντας ότι οι μεσοκυττάριοι χώροι είναι σε υδατική ισορροπία με τα κυτταρικά τοιχώματα. Με άλλα λόγια, το δυναμικό νερού των μεσοκυττάριων χώρων είναι ίσο με το δυναμικό νερού των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η παραπάνω προσέγγιση δεν απέχει πολύ από την πραγματικότητα, αφού η ελεύθερη επιφάνεια των κυτταρικών τοιχωμάτων – από την οποία εξατμίζεται το νερό – είναι ιδιαίτερα μεγάλη σε σχέση με τον όγκο των μεσοκυττάριων χώρων. Η επιφάνεια αυτή μπορεί να είναι ακόμα και 30 φορές μεγαλύτερη από την εξωτερική επιφάνεια του φύλλου, ενώ ο όγκος των μεσοκυττάριων χώρων κυμαίνεται από 5 έως 40% του συνολικού όγκου του φύλλου. Ακριβώς λόγω αυτού του υψηλού λόγου ελεύθερης επιφάνειας προς όγκο, κάτω από

κανονικές συνθήκες (επάρκεια νερού στο έδαφος, όχι ακραίες θερμοκρασίες), επιτυγχάνεται γρήγορη εξισορρόπηση υδρατμών στο εσωτερικό του φύλλου.

Με την παραπάνω παραδοχή, μπορούμε πλέον εύκολα να υπολογίσουμε την συγκέντρωση των υδρατμών στους μεσοκυττάριους χώρους εάν γνωρίζουμε (1) το δυναμικό νερού του φύλλου (που είναι ίσο με το δυναμικό νερού των κυτταρικών τοιχωμάτων) και (2) την θερμοκρασία του φύλλου. Ας πάρουμε σαν παράδειγμα ένα φύλλο με δυναμικό νερού -1.0 MPa. Το νερό εξατμίζεται από τα κυτταρικά τοιχώματα έως ότου το δυναμικό νερού των μεσοκυττάριων χώρων εξισορροπήσει με αυτό των κυτταρικών τοιχωμάτων. Το δυναμικό νερού του αέρα (Ψ) δίνεται από τη σχέση:

$$\Psi = \frac{RT}{\bar{V}_w} \ln\left(\frac{\Sigma Y}{100}\right) \quad (4.1)$$

όπου

R , η σταθερά των αερίων (0.0083143 l MPa mol $^{-1}$ °K $^{-1}$)

T , η απόλυτη θερμοκρασία (°K = °C + 273)

\bar{V}_w , ο μερικός γραμμομοριακός όγκος του νερού (για υπολογισμούς δυναμικού νερού είναι ίσος με 0.018 l mol $^{-1}$)

ΣY , η επί τοις εκατό σχετική υγρασία.

Η **σχετική υγρασία** (ΣY) αποτελεί ένα μέτρο της συγκέντρωσης των υδρατμών στην ατμόσφαιρα και ορίζεται ως:

$$\Sigma Y = \frac{c}{c_s} 100 \quad (4.2)$$

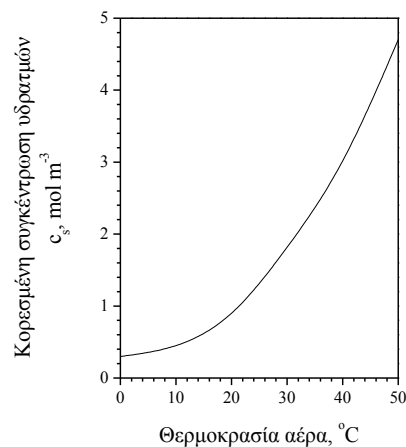
όπου

c , η συγκέντρωση των υδρατμών που υπάρχουν στην ατμόσφαιρα και

c_s , η συγκέντρωση των υδρατμών που θα υπήρχαν στην ατμόσφαιρα εάν ήταν κορεσμένη (σε υδρατμούς).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.1, η κορεσμένη συγκέντρωση των υδρατμών επηρεάζεται έντονα από τη θερμοκρασία. Αυτό σημαίνει ότι καθώς η θερμοκρασία του αέρα αυξάνεται, ο αέρας μπορεί να διατηρήσει μεγαλύτερα ποσά υδρατμών. Παράλληλα, εάν η θερμοκρασία μιας μάζας αέρα αυξηθεί χωρίς να μεταβληθεί η συγκέντρωση των υδρατμών της, η σχετική υγρασία θα μειωθεί (αφού θα έχει αυξηθεί η κορεσμένη συγκέντρωση των υδρατμών, παρονομαστής στη σχέση 4.2).

Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικές τιμές σχετικής υγρασίας



Σχήμα 4.1. Η εξάρτηση της κορεσμένης συγκέντρωσης των υδρατμών από τη θερμοκρασία.

καθώς και οι αντίστοιχες τιμές δυναμικού νερού του αέρα. Γίνεται φανερό ότι στους μεσοκυττάριους χώρους ενός φύλλου σαν του παραδείγματός μας ($\Psi = -1.0$ MPa) η σχετική υγρασία είναι εξαιρετικά υψηλή (σχεδόν 100%), ενώ αντίθετα οι συνηθισμένες τιμές σχετικής υγρασίας της ατμόσφαιρας (50%) αντιστοιχούν σε πολύ χαμηλές τιμές δυναμικού νερού (-93.57 MPa). Αυτή ακριβώς η διαφορά δυναμικού μεταξύ φύλλου και αέρα είναι υπεύθυνη για την απώλεια νερού από τα φύλλα μέσω του φαινομένου της διαπνοής.

Πίνακας 4.1. Η σχέση μεταξύ σχετικής υγρασίας και δυναμικού νερού του αέρα σύμφωνα με την εξίσωση (1) για θερμοκρασία 20° C.

Σχετική υγρασία, %	Δυναμικό νερού, MPa
100	0.00
99.9	-0.14
99.5	-0.68
99.0	-1.36
98.0	-2.73
95.0	-6.92
90.0	-14.22
75.0	-38.84
50.0	-93.57
20.0	-217.27
10.0	-310.85

Η διαπνοή ρυθμίζεται από την αντίσταση διαχύσεως του φύλλου στους υδρατμούς

Μετά την κλίση συγκέντρωσης των υδρατμών, ο δεύτερος πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τις απώλειες νερού από τα φύλλα είναι οι αντιστάσεις που παρεμβάλλονται στους υδρατμούς κατά τη διάχυσή τους από το εσωτερικό του φύλλου προς την ατμόσφαιρα. Κατά την πορεία τους αυτή οι υδρατμοί συναντούν τις ακόλουθες αντιστάσεις:

1. Αντίσταση μεσοφύλλου, R_m (mesophyll resistance). Αφορά τη δυσκολία διάχυσης των υδρατμών στους μεσοκυττάριους χώρους του φύλλου. Φύλλα εσωτερικώς συμπαγή, με μικρούς μεσοκυττάριους χώρους, παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντίσταση στην κίνηση των υδρατμών. Η αντίσταση αυτή εξαρτάται από ανατομικά χαρακτηριστικά του φύλλου και δεν μπορεί να μεταβληθεί βραχυχρόνια.

2. Στοματική αντίσταση, R_s (stomatal resistance). Αφορά την αντίσταση που συναντούν οι υδρατμοί κατά τη διέλευσή τους μέσω των στομάτων. Ανοικτά στόματα αντιστοιχούν σε μικρή αντίσταση στη διάχυση και επομένως μεγάλες απώλειες νερού. Αντιστρόφως, όταν τα στόματα είναι κλειστά παρουσιάζεται μεγάλη αντίσταση στη διάχυση των υδρατμών. Σε αντίθεση με την αντίσταση του μεσοφύλλου, η αντίσταση των στομάτων ρυθμίζεται με ευχέρεια και ταχύτητα από το ίδιο το φυτό, ως απόκριση στις μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών (επάρκεια σε νερό, θερμοκρασία, φως, συγκέντρωση CO_2). Ο μηχανισμός του ανοίγματος και κλεισίματος είναι μεταβολικός με τελική κατάληξη την αύξηση ή μείωση της σπαργής των καταφρακτικών κυττάρων. Αύξηση της σπαργής τους έχει σαν μηχανικό αποτέλεσμα το άνοιγμα των στοματικών πόρων ενώ μείωση της σπαργής προκαλεί το κλείσιμο τους. Ο φωτισμός προκαλεί κατά κανόνα άνοιγμα ενώ, η αύξηση της συγκέντρωσης του CO_2 στους υποστομάτιους χώρους και η έλλειψη νερού οδηγούν σε κλείσιμο των στομάτων.

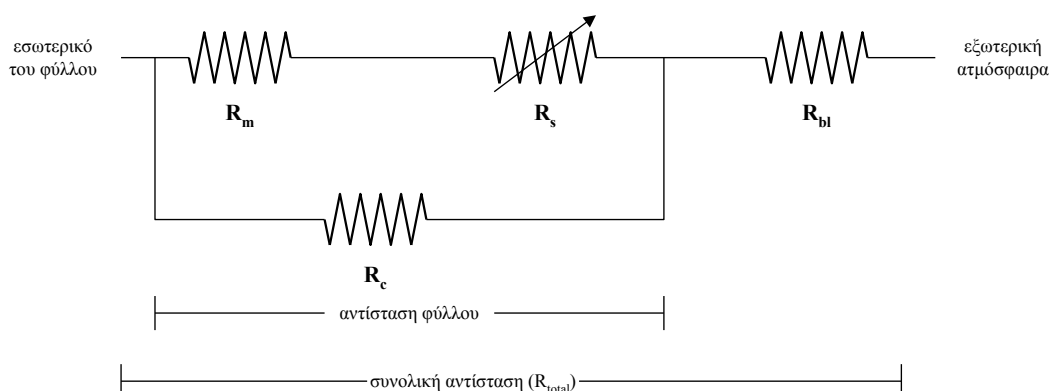
3. Αντίσταση οριακού στρώματος, R_{bl} (boundary layer resistance). Μεταξύ στομάτων και ελεύθερης ατμόσφαιρας μεσολαβεί ένα στρώμα σχετικά αδιατάρακτου αέρα, εμπλουτισμένο σε υδρατμούς μειούμενης συγκέντρωσης από το φύλλο προς την ατμόσφαιρα. Όσο παχύτερο είναι το οριακό στρώμα τόσο μεγαλύτερη είναι η αντίσταση στη διάχυση των υδρατμών. Το πάχος του οριακού στρώματος επηρεάζεται από την ταχύτητα του ανέμου (χαμηλή ταχύτητα ανέμου αντιστοιχεί σε μεγάλο πάχος), αλλά και από μορφολογικά και ανατομικά χαρακτηριστικά των φύλλων (ύπαρξη τριχών στην επιφάνεια του φύλλου, στόματα σε κρύπτες κλπ.).

4. Αντίσταση εφυμενίδας, R_c (cuticle resistance). Η αντίσταση που προβάλλει η εφυμενίδα στην διάχυση των υδρατμών είναι πολύ μεγαλύτερη από τις προηγούμενες αντιστάσεις, αναπτύσσεται όμως παράλληλα με αυτές (Σχήμα 4.2). Έτσι, η επίδρασή της στις απώλειες νερού από το φύλλο γίνεται σημαντική μόνον όταν τα στόματα είναι εντελώς κλειστά.

Με βάση τα παραπάνω, η αντίσταση του φύλλου (R_{leaf}) περιλαμβάνει τις αντιστάσεις R_m , R_s και R_c , ($R_{leaf} = \frac{(R_m + R_s) R_c}{R_m + R_s + R_c}$), ενώ η συνολική αντίσταση στη

διάχυση των υδρατμών (R_{total}) περιλαμβάνει την αντίσταση του φύλλου (R_{leaf}) συν την αντίσταση του οριακού στρώματος (R_{bl} , Σχήμα 4.2). Οι αντιστάσεις R_m και R_{bl} είναι αρκετά μικρότερες από την R_s , ακόμα και όταν τα στόματα είναι ανοικτά. Η συνεισφορά τους στη συνολική αντίσταση στη διάχυση των υδρατμών καθίσταται σημαντική μόνο σε ειδικές περιπτώσεις (π.χ. μεγάλα φύλλα σε άπνοια, ξηρόφυτα με αυξημένο R_m).

Τελικά, η διαπνοή (T) των υδρατμών από το φύλλο προς την ατμόσφαιρα δίνεται από την εξίσωση:



Σχήμα 4.2. Αντιστάσεις που παρεμβάλλονται στη διάχυση των υδρατμών, υπό μορφή ηλεκτρικού κυκλώματος. R_m : αντίσταση μεσοφύλλου, R_s : στοματική αντίσταση, R_{bl} : αντίσταση οριακού στρώματος,

R_c : αντίσταση εφυμενίδας. $R_{total} = \frac{(R_m + R_s) R_c}{R_m + R_s + R_c} + R_{bl}$. Το βέλος στην στοματική αντίσταση

υποδεικνύει ότι η αντίσταση των στομάτων ελέγχεται από το φυτό.

$$T = \frac{C_{\Phi} - C_A}{R_{\text{total}}} \quad (4.3)$$

όπου

c_{Φ} , η συγκέντρωση των υδρατμών στους μεσοκυττάριους χώρους του φύλλου

c_A , η συγκέντρωση των υδρατμών που υπάρχουν στην ατμόσφαιρα

R_{total} , η συνολική αντίσταση στη διάχυση των υδρατμών.

Πειραματικό μέρος

Στην άσκηση αυτή, θα μελετήσουμε τις κινήσεις των στομάτων με δύο μεθόδους: α) με άμεση παρατήρηση εκμαγείων (αποτύπωμα επιδερμίδας) φύλλου στο μικροσκόπιο και β) με μέτρηση της αντίστασης διαχύσεως με ειδικό όργανο, το οποίο ονομάζεται ποροόμετρο.

Κατασκευή εκμαγείων φύλλου

- Περίπου 1 cm³ υλικού με βάση τη σιλικόνη απλώνεται σε τρυβλίο Petri και προστίθενται 1-2 σταγόνες στερεωτικού.
- Το μίγμα αναμειγνύεται με τη βοήθεια σπάτουλας και κατόπιν ένα λεπτό στρώμα απλώνεται επάνω στο υπό εξέταση φύλλο. Η επάλειψη του φύλλου δεν πρέπει να διαρκέσει πάνω από 1 min, γιατί το μίγμα αρχίζει να σκληραίνει.
- Μετά από 10 min το στερεοποιημένο στρώμα της σιλικόνης ξεφλουδίζεται από το φύλλο προσεκτικά με τη βοήθεια λαβίδας.
- Στο αρχικό αποτύπωμα του φύλλου (στρώμα σιλικόνης), απλώνεται άχρωμο στιλβωτικό νυχιών.
- Μετά από 2-3 min το στρώμα του στιλβωτικού ξεφλουδίζεται από τη σιλικόνη με τη βοήθεια λαβίδας.
- Το στρώμα του στιλβωτικού τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο και παρατηρείται στο μικροσκόπιο.

Μέτρηση αντίστασης διαχύσεως με χρήση πορομέτρου

Η λειτουργία του πορομέτρου στηρίζεται στην μέτρηση υγρασίας. Το όργανο αποτελείται από ένα θάλαμο μέσα στον οποίο υπάρχει ένας αισθητήρας ευαίσθητος στην υγρασία και ένα θερμοζεύγος για μέτρηση θερμοκρασίας. Ο θάλαμος είναι κατασκευασμένος έτσι, ώστε να είναι δυνατός ο εγκλεισμός ενός φύλλου μέσα σε αυτόν αεροστεγώς. Το ηλεκτρονικό μέρος του οργάνου περιλαμβάνει ένα μικροαμπερόμετρο. Στη διάρκεια των μετρήσεων, οι δύο αισθητήρες (θερμοκρασίας, υγρασίας) προκαλούν την δίοδο ρεύματος μέσω του μικροαμπερόμετρου.

Όπως είδαμε στην Εισαγωγή, κάτω από σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες (φως, θερμοκρασία, συγκέντρωση CO₂) αποκαθίσταται στα φύλλα ένας σταθερός

ρυθμός διαπνοής, αντιστρόφως ανάλογος της αντίστασης διαχύσεως. Αυτό σημαίνει ότι μέσω των στομάτων θα διαπνέεται μια σταθερή ποσότητα υδρατμών στη μονάδα του χρόνου. Έτσι, εάν τοποθετήσουμε ένα φύλλο σε μια κλειστή ατμόσφαιρα θα τείνει να αυξήσει την συγκέντρωση των υδρατμών της. Το γεγονός αυτό εκμεταλλεύεται ο σχεδιασμός του πορομέτρου κατά τον ακόλουθο τρόπο: πριν τοποθετηθεί το προς μέτρηση φύλλο στον θάλαμο του οργάνου, διοχετεύεται ξηρός αέρας μέσα από αυτόν έτσι ώστε να ελαττωθεί η υγρασία της ατμόσφαιράς του (η ένδειξη του μικροαμπερόμετρου να κατέλθει περίπου στα 10 μA). Στη συνέχεια τοποθετείται το φύλλο εντός του θαλάμου και μετράται ο χρόνος (Δt) που χρειάζεται το φύλλο για να αυξήσει την υγρασία της ατμόσφαιρας κατά μια συγκεκριμένη ποσότητα υδρατμών (η ένδειξη του οργάνου να ανέλθει από τα 20 στα 60 μA). Έτσι, ένα φύλλο που διαπνέει έντονα (μικρή αντίσταση διαχύσεως) θα αυξήσει πολύ γρήγορα την υγρασία του θαλάμου (Δt μικρό), ενώ ένα φύλλο με μικρή διαπνοή (μεγάλη αντίσταση διαχύσεως) θα χρειαστεί μεγαλύτερο χρόνο για να προκαλέσει την ίδια αύξηση υγρασίας (Δt μεγάλο). Από την ένδειξη Δt και μέσω πρότυπης καμπύλης μπορούμε να υπολογίσουμε την αντίσταση διαχύσεως του φύλλου.

Διαδικασία

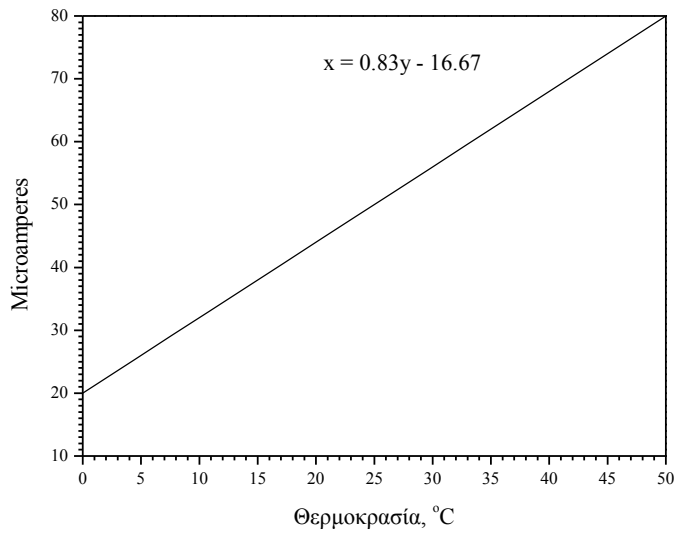
- Με τον θάλαμο του πορομέτρου κενό και κλειστό διοχετεύουμε ξηρό αέρα ώστε η ένδειξη του οργάνου να φτάσει στα 10 μA .
- Προσαρμόζουμε κατάλληλα τον θάλαμο σε ένα φύλλο και μετράμε το χρόνο που χρειάζεται για να ανέβει η ένδειξη από τα 20 στα 60 μA (Δt).
- Ταυτόχρονα, μετράμε και τη θερμοκρασία του φύλλου. Η μετατροπή από μA σε $^{\circ}\text{C}$ γίνεται μέσω της πρότυπης καμπύλης του Σχήματος 4.3.
- Ανάγουμε την τιμή Δt στους 25 $^{\circ}\text{C}$, πολλαπλασιάζοντας με τον συντελεστή διόρθωσης που αντιστοιχεί στην θερμοκρασία του μετρούμενου φύλλου (Σχήμα 4.4).
- Επαναλαμβάνουμε το ίδιο με δύο ακόμη φύλλα.
- Εξάγουμε τον μέσο όρο των τριών μετρήσεων και μετατρέπουμε την τιμή Δt σε αντίσταση διαχύσεως (sec cm^{-1}) μέσω της πρότυπης καμπύλης του Σχήματος 4.5.

Ερωτήσεις

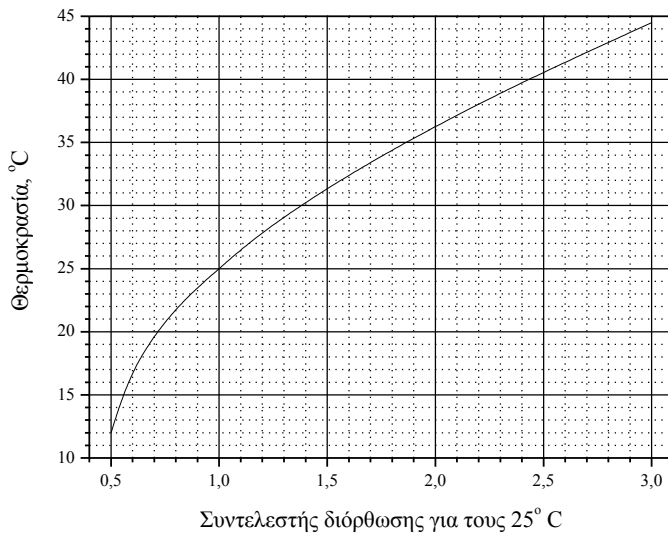
1. Με βάση τις εξισώσεις 4.2 και 4.3 καθώς και τον Πίνακα 4.2, υπολογίστε την διαπνοή των φύλλων που μετρήσατε σε $\mu\text{mol H}_2\text{O cm}^{-2} \text{sec}^{-1}$.

Πίνακας 4.2. Η κορεσμένη συγκέντρωση των υδρατμών συναρτήσει της θερμοκρασίας.

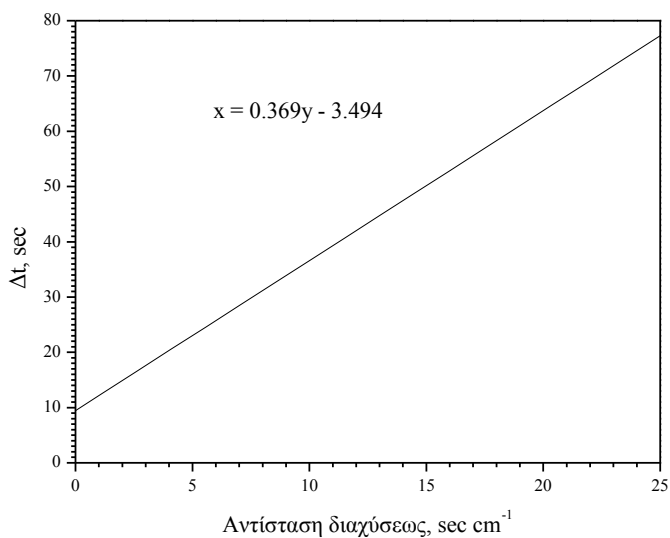
Θερμοκρασία, °C	Κορεσμένη συγκέντρωση υδρατμών, mol m ⁻³
10	0.522
11	0.556
12	0.592
13	0.630
14	0.670
15	0.713
16	0.757
17	0.804
18	0.854
19	0.906
20	0.961
21	1.018
22	1.079
23	1.143
24	1.210
25	1.280
26	1.354
27	1.432
28	1.513
29	1.598
30	1.687
31	1.781
32	1.879
33	1.981
34	2.089
35	2.201
36	2.318
37	2.441
38	2.569
39	2.703
40	2.842



Σχήμα 4.3. Πρότυπη καμπύλη μετατροπής μA σε θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C}$) για το πορόμετρο LI-COR LI-60.



Σχήμα 4.4. Πρότυπη καμπύλη του συντελεστή διόρθωσης για αναγωγή του Δt στους 25 $^{\circ}\text{C}$ συναρτήσει της θερμοκρασίας για το πορόμετρο LI-COR LI-60.



Σχήμα 4.5. Πρότυπη καμπύλη μετατροπής Δt σε αντίσταση διαχύσεως για το πορόμετρο LI-COR LI-60.

ΑΣΚΗΣΗ 5^η - Βλάστηση σπερμάτων και επίδραση της φωτεινής ακτινοβολίας στην ανάπτυξη των αρτίβλαστων

Εισαγωγή

Το ώριμο έμβρυο των σπερματοφύτων αποτελείται από έναν άξονα, ο οποίος φέρει μία ή δύο κοτυληδόνες, ανάλογα με το αν πρόκειται για μονοκότυλο ή δικότυλο φυτό. Στα αντίθετα άκρα του εμβρυακού άξονα βρίσκονται τα ακραία μεριστώματα του βλαστού και της ρίζας (**αρχέφυτρο του βλαστιδίου** και **αρχέφυτρο του ριζιδίου**). Το τμήμα του άξονα πάνω (επί-) από το σημείο έκπτυξης της ή των κοτυληδόνων μέχρι τη βάση του αρχέφυτρου του βλαστιδίου ονομάζεται **επικοτύλιο**. Το επικοτύλιο μπορεί να είναι πολύ βραχύ, ή σχετικά επιμηκυμένο, αποτελούμενο από ένα μικρό βλαστικό άξονα και ένα ζευγάρι νεαρών φύλλων με το ακραίο μερίστωμα του βλαστού στην κορυφή. Το τμήμα του άξονα κάτω (υπό-) από το σημείο έκπτυξης της ή των κοτυληδόνων έως το αρχέφυτρο του ριζιδίου ονομάζεται **υποκοτύλιο**. Σε αντιστοιχία με το επικοτύλιο, μπορεί να είναι πολύ βραχύ και αδιαφοροποίητο, ή να είναι περισσότερο διαφοροποιημένο, σχηματίζοντας ένα ριζίδιο με τις χαρακτηριστικές ιστολογικές περιοχές της ρίζας.

Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του εμβρύου και της ωρίμανσης του σπέρματος υπάρχει μια έντονη ροή θρεπτικών υλικών από το γονικό φυτό προς το αναπτυσσόμενο έμβρυο. Τα υλικά αυτά αποθηκεύονται προσωρινά στους ιστούς του σπέρματος με την προοπτική να χρησιμοποιηθούν ως πηγές ενέργειας και θρεπτικών κατά την διαδικασία της βλάστησης, όταν το νεαρό αρτίβλαστο αφενός δεν θα έχει πρόσβαση σε θρεπτικά του εδάφους, εφ' ετέρου δεν θα έχει αναπτύξει φωτοσυνθετικούς ιστούς. Δυο είναι οι ιστολογικοί σχηματισμοί που προκύπτουν ως αποθήκες θρεπτικών κατά τον σχηματισμό του σπέρματος: το **ενδοσπέρμιο** και οι **κοτυληδόνες**. Έτσι, σε κάποια φυτά το μεγαλύτερο μέρος του σπέρματος καταλαμβάνεται από το ενδοσπέρμιο (ρετινολαδιά, καλαμπόκι, σιτάρι) ενώ σε άλλα από τις κοτυληδόνες (ηλίανθος, καρυδιά, μπιζέλι, κερασιά, ροδακινιά, βερικοκιά, αμυγδαλιά).

Εξωτερικά, το σπέρμα περιβάλλεται από το **περίβλημα** του σπέρματος, το οποίο προέρχεται από τους χιτώνες της σπερματικής βλάστης. Ρόλος του περιβλήματος είναι η παροχή προστασίας από αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες. Η ανάπτυξη του εμβρύου συνήθως επιβραδύνεται κατά το χρονικό διάστημα της ωρίμανσης και της διασποράς των σπερμάτων. Η επαναφορά της εμβρυακής ανάπτυξης ή η βλάστηση των σπερμάτων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, τόσο εξωγενείς όσο και ενδογενείς. Μεταξύ των εξωγενών περιβαλλοντικών παραγόντων ιδιαίτερα σημαντικοί είναι το νερό, το οξυγόνο και η θερμοκρασία. Επιπροσθέτως, μικροί σπόροι, όπως αυτοί του

μαρουλιού (*Lactuca sativa*) και πολλών ζιζανίων, απαιτούν έκθεση στο φως για να βλαστήσουν.

Τα περισσότερα ώριμα σπέρματα είναι ιδιαίτερα αφυδατωμένα. Συνήθως, το περιεχόμενο νερό τους αντιστοιχεί στο 5 έως 20 % του συνολικού τους βάρους. Η βλάστηση δεν είναι δυνατή εάν πρώτα το σπέρμα δεν απορροφήσει το νερό που είναι απαραίτητο για τις μεταβολικές του διεργασίες. Ένζυμα, τα οποία ήδη βρίσκονται στο σπέρμα, ενεργοποιούνται και νέα συντίθενται με σκοπό την αποικοδόμηση και χρησιμοποίηση των αποθηκευμένων θρεπτικών συστατικών, τα οποία έχουν συσσωρευτεί στα κύτταρα του σπέρματος στη διάρκεια του σχηματισμού του εμβρύου. Το μέγεθος των κυττάρων αυξάνεται, ενώ παράλληλα ξεκινούν και οι κυτταρικές διαιρέσεις. Η περαιτέρω ανάπτυξη απαιτεί συνεχή παροχή νερού και θρεπτικών.

Στα αρχικά στάδια της βλάστησης, η αναπνοή μπορεί να είναι τελείως αναερόβια, αλλά μόλις το περισπέρμιο διαρρηχθεί μετατρέπεται σε αερόβια. Εάν το έδαφος είναι πλημμυρισμένο, τα διαθέσιμα ποσά οξυγόνου μπορεί να είναι ανεπαρκή για αερόβια αναπνοή, οπότε το σπέρμα δεν θα καταφέρει να βλαστήσει.

Παρ' όλον ότι τα περισσότερα σπέρματα μπορούν να βλαστήσουν μέσα σε ένα αρκετά μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος, συνήθως δεν μπορούν να βλαστήσουν κάτω ή πάνω από κάποιες συγκεκριμένες θερμοκρασίες, οι οποίες είναι διαφορετικές για κάθε είδος. Για πολλά είδη η ελάχιστη θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 0° και 5° C, και η μέγιστη μεταξύ 45° και 48° C, ενώ η βέλτιστη μεταξύ 25° και 30° C.

Η βλάστηση πολλών σπερμάτων γίνεται στο σκοτάδι. Ο μίσχος των αρτίβλαστων επιμηκύνεται γρήγορα, σπρώχνοντας την ακραία περιοχή του βλαστού έξω από το σκοτεινό χώμα. Ανάλογα με το εάν η περιοχή που εξέρχεται από το έδαφος είναι το υποκοτύλιο ή το επικοτύλιο, η βλάστηση ονομάζεται **επίγεια** και **υπόγεια** αντίστοιχα. Κατά το πρώιμο αυτό στάδιο της ανάπτυξης, δεν συμβαίνει καθόλου ανάπτυξη των φύλλων, γεγονός που θα παρεμπόδιζε την δίοδο του αναπτυσσόμενου βλαστού μέσα από τα τεμαχίδια του εδάφους. Προς αυτήν την κατεύθυνση, συνηγορεί και το γεγονός ότι και στα δύο είδη βλάστησης, η ακραία περιοχή δεν σπρώχνεται κατ' ευθείαν προς τα πάνω, αλλά το επικοτύλιο ή το υποκοτύλιο εξέρχονται από το έδαφος υπό μορφή **άγκιστρου**. Στην περαιτέρω πορεία της ανάπτυξης, το άγκιστρο ζετυλίζεται και ξεκινά η έκπτυξη φύλλων.

Αρτίβλαστα που αναπτύσσονται (κάτω από τεχνητές συνθήκες) στο σκοτάδι καταλήγουν στην ανάπτυξη έντονα επιμηκυσμένων μίσχων με μικρά φύλλα. Το άγκιστρο παραμένει τυλιγμένο, ενώ οι ιστοί τους είναι κίτρινοι ή άχρωμοι, καθώς τα πλαστίδια δεν αποκτούν πράσινο χρώμα εάν δεν εκτεθούν στο φως. Τέτοιου είδους αρτίβλαστα ονομάζονται **χλωρωτικά**. Όταν χλωρωτικά αρτίβλαστα εκτεθούν στο φως, το πρότυπο ανάπτυξης μετατρέπεται από χλωρωτικό σε κανονικό. Το άγκιστρο ζετυλίζεται, ο ρυθμός ανάπτυξης του μίσχου επιβραδύνεται και ξεκινά η ανάπτυξη των φύλλων. Επίσης, οι διάφοροι υπέργειοι ιστοί αποκτούν το κανονικό πράσινο χρώμα

τους. Τέτοιου είδους φωτο-επαγόμενα φαινόμενα ανάπτυξης και διαφοροποίησης θεωρείται ότι βρίσκονται κάτω από φωτομορφογενετικό έλεγχο και η διαδικασία ονομάζεται **φωτομορφογένεση**.

Κατά τις διαδικασίες της φωτομορφογένεσης, η φωτεινή ακτινοβολία δεν αξιοποιείται από το φυτό ως μορφή ενέργειας, όπως στην φωτοσύνθεση, αλλά ως μια σημαντική πληροφορία που αφορά το περιβάλλον του. Η αποτελεσματικότερη περιοχή του φάσματος είναι κυρίως η κόκκινη και ο υπεύθυνος φωτοδέκτης είναι μια μπλε χρωμοπρωτεΐνη, το **φυτόχρωμα**. Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε μεριστωματικές περιοχές χλωρωτικών ιστών. Το φυτόχρωμα, εκτός από τον παραπάνω ρυθμιστικό ρόλο που παίζει στις φωτομορφογενετικές διαδικασίες, αποτελεί και ένα αισθητήριο της ποιότητας της ακτινοβολίας που δέχονται τα φυτά: μέσω του μηχανισμού αυτού δίδεται και η κατάλληλη αναπτυξιακή ή προσαρμοστική απάντηση.

Πειραματικό μέρος

Σκοπός της άσκησης είναι η μελέτη της βλάστησης και ανάπτυξης αρτίβλαστων ραπανιού (*Raphanus sativus* L.) κάτω από διαφορετικά φωτεινά περιβάλλοντα:

- παρουσία φυσικού φωτισμού
- απουσία φυσικού φωτισμού
- κάτω από πράσινο φως
- κάτω από κόκκινο φως.

Διαδικασία

Υλικά: σπέρματα ραπανιού, έγχρωμα φίλτρα, διαφανής αυτοκόλλητη ταινία, διαφανή πλαστικά ποτήρια, αλουμινόχαρτο, περλίτης.

1. Ξεπλένετε πολύ καλά τον περλίτη που θα χρησιμοποιήσετε. Σε 4 πλαστικά ποτήρια τοποθετείτε περλίτη έως το 1/4 του ύψους τους, ρίχνετε νερό και τοποθετείτε με προσοχή 6 σπέρματα ραπανιού σε ίσες αποστάσεις μεταξύ τους. Τοποθετείτε σε κάθε ποτήρι ένα δεύτερο ανάστροφα και σφραγίζετε με την αυτοκόλλητη ταινία. Καλύπτετε κάθε ποτήρι ως εξής:

Αριθμός ποτηριού	Μεταχείριση
1	χωρίς φίλτρο
2	πράσινο φίλτρο x 2
3	κόκκινο φίλτρο x 1 και αλουμινόχαρτο x 1
4	αλουμινόχαρτο x 2

2. Τα ποτήρια 1 και 2 τοποθετούνται κάτω από φυσικό φωτισμό. Τα ποτήρια 3 και 4 τοποθετούνται σε σκοτεινό ντουλάπι για 7 περίπου ημέρες. Το ποτήρι 3 φωτίζεται για 10 min με φως μόλις τα φυτά φυτρώσουν και ξανακαλύπτεται με αλουμινόχαρτο.

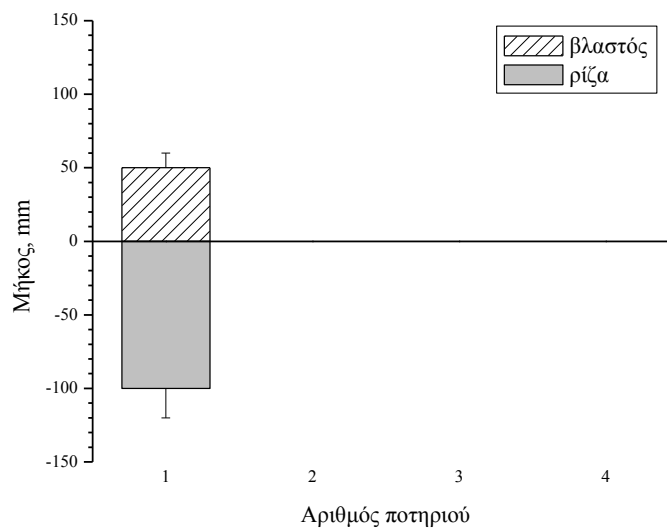
3. Περίπου μια εβδομάδα μετά την έναρξη του πειράματος παίρνετε όλα τα ποτήρια και αφαιρείτε τα φίλτρα και το πρόσθετο ποτήρι. Ελευθερώνετε με μεγάλη προσοχή τα αρτίβλαστα από τον περλίτη και ξεπλένετε.

4. Σχεδιάστε ένα τυπικό φυτό για κάθε περίπτωση.

5. Μετρήστε για όλα τα φυτά το μήκος του βλαστού, της ρίζας, και τον αριθμό των φύλλων.

Ερωτήσεις

1. Αποδώστε τις μετρήσεις σας γραφικά: σχεδιάστε ιστογράμματα για το μήκος του βλαστού, το μήκος της ρίζας και τον αριθμό των φύλλων ανά φυτό, σύμφωνα με το παράδειγμα του σχήματος.



2. Εξηγήστε τα αποτελέσματά σας.

3. Ποια η φυσιολογική σημασία του πράσινου φίλτρου;

4. Σε τι συμπέρασμα καταλήγετε με τη χρήση του κόκκινου φίλτρου;

ΑΣΚΗΣΗ 6^η - Επίδραση κυτοκινίνης στην γήρανση των φύλλων

Εισαγωγή

Η ανάπτυξη και ομαλή λειτουργία των φυτών, όπως συμβαίνει με όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς, εξαρτάται από τη ρύθμιση και το συντονισμό της φυσιολογικής δραστηριότητας των επιμέρους κυττάρων. Στα ανώτερα φυτά η ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται συχνά μέσω χημικών ουσιών - μηνυμάτων, των φυτικών ορμονών, που επηρεάζουν τόσο τη βλάστηση όσο και την ανάπτυξή τους.

Οι φυτικές ορμόνες διακρίνονται σε πέντε ομάδες: τις αυξίνες, τις γιββεριλλίνες, τις κυτοκινίνες, το αιθυλένιο και το αμψισικό οξύ. Οι φυτικές ορμόνες, όπως και οι ζωικές, δρουν σε εξαιρετικά μικρές συγκεντρώσεις από 10^{-6} έως 10^{-8} M. Ο έλεγχος με τον οποίο διαπιστώνεται αν μία ουσία έχει δράση ορμόνης ονομάζεται βιοδοκιμή*.

Η ανακάλυψη των κυτοκινινών ήταν αποτέλεσμα προσπάθειας με σκοπό την ανεύρεση παραγόντων που να διεγείρουν τις κυτταρικές διαιρέσεις. Η πρώτη ουσία, που απομονώθηκε και είχε την ιδιότητα να επάγει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων καθώς και τη δημιουργία ιστών σε καλλιέργειες κυττάρων, ήταν η κινετίνη (6-φουρφυουρυλαμινοπουρίνη), μία συνθετική ουσία, ενώ η πρώτη φυσική κυτοκινίνη ήταν η ζεατίνη. Έκτοτε, έχουν ανακαλυφθεί αρκετές ουσίες που φυσιολογικά υπάρχουν στα φυτά και παρουσιάζουν δράση κυτοκινίνης, ενώ έχουν συντεθεί πολλές ακόμα. Από χημική άποψη όλες οι κυτοκινίνες είναι παράγωγα της αδενίνης.

Εκτός από τον έλεγχο των κυτταρικών διαιρέσεων, που είναι η κύρια δράση τους, οι κυτοκινίνες, εμπλέκονται και σε άλλες βιοχημικές, φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως η αύξηση του μεγέθους των κυττάρων, η μορφογένεση ιστών, η ωρίμανση των χλωροπλαστών και η καθυστέρηση της γήρανσης. Ο μηχανισμός δράσης των κυτοκινινών δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι οι κυτοκινίνες έχουν επίδραση στο ρυθμό και στο είδος των πρωτεϊνών που συνθέτουν τα φυτικά κύτταρα, πιθανώς επάγοντας τη μεταγραφή ή τη διατήρηση ειδικών mRNAs.

Προκειμένου μία ένωση να χαρακτηριστεί ως κυτοκινίνη θα πρέπει, παρουσία βέλτιστης συγκέντρωσης αυξίνης, να επάγει τις κυτταρικές διαιρέσεις σε καλλιέργειες αδιαφοροποίητων παρεγχυματικών κυττάρων (π.χ. κύτταρα εντεριώνης καπνού). Αν και αυτού του είδους η βιοδοκιμή είναι η πιο συχνή, παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι χρειάζεται αρκετός χρόνος (πάνω από 1 μήνας) προκειμένου να φανούν τα αποτελέσματα. Έτσι, αναπτύχθηκαν άλλες εναλλακτικές βιοδοκιμές που απαιτούν πιο σύντομο χρονικό διάστημα για να ολοκληρωθούν και στηρίζονται στις επιδράσεις των

* Ο όρος **βιοδοκιμή** είναι ευρύτερος και αφορά μια οποιαδήποτε πειραματική διαδικασία η οποία έχει ως στόχο να απαντήσει στο ερώτημα εάν μια συγκεκριμένη ουσία είναι υπεύθυνη για κάποια βιολογική δράση.

κυτοκινινών σε άλλες λειτουργικές και αναπτυξιακές διαδικασίες. Μία από αυτές είναι ο έλεγχος της καθυστέρησης της γήρανσης σε κομμένα φύλλα.

Φυσιολογικά, σε φύλλα που αποκόπτονται από ένα φυτό, ξεκινά μια διαδικασία αποικοδόμησης χλωροφυλλών, RNA, πρωτεϊνών και λιπιδίων, ενώ παράλληλα διαταράσσεται η λειτουργική και δομική οργάνωση των μεμβρανών και των κυτταρικών οργανιδίων, ακόμη και αν συνεχίζουν να προσλαμβάνουν νερό. Αυτή η προγραμματισμένη διαδικασία, που οδηγεί τελικά στο θάνατο, ονομάζεται γήρανση και γίνεται πιο γρήγορα στο σκοτάδι. Αν και οι κυτοκινίνες δεν αναστέλλουν πλήρως τη γήρανση, φαίνεται ότι καθυστερούν τη διαδικασία. Μία παράμετρος, που θεωρείται ενδεικτική του βαθμού γήρανσης ενός φύλλου και είναι εύκολα μετρήσιμη, είναι το ποσό της χλωροφύλλης που περιέχει.

Πειραματικό μέρος

Σκοπός της άσκησης αυτής, είναι η μελέτη της επίδραση της συνθετικής κυτοκινίνης 6-φουρφουρυλαμινο-πουρίνης (κινετίνης) στην καθυστέρηση της γήρανσης δίσκων φύλλων, παίρνοντας σαν παράμετρο της γήρανσης την συγκέντρωση του ποσού της χλωροφύλλης.

Διαδικασία

- Τοποθετήστε στον πυθμένα 4 τρυβλίων Petri μια στρώση διηθητικού χαρτιού.
- Αριθμήστε τα τρυβλία και διαβρέξτε το χαρτί με 1 ml διαλύματος όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Αριθμός τρυβλίου	Συγκέντρωση κινετίνης, ppm*
1	0
2	0.15
3	5
4	15

- Από ώριμο φύλλο καταλλήλου φυτού, κόψτε 25 δίσκους με φελλοτρυπητήρα γνωστού εμβαδού.
- Τοποθετήστε 5 δίσκους σε κάθε τρυβλίο.
- Αφήστε τα τρυβλία σκεπασμένα στο σκοτάδι επί 7 ημέρες, σε θερμοκρασία 25° C περίπου.
- Τους υπόλοιπους 5 δίσκους κόψτε τους σε μικρά κομματάκια και εκχυλίστε σε γουδί με άμμο και μικρή ποσότητα CaCO₃, χρησιμοποιώντας ως εκχυλιστικό,

* ppm, μέρη στο εκατομμύριο (parts per million)

διάλυμα ακετόνης 80% (δες και Άσκηση 7^η). Το ανθρακικό ασβέστιο αποτρέπει τη μετατροπή των χλωροφυλλών σε φαιοφυτίνες.

- Μεταγγίστε το εκχύλισμα σε σωλήνα φυγοκέντρωσης.
- Φυγοκεντρώστε για 10 λεπτά στα 2500 g (4000 στροφές ανά λεπτό).
- Μεταγγίστε το υπερκείμενο σε ογκομετρικό σωλήνα και ογκομετρήστε.
- Φωτομετρείστε στα 720, 663, 646 και 470 nm. Η απορρόφηση (A) στα 720 nm οφείλεται σε πιθανό σκεδασμό και η τιμή αυτή αφαιρείται από τις αντίστοιχες στα 663, 646 και 470 nm.
- Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των χρωστικών σε μg ανά ml εκχυλίσματος χρησιμοποιήστε τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\text{χλωροφύλλη a, } \mu\text{g ml}^{-1}, c_a = 12.21A_{663} - 2.81A_{646}$$

$$\text{χλωροφύλλη b, } \mu\text{g ml}^{-1}, c_b = 20.13A_{646} - 5.03A_{663}$$

$$\text{καροτενοειδή, } \mu\text{g ml}^{-1}, c_{ar} = \frac{1000A_{470} - 3.27c_a - 104.3c_b}{229}$$

- Ανάγετε την συγκέντρωση χλωροφύλλης ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου.
- Μετά την πάροδο 7 ημερών επαναλάβετε τη διαδικασία εκχύλισης και προσδιορισμού της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών στους δίσκους κάθε τρυβλίου, όπως ακριβώς στο αρχικό δείγμα.

Ερωτήσεις

1. Παρουσιάστε τα αποτελέσματα σε πίνακα όπου να φαίνονται οι συγκεντρώσεις των χλωροφυλλών στην αρχή και μετά 7 ημέρες στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της κυτοκινίνης.
2. Αποδώστε τα αποτελέσματά σας γραφικά.
3. Εξηγήστε τα αποτελέσματα.

ΑΣΚΗΣΗ 7^η - Τροφοπενία φωσφόρου σε συνθήκες υδροπονικής καλλιέργειας στο φυτό *Gossypium hirsutum* L. (βαμβάκι)

Εισαγωγή

Τα φυτά προσλαμβάνουν από το περιβάλλον τις πρώτες ύλες που απαιτούνται για τις πολύπλοκες βιοχημικές αντιδράσεις, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξή τους. Κάτω από ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες, χρησιμοποιούν την ηλιακή ενέργεια για τη σύνθεση όλων των οργανικών ουσιών που θα χρησιμοποιηθούν στις μεταβολικές τους διεργασίες. Η **ανόργανη θρέψη** περιλαμβάνει την πρόσληψη των απαραίτητων πρώτων υλών από το περιβάλλον, την κατανομή τους στο φυτικό σώμα και την χρησιμοποίησή τους κατά το μεταβολισμό. Αν και τα ανόργανα στοιχεία στο σύνολο τους δεν ξεπερνούν το 1.0-1.5% του ξηρού βάρους των φυτικών ιστών, είναι απολύτως απαραίτητα για την φυσιολογική λειτουργία των φυτών. Η έρευνα σχετικά με τις απαιτήσεις των φυτών σε ανόργανα θρεπτικά έχει αποκαλύψει έναν κατάλογο 16 απαραίτητων στοιχείων, ο οποίος παραμένει ανοικτός. Τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία

Πίνακας 7.1. Επαρκείς συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων και μακροστοιχείων σε φυτικούς ιστούς.

Στοιχείο	Χημικό σύμβολο	Συγκέντρωση ανά μονάδα ξηρού βάρους		Σχετικός αριθμός ατόμων αναφορικά με το μολυβδένιο
		μmol g ⁻¹	ppm ή %	
<i>Ιχνοστοιχεία</i>			<i>ppm</i>	
Μολυβδένιο	Mo	0.001	0.1	1
Χαλκός	Cu	0.10	6	100
Ψευδάργυρος	Zn	0.30	20	300
Μαγγάνιο	Mn	1.0	50	1,000
Σίδηρος	Fe	2.0	100	2,000
Βόριο	B	2.0	20	2,000
Χλώριο	Cl	3.0	100	3,000
<i>Μακροστοιχεία</i>			%	
Θείο	S	30	0.1	30,000
Φώσφορος	P	60	0.2	60,000
Μαγνήσιο	Mg	80	0.2	80,000
Ασβέστιο	Ca	125	0.5	125,000
Κάλιο	K	250	1.0	250,000
Άζωτο	N	1,000	1.5	1,000,000
Οξυγόνο	O	30,000	45	30,000,000
Άνθρακας	C	40,000	45	40,000,000
Υδρογόνο	H	60,000	6	60,000,000

με βάση τις σχετικές ποσότητες που απαιτούνται στα φυτά, διακρίνονται σε **μακροστοιχεία** και σε μικροστοιχεία ή **ιχνοστοιχεία** (Πίνακας 7.1). Η μερική έλλειψη οποιουδήποτε θρεπτικού, είτε πρόκειται για μακροστοιχείο είτε για ιχνοστοιχείο, δημιουργεί στα φυτά παθολογικές καταστάσεις γνωστές ως **τροφοπενίες**. Οι τροφοπενίες συνοδεύονται από την εμφάνιση χαρακτηριστικών συμπτωμάτων στα διάφορα όργανα του φυτού (φύλλα, κορυφές βλαστών, καρποί κλπ). Οι δυσμενείς επιπτώσεις στην ανάπτυξη των φυτών, που συνεπάγεται η έλλειψη του κάθε ανόργανου στοιχείου, αίρονται μόνο με τη χορήγηση του.

Ο φώσφορος διαδραματίζει σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στην αποταμίευση και τη μεταφορά ενέργειας (αντιδράσεις στις οποίες εμπλέκεται ATP). Κατά τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, η ενέργεια αποταμιεύεται με την μορφή φωσφορικών δεσμών και μεταφέρεται για να χρησιμοποιηθεί στις διάφορες λειτουργίες του φυτού. Εκτός του ενεργειακού του ρόλου, ο φώσφορος συμμετέχει ως δομικό συστατικό σε μια μεγάλη ποικιλία βιομορίων (νουκλεϊκά οξέα, νουκλεοτίδια, συνένζυμα, φωσφολιπίδια κλπ). Φυτά τα οποία βρίσκονται σε συνθήκες τροφοπενίας φωσφόρου εμφανίζουν μικρή ανάπτυξη και φύλλα με σκούρο πράσινο χρώμα. Τα φύλλα τους μπορεί να είναι δυσμορφικά και να παρουσιάσουν νεκρωτικές κηλίδες, ενώ έχει παρατηρηθεί και υπερβολική παραγωγή ανθοκυανινών, η οποία προσδίδει χαρακτηριστικό πορφυρό χρώμα.

Πειραματικό μέρος

Τροφοπενία φωσφόρου σε συνθήκες υδροπονικής καλλιέργειας

- Σπέρματα βαμβακιού φυτεύονται σε πλαστικά γλαστράκια που περιέχουν περλίτη, ο οποίος προηγουμένως έχει πλυθεί καλά με απιονισμένο νερό (8 γλαστράκια, 1 σπέρμα ανά γλαστράκι).
- Τα γλαστράκια τοποθετούνται κάτω από τεχνητό σύστημα φωτισμού, ρυθμισμένο έτσι ώστε να παρέχει την απαιτούμενη φωτοπερίοδο για την βλάστηση του βαμβακιού.
- Αρχικά όλα τα γλαστράκια ποτίζονται με απιονισμένο νερό.
- Όταν ξεκινήσει η έκπτυξη των αρτίβλαστων, 4 γλαστράκια ποτίζονται με πλήρες **διάλυμα Hoagland** (φυτά +P), ενώ τα άλλα 4 με διάλυμα Hoagland ελλιπές σε φώσφορο (φυτά -P) (Πίνακας 7.2).
- Μετά την πλήρη ανάπτυξη των φυτών (περίπου 6-8 εβδομάδες) και την εκδήλωση μακροσκοπικών συμπτωμάτων τροφοπενίας, τα 3 από τα φυτά +P και τα 3 από τα φυτά -P χρησιμοποιούνται για μετρήσεις μορφολογικών χαρακτηριστικών με βάση τον Πίνακα 7.3.
- Στη συνέχεια, οι βλαστοί και οι μίσχοι των φυτών αυτών χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό φωσφόρου.

Πίνακας 7.2. Η σύνθεση πλήρους και ελλιπούς σε φωσφορικά θρεπτικού διαλύματος Hoagland.

Μητρικά διαλύματα	Συγκέντρωση μητρικών διαλυμάτων, M	ml μητρικού διαλύματος για 1l πλήρους Hoagland	ml μητρικού διαλύματος για 1l ελλιπούς σε φωσφορικά Hoagland
NH₄H₂PO₄	1	1	-
NH₄Cl	1	-	1
KNO₃	1	6	6
Ca(NO₃)₂ · 4H₂O	1	4	4
MgSO₄ · 7H₂O	1	2	2
EDTA Fe Na	0.1	1	1
Διάλυμα ιχνοστοιχείων*	1	1	1

***Διάλυμα ιχνοστοιχείων**

Συστατικό	Συγκέντρωση, g l ⁻¹
H₃BO₃	2.86
MnCl₂ · 2H₂O	1.48
ZnSO₄ · 7H₂O	0.25
CuSO₄ · 5H₂O	0.08
Na₂MoO₄ · 2H₂O	0.027

Ποσοτικός προσδιορισμός φωσφόρου

Η αρχή της μεθόδου για τον προσδιορισμό του φωσφόρου στηρίζεται στη δυνατότητα δημιουργίας συμπλόκου μεταξύ φωσφόρου και μολυβδαινίου. Η αναγωγή του συμπλόκου αυτού έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία χαρακτηριστικού μπλε χρώματος. Δεδομένου ότι ο βαθμός χρωματισμού είναι ανάλογος της συγκέντρωσης φωσφόρου, μπορούμε τελικά με μια απλή φωτομέτρηση, σε συνδυασμό με τη χρήση πρότυπης καμπύλης, να υπολογίσουμε τον περιεχόμενο φώσφορο των δειγμάτων μας.

Το πρώτο βήμα της διαδικασίας περιλαμβάνει την εκχύλιση του φωσφόρου που περιέχεται στους υπό εξέταση φυτικούς ιστούς σε διάλυμα.

- Οι βλαστοί και οι μίσχοι των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω κόβονται σε τεμάχια μήκους 2 mm. Τα τεμάχια πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφα, διότι ο ρυθμός διάχυσης των θρεπτικών στοιχείων από τον ιστό στο εκχυλιστικό διάλυμα είναι ανάλογος της επιφάνειας των τομών.
- 2.5 g αυτών τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως με 25 ml εκχυλιστικού μέσου (διάλυμα Morgan).
- Οι φυτικοί ιστοί παραμένουν στο εκχυλιστικό για 15 min και ανακινούνται περιοδικά.
- Το εκχύλισμα διηθείται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Η παραπάνω αναλογία δίνει εκχύλισμα για 4 επαναλήψεις (5 ml για κάθε ανάλυση).
- Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 5 ml φυτικού εκχυλίσματος.

- Προστίθενται 2 ml μολυβδαινικού αμμωνίου (διάλυμα Α) και 1 ml, διαλύματος υδροκινόνης (διάλυμα Β).
- Μετά από 5 λεπτά προστίθενται 2 ml ανθρακικού καλίου και θειώδους νατρίου (διάλυμα Γ) σιγά - σιγά διότι προκαλείται αφρισμός.
- Το τελικό χρώμα είναι βαθύ μπλε. Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με σύγκριση με διαλύματα γνωστής περιεκτικότητας φωσφόρου (2.5, 5, 10 και 20 ppm PO₄).

Διαλύματα

Διάλυμα Morgan

Το διάλυμα Morgan έχει την ακόλουθη σύνθεση: Οξικό οξύ ρυθμίζεται με οξικό νάτριο σε pH=4.8. Για τον σκοπό αυτό διαλύονται 100 g οξικού νατρίου και 30 (ml οξικού οξέος σε 1 l απεσταγμένου νερού).

Διάλυμα A₁ (θειικού οξέος)

Σε 200 ml απεσταγμένου νερού προσθέτουμε 65 ml πυκνού θειικού οξέος (ειδικού βάρους 1.84 g ml⁻¹) με συνεχή ανάδευση μέσα σε υδατόλουτρο. Μετά τη ψύξη του διαλύματος αραιώνουμε με νερό μέχρι τελικού όγκου 500 ml.

Διάλυμα A₂ (μολυβδαινικού αμμωνίου)

8.8 g μολυβδαινικού αμμωνίου διαλύονται σε 100 ml απεσταγμένου νερού (χωρίς θέρμανση). Στη συνέχεια προσθέτουμε διάλυμα θειικού οξέος (5.3 ml πυκνού θειικού οξέος σε 100 ml απεσταγμένου νερού) μέχρι τελικού όγκου 200 ml.

Διάλυμα Α

Αναμιγνύουμε ίσους όγκους των διαλυμάτων A₁ και A₂. Το προϊόν της ανάμιξης είναι το διάλυμα Α, το οποίο πρέπει να φυλάσσεται στο σκοτάδι ή σε μαύρο μπουκάλι.

Διάλυμα Β (υδροκινόνης)

5 g υδροκινόνης διαλύονται σε 500 ml απεσταγμένου νερού. Μετά από τη πλήρη διάλυση προσθέτουμε 0.3 ml πυκνού θειικού οξέος. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμες φιάλες και πρέπει να είναι πρόσφατο.

Διάλυμα Γ (ανθρακικού καλίου και θειώδους νατρίου)

Σε 500 ml απεσταγμένου νερού διαλύονται 130 g άνυδρου ανθρακικού καλίου και 24 g θειώδους νατρίου. Το διάλυμα πρέπει να διηθηθεί πριν από την χρήση. Χρειάζεται παρασκευή νέου διαλύματος κάθε εβδομάδα.

Πίνακας 7.3. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών μετά το τέλος του πειράματος.

Φυτά +P					
Αριθμός Φυτού	Νωπό βάρος υπέργειου μέρους, g	Νωπό βάρος υπόγειου μέρους, g	Αριθμός φύλλων	Επιφάνεια φύλλων, cm²	Ύψος φυτού
1					
2					
3					

Φυτά -P					
Αριθμός Φυτού	Νωπό βάρος υπέργειου μέρους, g	Νωπό βάρος υπόγειου μέρους, g	Αριθμός φύλλων	Επιφάνεια φύλλων, cm²	Ύψος φυτού
1					
2					
3					

Ερωτήσεις

1. Αποδώστε τα αποτελέσματά σας συγκριτικά για τα φυτά +P και -P σε πίνακες και γραφικά.
2. Εξηγήστε τα αποτελέσματά σας.

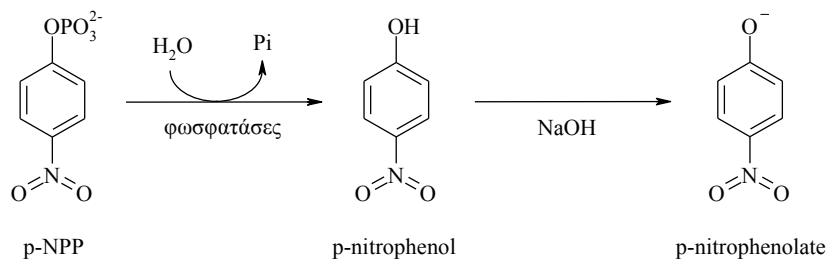
ΑΣΚΗΣΗ 8^η - Προσδιορισμός τροφοπενίας φωσφόρου μέσω ποιοτικής ανίχνευσης της δραστηριότητας φωσφατασών στο *Gossypium hirsutum* L. (βαμβάκι)

Εισαγωγή

Ως απόκριση στην έλλειψη φωσφορικών, τα φυτά έχουν την ικανότητα να αυξάνουν σημαντικά την δραστηριότητα των φωσφατασών τους. Οι **φωσφατάσες** είναι ένζυμα, τα οποία υδρολύουν φωσφορικές ομάδες οργανικών μορίων, χωρίς αυστηρή εξειδίκευση στην επιλογή του υποστρώματος. Με τη διαδικασία αυτή, τα φυτά καθίστανται ικανά – σε περιορισμένο βαθμό – να αντιμετωπίσουν την έλλειψη φωσφόρου, κινητοποιώντας τα ενδογενή αποθέματά του από τα διάφορα μακρομόρια. Μάλιστα, η αύξηση της δραστηριότητας των φωσφατασών είναι ανάλογη με το μέγεθος της έλλειψης φωσφόρου και αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της συγκεκριμένης τροφοπενίας.

Πειραματικό μέρος

Για την ενζυμική δοκιμή, ως υπόστρωμα των φωσφατασών χρησιμοποιείται το p-νιτροφαινυλ-φωσφορικό (p-NPP, 10 mM) και ως μέσον της αντίδρασης ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου (50 mM, pH=5.8).



Το προϊόν της αντίδρασης χρωματίζεται έντονα σε αλκαλικό pH. Εκμεταλλευόμενοι την ιδιότητα αυτή, μπορούμε να ανιχνεύσουμε τη δραστηριότητα των φωσφατασών εάν αυξήσουμε το pH του διαλύματος της αντίδρασης και καταγράψουμε την αύξηση της απορρόφησης στα 405 nm (το μέγιστο της απορρόφησης του προϊόντος της αντίδρασης).

Διαδικασία

1. Ετοιμάστε πέντε δοκιμαστικούς σωλήνες με βάση τον παρακάτω πίνακα:

Σωλήνας	1	2	3	4	5
Ρυθμιστικό διάλυμα, ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
p-NPP, ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

2. Τοποθετήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε υδατόλουτρο (30° C) και αφήστε τους να εξισορροπήσουν για 10 min.
3. Με φελλοτρυπητήρα αφαιρέστε 8 ομοιόμορφους και χωρίς νευρώσεις δίσκους από φύλλα των φυτών που αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό (+P) και 8 δίσκους από φύλλα των φυτών που αναπτύχθηκαν σε ελλιπές σε φωσφορικά θρεπτικό υλικό (-P).
4. Τοποθετήστε 4 δίσκους από φύλλα +P στον σωλήνα 1 και 4 δίσκους στον σωλήνα 2. Τοποθετήστε 4 δίσκους από φύλλα -P στον σωλήνα 3 και 4 δίσκους στον σωλήνα 4. Ο σωλήνας 5 αποτελεί τον μάρτυρα.
5. Προσθέστε 1.5 ml NaOH 1N στους σωλήνες 2, 4, και 5 και φωτομετρήστε αμέσως στα 405 nm.
6. Τοποθετήστε τα δείγματά σας (σωλήνες 1 και 3) στο υδατόλουτρο (30° C) και αφήστε τα να επωαστούν για 15 min.
7. Προσθέστε 1.5 ml NaOH 1N στους σωλήνες 1 και 3. Η έντονη αλλαγή στο pH προκαλεί αλλαγή στο χρώμα του μίγματος.
8. Μετρήστε την απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 405 nm.

Σωλήνας	1	2	3	4	5
Ρυθμιστικό διάλυμα, ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
p-NPP, ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Εξισορρόπηση στους 30° C για 10 min					
Φυτικός ιστός	4 δίσκοι +P	4 δίσκοι +P	4 δίσκοι -P	4 δίσκοι -P	-
1 N NaOH, ml	-	1.5	-	1.5	1.5
		*		*	*
Επώαση στους 30° C για 15 min					
1 N NaOH, ml	1.5	-	1.5	-	-
* Φωτομέτρηση στα 405 nm					

Ερωτήσεις

1. Εκφράστε τη δραστηριότητα των φωσφατασών ως ΔA_{405} ανά επιφάνεια φύλλου (cm^2).
2. Συνδυάστε τα αποτελέσματά σας με αυτά της προηγούμενης εργαστηριακής άσκησης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Hopkins W.G. **Introduction to Plant Physiology**. John Wiley & Sons, 1999 (2nd edition).
- Mauseth J.D. **Botany: an introduction to plant biology**. Jones and Bartlett Publishers, 1998 (2nd edition).
- Raven P.H., Evert R.F. & Eichhorn S.E. **Biology of plants**. W.H. Freeman and Company/Worth Publishers, 1999 (6th edition).
- Reiss C. **Experiments in plant physiology**. Prentice-Hall, Inc., 1994.
- Ridge I. **Φυσιολογία Φυτών**. Εκδόσεις Ίων, 2005.
- Roger J.R. **Handbook of Plant Ecophysiology Techniques**. Kluwer Academic Publishers, 2001.
- Salisbury F.B. & Ross C.W. **Plant physiology**. Brooks/Cole, 1999 (4th edition).
- Taiz L. & Zieger E. **Plant physiology**. Sinauer Assoc., 2002 (3rd edition).
- Γραμματικόπουλος Γ., Μανέτας Ι., Πετροπούλου Γ. & Ψαράς Γ. **Εργαστηριακές Ασκήσεις Φυσιολογίας Φυτών**. Πανεπιστήμιο Πατρών, 2002.
- Δροσόπουλος Ι. **Η ανόργανη διατροφή των φυτών**. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 1992.
- Μανέτας Ι. **Υδατικές σχέσεις**. Πανεπιστήμιο Πατρών, 2001.