

Δ. Μπουράνης – Χ. Κιτσάκη

**Εγχειρίδιο Εργαστηριακών Ασκήσεων
*Φυσιολογίας Φυτών***

3^{ου} Εξαμήνου

Κανονισμός Εργαστηρίου

Το Εργαστήριο Φυσιολογίας Φυτών γίνεται στις **Αίθουσες Φυσιολογίας Α & Β** που βρίσκονται στον 2ο όροφο του κτιρίου Χασιώτη. Οι **ανακοινώσεις** που αφορούν το Εργαστήριο αναρτώνται στον πίνακα ανακοινώσεων του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Φυτών στον 2ο όροφο του κτιρίου Χασιώτη.

Οι φοιτητές που πρόκειται να παρακολουθήσουν τις εργαστηριακές ασκήσεις κατανέμονται σε **εργαστηριακά τμήματα**, τα οποία έχουν σταθερό ωράριο για όλες τις εργαστηριακές ασκήσεις. Αν δεν πραγματοποιηθεί άσκηση θα γίνεται την επομένη εβδομάδα για τα τμήματα που δεν πραγματοποιήθηκε.

Οι **εργαστηριακές ασκήσεις** είναι 4 και υποχρεωτικές. Η κάθε εργαστηριακή άσκηση ολοκληρώνεται σε δύο εβδομάδες.

Οι φοιτητές προσέρχονται στο εργαστήριο την ώρα που ανακοινώνεται και εκτελούν τις ασκήσεις σύμφωνα με τις οδηγίες που υπάρχουν στο **εργαστηριακό εγχειρίδιο**. Το εγχειρίδιο διανέμεται στους φοιτητές δωρεάν κατά την έναρξη της εκπαιδευτικής περιόδου. Η προετοιμασία των φοιτητών για την εκτέλεση της κάθε εργαστηριακής άσκησης είναι απαραίτητη.

Δεν επιτρέπεται η αυθαίρετη προσέλευση φοιτητών για εργαστηριακή άσκηση σε ώρες διαφορετικές από αυτές που υποχρεούνται να προσέλθουν, λόγω έλλειψης πρόσθετων διαθέσιμων εργαστηριακών θέσεων.

Σε κάθε **εργαστηριακή θέση** ασκούνται μέχρι τρεις φοιτητές, οι οποίοι αποτελούν **εργαστηριακή ομάδα**. Η σύνθεση των εργαστηριακών ομάδων διαμορφώνεται από την αρχή ελεύθερα από τους φοιτητές και παραμένει σταθερή καθ'όλη τη διάρκεια της εκπαιδευτικής περιόδου.

Οι φοιτητές πρέπει να έχουν μαζί τους μπλοκ σημειώσεων, στυλό και υπολογιστή τσέπης με δυνατότητα υπολογισμού βασικών συναρτήσεων (π.χ. λογάριθμο ή εκθετική συνάρτηση) για να εκτελούν υπολογισμούς. Δεν επιτρέπεται η χρήση

κινητών τηλεφώνων μέσα στην αίθουσα ασκήσεων, ούτε ως υπολογιστικών μηχανών.

Τα αποτελέσματα της εργαστηριακής άσκησης καταγράφονται στο σχετικό **έντυπο αποτελεσμάτων** και παραδίδονται στον διδάσκοντα στο τέλος της άσκησης. Το έντυπο αυτό αποτελεί και **παρουσία** για το αντίστοιχο εργαστήριο. Οι φοιτητές που θα υπερβούν τον μέγιστο αριθμό απουσιών που προβλέπεται από τον κανονισμό του Πανεπιστημίου κόβονται και υποχρεούνται να παρακολουθήσουν το Εργαστήριο από την αρχή σε ερχόμενη διδακτική περίοδο.

Πριν την αποχώρηση τους από την αίθουσα ασκήσεων οι φοιτητές οφείλουν να επαναφέρουν την θέση εργασίας όπως την παρέλαβαν. Οι εργαστηριακές ομάδες βοηθούν εκ περιτροπής τον διδάσκοντα στην προετοιμασία των εργαστηριακών θέσεων και στην καθαριότητα του χρησιμοποιημένου εξοπλισμού μετά από σχετική συνεννόηση.

Τις επόμενες ημέρες οι φοιτητές που αποτέλεσαν την εργαστηριακή ομάδα συντάσσουν την **εργαστηριακή έκθεση** και την παραδίδουν την επόμενη εργαστηριακή ημέρα στον διδάσκοντα. Η ημέρα, οι ώρες και η θέση παράδοσης θα ανακοινωθούν από τον διδάσκοντα. Η σύνταξη της εργαστηριακής έκθεσης γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες που υπάρχουν στο εγχειρίδιο, είναι ομαδική, βαθμολογείται και ο βαθμός καταχωρείται. Ο βαθμός της έκθεσης αποτελεί το 40% του τελικού βαθμού και είναι ο ίδιος για όλους τους φοιτητές που αποτελούν την ομάδα. **Εργαστηριακή έκθεση που δεν είναι γραμμένη σύμφωνα με τις οδηγίες δεν γίνεται αποδεκτή.** Οι βαθμολογημένες ασκήσεις θα επιστρέφονται από τον διδάσκοντα στην εργαστηριακή ομάδα στο τέλος της επόμενης εργαστηριακής άσκησης.

Οδηγίες σύνταξης της εργαστηριακής έκθεσης

Με την εργαστηριακή έκθεση επιδιώκουμε να παρουσιάσουμε συνοπτικά και περιεκτικά την εργαστηριακή άσκηση που πραγματοποιήσαμε και να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματα που πήραμε.

Η εργαστηριακή έκθεση γράφεται με συγκεκριμένο τρόπο και περιλαμβάνει τις επόμενες ενότητες: **Τίτλο, Όνομα & Επώνυμο** του κάθε φοιτητή & φοιτήτριας της ομάδας, **Περίληψη, Εισαγωγή, Πειραματικό Μέρος, Αποτελέσματα, Συζήτηση Αποτελεσμάτων, Συμπεράσματα** και **Βιβλιογραφία**. Κατά την σύνταξη της εργαστηριακής έκθεσης τηρείται υποχρεωτικά αυτή η σειρά των ενοτήτων.

Περίληψη

Στην περίληψη γράφουμε τον σκοπό της εργασίας, τι κάναμε, τι βρήκαμε και τα συμπεράσματά μας συνοπτικά, ώστε ο αναγνώστης να σχηματίσει μία ολοκληρωμένη εικόνα της εργασίας με συντομία και σαφήνεια χωρίς να απαιτείται να διαβάσει το υπόλοιπο κείμενο για να καταλάβει για τι πρόκειται.

Εισαγωγή

Στην εισαγωγή παρουσιάζονται με συντομία το υλικό που κρίνεται ως αναγκαίο υπόβαθρο για να καταλάβουμε το πειραματικό μέρος που πραγματοποιήσαμε και να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματα που πήραμε. Η τελευταία παράγραφος είναι ο σκοπός και οι στόχοι της εργασίας. Κάθε πρόταση πρέπει να τεκμηριώνεται. Τεκμηρίωση σημαίνει ότι παραθέτουμε σε παρένθεση έναν αριθμό ο οποίος αντιστοιχεί στη βιβλιογραφική πηγή που χρησιμοποιήσαμε.

Πειραματικό Μέρος

Σ'αυτή την ενότητα της εργασίας παρουσιάζουμε με ακρίβεια και συντομία ότι κάναμε στο εργαστήριο, γράφοντας σε αόριστο χρόνο. Η ροή των περιγραφόμενων ενεργειών πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί από κάποιον άλλο στο εργαστήριο απρόσκοπτα.

Αποτελέσματα

Τα πρωτογενή πειραματικά αποτελέσματα καταχωρούνται σε κατάλληλα διαμορφωμένο πίνακα. Πρωτογενή ονομάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν άμεσα από την διαδικασία που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος. Τα πρωτογενή πειραματικά αποτελέσματα συνήθως πρέπει να τα επεξεργαστούμε στη συνέχεια με κατάλληλο τρόπο ώστε να μετασχηματιστούν σε μορφή, από την οποία θα εξαχεται βιολογικό νόημα.

Η επεξεργασία περιλαμβάνει στατιστική ανάλυση (εύρεση μέσων όρων και τυπικής απόκλισης, σύγκριση με κατάλληλο κριτήριο, απόρριψη των πειραματικών τιμών που αποκλίνουν εμφανώς κ.ά.) και τη δημιουργία γραφικών παραστάσεων. Οι πίνακες και τα διαγράμματα που παραθέτουμε στην ενότητα των αποτελεσμάτων πρέπει να έχουν αρίθμηση και λεζάντα. Η αρίθμηση και η λεζάντα των πινάκων γράφεται πάνω από τον σχετικό πίνακα (π.χ. Πίνακας 3), ενώ η αρίθμηση και η λεζάντα των διαγραμμάτων γράφεται κάτω ή δίπλα από το σχετικά διάγραμμα (π.χ. Διάγραμμα 1). Λεζάντα είναι η συνοπτική περιγραφή του περιεχομένου του πίνακα ή του διαγράμματος.

Το εποπτικό υλικό που παραθέτουμε στα αποτελέσματα πρέπει να το περιγράψουμε συνοπτικά και περιεκτικά. Δεν επιτρέπεται να επαναλαμβάνουμε τις λεζάντες στο κείμενο. Γράφουμε το κείμενο ως συνέπεια του πειραματικού μέρους που εφαρμόσαμε και σε παρένθεση παραθέτουμε στο σχετικό πίνακα ή διάγραμμα. Αν παραθέσουμε εικόνα σε ψηφιακή μορφή, η αρίθμηση και η λεζάντα γίνεται όπως στα διαγράμματα.

Συζήτηση

Λέγοντας συζήτηση εννοούμε την προσπάθεια να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματά μας χρησιμοποιώντας τη θεωρία που έχουμε ακούσει στο μάθημα, τις πληροφορίες που βρήκαμε από τις βιβλιογραφικές πηγές έχουμε στη διάθεσή μας. Είναι

αυτονόητο ότι καταγράφουμε την κρίση μας και τις παρατηρήσεις μας, ενώ τεκμηριώνουμε την παράθεση της βιβλιογραφικής πληροφορίας που ενσωματώσαμε, παραπέμποντας με τον αριθμό της αντίστοιχης βιβλιογραφικής πηγής.

Βιβλιογραφία

Η βιβλιογραφία παρατίθεται αριθμημένη και το No.1 αντιστοιχεί στην 1η βιβλιογραφική παραπομπή μέσα στο κείμενο. Αν χρειαστεί να την ξαναχρησιμοποιήσουμε παρακάτω για τεκμηρίωση, τότε σε παρένθεση βάζουμε τον αύξοντα αριθμό που είχε όταν χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά. Ο τρόπος με τον οποίο γράφουμε τις βιβλιογραφικές παραπομπές έχει την ακόλουθη μορφή:

1. Taiz L., Zeiger E. (1998). Plant Physiology. 2nd ed. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland. ISBN 0-87893-831-1 pp 61-80
2. Arnon D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxi-dase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol 24(1), 1-15.
3. Hiscox J. D. And G. F. Israelstam (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Can J Bot 57, 1332-1334.

1^η Άσκηση

Εκχύλιση σακχάρων από νωπό φυτικό ιστό και προσδιορισμός τους

Σκοπός της άσκησης

Σκοπός της άσκησης είναι η εκχύλιση των σακχάρων από νωπό φυτικό ιστό και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής τους με φασματοφωτομετρική μέθοδο.

Εισαγωγή

Η εκχύλιση του φυτικού ιστού

Η **εκχύλιση** του φυτικού ιστού είναι χειρισμός με τον οποίο αποσκοπούμε να φέρουμε σε διαλυτή μορφή τα συστατικά του ιστού αυτού, για να τα προσδιορίσουμε στη συνέχεια με κατάλληλη αναλυτική διαδικασία. Η εκχύλιση του φυτικού ιστού γίνεται με διάφορα **εκχυλιστικά** μέσα. Τα εκχυλιστικά αυτά συνήθως είναι το νερό, ρυθμιστικά διαλύματα, αραιά διαλύματα οξέων ή βάσεων ή οργανικοί διαλύτες. Όταν εκχυλίζουμε πρέπει να έχουμε κατά νου ότι με τον χειρισμό αυτό προσδιορίζουμε την ποσότητα που διαλυτοποιήθηκε κάτω από τις δεδομένες συνθήκες της εκχύλισης. Η ποσότητα αυτή μπορεί να είναι είτε ολόκληρη η ποσότητα του συστατικού αυτού είτε ένα κλάσμα της ποσότητάς του μέσα στο φυτό.

Στην άσκηση αυτή χρησιμοποιούμε μίγμα αιθανόλης-νερού 4:1. Για την παραλαβή του συγκεκριμένου εκχυλίσματος κόβουμε τους επιλεγμένους φυτικούς ιστούς σε μικρά τεμάχια, τοποθετούμε τα τεμάχια αυτά σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει το εκχυλιστικό και εκχυλίζουμε για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα σε συγκεκριμένη θερμοκρασία ανακινώντας περιοδικά το σωλήνα. Στη συνέχεια παραλαμβάνουμε μέρος του διηθήματος σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα, προσθέτουμε ορισμένα αντιδραστήρια με συγκεκριμένη σειρά και αναπτύσσεται χρώμα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης

ακτινοβολίας ορισμένου μήκους κύματος από το έγχρωμο διήθημα σε φασματοφωτόμετρο και μετατροπή της σε συγκέντρωση με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς.

Η αρχή της μεθόδου της φασματοφωτομετρίας

Η φασματοφωτομετρία είναι αναλυτική μέθοδος η οποία βασίζεται στη χρήση του φωτός για μέτρηση των συγκεντρώσεων χημικών ενώσεων ή στοιχείων που βρίσκονται σε μορφή διαλυμάτων. Η απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από ιόντα και μόρια αποτελεί τη βάση για ποιοτική ανίχνευση και για ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων αυτών.

Όταν το φως απορροφάται από ένα δείγμα, η ένταση της φωτεινής δέσμης ελαττώνεται, με αποτέλεσμα η ισχύς P να ελαττώνεται επίσης. Με τον όρο **ισχύς** εννοούμε την ενέργεια της φωτεινής δέσμης ανά δευτερόλεπτο και ανά μονάδα επιφάνειας. Η οπτική δέσμη που παράγεται από μία φωτεινή πηγή περνά μέσα από ένα **μονοχρωμάτωρα**, από όπου εξέρχεται το επιθυμητό μήκος κύματος ισχύος P_0 . Αυτό περνά μέσα από το δείγμα, το οποίο βρίσκεται μέσα σε μία **κυψελίδα** μήκους b και εξέρχεται από την άλλη πλευρά με ισχύ $P < P_0$, γιατί μέρος της ακτινοβολίας απορροφάται από το δείγμα. Η οπτική δέσμη που εξέρχεται από την κυψελίδα ανιχνεύεται από μια διάταξη που λέγεται **φωτοανιχνευτής**. Ο λόγος της ισχύος της εξερχόμενης ακτινοβολίας P προς την ισχύ της εισερχόμενης ακτινοβολίας P_0 στην κυψελίδα ονομάζεται διαπερατότητα και συμβολίζεται με T . Ο αρνητικός λογάριθμος της διαπερατότητας ονομάζεται **απορρόφηση** ή οπτική πυκνότητα.

Αν δεν έχουμε απορρόφηση από το διάλυμά μας τότε $P=P_0$ και $A=0$. Αν απορροφάται το 90% του φωτός τότε $A = 1 = \log[100/100-90]$, ενώ αν απορροφάται το 99% τότε $A = 2 = \log[100/100-99]$. Η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των μορίων του διαλύματος που απορροφούν ενέργεια από τη δέσμη του φωτός που εισέρχεται στο διάλυμα και ισχύει ο νόμος Beer. Σύμφωνα με αυτόν τον νόμο, η απορρόφηση είναι ίση με το γινόμενο του συντελεστή μοριακής απορρόφησης ϵ (σε $M^{-1} cm^{-1}$), του πάχους της κυψελίδας b (σε cm) και της συγκέντρωσης C του προσδιοριζόμενου συστατικού στο διάλυμα (σε M , δηλαδή $mol L^{-1}$), $A=\epsilon bC$. Ο νόμος του Beer ισχύει για αραιά διαλύματα, δηλαδή διαλύματα με συγκεντρώσεις μικρότερες από $0.01 M$.

Η ορατή περιοχή είναι μεταξύ $370 nm$ και $800 nm$. Η ένωση που απορροφά στην ορατή περιοχή χαρακτηρίζεται από χρώμα. Το μέρος του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση του φωτός ονομάζεται **χρωμοφόρο** και είναι κάποια χαρακτηριστική ομάδα. Η κάθε ένωση απορροφά σε συγκεκριμένα μήκη

κύματος και το μάτι μας βλέπει την φωτεινή ενέργεια που δεν απορροφάται. Έτσι το χρώμα που βλέπουμε είναι το συμπληρωματικό του χρώματος που απορροφάται.

Εργαστηριακό μέρος

1. Αντιδραστήρια

Εκχυλιστικό μέσο

Το εκχυλιστικό μέσο είναι μίγμα αιθανόλης-νερού 4:1 (κατ'όγκο).

Αντιδραστήριο ανθρόνης (A1)

200 mg ανθρόνης στα 100 mL H₂SO₄.

Πρότυπο διάλυμα σακχαρόζης

3.42 mg σακχαρόζης στα 100 mL εκχυλιστικού μέσου.

2. Διαδικασία

Παραλαβή του εκχυλίσματος

1. Ρυθμίζουμε το θερμαντικό σώμα στους 60 °C.
2. Καθαρίζουμε και ζυγίζουμε τον νωπό φυτικό ιστό.
3. Καταγράφουμε το ακριβές νωπό βάρος.
4. Τεμαχίζουμε και μεταφέρουμε τον φυτικό ιστό σε βαθμονομημένο σωλήνα.
5. Προσθέτουμε 10 mL εκχυλιστικού.
6. Πωματίζουμε τον σωλήνα και τον τοποθετούμε στο θερμαντικό.
7. Θερμαίνουμε για 30 min στους 60 °C.
8. Μεταφέρουμε το εκχύλισμα σε καθαρό βαθμονομημένο σωλήνα.
9. Συμπληρώνουμε τον όγκο στα 40 mL με εκχυλιστικό.

Ανάπτυξη χρώματος και προσδιορισμός

10. Ρυθμίζουμε το θερμαντικό σώμα στους 90 °C.
11. Προσθέτουμε 2 mL αντιδραστηρίου A1 σε σωλήνα
12. Τοποθετούμε το σωλήνα σε τρίμματα πάγου

13. Προσθέτουμε 1 mL εκχυλίσματος (ή κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος αν χρειαστεί, προσθέτοντας το απαιτούμενο εκχυλιστικό) πολύ προσεκτικά από τα τοιχώματα. Αυτός είναι ο σωλήνας του δείγματος.
14. Ετοιμάζουμε τον σωλήνα STD επαναλαμβάνοντας τα βήματα 11 έως 13 με 1 mL πρότυπου διαλύματος σακχαρόζης.
15. Ετοιμάζουμε τον σωλήνα BLANK επαναλαμβάνοντας τα βήματα 11 έως 13 με 1 mL εκχυλιστικού.
16. Πωματίζουμε και ανακινούμε.
17. Τοποθετούμε τους σωλήνες στο θερμαντικό για 10 min στους 90 °C.
18. Μετράμε την απορρόφηση στα 625 nm.
19. Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση σακχάρων που εκχυλίστηκαν εκφρασμένη ανά μονάδα νωπής μάζας δείγματος ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ NM}$).

2^η Άσκηση

Μελέτη της υδρόλυσης του αμύλου από τα υδρολυτικά του ένζυμα in vitro

Σκοπός της άσκησης

Να ανιχνεύσουμε τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων του αμύλου με τη βοήθεια χρωματικής αντίδρασης που βασίζεται στη δράση του ιωδίου με τα συστατικά του αμύλου, όσο και με τα προϊόντα της υδρόλυσης του αμύλου από τα σχετικά ένζυμα.

Εισαγωγή

Το άμυλο

Το άμυλο είναι αποθησαυριστική ένωση των φυτών και συναντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε αποθηκευτικούς ιστούς όργανων (όπως οι κοτύλες και το ενδοσπέρμιο των σπερμάτων, οι κονδύλοι και τα ριζώματα), στο ξυλώδες και το φλοιώδες παρέγχυμα καθώς και στην εντεριώνη στο βλαστό. Τα μεγαλομόρια του αμύλου βιοσυντίθενται στα ίδια τα αποθησαυριστικά όργανα (από δομικές μονάδες σακχάρων που συνήθως προέρχονται από τα φύλλα) και συνήθως οργανώνονται σε ειδικής μορφής κυτταρικά οργανίδια τους **αμυλόκοκκους**. Η ενέργεια και τα δομικά συστατικά του αμύλου είναι διαθέσιμα μόνο μετά από την διάσπαση των μόριων του αμύλου με ειδικά υδρολυτικά ένζυμα, τις αμυλάσες. Στο φυτό τα υδρολυτικά ένζυμα δρουν στα κύτταρα που είναι πλούσια σε άμυλο.

Τα συστατικά του αμύλου

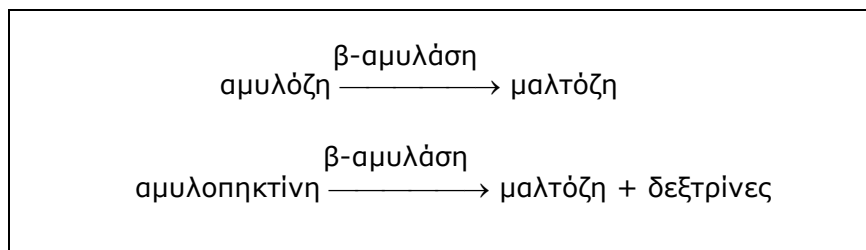
Το άμυλο αποτελείται από την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη, δύο συστατικά τα οποία είναι πολυμερή της α-D-γλυκόζης. Η **αμυλόζη** είναι γραμμικό πολυμερές, οι δομικές μονάδες του οποίου ενώνονται με γλυκοζιδικούς δεσμούς τύπου 1-4 και σχηματίζουν μακρομόριο χωρίς διακλαδώσεις με βαθμό πολυμερισμού 100-2000. Η **αμυλοπηκτίνη** είναι διακλαδισμένο πολυμερές. Σχηματίζεται από γραμμικά πολυμερή με μικρό βαθμό πολυμερισμού (μέχρι 20), τα οποία αποτελούνται από μονάδες α-D-γλυκόζης ενωμένες με γλυκοζιδικούς δεσμούς τύπου 1-4. Τα μικρά αυτά γραμμικά πολυμερή ενώνονται με γλυκοζιδικούς δεσμούς τύπου 1-6 και έτσι το μόριο της αμυλοπηκτίνης αποτελείται από διακλαδισμένες αλυσίδες. Ο

μεγαλύτερος αριθμός γλυκοζιδικών δεσμών είναι του τύπου 1-4 και μόνο ένας περιορισμένος αριθμός είναι του τύπου 1-6, στα σημεία των διακλαδώσεων και μόνο. Το μοριακό βάρος της αμυλοπηκτικής κυμαίνεται από 50.000-1.000.000 με βαθμό πολυμερισμού 250-10.000.

Οι αμυλάσες

Τα συστατικά του αμύλου υδρολύονται από ειδικά ένζυμα, τις **αμυλάσες**. Τα ένζυμα αυτά κατατάσσονται στις υδρολάσες. Οι αμυλάσες διακρίνονται ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους στους δεσμούς των συστατικών του αμύλου σε α-αμυλάση, β-αμυλάση και ισοαμυλάση ή R-ένζυμο.

Η **β-αμυλάση** διασπά τους 1-4,α-γλυκοζιδικούς δεσμούς των πολυσακχαριτών της α-D-γλυκόζης προοδευτικά από το μη-αναγωγικό άκρο των αλυσίδων, με την απόσπαση διαδοχικών μορίων του δισακχαρίτη μαλτόζη μέχρι την πλήρη αποδόμηση των αλυσίδων. Η αμυλόζη με την δράση της β-αμυλάσης υδρολύεται σε ποσοστό 70% λόγω της παρουσίας αραιών διακλαδώσεων στο μόριό της. Η αμυλοπηκτίνη υδρολύεται μερικά με την προοδευτική απόσπαση μορίων μαλτόζης από τις πλάγιες αλυσίδες μέχρι τις διακλαδώσεις. Στα σημεία διακλάδωσης υπάρχουν γλυκοζιδικοί δεσμοί τύπου 1-6, τους οποίους η β-αμυλάση αδυνατεί να διασπάσει. Κατά συνέπεια, τα προϊόντα που λαμβάνονται από τη δράση της β-αμυλάσης πάνω στα συστατικά του αμύλου είναι μαλτόζη και δεξτρίνες (Σχήμα 1).



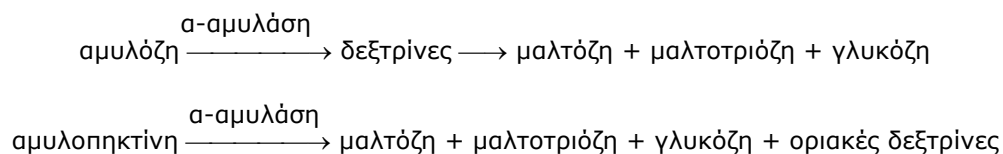
Σχήμα 2.1

Τα προϊόντα που λαμβάνονται από τη δράση της β-αμυλάσης πάνω στα συστατικά του αμύλου.

Η δραστηριότητα της β-αμυλάσης φαίνεται από το ρυθμό της μεταβολής του σκούρου-μπλε χρώματος που δίνει η αμυλόζη με διάλυμα ιωδίου. Το χρώμα εξασθενεί αργά (σε αντίθεση προς την α-αμυλάση) γιατί το ένζυμο αποδομεί προοδευτικά το μόριο της αμυλόζης.

Η **α-αμυλάση** διασπά τους γλυκοζιδικούς δεσμούς πολυμερών της α-D-γλυκόζης σε θέσεις 1-4 όπως και η β-αμυλάση, με τη διαφορά ότι δρα τυχαία. Με τη δράση της α-αμυλάσης η αμυλόζη διασπάται γρήγορα σε μόρια μικροτέρου μεγέθους, τις δεξτρίνες. Από την παραπέρα δράση του ενζύμου πάνω στα μόρια αυτά λαμβάνονται ως προϊόντα κυρίως η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη και δευτερευόντως η γλυκόζη. Το ένζυμο αυτό δεν δρα πάνω σε δεσμούς 1-6. Κατά συνέπεια η α-

αμυλάση με την αμυλοπηκτίνη παράγει οριακές δεξτρίνες και τα προϊόντα αποδόμησης της αμυλόζης. Οι οριακές δεξτρίνες είναι μικρά πολυμερή, τα οποία διαθέτουν τουλάχιστον ένα γλυκοζιδικό δεσμό τύπου 1-6.



Σχήμα 2.2

Τα προϊόντα που λαμβάνονται από τη δράση της α-αμυλάσης πάνω στα συστατικά του αμύλου.

Απομένει όμως ανέπαφος ο κεντρικός κορμός του μορίου της αμυλοπηκτίνης με διακλαδώσεις 1-6. Η α-αμυλάση προκαλεί γρήγορη μετατροπή του μπλέ χρώματος που δίνει το ιώδιο με την αμυλόζη (σε αντίθεση προς την β-αμυλάση), οπότε λαμβάνεται το ερυθρό χρώμα της αντίδρασης των δεξτρινών με το ιώδιο, ενώ στη συνέχεια δεν παρατηρείται αντίδραση.

Από τα προηγούμενα προκύπτει ότι κανένα από τα ένζυμα α-αμυλάση και β-αμυλάση δεν μπορεί να προσβάλλει τους δεσμούς 1-6 των διακλαδώσεων του μορίου της αμυλοπηκτίνης. Οι δεσμοί αυτοί διασπώνται επιλεκτικά από ένα άλλο ένζυμο το οποίο καλείται **ισοαμυλάση**. Με συνδυασμό του ενζύμου αυτού και της α-αμυλάσης ή και της β-αμυλάσης επιτυγχάνεται η πλήρης αποδόμηση και του κεντρικού κορμού του μορίου της αμυλοπηκτίνης, που περιλαμβάνει τις περιοχές με διακλαδώσεις. Χαρακτηριστικό της δράσης της ισοαμυλάσης πάνω στο μόριο της αμυλοπηκτίνης είναι ότι το ερυθρό χρώμα της αμυλοπηκτίνης μετατρέπεται με την δράση αυτού του ενζύμου σε μπλέ. Αυτό οφείλεται στο ότι το διακλαδισμένο μόριο της αμυλοπηκτίνης διασπάται σε μικρότερου μεγέθους αλυσίδες χωρίς διακλαδώσεις (αμυλόζη).

Εργαστηριακό μέρος

Η παραλαβή ενζυμικού παρασκευάσματος των αμυλασών

Τις αμυλάσες τις παραλάβαμε με λειοτρίβιση και ομογενοποίηση σπερμάτων σιταριού που τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε κατάλληλο περιβάλλον επί 7-10 ημέρες. Ο πολτός διηθήθηκε και διατηρήθηκε στο ψυγείο. Είναι εκχύλισμα που εκτός από τις αμυλάσες περιέχει και πολλά άλλα κυτταρικά συστατικά.

Το άμυλο προέρχεται επίσης από καρπούς αγροστώδους (καλαμπόκι) έχει όμως καθαριστεί προηγουμένως έτσι ώστε να είναι εύκολη η διαπίστωση της αντίδρασης του ιωδίου.



Εικόνα 2.1

Βλαστημένο σιτάρι με νεαρά φυτάρια ηλικίας 10 ημερών. Η βλάστηση των σπερμάτων αποτελεί ιδιαίτερης σημασίας φυσιολογική διεργασία, με την οποία καθίσταται δυνατή η ανάπτυξη του προϋπάρχοντος εμβρύου σε νέο φυτικό οργανισμό. Στο σύστημα αυτό υπάρχουν και οι δύο παράγοντες που απαιτούνται για την πραγματοποίηση της υδρόλυσης του αμύλου in vivo, δηλαδή το υπόστρωμα (άμυλο) στο αμυλοφόρο στρώμα του καρπού και το ένζυμο (αμυλάσες). Οι αμυλάσες αρχίζουν να βιοσυντίθενται καθώς ενυδατώνεται ο καρπός και το έμβρυο (στην περιοχή του πρωτεϊνικού στρώματος του καρπού και από εκεί μεταφέρονται στην περιοχή του αμύλου).

Ανίχνευση της δραστηριότητας των αμυλασών

Απαιτούμενα υλικά

Στην κάθε εργαστηριακή θέση πρέπει να υπάρχουν τα επόμενα για να πραγματοποιηθεί η άσκηση:

- 4 δοκιμαστικοί σωλήνες (σωλήνας α, β, γ, δ)
- 3 ύαλοι ωρολογίου
- διάλυμα αμύλου 1%
- απεσταγμένο νερό
- ενζυμικό παρασκεύασμα
- διάλυμα ιωδίου
- πιπέτα του 1 mL, με την οποία θα προσθέσουμε το διάλυμα του αμύλου στους δοκιμαστικούς σωλήνες
- πιπέτα των 2 mL, με την οποία θα προσθέσουμε απεσταγμένο νερό στους σωλήνες
- πιπέτα των 2 mL, με την οποία θα προσθέσουμε ενζυμικό παρασκεύασμα στους σωλήνες

- λευκό χαρτί

Διαδικασία

1. Στον **δοκιμαστικό σωλήνα α** προσθέτουμε 1 mL **διαλύματος αμύλου** (με την πιπέτα του διαλύματος αμύλου) και 1,5 mL απεσταγμένου νερού (με την πιπέτα του απεσταγμένου νερού. Προσοχή να μη μπερδέψουμε τις πιπέτες γιατί θα αποτύχει το πείραμα). Ανακινούμε ελαφρά το σωλήνα για να ομοιογενοποιηθεί το περιεχόμενό του.
2. Μεταγγίζουμε ελάχιστη ποσότητα του περιεχομένου του σωλήνα α σε μία ύαλο ωρολογίου. Προσθέτουμε 1-2 σταγόνες από το **διάλυμα ιωδίου** στην ύαλο ωρολογίου, ανακινούμε την ύαλο περιστροφικά και προσεκτικά για να μη χυθεί το περιεχόμενο της απέξω, τοποθετούμε την ύαλο πάνω σε λευκό χαρτί και παρατηρούμε το χρώμα που παίρνει το διάλυμα. Αυτή η ύαλος ωρολογίου που αντιστοιχεί στο σωλήνα α διατηρείται για μάρτυρας. Υπόψη ότι ο σωλήνας α δεν περιέχει ένζυμο.
3. Στο **δοκιμαστικό σωλήνα δ**, προσθέτουμε 1 mL **διαλύματος αμύλου** (με την πιπέτα του διαλύματος αμύλου) και 1,5 mL **ενζυμικού παρασκευάσματος** (με την πιπέτα του ενζυμικού παρασκευάσματος) και με αυτή τη σειρά. Προσοχή να μη μπερδέψουμε τις πιπέτες. Σημειώνουμε ΑΜΕΣΩΣ **το χρόνο μηδέν** και ανακινούμε ελαφρά το σωλήνα για να ομοιογενοποιηθεί το περιεχόμενό του.
4. Μεταγγίζουμε ελάχιστη ποσότητα του περιεχομένου του σωλήνα δ σε μία ύαλο ωρολογίου. Προσθέτουμε 1-2 σταγόνες από το **διάλυμα ιωδίου** στην ύαλο ωρολογίου και εργαζόμαστε όπως στο βήμα 2. Παρατηρούμε το χρώμα που παίρνει το διάλυμα.
5. Κάθε 0.5 min επαναλαμβάνουμε το βήμα 4. Όταν διαπιστώσουμε αλλαγή του χρωματισμού καταγράφουμε το χρόνο που πέρασε από το χρόνο μηδέν και επαναλαμβάνουμε το βήμα 4 μέχρι να μην παρατηρούμε παραπέρα αλλαγή του χρωματισμού. Ο χρόνος εμφάνισης του σταθερού χρωματισμού καταγράφεται ως πειραματικός χρόνος στον Πίνακα 1. Η ύαλος ωρολογίου που αντιστοιχεί στο σωλήνα δ με το τελικό χρώμα διατηρείται επίσης για μάρτυρας. Υπόψη ότι ο σωλήνας δ περιέχει την περισσότερη ποσότητα ενζύμου.
6. Πάμε τώρα στο **δοκιμαστικό σωλήνα β**, όπου προσθέτουμε 1 mL **διαλύματος αμύλου**, 1 mL νερού και 0,5 mL **ενζυμικού παρασκευάσματος** (με την κατάλληλη πιπέτα σε κάθε περίπτωση και με αυτή τη σειρά). Σημειώνουμε ΑΜΕΣΩΣ **το χρόνο μηδέν**, ανακινούμε ελαφρά το σωλήνα για να ομοιογενοποιηθεί το περιεχόμενό του και μεταγγίζουμε ελάχιστη ποσότητα του περιεχομένου του σωλήνα β σε μία ύαλο ωρολογίου. Προσθέτουμε 1-2

7. σταγόνες από το **διάλυμα ιωδίου** στην ύαλο ωρολογίου και εργαζόμαστε όπως το βήμα 2. Παρατηρούμε το χρώμα που παίρνει το διάλυμα. Εργαζόμαστε όπως στο βήμα 5 και καταγράφουμε τον πειραματικό χρόνο στον Πίνακα 1.
8. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 6, προσθέτοντας στον **δοκιμαστικό σωλήνα γ** 1 mL **διαλύματος αμύλου**, 0,5 mL νερού και 1 mL **ενζυμικού παρασκευάσματος**. Καταγράφουμε το χρόνο στον Πίνακα 1.
9. Η κάθε περίπτωση επαναλαμβάνεται τρεις φορές και οι αντίστοιχοι χρόνοι (1^η, 2^η και 3^η επανάληψη) καταγράφονται στον Πίνακα 1. Επεξεργαζόμαστε τα δεδομένα αυτά υπολογίζοντας τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση και κατασκευάζουμε διάγραμμα, όπου απεικονίζεται η καμπύλη υδρόλυσης του αμύλου.

Πίνακας 2.1

Ανίχνευση της δραστηριότητας των αμυλασών

Σωλήνας	άμυλο	νερό	ένζυμο	τελικός όγκος	Χρόνος υδρόλυσης (min)				
	mL	mL	mL	mL	1 ^η	2 ^η	3 ^η	ΜΟ	ΤΑ
A	1	1,5	-	2,5					
B	1	1	0,5	2,5					
Γ	1	0,5	1	2,5					
Δ	1	-	1,5	2,5					

3^η Άσκηση

Προσδιορισμός της υδατικής κατάστασης του φυτού

Σκοπός της άσκησης

Να προσδιορίσουμε την υδατική κατάσταση φυτικών οργάνων, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της πλασμόλυσης των κυττάρων και τη μέθοδο μεταβολής του μεγέθους των φυτικών ιστών.

Εισαγωγή

Η σημασία του νερού για τα φυτά

Η ιδιαίτερη σημασία του νερού για τα φυτά δεν απορρέει μόνο από το γεγονός ότι συμμετέχει με το μεγαλύτερο ποσοστό στη σύνθεση των κυττάρων αλλά και διότι:

1. αποτελεί άριστο διαλύτη ηλεκτρολυτών και μη συστατικών των κυττάρων
2. αμβλύνει την αρνητική επίδραση ακραίων θερμοκρασιών και θερμοκρασιακών μεταβολών του περιβάλλοντος και εξασφαλίζει ήπιο θερμοκρασιακό περιβάλλον για τις βιοχημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στα κύτταρα
3. καθορίζει αποφασιστικά τη λειτουργία της φωτοσύνθεσης μέσω της επίδρασης στο άνοιγμα-κλείσιμο των στομάτων.
4. επηρεάζει την απορρόφηση ιόντων από το εδαφικό διάλυμα μέσω του ρεύματος της διαπνοής
5. συμμετέχει άμεσα ως αντιδρόν ή προϊόν σε πάρα πολλές αντιδράσεις των κυττάρων
6. είναι καθοριστικός παράγοντας για τη λειτουργία των φυτικών κυττάρων και ιστών ως ωσμωτικών συστημάτων και για την υπόστασή τους ως πολυκύτταρων οργανισμών.

Η τελευταία αυτή ιδιότητα έχει καθοριστική σημασία για την εύρυθμη λειτουργία των κυττάρων αλλά και την εξασφάλιση της ύπαρξης του συμπλάσματος. Είναι ιδιότητα η οποία επηρεάζεται αμεσότατα από το περιβάλλον. Σε αντιδιαστολή με άλλες λειτουργίες του φυτού επηρεάζει με τη σειρά της ζωτικά και άμεσα την ίδια την υπόσταση και ύπαρξη του φυτικού οργανισμού. Με άλλα λόγια το φυτό μπορεί και αντεπεξέρχεται ευκολότερα σε συνθήκες τροφопενίας, ή μειωμένης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, ενώ κινδυνεύει άμεσα να μαραθίσει και στη συνέχεια να νεκρωθεί μετά από σχετικά βραχυχρόνια δυσμενή υδατική κατάσταση των κυττάρων του.

Το δυναμικό του νερού

Σύστημα αναφοράς για την μελέτη οποιουδήποτε υδατικού διαλύματος θεωρείται το καθαρό νερό, το οποίο από ενεργειακή άποψη είναι και το ανώτερο σύστημα. Απόρροια του γεγονότος αυτού είναι η κίνηση των μορίων του νερού από τον καθαρό διαλύτη προς κάποιο διάλυμα και γενικά από τη μεγαλύτερη προς τη μικρότερη συγκέντρωση των μορίων του. Το δυναμικό νερού αποδίδει την ενεργειακή κατάσταση ενός διαλύματος σε σχέση με το καθαρό νερό. Η εξίσωση έκφρασης του δυναμικού του νερού (1) αποτελεί έκφραση της ενεργειακής κατάστασης κάθε συγκεκριμένου διαλύματος σε σχέση προς το καθαρό νερό και είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης των μορίων του διαλυμένου σώματος.

$$\Psi = - cRT \quad (1)$$

όπου Ψ : το δυναμικό νερού, εκφρασμένο σε μονάδες πίεσης συνήθως σε MPa (MegaPascal) ή σε atm (10 atm = 1.013 MPa)
 c : η συγκέντρωση του διαλυμένου σώματος σε (mol L⁻¹)
 R : η παγκόσμια σταθερή των αερίων (0,082 L · atm · mol⁻¹ · T⁻¹)
 T : η απόλυτη θερμοκρασία (273 + θερμοκρασία σε °C)

(Για καθαρό νερό η τιμή του c είναι μηδενική, άρα η τιμή του Ψ είναι μηδέν. Για διαλύματα με οποιαδήποτε συγκέντρωση διαλύτη η τιμή του Ψ παίρνει αρνητικές τιμές. Για τιμές συγκέντρωσης $c=1$ mol L⁻¹ μη ηλεκτρολύτη και για θερμοκρασία 27°C η εξίσωση (1) δίνει $\Psi=-2,27$ MPa ή 22,4 atm; Για $c= 0,5$ mol L⁻¹ δίνει $\Psi=- 1,14$ MPa ή 11,2 atm κ.ο.κ).

Τα φυτικά κύτταρα ως ωσμωτικά συστήματα

Υπάρχουν ιδιαιτερότητες που διαφοροποιούν καθοριστικά τα φυτικά κύτταρα από τα συνήθη διαλύματα. Οι σημαντικότερες είναι: (1) η παρουσία του κυτταρικού τοιχώματος και (2) η πολυπλοκότητα του πρωτοπλάστη, λόγω της παρουσίας μεγαλομορίων πληθώρας μεμβρανών κ.ά.

Στην κατάσταση της σπαργής λόγω της επαφής του ζωντανού περιεχομένου του κυττάρου με το κυτταρικό τοίχωμα ασκούνται δύο ίσες και αντίθετες πιέσεις: μία από το ζωντανό περιεχόμενο προς το κυτταρικό τοίχωμα η **πίεση σπαργής** (ψ_p : δυναμικό πίεσης) και μια αντίθετη της από το κυτταρικό τοίχωμα προς το ζωντανό περιεχόμενο του κυττάρου η **πίεση τοιχωμάτων** (σαν αντίδραση στην πίεση σπαργής). Ισχύει δηλαδή:

$$\text{πίεση σπαργής} = - \text{πίεση τοιχωμάτων} \quad (2)$$

Αν δεν υπήρχαν άλλες συνιστώσες το δυναμικό του νερού του κυττάρου θα ήταν η συνισταμένη του δυναμικού του νερού του κυττάρου, λόγω της υπόστασής του σαν ωσμωτικό σύστημα (αρνητικές τιμές) αυξημένη κατά το ποσοστό που προέρχεται από την πίεση τοιχωμάτων (θετικές τιμές).

$$\Psi_{w, \text{κυτ}} = \Psi_s + \Psi_p \quad (3)$$

Όπου $\Psi_{w, \text{κυτ}}$: δυναμικό νερού του κυττάρου
 Ψ_s : ωσμωτικό δυναμικό κυττάρου
 Ψ_p : δυναμικό πίεσης

Η άλλη ιδιαιτερότητα απορρέει από το γεγονός ότι τα κύτταρα δεν είναι απλά διαλύματα αλλά πολύπλοκα συστήματα (μεμβράνες, μεγαλομόρια κ.λ.π.), τα οποία συνεισφέρουν στην τελική ωσμωτική κατάσταση του νερού του κάθε κυττάρου. Ο παράγοντας αυτός είναι γνωστός ως **δυναμικό μάζας** (Ψ_m). Επομένως, στην πλήρη μορφή της η σχέση που αποδίδει το δυναμικό του νερού του φυτικού κυττάρου θα είναι:

$$\Psi_{w, \text{κυτ}} = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_m \quad (4)$$

Όπου $\Psi_{w, \text{κυτ}}$: δυναμικό νερού του κυττάρου
 Ψ_s : ωσμωτικό δυναμικό κυττάρου
 Ψ_p : πίεση σπαργής (ή δυναμικό πίεσης λόγω των κυτ.τοιχωμάτων)
 Ψ_m : δυναμικό μάζας

Ο παράγοντας Ψ_m δεν είναι εύκολο να μετρηθεί ως ξεχωριστή συνιστώσα, αλλά υπεισέρχεται στη μέτρηση του Ψ_s . Έτσι, για τον υπολογισμό του δυναμικού του νερού του κυττάρου εφαρμόζεται η απλουστευμένη μορφή (3).

Μέθοδοι προσδιορισμού της υδατικής κατάστασης των φυτών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της υδατικής κατάστασης των φυτών συνήθως στηρίζεται σε προσδιορισμό διαφόρων παραμέτρων όπως:

Δυναμικό νερού (Ψ_w)

Ωσμωτικό δυναμικό (Ψ_s)

Πίεση σπαργής (Ψ_p) (πλασμολυτική μέθοδος)

Αγωγιμότητα στοματίων κ.ά.

Εργαστηριακό μέρος**Απαιτούμενα υλικά και για τις δύο πειραματικές διαδικασίες**

1. Διαλύματα σακχαρόζης κλιμακούμενου δυναμικού νερού (από -0.4 έως -1,8 MPa)
2. Σιφώνια των 10 mL για τη διανομή των διαλυμάτων σακχαρόζης στα τριβλία και τους δοκιμαστικούς σωλήνες κάθε θέσης

Προσδιορισμός του ωσμωτικού δυναμικού του νερού των κυττάρων με τη μέθοδο σπαργής-πλασμόλυσης**Απαιτούμενα υλικά**

1. Έγχρωμες επιδερμίδες χιτώνων κρεμμυδιού
2. Μικροσκόπιο
3. 8 σημειωμένα τριβλία για τα διαλύματα σακχαρόζης δυναμικών νερού -0,4 έως -1,8 MPa (T4, T6, T8, T10, T12, T14, T16, T18)
4. Ξυραφάκι
5. Ανατομική βελόνα
6. Αντικειμενοφόροι πλάκες
7. Καλυπτρίδες
8. Απορροφητικό χαρτί

Διαδικασία

1. 5 mL από κάθε διάλυμα σακχαρόζης μεταφέρονται στο αντίστοιχο σημειωμένο τριβλίο T4, T6, T8, T10, T12, T14, T16, T18.
2. Με τη βοήθεια της ανατομικής βελόνας και του ξυραφιού αφαιρούνται τεμάχια από την κάτω επιδερμίδα του δείγματος και τοποθετούνται 2 παρασκευάσματα επιδερμίδας ανά τριβλίο αντίστοιχα στη σειρά τριβλίων με τα διαλύματα σακχαρόζης δυναμικού νερού -0,4/ -0,6 / -0,8/ -10/ -1,2/ -1,4/ -1,6 και -1,8 Mpa.
3. Οι ιστοί παραμένουν για εξισορρόπηση στο αντίστοιχο διάλυμα για 10 min περίπου.
4. Σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετείται σταγόνα διαλύματος από το πρώτο τριβλίο. Ο αντίστοιχος ιστός επιδερμίδας μεταφέρεται στην αντικειμενοφόρο και καλύπτεται με καλυπτρίδα.
5. Στη συνέχεια γίνεται μικροσκοπική παρατήρηση και από τη μορφή του έγχρωμου χυμοτοπίου διαπιστώνεται αν τα κύτταρα της επιδερμίδας βρίσκονται σε σπαργή ή σε πλασμόλυση.
6. Η κατάσταση των κυττάρων καταγράφεται στην αντίστοιχη θέση του Πίνακα 3.1.
7. Η διαδικασία της μικροσκοπικής παρατήρησης επαναλαμβάνεται για όλα τα παρασκευάσματα και συμπληρώνεται ο αντίστοιχος πίνακας.

Σχόλια: Μετά την εξισορρόπηση το δυναμικό νερού των κυττάρων είναι ίσο με το δυναμικό νερού του αντίστοιχου εξωτερικού διαλύματος σακχαρόζης και ισχύει:

$$\Psi_{w, \text{κυτ επιδερμίδας}} = \Psi_s + \Psi_p = \Psi_{w, \text{διαλ}} \quad (5)$$

Για να προκύψει η εξισορρόπηση τα κύτταρα ή θα πάρουν νερό από το εξωτερικό διάλυμα (που σημαίνει ότι έχουν αρνητικότερο δυναμικό νερού συγκριτικά με το αντίστοιχο διάλυμα σακχαρόζης) και η μικροσκοπική εικόνα θα αποκαλύπτει κατάσταση σπαργής, ή θα χάσουν νερό (που σημαίνει πως το αντίστοιχο εξωτερικό διάλυμα σακχαρόζης έχει αρνητικότερο δυναμικό νερού από το δυναμικό νερού του κυττάρου) και η μικροσκοπική εικόνα θα αποκαλύπτει κατάσταση πλασμόλυσης. Με τη διαδικασία αυτή μπορούμε να ορίσουμε τα ελάχιστα όρια στα οποία:

$$\Psi_{w, \text{διαλ } n+1} < \Psi_{w, \text{κυτ επιδ}} < \Psi_{w, \text{διαλ } n} \quad (6)$$

Είναι ενδεχόμενο η μικροσκοπική παρατήρηση να μας αποκαλύψει κατάσταση αρχόμενης πλασμόλυσης, κατά την οποία το 50% των κυττάρων του ιστού βρίσκεται σε πλασμόλυση (δηλαδή το χυμοτόπιο αρχίζει να ξεκολλάει στις γωνίες

από το κυτταρικό τοίχωμα) και το υπόλοιπο σε σπαργή. Στην αρχόμενη πλασμόλυση η πίεση σπαργής είναι ίση με το μηδέν, οπότε από τον τύπο (5) προκύπτει:

$$\Psi_{w, \text{κυτ}} = \Psi_s + 0 = \Psi_{w, \text{διαλ}} \quad (7)$$

$$\Psi_s = -\Psi_{\text{διαλ}} \quad (8)$$

Άρα, στην αρχόμενη πλασμόλυση προσδιορίζουμε ποιο ακριβώς είναι το ωσμωτικό δυναμικό των κυττάρων που εξετάζουμε. Αν δεν προκύψει κατάσταση αρχόμενης πλασμόλυσης για μεγαλύτερη ακρίβεια μπορούν να παρασκευαστούν και διαλύματα με δυναμικά νερού της περιοχής μετάβασης από τη σπαργή στην πλασμόλυση και με μικρότερη κλιμάκωση.

Πίνακας 3.1

Η κατάσταση των κυττάρων της επιδερμίδας μετά την εξισορρόπηση τους με τα διαλύματα γνωστής ωσμωτικής πίεσης

α/α	Δυναμικό του νερού διαλύματος σακχαρόζης (MPa)	Κατάσταση κυττάρων
1	-0,4	Σπαργή
2	-0,6	
3	-0,8	
4	-1,0	
5	-1,2	
6	-1,4	
7	-1,6	
8	-1,8	Πλασμόλυση

Προσδιορισμός του δυναμικού του νερού των φυτικών οργάνων με τη μέθοδο της παρακολούθησης των μεταβολών των διαστάσεών τους

Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμογή σε ογκώδη όργανα, από τα οποία είναι δυνατό να ληφθούν με φελλοτρυπητήρα κύλινδροι ιστών.

Απαιτούμενα υλικά

1. Κόνδυλοι πατάτας διαστάσεων 10x8x8 cm περίπου

2. Στατό
3. 8 σημειωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 20 mL για τα διαλύματα σακχαρόζης ωσμωτικών πιέσεων $-0,4$ έως $-1,8$ MPa (Σ4, Σ6, Σ8, Σ10, Σ12, Σ14, Σ16, Σ18)
4. Φελλοτρυπητήρας
5. Ξυραφάκι
6. Ζυγός
7. Πλακίδια για την κοπή και μέτρηση των κυλίνδρων πατάτας

Διαδικασία

1. 10 mL κάθε διαλύματος σακχαρόζης μεταφέρονται σε αντίστοιχους σημειωμένους σωλήνες (Σ4, Σ6, Σ8, Σ10, Σ12, Σ14, Σ16, Σ18).
2. Με τη βοήθεια του φελλοτρυπητήρα δημιουργούμε 8 κυλίνδρους από τον κόνδυλο της πατάτας συνολικού μήκους 6-8 cm. Προσέχουμε ώστε οι κύλινδροι που δημιουργούμε να μη περιλαμβάνουν επιδερμικούς ιστούς. Για να αποφύγουμε αλλοίωση του βάρους των ιστών χρησιμοποιούμε το πλακίδιο.
3. Ανανεώνουμε τις δύο εγκάρσιες πλευρές των κυλίνδρων, ώστε να είναι κάθετες στο μεγάλο άξονα, και τους μεταφέρουμε σε τρυβλίο.
4. Μετράμε το αρχικό βάρος κάθε κυλίνδρου πατάτας και το σημειώνουμε στην αντίστοιχη θέση του Πίνακα 3.2.
5. Τοποθετούμε από ένα κύλινδρο σε καθένα από τους 8 δοκιμαστικούς σωλήνες με τα διαλύματα σακχαρόζης.
6. Αφήνουμε τους ιστούς για εξισορρόπηση για 1 ώρα περίπου.
7. Αδειάζουμε το διάλυμα σακχαρόζης από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
8. Μετράμε το τελικό βάρος κάθε κυλίνδρου αφού απομακρύνουμε το επιπλέον διάλυμα από την επιφάνεια του κονδύλου και το σημειώνουμε στην αντίστοιχη στήλη του Πίνακα 3.2

Σχόλια: Μετά την εξισορρόπηση το δυναμικό νερού των κυττάρων του κυλίνδρου $\Psi_{w, \text{κυτ}}$ είναι ίσο με το δυναμικό νερού του αντίστοιχου διαλύματος σακχαρόζης:

$$\Psi_{w, \text{κυτ κυλίνδρου}} = \Psi_{w, \text{διαλ}} \quad (9)$$

Για να προκύψει η εξισορρόπηση τα κύτταρα του ιστού ή θα πάρουν νερό από το εξωτερικό διάλυμα σακχαρόζης (που σημαίνει ότι έχουν αρνητικότερο δυναμικό νερού των κυττάρων του κυλίνδρου συγκριτικά με το διάλυμα) και η τελική εικόνα θα αποκαλύπτει αύξηση του μήκους του αντίστοιχου κυλίνδρου, ή θα χάσουν νερό (που σημαίνει πως το εξωτερικό διάλυμα έχει αρνητικότερο δυναμικό νερού από το δυναμικό νερού του κυττάρου) και η τελική εικόνα θα αποκαλύπτει

μείωση του μήκους του αντίστοιχου κυλίνδρου. Με τη διαδικασία αυτή μπορούμε να ορίσουμε τα ελάχιστα όρια στα οποία:

$$\Psi_{w, \text{διαλ } n+1} < \Psi_{w, \text{ΚΥΤ κυλίνδρου}} < \Psi_{w, \text{διαλ } n} \quad (10)$$

Πίνακας 3.2

Η μεταβολή του μήκους των κυλίνδρων πατάτας μετά την εξισορρόπηση των ιστών τους με τα διαλύματα γνωστής ωσμωτικής πίεσης

α/α	δυναμικό του νερού διαλύματος σακχαρόζης (MPa)	αρχικό βάρος κυλίνδρου (g)	τελικό βάρος κυλίνδρου (g)	διαφορά (+/- g)
1	-0,4			
2	-0,6			
3	-0,8			
4	-1,0			
5	-1,2			
6	-1,4			
7	-1,6			
8	-1,8			

Στην περίπτωση που το τελικό βάρος του κυλίνδρου μείνει αμετάβλητο, η ταχύτητα εισόδου-εξόδου νερού θα είναι ίδια. Αυτή η περίπτωση μας δίνει και τη δυνατότητα ακριβούς προσδιορισμού του $\Psi_{w, \text{ΚΥΤ}}$. Αν δεν προκύψει τέτοια περίπτωση ή για μεγαλύτερη ακρίβεια μπορούν να παρασκευαστούν και διαλύματα σακχαρόζης ενδιαμέσων δυναμικών νερού για ακριβέστερο προσδιορισμό του δυναμικού νερού των κυττάρων του ιστού.

Βιβλιογραφία

1. Kirkham, M.B. (1985). Techniques for water-use measurements of crop plants. Hortscience 20(6);993-1001
2. Taiz, L., Zeiger, E. (2002). Plant Physiology. 3rd ed. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland. ISBN 0-87893-831-1 pp 61-80
3. Κιτσάκη Χ. (2004). Υδατική καταπόνηση στα φυτά. Σημειώσεις για το μεταπτυχιακό του Τμήματος Βιοτεχνολογίας

4^η Άσκηση

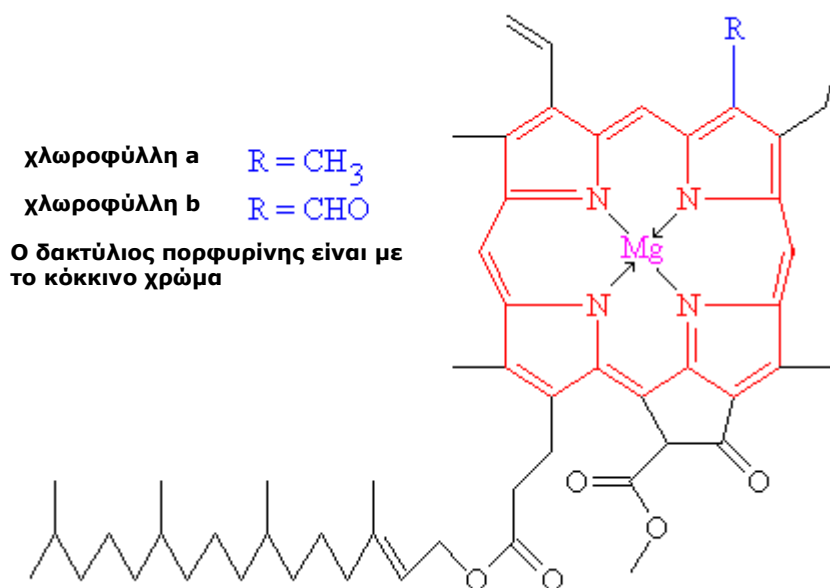
Εκχύλιση και προσδιορισμός των χλωροφυλλών

Σκοπός της άσκησης

Να εκχυλίσουμε τις πράσινες χρωστικές του φύλλου και να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωσή τους φωτομετρικά.

Εισαγωγή

Οι χλωροφύλλες είναι μίγμα δύο πράσινων χρωστικών που ονομάζονται χλωροφύλλη α και χλωροφύλλη β και βρίσκονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών των χλωροπλαστών. Έτσι, ο όρος 'χλωροφύλλη' λέγεται για λόγους συντομίας και εννοούμε το μίγμα των δύο χρωστικών. Οι χλωροφύλλες είναι βυθισμένες στις μεμβράνες αυτές, συνδεδεμένες με πρωτεϊνικά μόρια και δίνουν το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα στα φυτά.

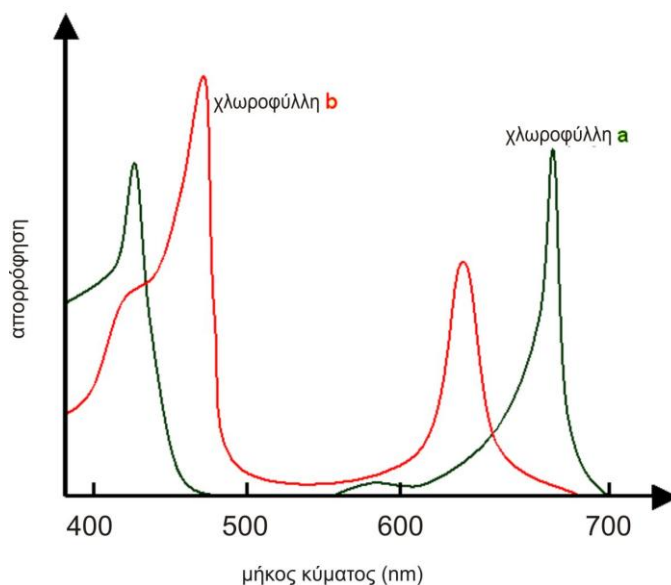


Εικόνα 4.1

Η δομή των μορίων των χλωροφυλλών α & β.

Οι χλωροφύλλες είναι αδιάλυτες στο νερό, αλλά διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες (ακετόνη, ακετόνη 80% v/v, αιθανόλη 96% v/v και διαιθυλαιθέρα) τους οποίους και χρησιμοποιούμε για να τις παραλάβουμε και να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωσή τους.

Το μόριο των χλωροφυλλών αποτελείται από ένα τμήμα πορφυρίνης και ένα τμήμα φυτόλης. Το τμήμα της πορφυρίνης αποτελείται από ένα τετραπυρολικό δακτύλιο με ένα άτομο μαγνησίου στο κέντρο, είναι το υδρόφιλο μέρος των χλωροφυλλών και είναι συνδεδεμένο με τις πρωτεΐνες της μεμβράνης στην οποία βρίσκονται. Το τμήμα της φυτόλης είναι το υδρόφοβο μέρος των χρωστικών αυτών και είναι βυθισμένο μέσα στα λιπίδια της μεμβράνης αυτής. Η χλωροφύλλη *a* φέρει μεθυλομάδα στον 2^ο πυρολικό δακτύλιο της πορφυρίνης, ενώ στην χλωροφύλλη *b* η αντίστοιχη ομάδα είναι η αλδεϋδομάδα. Αυτή είναι και η μόνη διαφορά μεταξύ των δύο χρωστικών, με συνέπεια το φάσμα της χλωροφύλλης *a* να εμφανίζει ισχυρή απορρόφηση στα 660 nm, ενώ της χλωροφύλλης *b* στα 643 nm. Οι χλωροφύλλες έχουν πράσινο χρώμα επειδή απορροφούν το φως στην περιοχή του μπλέ και του ερυθρού του φάσματος και αντανakλούν το πράσινο φως. Η χλωροφύλλη *a* είναι κυανοπράσινη ενώ η χλωροφύλλη *b* είναι κιτρινοπράσινη.

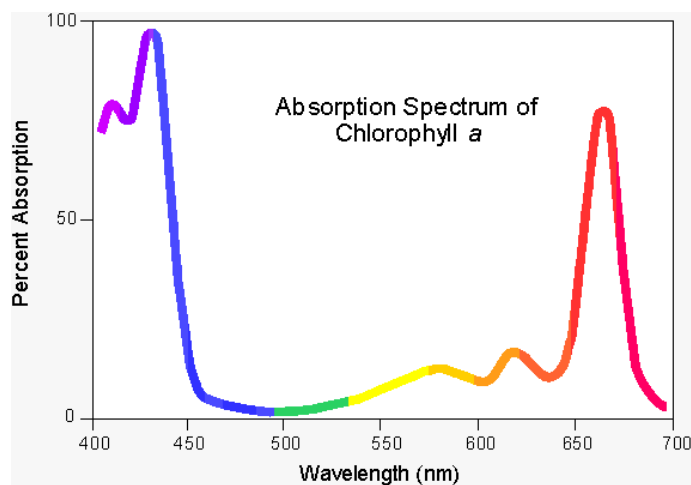


Εικόνα 4.2

Τα φάσματα απορρόφησης των χλωροφυλλών *a* & *b*.

Ο λειτουργικός ρόλος των χλωροφυλλών είναι να απορροφούν την ηλιακή ενέργεια. Ένα μέρος της φωτεινής ενέργειας που απορροφήθηκε αποταμιεύεται με τη μορφή χημικής ενέργειας. Τα μόρια των χλωροφυλλών είναι οργανωμένα σε λειτουργικές δομές, τις αντένες, που χρησιμεύουν ως συλλέκτες της φωτεινής

ενέργειας, μετατροπείς της φωτεινής ενέργειας σε χημική και μεταφορείς της χημικής ενέργειας στα φωτοσυστήματα της φωτοσυνθετικής μηχανής.



Εικόνα 4.3

Λεπτομέρειες του φάσματος απορρόφησης της χλωροφύλλης a, με έμφαση στην ένταση με την οποία απορροφά το μόριο στην κάθε περιοχή του ορατού.

Στην άσκηση αυτή το ενδιαφέρον μας επικεντρώνεται στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης a, της χλωροφύλλης b σε ένα φύλλο. Μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρύτατα δημοσιεύτηκε από τον Arnon το 1949 (2). Εμείς θα χρησιμοποιήσουμε μία παραλλαγή της μεθόδου που δημοσιεύτηκε από τους Hiscox & Israelstam το 1979 (3) και χρησιμοποιεί το διμεθυλοσουλφοξείδιο ως εκχυλιστικό μέσο αντί του μίγματος ακετόνης 80% με νερό, γιατί απλουστεύεται κατά πολύ η διαδικασία ενώ ισχύουν οι ίδιοι τύποι υπολογισμού.

Η αρχή της μεθόδου προσδιορισμού έχει ως εξής: Εκχυλίζουμε τον ζυγισμένο φυτικό ιστό χρησιμοποιώντας ως εκχυλιστικό μέσο το διμεθυλοσουλφοξείδιο στους 65 °C για ορισμένο χρόνο (15 min), παραλαμβάνουμε το εκχύλισμα και το πηγαίνουμε σε γνωστό όγκο, μετράμε την απορρόφηση σε φωτόμετρο στα 649 και 665 nm, υπολογίζουμε τις συγκεντρώσεις των χρωστικών (χλωροφύλλης a, χλωροφύλλης b και μίγματος) σε mg κατά L εκχυλίσματος και ανάγουμε το αποτέλεσμα σε mg κατά g νωπού ιστού.



Εικόνα 4.4

Καθώς η χλωροφύλλη των φύλλων αποδομείται το φθινόπωρο, το πράσινο χρώμα εξασθενίζει και αντικαθίσταται από το πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα των καροτινοειδών.

Στη συνέχεια θα εκχυλίσουμε φύλλα με έντονο πράσινο χρώμα, φύλλα χλωρωτικά και φύλλα που βρίσκονται στο στάδιο της φυσιολογικής απόπτωσης από το φυτό και θα αξιολογήσουμε τα αποτελέσματά των αναλύσεών μας.

Εργαστηριακό μέρος

Διαδικασία

1. Καθαρίζουμε το δείγμα με απεσταγμένο νερό και απορροφητικό χαρτί.
2. Ζυγίζουμε το δείγμα και καταγράφουμε το ακριβές νωπό βάρος στον πίνακα.
3. Σε σωλήνα βάζουμε 3 mL DMSO και το δείγμα (ελαφρά τεμαχισμένο, ώστε να καλύπτεται από το DMSO).
4. Τοποθετούμε το σωλήνα σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 15 min.
5. Μεταφέρουμε με απόχυση το εκχύλισμα σε βαθμονομημένο σωλήνα, συμπληρώνουμε μέχρι τα 10 mL με DMSO και επαναφέρουμε στον προηγούμενο σωλήνα, αφού απομακρύνουμε τον φυτικό ιστό.
6. Φωτομετρούμε στα 649 nm και στα 665 nm ως προς το DMSO.
7. Καταγράφουμε τις απορροφήσεις στον πίνακα και υπολογίζουμε τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης a, της χλωροφύλλης b και της ολικής χλωροφύλλης στο διάλυμα σε mg L⁻¹, σύμφωνα με τους τύπους:

$$C_a = 12,47 \times A_{665} - 3,62 \times A_{649}$$

$$C_b = 25,06 \times A_{649} - 6,50 \times A_{665}$$

$$C_{ολ} = 5,97 \times A_{665} + 21,44 \times A_{649}$$

8. Υπολογίζουμε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των χλωροφυλλών του δείγματος σε mg Chl g⁻¹ NB.

Δείγμα	NB	A ₆₄₉	A ₆₆₅	mg Chl g ⁻¹ NB			C _a /C _b	C _a /C _{ολ}
				C _a	C _b	C _{ολ}		
Φύλλο 1								
Φύλλο 2								

Βιβλιογραφία

1. Taiz L., Zeiger E. (1998). Plant Physiology. 2nd ed. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland. ISBN 0-87893-831-1 pp 61-80
2. Arnon D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol 24(1), 1-15.
3. Hiscox J. D. And G. F. Israelstam (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Can J Bot 57, 1332-1334.