دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس

جزوه آزمایشگاه مبانی فیزیولوژی گیاهی

استاد

دکتر بارانی

سال تحصیلی ۱۴۰۱-۱۴۰۰

راهنمایی های اولیه آزمایشگاهی

۱- همیشه از وسایل تمیز استفاده کنید و میز آزمایشگاه را مرتب و پاکیزه نگهداری کنید.
۲- همیشه با روپوش سفید در آزمایشگاه حاضر شوید.
۳- قبل از خروج از آزمایشگاه میز کار خود را تمیز کنید.
۴- همیشه کلیه وسایل آغشته به مواد شیمیایی را با مایع ظرفشویی و آب شهری به خوبی شست و شو داده و با آب مقطر آبکشی کنید.
۵- از خوردن نمونه های گیاهی آماده شده برای آزمایش خودداری کنید.
۶- در موقع کار از صحبت کردن و اتلاف وقت خود و دیگران خودداری نمایید.
۷- از دست زدن به مواد و وسایلی که مربوط به کار شما نیست و هم چنین مواد فاقد برچسب خودداری نمایید.
۸- هر وقت خواستید از ماده شیمیایی مورد مصرف عموم استفاده کنید ظرف خود را نزدیک شیشه اصلی ببرید و به اندازه لازم از آن بردارید. از جابجایی وسایل به خصوص مواد شیمیایی خودداری کنید.
۹- هرگز مایعاتی را که زود شعله ور می شوند مثل الکل، روی توری یا شعله حرارت مستقیم ندهید بلکه برای این کار از حمام آب گرم (بن ماری) استفاده کنید.
۱۰- اگر مواد شیمیایی وارد دهان شما شد نباید آن را ببلعید بلکه بلافاصله از دهان خارج نموده و دهان را با آب فراوان بشویید.
۱۱- مواد مورد نیاز جهت آزمایش هر هفته را یادداشت نموده و تهیه آن را فراموش نکنید.

چگونگی تهیه گزارش آزمایشگاهی

بعد از هر آزمایش، دانشجو بایستی هدف از انجام آزمایش، روند آزمایش و نیز نتایج آزمایشگاهی را بطور شکیل تنظیم و در صورت نیاز نمودار های مربوطه را ترسیم و با پاسخگویی به سوالات مطرح شده، گزارش کار آزمایش انجام گرفته را تهیه و تکمیل و ارائه نماید. در تهیه و تنظیم گزارش کار آزمایشگاه رعایت نکات زیر الزامیست:

۱-عنوان آزمایش

۲-هدف آزمایش

۳- روش انجام آزمایش شامل مراحل آزمایش، استفاده از وسایل و دستگاه ها و مواد آزمایش

۴-تئوری آزمایش (با ذکر منبع)

۵-روش انجام محاسبات

۶-ترسیم منحنی های لازم همراه با توضیحات

۷- نتیجه گیری و بحث در مورد نتایج و پاسخگویی به سوالات مطرح شده

آزمایش های فیزیولوژی سلولی

مطالعه و اندازه گیری فشار اسمزی و شیره واکوئلی با استفاده از روش پلاسمولیز حد

اسمز و مفاهیم مربوط به آن

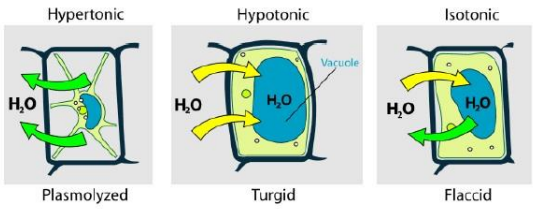
سیتوپلاسم و اندامک های درون یاخته ای توسط غشای پلاسمایی احاطه می شوند. غشای پلاسمایی دارای نفوذ پذیری انتخابی است. این غشا اجازه عبور سریع به مواد بدون بار کوچک را داده و در عوض مواد باردار بزرگتر کندتر عبور می کنند. به حرکت آب از درون این غشا اسمز می گویند. میزان و سرعت عبور آب از میان غشا توسط شیب غلظت آب و شیب فشار آب تعیین می گردد ولی جهت حرکت آب را پتانسیل آب تعیین می نماید. پتانسیل آب انرژی آزاد حجم یک مولال آب است. پتانسیل آب یک کمیت نسبی است به گونه ای که همواره آن را با یک سطح استاندارد می سنجند. پتانسیل آب خالص همواره صفر است و با افزایش مواد حل شدنی به آب خالص پتانسیل آب آن کاهش می یابد. جهت حرکت همواره از محیطی با پتانسیل آبی بیشتر به سوی محیطی با پتانسیل آبی کمتر است.

با توجه به غلظت شیره یاخته ای و محیط بیرون آن می توان حالات زیر از نظر اسمز را تعریف نمود:

الف- در صورتی که میزان مواد درون یاخته ای کم بوده و یا به عبارتی شیره یاخته ای رقیق باشد محیط درون هیپوتونیک است (Hypotonic). چنانچه این یاخته به محیطی با تراکم بالا که هیپرتونیک است (Hypertonic) منتقل شود، آب یاخته را ترک می کند. حجم یاخته کاهش می یابد و فرایندی بنام اسمز بیرونی حادث می شود.

ب- در صورتی که میزان مواد درون یاخته ای زیاد باشد و یا شیرابه یاخته غلیظ تر گردد، محیط درون یاخته هیپرتونیک است. اگر این یاخته به محیطی رقیق که از نظر محتوی ماده کمتر از یاخته است منتقل شود، آب وارد یاخته شده حجم یاخته افزایش یافته و فرایندی بنام اسمز درونی انجام می شود.

ج- در صورتی که میزان مواد درون یاخته ای با میزان مواد موجود در محلول خارجی یکسان باشد، دو محیط نسبت به هم ایزوتونیک هستند. بین این دو محیط یعنی محیط درون یاخته ای و محیط بیرون یاخته ای عملا تبادل آبی صورت نمی گیرد، به عبارتی تعداد مولکول های آب وارد شده به درون یاخته با تعداد مولکول های آب خارج شده از یاخته برابر است؛ در نتیجه حجم یاخته ثابت می ماند.



چگونگی جابجایی آب بین سلول و محیط در حالات مختلف

روشهای اندازه گیری تنظیم کننده های اسمزی گیاهان:

تمامی گیاهان دو عامل را برای رشد در برابر با خود دارند، یکی آب و دیگری املاح محلول در آن، یعنی تمام سلول های زنده باید به یک بالانس مناسبی از آب و املاح موجود در سیتوپلاسم شان دست یابند، تا بتوانند از این تعادل داخلی جهت رسیدن به تعادل نهایی با محیط اطراف بهره مند شوند، چرا که لازمه ادامه حیات هر سلولی در هر محیط، داشتن رابطه تعادلی (یعنی حرکت دو طرفه) بین سلول و محیط است، تا بتواند مواد غذایی و املاح را از محیط جذب و مواد زائد و یا ترشحی خود را به محیط اطراف دفع نماید. برای رسیدن به این تعادل ابزاری در اختیار سلول گیاهی وجود دارد، که در آزمایشات و تست های مربوطه چگونگی و سنجش و اندازه گیری آنها را مرور می کنیم. بدین منظور و برای آشنایی با مکانیسم های تعادلی ابتدا باید علل و عواملی را که سبب ایجاد آن می شوند را بررسی نماییم. در یک سیستم زنده دو پدیده تورژسانس و پلاسمولیز (ورود و خروج آب به سیستم) سبب تنظیم اسمزی سلول با محیط اطراف می گردد، که در روشهای آزمایشگاهی می توان مقدار آن را تحت عنوان اسمز آب محاسبه نمود.

سلول در شرایط طبیعی، در حال تورژسانس می باشد و اگر داخل محلولی که نسبت به شیره واکوئلی غلیظ باشد قرار بگیرد، آب خود را از دست می دهد و سیتوپلاسم از دیواره سلولی جدا می شود و حالت پلاسمولیز به خود می گیرد. ولی اگر همین سلول پلاسمولیز شده در یک محیط رقیق قرار بگیرد، مجددا با جذب آب به حالت تورژسانس بر می گردد که این پدیده دپلاسمولیز نامیده می شود.

اسمز: هنگامی که در یک جابجایی فقط مولکول های حلال اجازه حرکت از عرض غشا داشته باشند، اسمز یا **انتشار فقط مولکول های حلال** شکل می گیرد. حرکات اسمزی سبب تورم و یا چروکیدگی سلول یا بافت می گردد.

انرژی شیمیایی آب سیستم: برخی محققین و فیزیولوژیست ها بر این عقیده اند که، آب موجود درون سلول (بافت) نیروی بالقوه ای در آن بوجود می آورد، در واقع تراکم و یا انباشت مولکول های آب در یک سیستم که می بایست بصورت طبیعی انجام شود را به عنوان انرژِی شیمیایی آب سیستم اطلاق می نمایند. و مقدار آن در

آب خالص که فقط از مولکول های آب تشکیل شده است را بزرگترین مقدار آن در حالت طبیعی در نظر می گیرند که برابر است با $\Psi=0$، لذا هیچ سیستمی در شرایط طبیعی نمی توان یافت که Ψ برای آن بزرگتر از صفر باشد $\Psi>0$، و همچنین هیچ سلول زنده ای نیست که Ψ برای آن صفر و یا مثبت باشد. به عبارت دیگر هر سیستمی در کنار سیستم آب مقطر دچار تورژسانس شده و متورم می شود. با افزوده شدن املاح و ترکیبات مختلف به سیستم آب خالص تراکم مولکول های آب در واحد حجم آن کاهش یافته و این فضا توسط مولکول های جدیدی به نام اجسام حل شونده نیز اشغال می شود که نتیجه آن کاهش Ψ برای این سیستم است، بر این اساس به کاهش انرژی شیمیایی آب در یک سیستم نسبت به آب خالص پتانسیل آب اطلاق می شود.

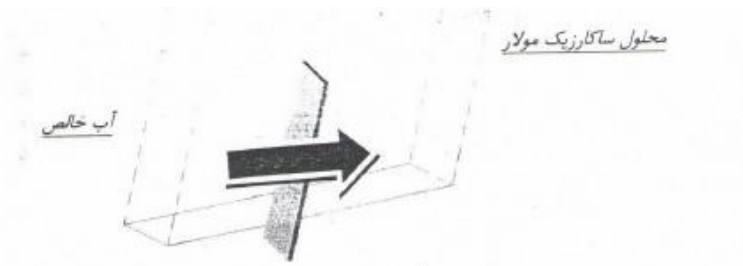
فرمولی وجود دارد که مورد توافق تعداد بیشتری از محققین است، معادله وانت هوف که به جهت ارائه آن و اندازه گیری فشار اسمزی محلول های مختلف موفق به دریافت اولین جایزه نوبل فیزیک در سال ۱۹۰۴ شد.

معادله ساده وانت هوف در عین حال یکی از کارآمد ترین و معتبر ترین فرمول ها در تعیین **فشار اسمزی** محلول ها است: $\pi = - iCRT$

π: پتانسیل اسمزی سیستم، i : ضریب تفکیک ذره ای، C: غلظت مولاریته محلول، R: ثابت انتشار گازها و T: دمای مطلق محلول می باشد.

با استفاده از این فرمول می توان پتانسیل اسمزی محلول یک مولار ساکارز را در ۲۰ درجه سانتی گراد محاسبه کرد:

$\Pi = - 1 \times 1 \times 0,083 \times (273+20) = - 24/319$ Bar.



شکل -۲-۱) جهت حرکت آب را از عرض غشاءنیمه تراوا نشان می دهد.

درشکل (۲-۱) اگردربخش آب خالص بتدریج کریستال های قندساکارزراحل نماییم،حجم،قدرت و سرعت جابجایی آب(نیروی اسمزی آب) کاهش یافته، ولذا پتانسیل اسمزی(JI) آب خالص کاهش ویافشاراسمزی(OP) آن افزایش می یابد.دراین بخش برای سنجش و اندازه گیری تنظیم کننده های اسمزی به بازگونمودن چند تست معتبرومتداول اشاره خواهیم نمود:

متد سنجش پتانسیل اسمزی در بافت های گیاهی

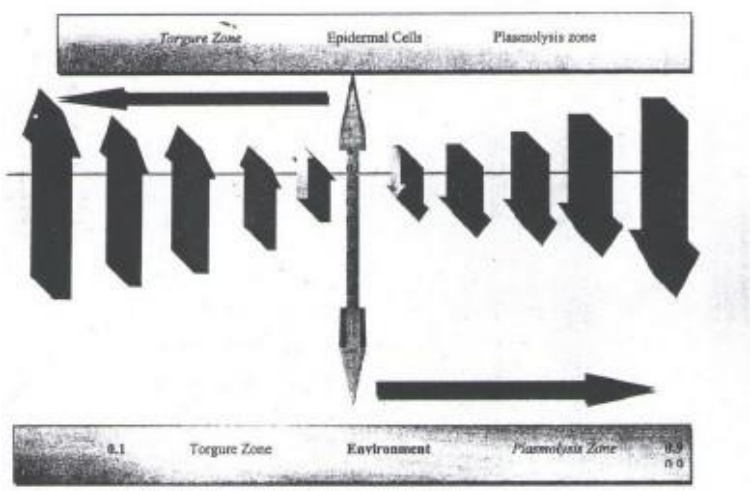
روش کار:

ابتدا غلظت های استاندارد قند ساکارز یک مولار را از غلظت های ۰/۱ تا ۰/۹ مولار بدقت ساخته و پس از تکان دادن هر لوله بخشی از محتویات آن را درون شیشه ساعت های هم شماره آن اضافه نمود (تعداد لوله ها برابر با ۹ غلظت استاندارد ساکارزی است) و سپس برای انتخاب بافت موارد زیر را در نظر می گیریم:

۱-چون مبنای تشخیص در این روش براساس گستردگی واکوئل های رنگی بافت بوده لذا بافت پیشنهادی در این روش لزوما باید رنگی بوده و ماده رنگی پایه معدنی داشته (حلال در آب باشد) و در واکوئل ها ذخیره گردد تا کاربر بتواند به راحتی در زیر میکروسکوپ محدوده واکوئل ها را تشخیص دهد. نمونه هایی نظیر گوجه فرنگی، خرمالو و توت فرنگی برای این تست مناسب نیستند، در عوض بافت هایی مثل کلم قرمز یا پیاز قرمز نمونه های مناسبی هستند.۲- تمامی نمونه ها با توجه به نوع بافت باید از منطقه ای مشخص انتخاب شوند.

نمونه ها پس از برش گیری در ابعاد ۴ تا ۸ میلی متر مربع درون محلول ها غوطه ور شده و پس از بافت گذاری در آخرین شیشه ساعت ۱۵ -۲۰ دقیقه فاز تاخیری در این آزمایش بوده که با توجه به معادله انتشار (قانون فیک) زمان لازم برای جابجایی مولکول های آب بین بافت و محیط جدیدی است که هریک از نمونه ها در آن قرار داده شده اند.

دیاگرام زیر می تواند دیدگاه نوینی از چگونگی حرکات مولکول آب را برای ما آشکار سازد:

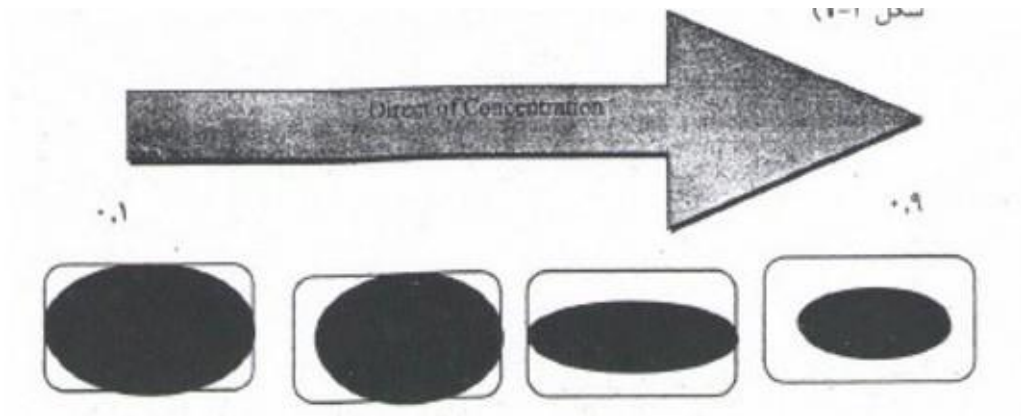


دیاگرام فوق چگونگی جابجایی مولکول های آب را بین محیط های جدید وسلول های بافت مورد آزمایش نشان می دهد. مهمترین نکته در این دیاگرام منطقه ایست که جهت حرکت مولکول های آب عوض شده که در حقیقت همان منطقه ایزوتونیک را مشخص می سازد.

همانگونه که قبلا اشاره شده علت اصلی این تغییرات اختلاف غلظت محیط های استاندارد ساکارزی و شیره سلولی بافت بوده که نیروی اصلی برای حرکت آب بین بافت و محیط اطرافش را فراهم کرده است.

سلول ها همیشه می خواهند مثل محیط خود باشند.

اهمیت واکوئل های رنگی در این آزمایش به سبب تعیین محدوده آن درون لومن (حفره) سلولی می باشد تا به راحتی بتوان عقب نشینی واکوئل ها را تشخیص داد. تصاویر زیر نشاندهنده این مورد می باشند:



پس از مدت زمان ۲۰ دقیقه (زمان لازم برای انتشار) اسلایدهای لازم (لام) را از نمونه ها تهیه نموده و برای مشاهدات میکروسکوپی آماده می کنیم.

پس از مشاهده نمونه ها در زیر میکروسکوپ در هر غلظت شروع به شمارش سلول های I.P می کنیم. I.P مخفف سلولی که در حالت آغاز پلاسمولیز قرار گرفته است.

I.P= Incipient plasmolysis

همه سلول ها I.P در نظر گرفته می شوند، مگر سلول هایی که تورژسانس کامل هستند.

شکل های زیر در تشخیص سلول های I.P و تورژسانسی به ناظر کمک می کنند:

در شرایط ایزوتونیک ۵۰ ٪ از سلول ها در حالت I.P بسر می برند و لذا ۵۰ ٪ باقیمانده در حالت تورژسانس کامل هستند.

پس از انجام شمارش در بزرگنمایی ۴۰× باید دقت شود که تعداد کل سلول ها از ۱۰ سلول رنگی کمتر نبوده، و سلول هایی که به هر دلیل پیگمان خود را از دست داده اند به هیچ عنوان شمارش نمی کنیم. سپس درصد سلول های I.P را برای هر غلظت طبق فرمول زیر محاسبه نموده و نتایج را در غلظت های مختلف مقایسه می کنیم.

$$\%\ \text{Of I.P. Cell} = \frac{\text{I.P. Cell}}{\text{Total Cell}} \times 100$$

اندازه گیری پتانسیل آبی بافت گیاهی به روش گرانی سنجی (وزنی)

همه موجودات زنده از جمله گیاهان نیازمند ورود انرژی آزاد آب برای حفظ و ترمیم ساختار های خود، رشد و تولید مثل می باشند. پتانسیل شیمیایی آب بیان کمی انرژی آزاد آب است. از دیدگاه ترمودینامیک انرژی آزاد نشانگر توان انجام کار است. به دلایل تاریخی فیزیولوژیست های گیاهی اغلب از واژه پتانسیل آبی به جای پتانسیل شیمیایی آب استفاده می کنند. پتانسیل آبی انرژی آزاد آب در واحد حجم است.

اندازه گیری پتانسیل آب بافت گیاهی روش مناسبی برای سنجش مقدار آب سلول ها و بافت های گیاهی می باشد. پتانسیل آب بافت گیاهی میزان تشنگی و کمبود آب بافت گیاهی را نسبت به یک سیستم استاندارد نشان می دهد. هرچه پتانسیل آب سلول یا بافتی منفی تر باشد. یعنی بافت فوق تشنه تر است و کمبود آب بیشتری دارد. بنابراین توانایی جذب آب توسط آن سلول یا بافت بیشتر است و بالعکس.

پتانسیل آب تمامی سیستم ها از جمله بافت گیاهی همیشه عدد منفی است. پتانسیل آب درجه کمبود آب سیستم نسبت به آب مقطر می باشد و درجه کمبود آب، آب مقطر صفر است یعنی آب مقطر اصلا تشنه نیست و کمبود آبی ندارد.

سه عامل مهم پتانسیل آبی در گیاهان را متاثر می سازد: غلظت، فشار و جاذبه. پتانسیل آب با رابطه زیر بدست می آید:

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g$$

Ψ_s: پتانسیل ماده حل‌شده یا پتانسیل اسمزی است و اثر عوامل حل‌شده را بر میزان پتانسیل آبی نشان می‌دهد. مواد حل‌شده سبب کاهش سطح انرژی آزاد آب می‌شوند.

Ψ_p: پتانسیل فشار، فشار هیدرواستاتیک محلول است. فشار مثبت، پتانسیل آبی را افزایش می‌دهد و برعکس فشار منفی پتانسیل آبی را می کاهد.

Ψ_g: پتانسیل جاذبه وابسته به ارتفاع است که آب در بالاتر از سطح استاندارد آب قرار دارد. جاذبه سبب می‌شود تا آب در جهت نیروی جاذبه به‌سوی پایین کشیده شود.

با توجه به این‌که مطالعات پتانسیل آبی در سطح یاخته‌ای انجام می‌شود معمولاً از محاسبه Ψ_g صرف‌نظر می‌گردد. درنتیجه پتانسیل آبی یاخته گیاهی با رابطه زیر قابل اندازه‌گیری است:

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p$$

روش کار:

در ۶ لوله آزمایش غلظت های ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ از ساکارز را تهیه کرده و سپس یک عدد سیب زمینی درشت را به کمک چوب پنبه سوراخ کن در چند محل سوراخ کنید و استوانه های حاصله را که دارای قطر مشابهی می باشند عرضا به قطعات کوچکتری که وزن هریک از آنها در حدود ۳ گرم باشید تقسیم کنید.

برشهایی را که از هر قطعه استوانه ای شکل بدست آمده است به سرعت در آب شست و شو دهید و پس از خشک کردن وزن کنید (P گرم) و در لوله های آزمایش حاوی محلول ساکارز وارد کنید. این عمل را به ترتیب در مورد قطعات استوانه ای شکل دیگری از سیب زمینی که در ظرف سرپوشیده باقی مانده اند تکرار کنید و دقت کنید که تعداد برشها به یک اندازه باشد. برشها را مدت ۲ ساعت به حال خود بگذارید. سپس به ترتیب از محلول ها خارج کرده و پس از خشک کردن وزن کنید. (P1). سپس درصد تغییرات وزن قطعات را نسبت به وزن اولیه آنها از فرمول زیر محاسبه کنید و منحنی تغییرات وزن قطعات را نسبت به تراکم ساکارز رسم کنید و تراکمی از ساکارز را که در آن وزن قطعات مذکور به طور محسوس تغییر ننماید را بدست آورید. هدف آن است که محلولی یافت شود که در آن وزن یا حجم تغییر نکند، یعنی اینکه بافت نه آب بگیرد و نه آب از دست بدهد: در چنین محلولی بافت و محلول در تعادل اسمزی هستند، یعنی پتانسیل آب بافت ها و محلول خارجی برابرند؛ لذا اگر پتانسیل آب این محلول خارجی را محاسبه کنیم، پتانسیل آب سلول ها بدست خواهد آمد.

$$\frac{P-P_1}{P} \times 100$$

پتانسیل آبی هر بافت برابر است با محلولی که در آن حداقل تغییرات وزنی صورت گرفته است.

آزمایش های تعرق و تنفس در گیاهان

مطالعه باز و بسته شدن روزنه ها و محاسبه تعرق در گیاهان

هنگامی که قصد مطالعه بر روی روزنه ها را داریم، ابتدا می بایست خصوصیات بافت اپیدرمی را مورد بررسی قرار دهیم. در یک منظر کلی سیستم بافت اپیدرمی که وظیفه پوشش دادن بافت ها و عموما ساختار اولیه را بر عهده دارد. بافتی اولیه و مرکب بوده که تنوع سلولی در آن به شرح زیر است:

تقسیم بندی تنوع سلولی در بافت اپیدرمی: سیستم بافت اپیدرم، بافتی مرکب در گیاهان که از سه گروه سلول، سلول های معمولی (سنگ فرشی) : Epidermal Cell، سلول های روزنه ای (Stomata) و کرک (Trichomes) تشکیل شده است.

ویژگی بافت اپیدرم: ۱-بافت اپیدرم مرکب بوده و دارای سلول هایی زنده و فعال است. ۲- دارای پوششی از کوتین یا موم و یا تلفیقی از هر دو. ۳- سلول هایی تقریبا هم شکل دارند ۴- واکوئل های بزرگی دارند.۵- فاقد کلروپلاست هستند البته به استثنا گیاهان آبزی، خزه ها و هپاتیک ها که در اپیدرم خود دارای کلروپلاست می باشند. ۶- به جای کلروپلاست دارای آمیلوپلاست است. ۷- اپیدرم ممکن است به صورت چند لایه باشد. ۸- دارای تعداد زیادی پلاسمودسم است. ۹- فاقد فضاهای بین سلولی هستند. سلول های معمولی اپیدرمی که در گیاهان عالی دارای مشخصات زیر می باشند سلول های تقریبا حجیم و متحدالشکل، فاقد فضای های بین سلولی و کلروپلاست و الگوی ضخیم شدن دیواره در آنها با سایر سیستم های بافتی متفاوت بوده ؛ضخامت دیواره سلولی در آنها از الگوی خاصی پیروی نموده بطوریکه در سطح عمود به سطح، مماس با سطح خارجی (بیرونی) ضخیم تر است، وظیفه شان نیز حفاظت بوده، در همسایگی سلول های معمولی اپیدرمی، سلول هایی هستند که ابتدا از نظر شکل ظاهری متفاوت بوده وتفاوت های دیگری را نیز از قبیل وجود فضاهای بین سلولی؛ کلروپلاست و ضخامت متفاوت دیواره سلولی با سلول های همسایه خود داشته، و وظیفه کنترل تبادلات مولکول ها در فاز گار را برعهده دارند. ولی بارزترین و مهمترین اختلاف آنها عملکرد و عکس العمل این سلول ها در برابر نور بوده که در سایر سلول های اپیدرمی قابل مشاهده نیست. همانطور که می دانیم سلول های روزنه ای (گیاهان معمولی) در روز باز و در شب بسته اند، عده ای از دانشمندان بر این عقیده اند که برخی از گیرنده های نوری که عمدتا فیتوکروم های متصل به غشا های کلروپلاستی می باشند، انرژی تابشی را دریافت نموده و از این پس گروهی از فرایندها و مکانیسم های فتو بیوشیمیایی بصورت زنجیر وار رخ داده که سبب افزایش غلظت شیره سلول های محافظ روزنه ای در ابتدای روز (صبح) می گردد. لذا سلول های روزنه ای از نظر غلظت شیره سلولی نسبت به سلول های اطراف (سلول معمولی اپیدرمی) کمی غلیظ تر می شوند. در نتیجه براساس قوانین انتشار و تغییرات پتانسیل اسمزی حجم قابل توجه ای از مولکول های آب از محیط اطراف وارد سلول های محافظ روزنه ای شده و همانند هر سیستم زنده ای که آب دریافت نماید، سلول روزنه ای نیز متورم شده و تورژسانس می یابد و در اثر ویژگی های خاص دیواره های سلولی خود و کشش جانبی وارده بر فضای بین سلولی موجود، سبب باز شدن Ostiol یا منفذ روزنه می گردد و اصطلاحا گفته می شود که روزنه ها باز شده

اند. این پدیده شب، در جهت عکس رخ داده و روزنه ها با کاهش غلظت شیره سلولی خود نسبت به محیط اطراف مواجه شده و در نتیجه مقداری از آب موجود در سلول های محافظ روزنه در اواخر روز خارج شده و سلول روزنه ای دچار پلاسمولیز نسبی شده، که به دلیل تراکم ناهمگون میکروفیبریل های سلولزی و اعمال فشار های جانبی در جهت عکس قطر منفذ کاهش یافته و اصطلاحا به این سول روزنه، روزنه بسته گفته می شود.

مواد و وسایل مورد نیاز آزمایش:

لام و لامل، ارلن، بشر، پی پت ۵ و ۱۰، لوله آزمایش، تیغ و پنس، میکروسکوپ

مواد: محلول یک مولار ساکارز، آب مقطر، تعدادی برگ گیاه دولپه علفی.

از آنجایی که اثر غلظت مورد بررسی قرار می گیرد می بایست از مواد و محلول هایی در محیط استفاده گردد که قابل نفوذ در غشا نبوده که قند ساکارز در مورد سلول های اپیدرمی گزینه مناسبی می باشد، لذا غلظت های استاندارد قند ساکارز از ۰/۹ تا ۰/۱ مولار ساخته (براساس جدول محلول سازی)

شماره لوله / محلول	لوله ۱	لوله۲	لوله۳	لوله۴	لوله۵	لوله۶
آب مقطر بر حسب cc	5	4	3	2	1	0
محلول ساکاروز۱ مولار بر حسب cc	0	1	2	3	4	5
غلظت نهایی (مولاریته)	۰	۰/۲	۰/۴	۰/۶	۰/۸	۱

درون شیشه ساعت های تمیزی ریخته و سپس برای انتخاب بافت **می بایست گیاهی را انتخاب کنیم که جدا کردن بافت اپیدرمی در آن ساده و آسان باشد،** مثل برگ های بالغ و توسعه یافته اغلب گیاهان دولپه علفی، که در این تست می توان از آنها استفاده نمود. قطعات اپیدرمی بهتر است از اپیدرم پایینی برگ ها جدا گردند و در هر شیشه ساعت ۲ قطعه بافت اپیدرمی را غوطه ور نموده، بهتر است نمونه های بافتی از یک برگ و یا برگ هایی که از نظر سطح برگ (پهنک) یکسان می باشند جدا شده، تا در مرحله دوم در مشاهدات میکروسکوپی اختلاف زیادی در اندازه سلول ها بروز نکند، که باعث دشواری در تشخیص سلول ها گردد. زمان تاخیری برای برقراری تعادل با محیط پس از قرار دادن بافت ها در اخرین شیشه ساعت ۲۰-۱۵ دقیقه می باشد. در این مرحله می توان آزمایش را در ۲ حالت کاملا جداگانه بخش تاریکی و بخش روشنایی انجام داد و نتایج بدست آمده را در هر حالت با یکدیگر مقایسه نمود. در حالت عمومی هنگامی که تست در روشنایی انجام بگیرد؛ پس از گذشت زمان مورد نظر برای تعادل رسیدن بافت و محیط های استاندارد، قطعات بافتی (نمونه های)

مناسب را جدا نموده و لامل گذاری نموده بطوریکه از هر شیشه ساعت یک نمونه برداشته و روی لام قرار داده و با قطره چکان یک قطره از محلول اطراف نمونه را نیز بر روی آن می چکانیم و سپس لامل را قرار می دهیم، حال میکروسکوپ را روشن کرده و ابتدا لنزهای چشمی و شیئی ۱۰ و ۴۰ را با پنبه و الکل تمیز می نماییم، سپس نمونه ها را به ترتیب غلظت هایشان زیر میکروسکوپ قرار داده و میکروسکوپ را تنظیم نموده و با بزرگنمایی ۴۰ سلول های روزنه ای را مورد بررسی قرار می دهیم (بر اساس معیار باز وبسته بودن روزنه ها) البته باید دقت نماییم دیافراگم کمی بسته و شدت نور کم باشد تا روزنه ها را بهتر مشاهده نماییم. در بزرگنمایی ۴۰، در دو میدان دید به صورتی در هر میدان دید حداقل ۱۰ سلول روزنه ای وجود داشته باشد، انتخاب نموده و سپس تعداد کل سلول های روزنه ای T و تعداد روزنه های بسته C را با دقت شمارش نموده و نتایج را یادداشت می نماییم.

تعرق و اندازه گیری آن

به تبخیر آب از گیاه تعرق گفته می شود که شدت تعرق در گیاهان مختلف متفاوت است و در حدود ۹۰ تا ۹۵ درصد تعرق از طریق روزنه ها صورت می گیرد که بازو بسته شدن روزنه ها در عمل تعرق تاثیر بسزایی دارد.

به همین دلیل عمل تعرق و اثر روزنه ها را بر این عمل مطالعه می کنیم.

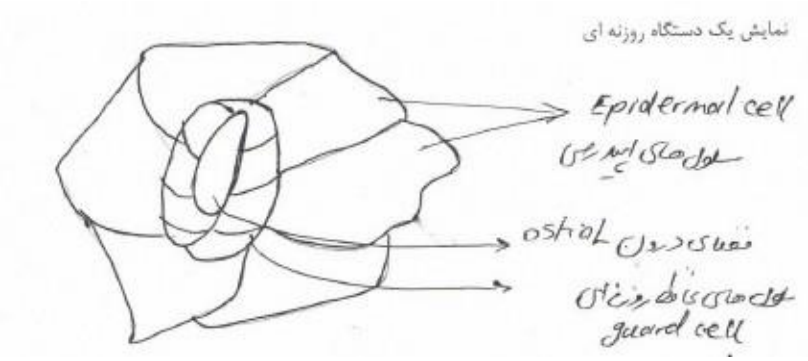
زمانی که آب از سطح سلول تبخیر شده و به فضای بین سلول ها وارد می شود، حرکت آب به خارج از برگ در نتیجه انتشار صورت می گیرد. کوتیکول ورق نازک مومی که سطح برگ ها را می پوشاند، در مقابل حرکت آب یک مانع محسوب می گردد. بنظر می رسد که تنها در حدود ۵ درصد آب کاهش یافته از سطح برگ ها از طریق کوتیکول خارج می شود. تقریبا همه آب از دست رفته برگ ها بوسیله انتشار بخار آب از میان منافذ کوچک دستگاههای روزنه ای که تقریبا به تعداد زیادی در سطح پشتی وجود دارند، صورت می گیرد. یک دستگاه روزنه ای شامل دو سلول لوبیایی شکل است که در بین آنها سوراخی به نام روزن یا ostiol وجود دارد. علاوه بر این ها سلول هایی به نام سلول های محافظ یاGuard cell نیز وجود دارد که توسط سلول های همراه و منفذ سلول های محافظ مجموعا به نام مجموعه روزنه ای Stomatal complex نامیده می شود.

از ویژگیهای سلول محافظ روزنه، ضخامت دیواره آنها است که به مراتب بیشتر از سلول های بشره ای است. بطور مثال ضخامت ۵ میکرومتر دیواره سلولهای محافظ روزنه در مقابل ضخامت ۱ تا ۲ میکرومتر سلولهای اپیدرمی قابل ملاحظه است.

باز شدن روزنه در نتیجه افزایش فشار تورژسانس سلول های محافظ روزنه ای است. در غشا سلول های محافظ یک پمپ پروتونی ATPase وجود دارد که در نتیجه فعال شدن کلروپلاست های سلول های محافظ توسط پرتو های فعال فتوسنتزی photosynthetic active radiation(PAR) بکار می افتد. این پمپ مذکور توسط

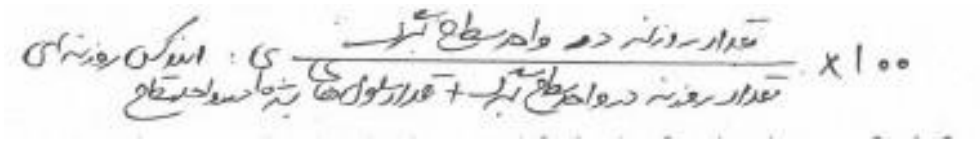
یک سیستم پذیرنده نوری دیگری که نسبت به نور آبی حساس است، فعال می شود. ATP لازم جهت فعال شدن پمپ از طریق کلروپلاست و یا میتوکندری تامین می شود.

نمایش یک دستگاه روزنه ای



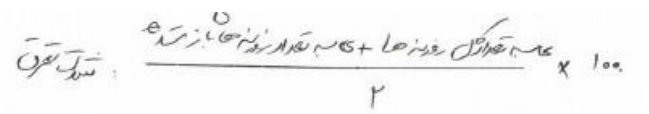
فراوانی روزنه ها یا تعداد روزنه در واحد سطح برگی در برگهای مختلف متفاوت است، با توجه به مطالعات انجام شده، درگیاهان مختلف به نظر می رسد که در گونه های درختی بطور عموم فراوانی روزنه زیاد است در حالیکه در گیاهان خشکی زی Xerophytes فراوانی روزنه کم می باشد.

فراوانی روزنه ها براساس اندازه سلول تغییر می کند و سلول های محافظ کوچکتر اغلب همراه با فراوانی روزنه بیشتر هستند. بر همین اساس اصطلاح ایندکس روزنه ای Stomatal index که در ارتباط با تعداد روزنه در واحد سطح برگ به مجموع تعداد سلول های بشره ای و سلول های محافظ در واحد سطح برگی است را معرفی کرد.



به نظر می رسد که ایندکس روزنه ای برای برگ های یک گیاه مشخص که ثابت باشد. البته در همه گونه ها ثابت نیست. زیرا دیده شده که در *Vigna sinensis* شدت و کیفیت روشنایی دریافت شده توسط برگ گیاه ایندکس روزنه ای را تحت تاثیر قرار می دهد.

در این آزمایش برای مشاهده شدن باز و بسته شدن روزنه ها و محاسبه شدت تعرق در گیاه از فرمول زیر استفاده می کنیم:



آزمایش تنفس در بافتها

جهت نشان دادن تنفس در بافت ها ابتدا سه لوله آزمایش انتخاب کنید. در لوله اول قطعات خرد شده بافت را قرار دهید. در لوله دوم پس از پختن قطعات بافت را در آن قرار دهید و در لوله سوم که به عنوان شاهد است هیچگونه بافتی قرار ندهید. سپس محلول رقیق شده ای از متیلن بلو را روی آن ریخته (حدود دو سانتیمتر) و یک لایه روغن زیتون یا پارافین مایع به ضخامت یک میلی متر مکعب جهت جلوگیری از هرگونه تماس با اکسیژن هوا بر روی آن می ریزید، سپس هر سه لوله را در بن ماری با حرارت حدود ۴۰ درجه قرار دهید. پس از گذشت زمان حدود دو ساعت آنها را بررسی نموده و نتایج را یادداشت کنید.

تفسیر نتایج:

در طول گلیکولیز و سیکل کربس، اکسیداسیون مواد آلی موجب تولید کوانزیم های احیا شده مانند NADH2 می شود. این کوانزیم ها هیدروژن را به زنجیره انتقال الکترون منتقل می کنند. هر اتم هیدروژن شامل یک پروتون H^+ و یک الکترون است. زنجیره انتقال الکترون شامل یک سری حامل های پروتئینی الکترون است که الکترون ها را از $NADH_2$ به یک دریافت کننده نهایی الکترون مانند اکسیژن تحویل می دهند.

حال اگر به جای اکسیژن که جاذب هیدروژن و الکترون است، ماده گیرنده دیگری مانند متیلن بلو باشد می توان این کیفیت را مشاهده کرد. در این آزمایش متیلن بلو الکترون های حاصل از زنجیره انتقال الکترون را جذب کرده و درحالت احیا بی رنگ می شود و اگر تنفس انجام نشود (در حالت پخته) متیلن بلو تغییر رنگ نخواده داد. درلوله شاهد نیز چون هیچ بافتی وجود ندارد پس رنگ متیلن بلو تغییر نخواهد کرد و آبی می ماند.

آزمایش های مطالعه رنگیزه های فتوسنتزی و غیر فتوسنتزی گیاهان

جداسازی رنگیزه های فتوسنتزی به روش کروماتوگرافی کاغذی

رنگیزه های فتوسنتزی به مولکول هایی اطلاق می شوند که توانایی جذب نور و تبدیل آن به انرژی شیمیایی را دارا باشند. چنین مولکول هایی را رنگیزه و یا رنگدانه می نامند. این مولکول ها به سه گروه اصلی تقسیم می شوند: **کلروفیل ها،کارتنوئید ها ،فیکوبیلین ها**

کلروفیل ها: در حدود ۱۰ نوع کلروفیل تاکنون شناسایی شده است که مهمترین آنها کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل c، کلروفیل d، و باکتریوکلروفیل می باشند. اسکلت مولکولی کلیه کلروفیل ها یکسان است و تفاوت ها فقط در برخی از شاخه های جانبی دیده می شود. تمامی این مولکول ها از چهار حلقه پیرول و یک اتم منیزیم تشکیل شده اند که مجموعا بخش پورفیرین نامیده می شود. این قسمت هیدروفیل یا به عبارتی آبدوست می باشد. بر روی یکی از حلقه ها زنجیره ۲۰ کربنی قرار دارد که فیتول نام دارد و آبگریز می باشد.

مولکول کلروفیل به واسطه بزرگ بودن و جدا بودن دو بخش قطبی و غیر قطبی آن اصطلاحا آمفی پاتیک نامیده می شود.

این نوع مولکول ها در حلال های غیر آلی مانند آب به راحتی حل نمی شوند و برای حل کردن آنها بایستی از حلال آلی استفاده نمود. حلال های مانند الکل، استون، تتراکلرور کربن، بنزن، اتر، اترنفت و بنزین مناسب هستند.

کلروفیل a تنها رنگدانه ایی است که می تواند انرژی نورانی را به انرژی شیمیایی تبدیل نماید و سایر انواع کلروفیل چنین توانایی را ندارند، بدین جهت کلروفیل a را رنگیزه اصلی و مابقی را رنگیزه کمکی می نامند. جایگاه کلروفیل درون کلروپلاست و بر روی تیغه های تیلاکوئید می باشد این نوع مولکول ها به رنگ سبز، آبی، سبز-زرد و سبز دیده می شوند. در گیاهان عالی بیشترین مقدار کلروفیل مربوط به کلروفیل a و سپس کلروفیل b می باشد و سایر کلروفیل ها از نظر مقدار جزئی هستند.

در اکثر جلبک ها کلروفیل b دیده نمی شود و به جای آن سایر کلروفیل ها مانند کلروفیل c و یا کلروفیل d بیشتر مشاهده می شوند. از نظر رنگ نیز کلروفیل ها با یکدیگر تفاوت دارند کلروفیل a سبز مایل به زرد و کلروفیل b سبز مایل به آبی است.

کاروتنوئید ها: کاروتنوئید ها مولکول های به رنگ های زرد، قرمز، قهوه ای، بنفش، نارنجی و ... می باشند و در گروه کاروتن ها و گزانتوفیل ها طبقه بندی می گردند.

کاروتن: مولکولی با فرمول شیمیایی $C_{40}H_{56}$ است. مولکول آن خطی و نوعی ترپنوئید و در واقع لیپید می باشد. این مولکول غیر اشباع است و با توجه به محل قرار گرفتن پیوند های دو گانه به انواع مختلفی تقسیم می گردد. برای جدا کردن آن از بافت های گیاهی بایستی از حلال های آلی مانند اترنفت، الکل، استون استفاده نمود.

تمامی کاروتن ها رنگدانه کمکی می باشند و فقط در جذب انرژی نوری و انتقال آن به کلروفیل a دخالت دارند. پراکندگی این رنگدانه در اندام های گیاهی بسیار متنوع تر از کلروفیل می باشد به صورتی که در برگ، میوه، ریشه، قطعات گلپوش و ساقه می تواند وجود داشته باشد. گزانتوفیل: مولکولی با فرمول شیمیایی $C_{40}H_xO_y$ است بنابراین نسبت به کاروتن اتم اکسیژن اضافه دارد. تعداد اکسیژن وارد شده در آن بستگی به پیوند های دوگانه باز شده دارد. مولکول آن خطی و نوعی ترپنوئید و در واقع لیپید می باشد. برای جدا کردن آن از بافت های گیاهی باید از حلال های آلی مانند اترنفت، الکل و استن استفاده نمود. تمامی انواع گزانتوفیل ها رنگدانه کمکی می باشند. پراکندگی این رنگدانه در اندام های گیاهی بسیار متنوع تر از کلروفیل می باشد به صورتی که در برگ، میوه، ریشه، قطعات گلپوش و ساقه می تواند وجود داشته باشد. لیکوپن رنگیزه قرمز گوجه فرنگی از این گروه است.

فیکوبیلین: این رنگیزه یک نوع مولکلول خطی متشکل از چهار حلقه پیرول پیوسته می باشد، که به بخش های پروتئینی غشا تیلاکوئید اتصال دارد. به دلیل عدم وجود این رنگدانه در گیاهان عالی در خصوص ساختار آن بحث نمی شود. در این گروه دو نوع رنگیزه اصلی شناسایی می شود: فیکوسیانین (آبی)، فیکواریترین(قرمز) فیکوسیانین در سیانوفیسه ها و فیکواریترین در جلبک های قرمز دیده می شود.

یکی از روش های جدا کردن رنگیزه ها ی موجود در عصاره گیاه استفاده از تکنیک کروماتوگرافی می باشد. برای اولین بار گیاه شناس روسی به نام میخائیل سویت برای جداسازی رنگ های گیاهی از این تکنیک استفاده نمود. کروماتوگرافی به روش های مختلفی از جمله کروماتوگرافی کاغذی ، کروماتوگرافی لایه نازک یا TLC و کروماتوگرافی گازی است.

کروماتوگرافی کاغذی: در این روش روی کاغذ کروماتوگرام عصاره محتوی ماده مورد نظر را بصورت خطی یا نقطه ای قرار می دهیم و سپس در تانک که حلال مناسبی در آن وجود دارد قرار می دهیم. حلال که فاز مایع را تشکیل می دهد از کاغذ که فاز جامد است بالا می رود و مواد عصاره را جابجا می کند و بسته به وزن مولکولی و درجه حلالیت جسم عصاره در حلال در نقاط مختلف رسوب می نماید.

کروماتوگرافی لایه نازک: شبیه روش قبل می باشد با این تفاوت که بر روی شیشه انجام می شود. بدین صورت که روی شیشه مخصوص ژلاتین ماده مخصوص دیگری می مالند و عصاره روی آن گذاشته می شود و در تانک محتوی حلال مناسب قرار داده می شود. مزیت این روش در این است که از شیشه به دفعات فراوان استفاده می شود و مقرون به صرفه است.

کروماتوگرافی گازی: توسط دستگاه مخصوصی به نام کروماتوگرافی GC انجام می شود. بدین صورت که ماده مجهول را به دستگاه می دهند دستگاه ماده را به صورت بخار گاز در می آورد و منحنی های می دهد. با استفاده و کمک منحنی های استاندارد می توان به وجود ماده و میزان آن پی برد.

در این آزمایش از روش کروماتوگرافی کاغذی استفاده می شود.

مواد و وسایل آزمایش

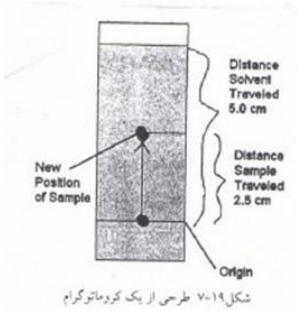
۱-گیاه اسفناج، استن، الکل ۲-هاون چینی، کاغذ کروماتوگرافی، استوانه مدرج یا لوله آزمایش، پی پت پاستور

روش انجام آزمایش

یک برگ اسفناج را شسته و خشک شده را با mL ۳ استن ۸۰ ٪ در هاون چینی بسایید و محلول کلروفیل را تهیه کنید . قطعه کاغذ کروماتوگرافی را طوری ببرید که دارای عرضی کمتر از قطر لوله استوانه مدرج و طولی تقریبا برابر آن داشته باشد. بنابراین استوانه مدرج به عنوان تانک کروماتوگرافی استفاده شده است. در یک انتهای کاغذ کروماتوگرافی به فاصله ۱,۵ سانتیمتر از انتهای با کمک پیپت پاستور یک لکه عصاره رنگی بچکانید و بگذارید خشک شود. این عمل را ۸-۶ بار تکرار نمایید تا آن نقطه کاملا سبز شود. در لوله آزمایش به نسبت (۱/۳) استن و الکل بریزید به نحوی که حدود cm ۱ ته لوله آزمایش یا استوانه مدرج را گرفته و انتهای کاغذ کروماتوگرافی با آن تماس حاصل نماید. بدین ترتیب حلال از کاغذ کروماتوگرافی بالا رفته و مواد مختلف را براساس وزن مولکولی و حلالیت بالا می برد. عمل را تا جایی ادامه دهید که لبه جلویی حلال تا بالای کاغذ بیاید. آنگاه کاغذ را در آورده و بگذارید تا خشک شود و رنگ های ایجاد شده در اثر تفکیک رنگیزه ها را بر روی کاغذ کروماتوگرافی مشاهده کرده و مقدار R_f یا Rate of flowing را که به نوع ماده و حلال بستگی دارد را براساس رابطه زیر برای هر رنگیزه محاسبه نمایید.

R_f =

مسافت پیموده شده توسط حلال / مسافت پیموده شده توسط ماده



شکل ۱۹-۷ طرحی از یک کروماتوگرام

اصول اسپکتروفوتومتری

سنجش جذب توسط اسپکتروفوتومتر از روشهای متداولی است که برای تعیین غلظت مواد استفاده می‌شود. در این روش مقدار پرتوی که یک نمونه در یک طول موج ویژه‌ای جذب می‌کند سنجش می‌شود و جهت تعیین غلظت نمونه استفاده می‌گردد. جذب پرتو توسط مواد چگالی نوری OD (Optical Density) تام دارد.و شکل ۱-۲جذب به صورت زیر تعریف می‌شود.

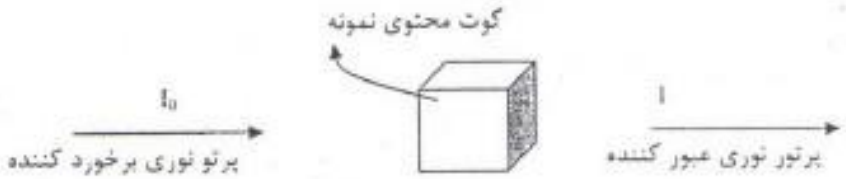
$$A = Log_{10} \frac{I_0}{I}$$

A= میزان جذب پرتو (Absorbance)

I_0= شدت پرتو برخورد کننده به نمونه

I = شدت پرتو عبور کرده (منتشر شده) به وسیله نمونه

Log_{10} = لگاریتم در مبنای ۱۰، نسبت I_0 به I مقدار جذب توسط نمونه را مشخص می‌کند.

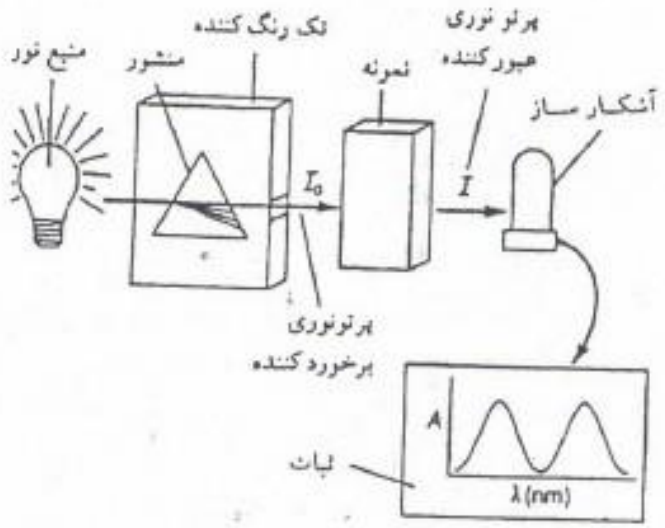


یک پرتو تک رنگ با شدت I_0 از یک نمونه موجود در کووت (Cuvette) با پهنای l (cm) عبور می‌کند.

مقداری از پرتو توسط ماده رنگی موجود در نمونه جذب می‌شود و پرتو با شدت I از نوع خارج می‌شود

سنجش جذب پرتو توسط دستگاه اسپکتروفتومتر

جذب پرتو با استفاده از دستگاهی به نام اسپکتروفتومترسنجش می‌شود.(شکل زیر). بخش‌های اساسی یک اسپکتروفتومتر شامل منبع نور، تنظیم کنندهٔ طول موج، یک منوکروماتور یا فیلتر، یک محفظه نمونه، یک آشکارساز نوری و یک خروجی است. سیستم‌های جدید اسپکتروفتومتری اغلب دارای یک کامپیوتر نیز هستند که برای ذخیره و آنالیز طیف مورد استفاده قرار می‌گیرند.



طرح یک اسپکتروفتومتر

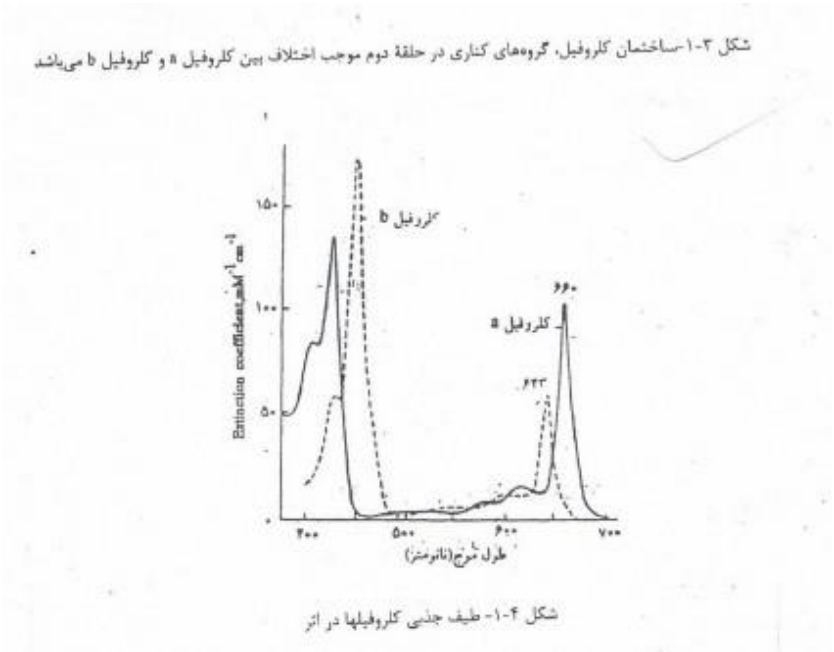
دستگاه دارای یک منبع نور، تک رنگ کننده؛ محل جایگزینی نمونه، یک آشکارساز نوری و یک ثبات و یا از طریق رابط به یک کامپیوتر وصل می‌شود. طول موج خروجی تنک رنگ کننده به وسیله چرخش منشور تعویض می‌گردد. منحنی جذب بر اساس طول موج‌های مختلف طیف نامیده می‌شود.

تعیین تراکم کلروفیل a و b بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر

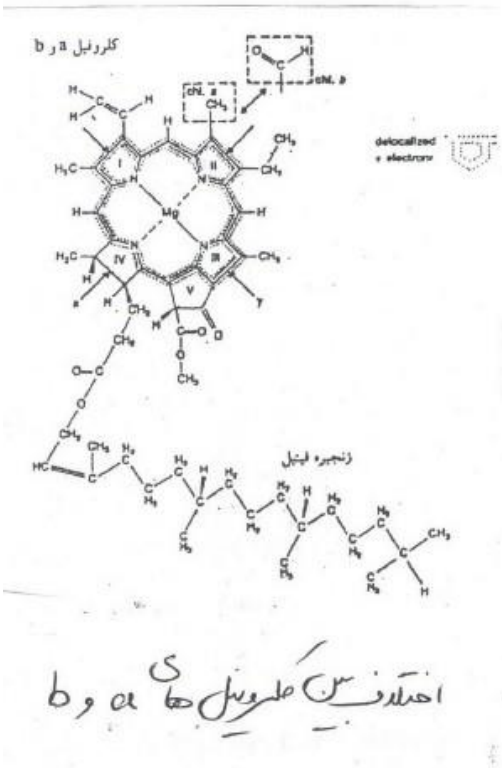
کلروفیل ها رنگیزه هایی هستند که رنگ سبز گیاهان را موجب می شوند و ۴ درصد وزن خشک گیاه را تشکیل می دهند که غیر محلول در آب ولی محلول در حلال های آلی هستند.

کلروفیل a به رنگ سبز مایل به آبی و کلروفیل b به رنگ زرد مایل به سبز هستند. کلروفیل در همه اندام های فتوسنتزی وجود دارد که موجب تولید اکسیژن می شود.

شکل زیر طیف جذبی کلروفیل a و b در حلال اتر را نشان می دهد. فرمول بسته مولکول کلروفیل a $C_{55}H_{72}N_4O_4Mg$ با وزن مولکولی ۸۹۲ کیلو لاکتون و فرمول بسته مولکولی کلروفیل b $C_{55}H_{70}N_4O_4Mg$ با وزن مولکولی 906 کیلولاکتون می باشد.



در آزمایش قبل درباره ساختمان کلروفیل ها بحث شده است. تنها اختلافاتی که بین کلروفیل a و b موجود است در ساختمان آنها است زیرا کلروفیل a در یکی از حلقه ها دارای گروه متیل و کلروفیل b در همان حلقه به جای گروه متیل دارای گروه متیل فرمیل می باشد.



هدف آزمایش

استخراج و جداسازی کلروفیل a و b بوسیله حلال های مختلف، تعیین طیف جذبی کلروفیل a و b به روش اسپکتروفتومتر و اندازه گیری مقادیر کلروفیل a و b.

مواد و وسایل مورد نیاز:

بافت برگ اسفناج استن ۸۰ ٪ کاغذ صافی هاون چینی آب مقطر استوانه مدرج دستگاه اسپکتروفتومتر

روش کار:

مقداری برگ اسفناج تازه را خوب شسته توسط دستمال کاغذی آب آن را گرفته و گلبرگ اصلی را جدا کنید و سپس با ترازو ۵ گرم برگ تازه را با دقت وزن کرده و سپس در هاون چینی قرار دهید و با ۱۵ سی سی استن ۸۰ ٪ خوب بسایید. پس از ساییدن محصول را صاف کنید سپس به حجم برسانید و به هم بزنید و مقدار جذب را در طول موج های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر بدست آورید. دقت کنید هر بار دستگاه را با استن ۸۰٪ صفر کنید.

سپس از روی فرمول زیر و با در نظر گرفتن وزن و حجم، میزان کلروفیل را در 1gr وزن تر ماده حساب کنید.

$chl\,a = (0/127 \times OD_{772} - 0/00\,259 \times OD_{645}) \times 1000 = mg/ml$

$chl\,b = (0/229 \times OD_{645} - 0/00\,658 \times OD_{772}) \times 1000 = mg/$

جداسازی کاروتنوئید ها

کاروتنوئید ها رنگیزه قرمز، نارنجی و یا زرد رنگی هستند که در آب غیر محلول بوده و در داخل پلاست ها (کلروپلاست و کروموپلاست) دیده می شوند و از واحد های ایزوپرن تشکیل یافته اند. کاروتنوئید ها طول موج هایی از نور را جذب می کنند که کلروفیل ها در آن مناطق جذب کمی دارند یا اصلا جذب ندارند و انرژی جذب شده را طی پدیده رزونانس به کلروفیل منتقل می نمایند و بدین ترتیب باعث بازدهی بیشتر دستگاه فتوسنتزی می شوند. کاروتنوئید ها رنگیزه کمکی در تمامی فتوتروف ها هستند. رنگیزه هایی هستند چربی دوست و غیر محلول در آب و شامل دو گروه کاروتن و گزانتوفیل می باشند.

مواد و وسایل آزمایش

۱- هویج
۲- رنده
۳- اتانول
۴- اتر یا اترنفت
۵- دکانتور

روش انجام آزمایش

۱- تهیه کاروتن از هویج

۵ گرم هویج رنده شده را در ۵ میلی لیتر الکل اتیلیک جوش به مدت ده دقیقه حرارت دهید. در موقع حرارت دادن دقت کنید که زیاد گرم نشود. به جای الکل از استن هم می توان استفاده نمود که در این صورت نیازی به حرارت نیست ولی باید استن حاوی هویج را به مدت یک ساعت به حال خود گذاشت. محلول رنگی حاصل را با استفاده از کاغذ صافی صاف کنید و محلول صاف شده را به دکانتور منتقل نمایید. در دکانتور 10mL اتر و 5ml آب مقطر اضافه کنید و پس از تکان دادن آن را به حال خود بگذارید. کاروتن و گزانتوفیل از سایر مواد محلول در الکل یا استن جدا می شوند و جذب اتر می گردند.

۲- تعیین طیف جذبی کاروتن و گزانتوفیل

با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر طیف جذبی کاروتن و گزانتوفیل را در ناحیه ۳۸۰ تا ۶۰۰ نانومتر تعیین کنید. فاصله بین طول موج ها را ۱۰ نانومتر در نظر بگیرید. اعداد بدست آمده را روی محور عمودی و طول موج را روی محور افقی قرار دهید و منحنی طیف جذبی کاروتن و گزانتوفیل را روی کاغذ میلیمتری رسم نمایید و قله جذبی را بدست آورید.

آزمایش بررسی رنگیزه های محلول در آب (رنگیزه های غیر فتوسنتزی)

آنتوسیانین ها مهمترین گروه از رنگدانه های طبیعی بعد از کلروفیل هستند که غیر سمی و محلول در آب بوده و در سطح وسیعی در مایع سلول های گیاهی وجود دارند این رنگدانه های فلاونوئیدی مسیول رنگ های قرمز، آبی، بنفش و در بسیاری از میوه ها، سبزی ها و گل ها می باشند. این رنگدانه ها و به طور کلی ترکیبات فنولیک موجود در سلول های گیاه آن ها را از اشعه ماورای بنفش و نیز حمله حشرات محافظت می نمایند. از طرفی این ترکیبات می توانند به عنوان سوبسترا در واکنش قهوه ای شدن عمل نمایند.

تاکنون حدود ۵۴۰ نوع آنتوسیانین از منابع مختلف گیاهی شناخته شده است. در مواد غذایی چند نوع آنتوسیانین از اهمیت بیشتری برخوردارند که این ساختارها به دلیل جایگزینی قند در کربن سه و پنج و نوع قند می توانند متغیر باشند.

آنتوسیانین ها مهمترین ترکیبات رنگی در بین فلاونوئید ها هستند در بیشتر مواد غذایی رنگی مانند توت فرنگی، تمشک، پرتغال قرمز، کلم قرمز و ... وجود دارند.

یکی از مهمترین عملکرد آنتوسیانین ها در ناحیه مرئی جلب توجه حیوانات، حشرات و پرندگان به گل ها و در نتیجه پراکندگی دانه های آن ها است.

عوامل موثر بر پایداری آنتوسیانین ها:

۱-دما

۲-نور: باعث تخریب رنگ می شود.

۳- مقدار ازت: در محیط با کمبود ازت مقدار آنتوسیانین افزایش می یابد چون در محیط با ازت کم قند ها بیشتر در بافت های گیاهی تجمع کرده و تشکیل آنتوسیانین ها را تسهیل می کند.

۴-اثرpH:آنتوسیانین ها در pHهای مختلف به اشکال شیمیایی متفاوتی تبدیل می شوند. در سیستم های خارج از بدن موجود زنده آنتوسیانین ها می توانند در pHهای متفاوت به فرم های مختلف در آیند. در pHاسیدی آنتوسیانین ها به صورت قرمز رنگ محلول در آب و در محیط قلیایی به رنگ صورتی مایل به آبی در می آیند. pHنه تنها روی رنگ آنتوسیانین ها اثر دارد بلکه باعث استحکام آن ها نیز می شود.

۵. اکسیژن: از مهمترین عوامل تخریب آنتوسیانین ها هستند.

وسایل مورد نیاز:

۱-آب مقطر ۲-KOH ۳-HCl ۴- شیشه ساعت ۵- پیپت ۶- پیاز قرمز ۷- کلم قرمز

شرح آزمایش: ابتدا در زیر هود دو قطره از KOH را درون یک شیشه ساعت می ریزیم. دو قطره هم HCL درون شیشه ساعت دیگر .

سپس دو سه قطره آی در شیشه ساعت سوم ریخته. اپیدرم پیاز و کلم را جدا می کنیم درون هر سه شیشه ساعت می ریزیم. بعد از ۵ دقیقه مشاهدات خود را گزارش می دهیم.

در مرحله ۵ پیاز و کلم درون KOH و HCL را درون آب مقطر می ریزیم و بعد از ۵ دقیقه مشاهدات خود را یادداشت می کنیم.

آزمایش های بررسی فعالیت های آنزیمی گیاهان

بررسی فعالیت آمیلازی بذرهای گندم در حال رویش

بذرهای گندم از دو بخش تشکیل شده اند: جنین دیپلوئید و آندوسپرم ترپیلوئید. جنین شامل یک جنین و یک اندام جذب کننده اختصاصی به نام سپر (Scutellium) می باشد. آندوسپرم از دو بافت تشکیل شده است، آندوسپرم نشاسته ای که در بخش وسط قرار گرفته و لایه آلرون. آندوسپرم نشاسته ای در هنگام بلوغ فاقد حیات بوده و دارای سلول هایی با دیواره باریک هستند که سرشار از دانه های نشاسته می باشند. لایه آلرون، آندوسپرم نشاسته ای را احاطه کرده است و از نظر سیتولوژیکی و بیوشیمیایی کاملا با یکدیگر متفاوت می باشند. سلول های آلرون دارای دیواره های سلولی ضخیم هستند و دارای تعداد زیادی اندامک های ذخیره پروتئینی که دانه های آلرون نامیده می شود و یا اجسام پروتئینی و اسفروزوم های ذخیره لیپیدی می باشند.

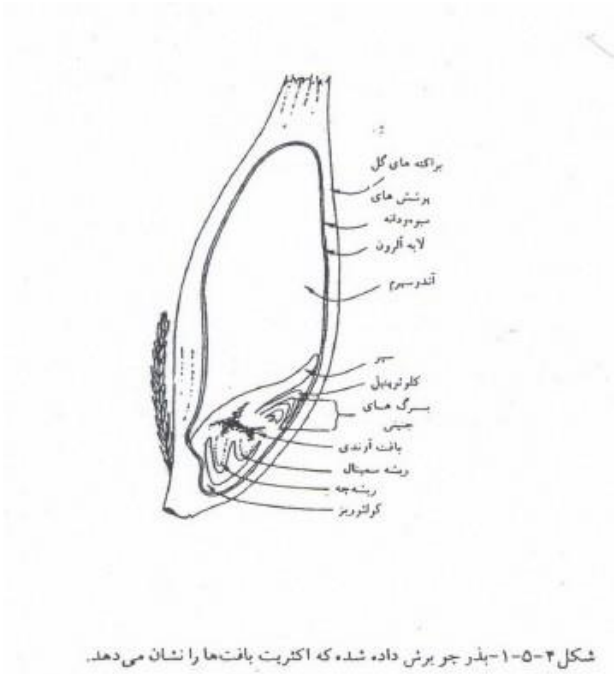
در مدت جوانه زدن اندوخته غذایی ذخیره شده آندوسپرم، به طور عمده نشاسته توسط آنزیم های هیدرولیتیک شکسته شده و به صورت قندهای محلول، اسیدهای آمینه و دیگر فراورده ها به جنین در حال رشد منتقل می شود. دو آنزیم مسئول برای تجزیه نشاسته، α – آمیلاز و β- آمیلاز می باشند. α- آمیلاز بر روی بخش داخلی زنجیره نشاسته اثر کرده و آن را هیدرولیز می کند. فراورده هیدرولیز نشاسته در نتیجه عمل α-آمیلاز اولیگوساکارید ها یا دکسترین های محدود است که شامل باقیمانده های گلوکز هستند.

Bآمیلاز نشاسته را از بخش انتهایی تجزیه کرده و تولید مالتوز می کند که یک دی ساکارید است. مالتوز توسط آنزیم مالتاز به دو باقیمانده گلوکز تجزیه می شود.

آمیلاز در آندوسپرم نشاسته ای دانه های گندم توسط دو نوع بافت ترشح می شود: سپر یا اسکوتلوم و لایه آلرون. اگرچه نقش اولیه سپر جذب فراورده های قندی در مدت تجزیه نشاسته است، ولی این بخش همچنین آمیلاز نیز آزاد می کند و بنابراین در تجزیه نشاسته نیز نقش دارد.

آزمایشات انجام شده در سال ۱۹۶۰، مشاهدات هابرلند را در سال ۱۸۹۰ تایید می کند، به این ترتیب که ترشح آنزیم های تجزیه کننده نشاسته توسط لایه آلرون بستگی به حضور جنین دارد. به طوری که اگر جنین بذر برداشته شود، تجزیه نشاسته حتی در شرایط کشت طولانی بر روی آگار صورت نمی گیرد. به هرحال وقتی که بذر نیمه شده در مجاورت با جنین جدا شده خوابانیده می شود، هضم نشاسته صورت می گیرد. بنابراین جنین یک ماده قابل انتشار تولید می کند که تولید یا سنتز α آمیلاز را در لایه آلرون تحریک می کند.

در تحریک تجزیه نشاسته اسید ژیبرلیک می تواند جایگزین جنین شود. هنگامی که دانه های نیمه شده در محلول بافری در حضور اسید ژیبرلیک خوابانیده می شوند، آزاد سازی آمیلاز به مقدار زیادی در محیط صورت می گیرد.



شکل ۴-۵-۱-بذر جو برش داده شده که اکثریت بافت‌ها را نشان می‌دهد.

روش کار

مواد و وسایل آزمایش

۱-نشاسته۲- لوگول، ۳- بندکیت، ۴- گیاهچه های ۴ روزه گندم، لوله آزمایش، قیف، کاغذ صافی، هاون چینی

تهیه عصاره آنزیمی:

۲۰ تا ۲۵ جوانه گندم را در هاون چینی با مقداری آب مقطر به خوبی می ساییم تا عصاره آنزیمی تهیه شود.

در چهار لوله آزمایش نشاسته می ریزیم. به لوله شماره ۳ و لوله شماره ۴ عصاره آنزیمی اضافه می کنیم.

به لوله شماره ۱ و لوله شماره ۲ بدون افزودن عصاره آنزیمی به ترتیب لوگول و بندیکت اضافه می کنیم.

پس از گذشت ۲۰ دقیقه به لوله شماره ۳ و ۴ به ترتیب لوگول و بندیکت اضافه می کنیم. (پس از گذشت ۲۰ دقیقه آنزیم عمل کرده و نشاسته به واحد های سازنده اش (گلوکز) شکسته می شود.

لوله شماره ۳ و ۴ را در مجاورت حرارت قرار می دهیم.

تغییر رنگ های ایجاده شده در هر ۴ لوله را مشاهده کرده و نتایج را تفسیر کنید.

بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز

آنزیم کاتالاز داری یک گروه غیر پروتئینی حاوی آهن مشابه با هموگلوبین خون است. این آنزیم شکسته شدن H_2O_2 را به اکسیژن و آب کاتالیز می نماید. عمل کاتالیز کنندگی این آنزیم سریعترین پدیده کاتالیز شونده توسط آنزیم ها شناخته شده است.

سنجش کاتالاز مورد استفاده در این تجربه براساس اندازه گیری اکسیژن آزاد شده توسط عمل آنزیم خواهد بود. با این حال حجم اکسیژن آزاد شده به این صورت اندازه گیری نمی شود. بلکه تاثیر شناور کنندگی اکسیژن ایجاد شده بر روی قرص های کاغذ اشباع شده با محلول آنزیم بطور غیر مستقیم توسط ثبت زمان لازم برای رسیدن قرص به سطح محلول H_2O_2 اندازه گیری می شود.

روش کار

الف) طرز تهیه کاتالاز از چمن (*Poa*)

مقدار ۵ گرم چمن را وزن کرده و در هاون همراه با ۴۰ میلی لیتر آب مقطر می ساییم. عصاره بدست آمده را از تنظیف ۲ لایه عبور داده و می گذاریم مدتی بماند تا ذرات درشت و خشن آن ته نشین شوند. سپس لایه بالایی را به ظرف دیگری منتقل می کنیم. مقدار ۲۰ میلی لیتر عصاره بدست می آید که به عنوان کاتالاز ۱ واحد مصرف خواهد شد (چون غلظت کاتالاز موجود در عصاره دقیقا مشخص نیست لذا به عنوان آنزیم ۱ واحد در نظر گرفته می شود). سپس با رقیق کردن عصاره غلظت های ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ و ۰/۰۶۲۵ را بدست می آوریم (هر بار با نصف کردن محلول مادر و هم حجم آن اضافه کردن آب مقطر غلظت ها نصف می شوند.).

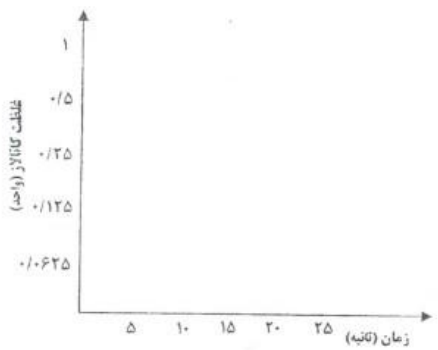
ب) طرز تهیه منحنی فعالیت کاتالاز

۱۰ میلی لیتر H_2O_2 ۳٪ را در یک بشر تمیز ۱۰۰ میلی لیتری بریزید. قرص های کاغذی را به قطر ۱/۳ سانتی متر (قطر یک سکه ۲ ریالی) که با پنس کاملا نوک تیز نگهداشته اید درون محلول کاتالاز ۱ واحد فروکنید تا اینکه از آنزیم اشباع شود. سپس بلافاصله قرص کاغذ را درون بشر محلول H_2O_2 بیندازید. با یک ساعت زمان گیر زمان را بین لحظه ای که قرص کاغذی سطح محلول H_2O_2 را لمس می کند (در حالیکه به ته بشر فرو می رود) تا زمانیکه مجددا به سطح می رسد را یادداشت کنید. به حباب های اکسیژن در اطراف قرص موقعی که در محلول شناور است ایجاد می شود توجه کنید. نتایج را در جدول زیر ثبت کنید.

زمان شناور شدن قرص کاغذی (ثانیه)	غلظت کاتالاز (واحد)
	۱
	۰/۵
	۰/۲۵
	۰/۱۲۵
	۰/۰۶۲۵

۲

با استفاده از این نتایج تراکم کاتالاز را در مقابل زمان شناوری قرص کاغذی در منحنی زیر رسم نمایید:



مواد و وسایل مورد نیاز:

۱- گیاه چمن
۲- آب مقطر
۳- کاغذ صافی
۴- لوله آزمایش
۵- بشر ۱۰۰ میلی لیتری
۶- ٪۳ H_2O_2
۷- تایمر
۸- پنس نوک تیز

بررسی فعالیت هیدرولیزی آنزیم انورتاز

آنزیم انورتاز آنزیمی است که به مقیاس وسیعی در بافت های گیاهی وجود داشته و ساکارز را بطور هیدرولیزی به گلوکز و فروکتوز تجزیه می کند.

Sucrose+ H2O ⟶ D-Glucose+ D-Fructose

این واکنش غیر قابل برگشت بوده و به همین خاطر انورتاز نمی تواند سنتز ساکارز را از گلوکز و فروکتوز انجام دهد. در این کاوش، هیدولیز ساکارز با دخالت انورتاز مورد مطالعه قرار می گیرد و وجود گلوکز در محلول هیدرولیز شده با محلول بندیکت و وجود فروکتوز در محلول با تست تغییر رنگ ثابت می شود.

مواد لازم

مخمر، محلول ساکارز ۲٪ وزنی، معرف بندیکت، سانتریفوژ، حمام آب گرم، اسیدکلریدریک ۰/۰۲۵۰نرمال، رزورسینول

روش کار

۱. ۱۰ گرم مخمر را در ۴۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه به حال خود بگذارید.
۲. مخلوط را به مدت ۵ دقیقه در 500g سانتریفیوژ کنید تا محلول نیمه خالص انورتاز بدست بیاید.
۳. در دو لوله آزمایش به ترتیب ۱۰ میلی لیتر محلول انورتاز بریزید، یکی را در حرارت معمولی آزمایشگاه و دیگری را در حرارت ۱۰۰C به مدت ۳ دقیقه بجوشانید، سپس سرد کنید.
۴. ۲۵ میلی لیتر محلول ساکارز ۲٪ وزنی حجمی به هرکدام از لوله ها بیفزایید.
۵. محلول را به مدت یک ساعت در آزمایشگاه در درجه حرارت 30 درجه سانتیگراد در آون یا حمام آب گرم قرار دهید.
۶. برای شناسایی گلوکز و فروکتوز دو آزمایش زیر را انجام دهید:

تست بندیکت (جهت شناسایی گلوکز)

به ۲ میلی لیتر از هرکدام از محلول ها ۵ میلی لیتر معرف بندیکت اضافه کرده و تغییر رنگ را یادداشت کنید.

تست سیلوانف (جهت شناسایی فروکتوز)

به یک میلی لیتر از محلول هرکدام از لوله ها ۶ قطره کلریدریک به همراه کمی رزورسینول اضافه کنید؛ تغییر رنگ و ظهور رنگ قرمز نشانگر حضور کتوز در محیط است.