دانشگاه تربیت معلم سبزوار

آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی ۲

دکتر محمدرضا واعظی

آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی ۲ ..... ۱

1. ضوءرت نور برای فتوسنتز ۳

مواسرس‌سایل: ۳
وش‌کار: ۳

۲. اندازه‌گیری مقدار فتوسنتز از راه تصاعد اکسیژن ۵

مواسرس‌سایل: ۵
وش‌کار: ۵

۳. اندازه‌گیری فتوسنتز در گیاهان‌س اثر برخی عوامل محیطی بر آن ۷

مواسرس‌سایل: ۷
وش‌کار: ۷
طرز تهیهٔ بافر: ۸

٤. مشاهدهٔ ساختمان برگ در گیاهان سه‌کربنی، چهارکربنی‌س CAM ۹

۵. استخراج مواد رنگی داخل کلوپلاستس تفکیک آن‌ها به طریقه کوماتوگرافی ستونی ۱۰

وش‌های کوماتوگرافی (CHROMATOGRAPHY) ۱۰
س‌سایل‌س مواد لازم: ۱۱
الف: آماده کردن ستوت کوماتوگرافی: ۱۲
ب: استخراج موادرنگی از کلوپلاست‌های برگ: ۱۳
ج: تفکیک رنگ‌های مختلف کلوپلاست به وش کوماتوگرافی ستونی ۱٤

٦. تعیین طیف جذبی مواد رنگی داخل کلوپلاست ۱۵

س‌سایل‌س مواد لازم: ۱۵
وش آزمایش: ۱۵

۷. تعیین مقدار کلوفیل‌س‌اکنش هیل: ۱٦

س‌سائل‌س مواد لازم: ۱٦
وش آزمایش: ۱۷
الف ـ تعیین مقدار کلوفیل محلول کلوپلاست: ۱۷
ب ـ اندازه‌گیری‌س‌اکنش هیل : ۱۸
به سئوالات زیر جواب دهید: ۱۹

۸. تعیین مقدار قندهای احیاءکننده گیاه به وش نلسن (NELSON) : ۲۰

س‌سائل‌س مواد لازم: ۲۰
وش آزمایش: ۲۱
الف ـ رسم منحنی جذب ۲۱
ب ـ رسم منحنی استاندارد: ۲۱
ج ـ تعیین مقدار مونوساکاریدهای احیاءکننده در گیاه: ۲۲

۹. ثبات PH شیره گیاهی طرزکار با PH متر : ۲۳

احتیاط: ۲٤
طرز کار: ۲٤
آزمایش ۱: ۲۵
آزمایش ۲: ۲۵
آزمایش ۳: ۲۵
آزمایش ٤: ۲۵
احتیاط: ۲۵

۱۰. مطالعه آنزیم فسفوریلاز ۲٦

مواسرس‌سایل لازم: ۲٦
وش آزمایش: ۲۷
الف ـ وش استخراج آنزیم: ۲۷
ب ـ اثر حرارت بر وی فعالیت آنزیم فسفوریلاز: ۲۸
طرز تهیه بافر اسیدمالئیک: ۲۹
طرز تهیه محلول نشاسته: ۲۹

۱۱. اثر دملس برخی از مواد سمی بر وی شدت تنفس ۳۰

مواسرس‌سایل لازم: ۳۰
آزمایش ۱: ۳۱
آزمایش ۲: ۳۲
آزمایش ۳: ۳۲

۱۲. رنگیزهای فتوسنتزی (PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS)، طیف جذبی کلوفیل‌س‌کاروتنوئید ۳۳

۱ـمقدمه ۳۳
۲ـساختمان کلوفیل ۳۳
۳ـخواص کلوفیل ۳۵
٤ـهدف آزمایش ۳٦
۵ـمواسرس‌سایل موردنیاز ۳٦
٦ـوش کار ۳۷
٦ـ۱ ـاستخراج کلوفیل، کاروتنوگزانتوفیل ۳۷
٦ـ۲ ـتعیین طیف جذبی کلوفیل‌س کاروتنوئید ۳۷

۱۳. رنگیزه های فتوسنتزی، طیف جذبی کاروتن‌س‌گزانتوفیل ۳۹

۱ـمقدمه ۳۹
۲ـساختمان کاروتنوئیدها ۳۹
۲ـ۱ ـکاروتن ها (Carotenes) ۳۹
۲ـ۱ ـگزانتوفیلها ٤۰
۳ـخواص کاروتنوئیدها ٤۰
٤ـهدف آزمایش ٤۰
۵ـمواسرس‌سایل مورد نیاز ٤۰
٦ـوش کار ٤۱
٦ـ۱ ـاستخراج کاروتن‌س‌گزانتوفیل از هویج ٤۱

۱٤. مطالعه تنفس در گیاهان ٤۲

۱ـمقدمه ٤۲
۱ـمعرفی تنفس در گیاهان بدون کلوفیل ٤۲
۲ـنمایش تنفس بافتها ٤۲
تفسیر ٤۲
۳ـمعرفی تنفس در جوانه های در حال وش:برای این کار از رنگ حیاتی تتراوس‌لیوم کلراید ٤۳
٤ـمعرفی تنفس‌س فتوسنتز به‌س‌سیله معرف بی کربنات ٤۳

۱۵. کشت بافت گیاهی ٤٤

۱ـمقدمه ٤٤
۱ـ۱ ـمحیط های کشت مایع ٤٤
۱ـ۲ ـمحیط های کشت جامد ٤٤
۱ـ۳ ـمحیط های کشت نیمه جامد ٤۵
۱ـ٤ ـمحیط کشت بافت ها ٤۵
۲ـوش کار ٤۵
۲ـ۱ ـمحیط کشت پایه MS (Murashig and Skoog) ٤۵

۱. ضرورت نور برای فتوسنتز

مواد و وسایل:

۱ـ برگ آلومینیم
۲- قیچی
۳- گلدان حسن‌یوسف
۴- گلدان لوبیا
۵- بشر ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ ml
۶- الکل ۹۵ درصد
۷- اجاق‌برقی
۸- محلول لوگل
۹- پتری دیش

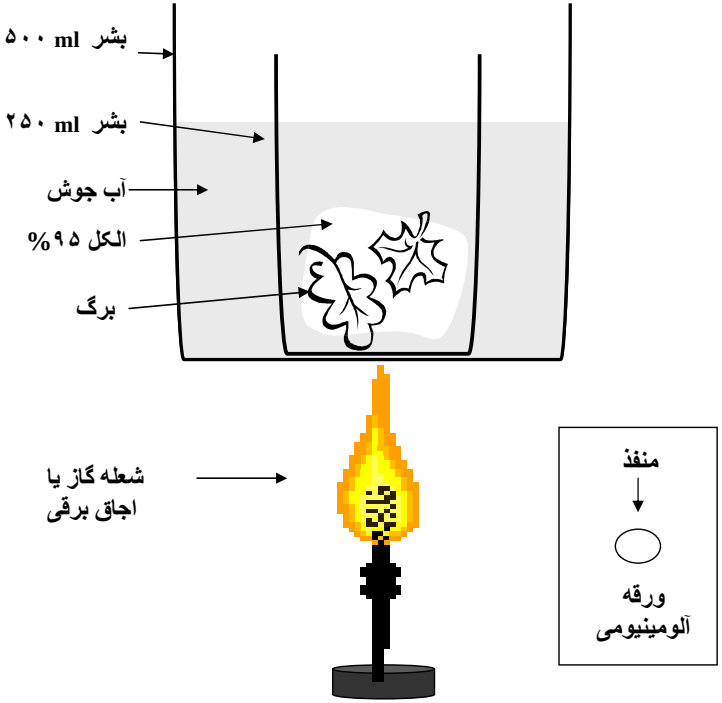
روش کار:

چهار برگ آلومینیومی به ابعاد ۱۵×۱۵ سانتی‌متر برش بزنید. یک دایره به قطر ۵ سانتی‌متر در یک سمت ۴ برگ آلومینیومی کشیده و آن را ببرید. سطح بالایی زیرین یک برگ سالم حسن‌یوسف لوبیا را با برگ آلومینیومی بدون سوراخ بپوشانید دقت کنید که هیچ نوری به برگ نرسد. برگ دیگری از هر کدام از گیاهان مذکور را با برگ آلومینیوم سوراخ‌دار طوری بپوشانید که سوراخ گرد در سطح بالایی برگ قرار بگیرد. گیاهان را در مدت ۲-۳ روز در معرض تابش نور مستقیم آفتاب قرار دهید. گلدان دیگری از هر گیاه فوق را در محل تاریکی به مدت ۲-۳ روز قرار دهید و لی از پوشش آلومینیومی برای برگ‌ها استفاده نکنید.

پس از گذشت ۲-۳ روز به آرامی برگ آلومینومی را از برگ‌ها جدا کرده، برگ‌ها را از گیاه جدا کنید. برگ دیگری را از گیاه که پوشانده نشده، جدا کنید. برگ‌های جدا شده را با یک نخ ببندید در قسمت دیگر نخ، یک برچسب که مشخصات برگ روی آن نوشته شده است، نصب کنید. این شش برگ جدا شده را مدت ۳-۴ دقیقه در آب‌جوش قرار دهید. این عمل باعث مردن بافت‌ها می‌شود. حدود ۹۰ میلی‌لیتر الکل ۹۵ درصد را در بشر ۲۵۰ میلی‌لیتر بریزید. این بشر را در بشر ۵۰۰ میلی‌لیتری دیگری که محتوی آب‌جوش است قرار دهید. برگ‌ها را به الکل منتقل کنید. آب را به آرامی بجوشانید تا کلروفیل از برگ‌ها خارج شود (حدود ۵ دقیقه) .

برگ‌ها را روی پتری‌دیش پهن کنید آن را با محلول لوگل بپوشانید پس از چند دقیقه برگ‌ها را از لوگل خارج کنید محل تشکیل نشاسته را در برگ‌ها مشخص کنید آنگاه سؤالات زیر را پاسخ دهید.

- نشاسته در چه قسمتی از برگ‌های پوشانده شده تشکیل شده است؟
- نقش نور در انجام فتوسنتز چیست؟
- نتایج خود را در مورد گیاهی که در تاریکی قرار گرفته توضیح دهید؟



۲. اندازه‌گیری مقدار فتوسنتز از راه تصاعد اکسیژن

مواد و وسایل:

۱- گیاه الودآ یا هر گیاه آبزی دیگر
۲- محلول بی‌کربنات سدیم ۰/۵ درصد
۳- سربطری لاستیکی
۴- بشر یک لیتری
۵- قیف شیشه‌ای بزرگ
۶- لولهٔ آزمایش
۷- چراغ مطالعه

روش کار:

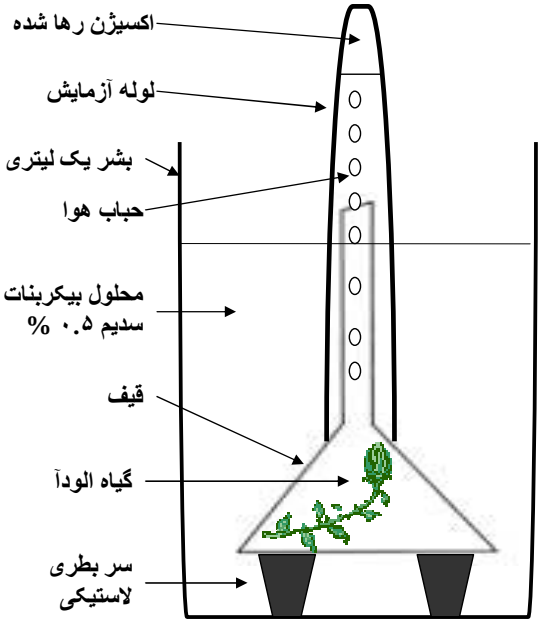
سه چهارم یک بشر یک لیتری را با محلول بی‌کربنات سدیم ۰/۵ درصد پر کنید. قسمت انتهایی ساقهٔ یک گیاه الودآ یا هر گیاه آبزی دیگر را جدا کنید آن را درون قیفی جای دهید. سه عدد سربطری لاستیکی را به عنوان پایهٔ قیف ـ مطابق شکل ـ در بشر قرار دهید. دقت کنید که قسمت انتهایی قیف در زیر آب قرار دارد. لولهٔ آزمایش را پر از آب کنید و ری انتهای قیف برگردانید، به طوری که آبی از لوله بیرون نریزد. لامپی را در فاصلهٔ ۱۰ سانتی‌متری ظرف بشر قرار دهید آن را روشن کنید پس‌ازآن که حباب اکسیژن به طور یکنواخت رها شد، تعداد حباب‌هایی را که در یک دقیقه رها می‌شود برای مدت ۵ دقیقه بشمارید نتایج خود را در جدولی تنظیم کنید. پس از ۵ دقیقه لامپ را خاموش کنید مجدداً چند دقیقه بعد لامپ را در فاصلهٔ ۲۰ سانتی‌متری از بشر قرار دهید آن را روشن کنید. تعداد حباب‌های رهاشده را در مدت ۵ دقیقه شمارش کنید. سپس لامپ را خاموش کرده، این روش را برای فاصلهٔ ۳۰ سانتی‌متری تکرار کنید.

لولهٔ آزمایش را برای آزمایش مرحلهٔ بعدی به اندازهٔ کافی بالا بکشید تا بتوانید انگشت شست خود را سرلوله قرار دهید دقت کنید که آب‌درلوله نشود. لوله را عمودی از آب بیرون بکشید اجازه دهید که باقیماندهٔ آب از لوله به آرامی خارج شود. سرلوله را همچنان پایین نگهدارید. حالا کبریت گداخته‌ای را داخل نمایید. اگر اکسیژن‌وجود داشته باشد، چوب کبریت شعله‌ور خواهد شد.

منحنی مربوط به تعداد حباب‌های رهاشده به ازای هر دقیقه را برای هر فاصلهٔ معین، رسم کنید. نکته: حباب‌های گاز باید اندازهٔ یکسان داشته باشند. بعضی حباب‌ها در اثر روشنایی‌ی گرما در یک طرف ظرف بشر جمع می‌شوند موجب خطا در آزمایش می‌شوند.

نتایج آزمایش را توضیح بدهید بگویید: چرا گیاه الودآ را در این آزمایش بکار می‌برید؟ چه عواملی در طول این آزمایش بطور کامل کنترل نشده‌اند؟ آیا هیچ‌یک از این عوامل می‌توانند خطاهای آزمایش را توجیه کنند، نحوهٔ

تشخیص نوع گاز رهاشده از گیاه الودآ چگونه است؟ آیا فاصلهٔ لامپ از گیاه در میزان حباب‌های رهاشده اثر می‌گذارد؟



۳. اندازه‌گیری فتوسنتز در گیاهان و اثر برخی عوامل محیطی بر آن

فتوسنتز فرایندی است که گیاهان کلروفیل‌دار در طی آن انرژی نورانی را به شیمیایی تبدیل می‌کنند. انرژی شیمیایی حاصل در پیوندهای شیمیایی ترکیبات آلی تولید شده ذخیره می‌شود.

از آن‌جایی که عوامل مختلف مانند نور، co_2، درجه حرارت‌س غیره بر رو‌ی شدت فتوسنتز تأثر دارند با تغییر عوامل مذکور می‌توان شدت فتوسنتز را اندازه‌گیری کرد. آزمایش حاضر، شدت فتوسنتز را باتوجه به تولید اکسیژن توسط قطعاتی از برگ می‌توان اندازه گرفت.

مواد‌س‌سایل:

۱- برگ سبز لوبیا یا گیاه دیگری که کوتیکول ضخیم نداشته باشد

۲- چوب‌پنبه سوراخ‌کن

۳- پتری‌دیش

۴- ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری (با لولهٔ جانبی)

۵- خرطوم خلأ

۶- محلول بافر

۷- محلول ۱۰ درصد $Na\,H\,CO_3$

۸- لامپ ۶۰، ۱۰۰ وا‌ت ۱۵۰ وا‌ت

رو‌ش‌کار:

شش قطعه برگ لوبیا را با چوب‌پنبه سوراخ‌کن شمارهٔ ۳ در‌لوله‌د‌س در حجم معلوم (۵۰ میلی‌لیتر) محلول بافر رو‌ی ارلن بیندازید. ده قطره محلول ۱۰ درصد $Na\,H\,CO_3$ به بافر رو‌ی ظرف بیفزاییدس لولهٔ ارلن را به خرطوم خلأ‌س‌صل کنید. برای بستن در ارلن، یک چوب‌پنبه را خیس کنید رو‌ی د‌رآن بگذارید. حدود ۵ دقیقه مکشس در ارلن کافی است‌س پس از آن خلأ را بشکنید.

ضمن ایجاد خلأ، گاز رو‌ی بافت‌های اسفنجی برگ از رو‌ی قطعات خارج شده، محلول در آن نفوذ می‌کند‌س پس از شکستن خلأ قطعات برگ به ته محلول فرو می‌رو‌د. قطعات برگ سنگین شده را به پتری حا‌ی ۵۰ میلی‌لیتر بافر‌س ۱۰ قطره بی‌کربنات منتقل کنید.

یک پتری دیگر محتوی آب رو‌ی پتری حا‌ی قطعات برگ قرار دهید. اکنون لامپ ۱۰۰ وا‌ت را رو‌شن کنید طوری آن را قرار دهید که نور عمود بر سطح پتری بتابد. ملاحظه خواهید کرد که قطعات برگ به تدریج بالا آمد‌س به سطح محلول می‌رسند. زمان بالا آمدن هر قطعه را یادداشت کنید‌س میانگین بگیرید‌س برای محاسبهٔ شدت فتوسنتز، در فرمول زیر قرار دهید:

$$\text{شدت فتوسنتز} = \frac{۱۰۰۰}{\text{زمان بالا آمدن قطعات برگ برحسب ثانیه}}$$

همان‌طور که می‌بینید، شدت فتوسنتز با زمان بالاآمدن برگ نسبت عکس دارد.

اکنون آزمایش فوق را با لامپ‌های ۶۰س ۱۵۰وا‌تی تکرار کنید‌س اعداد به دست آمده را رو‌ی نمودار ببرید. (شدت فتوسنتز را رو‌ی محور yرو‌س تراکم نور را رو‌ی محور x)س منحنی مربوطه را ترسیم کنید.

آزمایش فوق را عیناً برای غلظت‌های مختلف co_2 در محیط تکرار کنید. (با افزو‌ن مقادیر بیشتری محلول $Na\,H\,CO_3$ به محیط) س منحنی مربوطه را رسم کنید. (میزان بی‌کربنات افزو‌ده شده عبارت است از: ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ قطره).

آزمایش مذکور را می‌توان برای بررسی اثر نورهای تک‌رنگ، درجه حرارت محیطس یا سایر عوامل مؤثر بر فتوسنتز تکرار کنید.

حالا به این سؤالات پاسخ دهید: چرا گیاهی که در این آزمایش استفاده می‌شود نباید کوتیکول ضخیم داشته باشد؟ چرا از محلول بافر برای انجام آزمایش استفاده می‌شود؟ چرا قطعات برگ در پایان آزمایش به سطح محلول می‌آیند.

طرز تهیهٔ بافر:

۱. محلول فسفات سدیم دی‌بازیک $Na_2\,H\,PO_4$: ۷۱/۰۱ در یک لیتر آب‌مقطر

۲. محلول اسید سیتریک: ۲۶ میلی‌لیتر اسید سیتریک را با آب‌مقطر به حجم ۲۵۰ برسانید.

۳. اکنون ۳۰ میلی‌لیتر محلول اسید سیتریک‌س ۴۵/۵ میلی‌لیتر محلول فسفات را مخلوط کنید‌س حجم آن را به یک لیتر برسانید.

۴. مشاهدهٔ ساختمان برگ در گیاهان سه کربنی، چهارکربنی و CAM

برخی از گیاهان مثل ذرت، نیشکر، تاجخروس وحشی و گونه‌هایی از گیاهان خانوادهٔ چتریان و اسفنجیان قادر هستند در کم‌آبی و نیز غلظت کم co_2 به خوبی فتوسنتز کنند. علت این امر، چگونگی تثبیت co_2 در برگ این گیاهان است که به روشی غیر از تثبیت co_2 در گیاهان عادی (گیاهان سه‌کربنی) می‌باشد. در برگ گیاهان چهارکربنی دو نوع سلول حاوی کلوپلاست مشاهده می‌شود: اول سلول‌های مزوفیل برگ که دارای کلروپلاست‌های تیره‌تری هستند؛ دوم سلول‌های درشت اطراف دستجات آوندی که دارای کلروپلاست‌های روشن‌تری می‌باشند. دی‌اکسیدکربن وارد شده در فضای زیر روزنه توسط سلول‌های مزوفیل جذب می‌شود و با فسفوانول پیرووات (PEP) ترکیب شده، اسیدهار چهارکربنی مالیک و آسپارتیک را تولید می‌کند (وجه تسمیهٔ این گیاهان نیز تولید همین اسیدهای چهارکربنی در اولین مرحلهٔ تثبیت co_2 است) . اسیدهای تولید شده پس از ورود به غلاف اطراف آوندها توسط آنزیم مربوطه تجزیه شده، ملکول‌های سه‌کربنی پیرووات و co_2 تولید می‌شود که پیرووات دوباره با ATP تولید شده در اولین مرحله فتوسنتز ترکیب می‌شود و PEP تولید می‌کند (برای ادامهٔ جذب co_2) و co_2 آزاد شده نیز جذب ریولوزبیس فسفات (RuBP) می‌شود (توسط آنزیم RuBP - کربوکسیلاز) وارد چرخهٔ کالوین می‌شود (نظیر فتوسنتز در گیاهان سه‌کربنی) . در حقیقت جذب co_2 و فتوسنتز در گیاهان چهارکربنی دارای یک مرحلهٔ اولیهٔ بیشتر از جذب co_2 و فتوسنتز در گیاهان سه‌کربنی است و چون PEP پیوسته با co_2 دارای فعالیت بیشتری نسبت به RuBP است و علاوه براین، فعالیت PEP برخلاف RuBP با اکسیژن جلوگیری نمی‌شود، بنابراین طبیعی است که گیاهان چهارکربنی در غلظت‌های کمتر co_2 بتوانند به خوبی فتوسنتز کنند.

برای مشاهدهٔ ساختمان برگ در گیاهان چهارکربنی، برش نازکی از برگ ذرت، تاجخروس وحشی، و یا *Atriplex Lentiformis* تهیه کنید و پس از تهیهٔ لام آماده، درشت‌نمایی‌های بالای میکروسکوپ مشاهده و ساختمان برگ آن را رسم کنید.

برای مقایسه می‌توانید برشی نیز از برگ گیاهان سه‌کربنی نظیر شمعدانی، هلو، شب‌بور، و یا بنفشه تهیه کرد. پس از مشاهده ساختمان برگ، شکل آن را رسم کنید.

محتوای کلروپلاستی مزوفیل در کدام‌یک از برگ‌ها یکنواخت است؟ غلاف آوندی در کدام برگ دیده می‌شود؟ آیا اندازه و رنگ کلروپلاست در سلول‌های مزوفیل و غلاف آوندی فرق می‌کند؟ اگر فرق می‌کند، آیا دلیل آن را می‌دانید؟ وضعیت زندگی دو نمونهٔ گیاه مورد آزمایش چگونه است؟

۵. استخراج موادرنگی داخل کلروپلاست و تفکیک آن‌ها به طریقه کروماتوگرافی ستونی

روش‌های کروماتوگرافی (Chromatography)

کروماتوگرافی به معنی اعم عبارت از روش جداسازی و تفکیک مواد و اجزاء تشکیل‌دهنده (Component) مخلوط‌ها و ترکیبات شیمیایی می‌باشد.

در این روش‌ها دو محیط یا فاز به کار می‌رود. یک فاز ساکن (Staining Phase) که معمولاً یک محیط جامد و یا مایع است و دیگری فاز متحرک (Moving Phase) که می‌تواند گاز یا مایع باشد.

فاز متحرک مولکول‌ها را حمل کرده و باعث انتشار آن‌ها در محیط فاز ساکن می‌شود. براساس خاصیت جذب (Absorption) متفاوت مولکول‌ها به فاز ساکن، ترکیبات مختلف در مناطق معین و به فواصل مختلف از مبدأ انتشار آن‌ها آزاد می‌شوند و از دیگر مولکول‌ها و ترکیباتی که در محلول وجود دارند جدا شته و مورد شناسایی قرار می‌گیرند.

ترکیباتی که قابلیت حلایت آن‌ها در فاز متحرک (حلال) زیاد است و تمایل آن‌ها به جذب شدن به فاز ساکن کمتر می‌باشد نسبت به ترکیباتی که قابلیت حلالیت آن‌ها در فاز متحرک کم و جذب آن‌ها به فاز جامد بیشتر است با سرعت بیشتری حرکت کرده مسافت بیشتری را در فاز جامد خواهند پیمود.

روش‌های کروماتوگرافی معمولاً برحسب شکل و جنس و نوع محیط جذب‌کننده ترکیبات (فاز ساکن) طبقه‌بندی می‌شوند. به عنوان مثال در کروماتوگرافی ستونی (Column Chromatography) فاز ساکن یک محیط جامد است که درون یک لوله شیشه‌ای استوانه‌ای قرار دارد. اگر فاز ساکن به شکل یک قشر و لایه روی یک صفحه شیشه‌ای یا پلاستیکی قرار داشته باشد آن را روش T.L.C یا (Thin – Layer Chromatography) گویند و اگر فاز ساکن به صورت ورقه‌های کاغذ باشد آن را کروماتوگرافی کاغذی(Paper Chromatography) می‌نامند.

عمل عبور حلال بدرون فاز ساکن را ظهور یا (Development) کروماتوگرام می‌نامند (کروماتوگرام فاز ساکن است و در مواردی گفته می‌شود که مناطقی که مولکول‌های مواد مختلف از یکدیگر جدا می‌شوند و روی فاز ساکن قرار می‌گیرند یا به وسیله رنگ و یا استفاده از روش‌های شیمیایی تشخیص مواد قابل رویت باشند و این بیشتر در مورد کروماتوگرافی کاغذ صدق می‌کند) . در کروماتوگرافی ستونی محلولی که قرار است ترکیبات درون آن از یکدیگر جدا و تفکیک شوند از درون ستون جامد عبور داده می‌شود و ترکیبات مختلف در قسمت‌های انتهایی ستون جدا می‌شوند. در کروماتوگرافی کاغذی چند قطره از محلول مورد آزمایش به صورت نقطه‌هایی روی یک خط مستقیم در قسمت انتهایی کروماتوگرام قرار داده می‌شود و با قرار گرفتن آن در حلال ترکیبات در حلال حل شده و توسط آن به مناطق مختلف کروماتوگرام برده می‌شوند مسافتی که به وسیله یک ترکیب معین روی کاغذ کروماتوگرافی و تحت شرایط معین (درجه حرارت سیستم - نوع حلال جهت جریان

حلال در فاز ساکن ـ نوع کاغذ و یا محیط فاز ساکن) پیموده شده صفت مشخصه آن ترکیب شیمیایی می‌باشد و توسط همین عامل شناسایی می‌گردد. نسبت مسافت پیموده شده به وسیله یک ترکیب به مسافت پیموده شده توسط حلال به مقدار عددی معروف است.

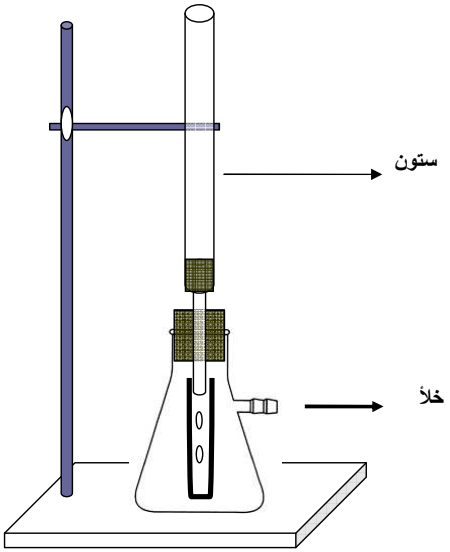
$$Rf = \frac{\text{مسافت پیموده شده از مبدأ توسط ترکیب}}{\text{مسافت پیموده شده از مبدأ توسط حلال}}$$

مقدار Rf برای شناسایی ترکیبات شیمیایی به کار می‌رود بدین ترتیب که ماده مجهول همراه با یک سری ترکیبات شناخته شده و معلوم کروماتوگرافی می‌شوند و مقادیر Rf آن‌ها مقایسه شده و ترکیب مجهول شناسایی می‌گردد. مقادیر Rf های یکسان لزوماً به معنی وجود ترکیبات یکسان در یک محلول مورد آزمایش نمی‌باشد زیرا ممکن است ترکیبات مختلف دارای مقادیر Rf یکسان باشند و در این حالت برای شناسایی ترکیب موردنظر باید روی آن چند مرحله کروماتوگرافی با بکار بردن حلال‌های مختلف انجام داد و همچنین با استفاده از روش‌های آنالیز شیمیایی دیگر، شناسایی ترکیب مجهول را موردتأیید قرار داد.

وسایل و مواد لازم:

۱- ستون کروماتوگرافی که تشکیل شده از لوله شیشه‌ای به طول ۲۰ سانتیمتر و قطر داخلی ۲ سانتیمتر شکل زیر قسمت‌های وابسته به ستون و طرز نصب نمودن آن‌را نشان می‌دهد.

۲- برگ اسفناج
۳- اتر نفت
۴- استن
۵- قیف جداکننده
۶- متانول ۸۰ درصد
۷- کلرورسدیم ۱۰ درصد
۸- سولفات سدیم بی‌آب
۹- پوپانول
۱۰- ترازو
۱۱- هاون
۱۲- قیچی



الف: آماده کردن ستوت کروماتوگرافی:

۱. کمی پشم شیشه در ته ستون قرار داده و با کمک میله همزن شیشه‌ای آن را فشرده کنید.
۲. مقدار کمی پودرشکر به ارتفاع تقریبی ۳ سانتی‌متر در آن بریزید و به وسیله میله شیشه‌ای آن را به آهستگی بکوبید تا فشرده شود.
۳. ۳cm دیگر شکر به آن بیفزایید و فشرده کنید.
۴. اعمال فوق را چندبار تکرار کنید تا ارتفاع پودرشکر فشرده شده به ۱۲ سانتی‌متر برسد.
۵. روی ستون شکر را به ارتفاع تقریباً ۰/۵ سانتی‌متر یا پودر سولفات سدیم بدون آب بپوشاند.
۶. در آخر یک لایه کاغذصافی که قطر آن مساوی قطر داخلی استوانه ستون است روی سولفات سدیم بگذارید. در این حالت ستون آماده است.

ب: استخراج موادرنگی از کلروپلاست‌های برگ:

تذکر: چون در این آزمایش با اتر نفت Petrolium Spirit کار می‌کنید و اتر یک ماده آتش‌گیر است و گاز آن قابل انفجار می‌باشد توجه داشته باشید که در هنگام آزمایش دور از شعله و هرگونه جرقه کار کنید.

۱. مقدار ۱۰ تا ۱۵ گرم از برگ‌های سبز اسفناج (یا هر گیاه دیگر) را با ترازو وزن کنید و آن‌ها را قطعه‌قطعه کرده داخل یک هاون چینی بریزید.

۲. ۵۰ml استون به آن اضافه کرده آن را بسایید تا موادرنگی در استون حل گردد.

۳. محتویات هاون را با گذراندن از ۳ لایه پارچه تنظیف صاف کنید.

۴. محلولی را که از پارچه تنظیف عبور کرده، به قیف جداکننده واجد ۵۰ml اتر نفت انتقال دهید.

۵. ۵۰ml آب‌مقطر به آن اضافه کنید.

۶. قیف جداکننده را طوری در دست بگیرید که سرقیف در کف دست و انتهای قیف که واجد شیر است طرف بالا باشد به طوری‌که با دست راست بتوان شیر را بازوبسته نمود.

۷. حال قیف را به آهستگی تکان دهید ولی توجه داشته باشید که بعد از هر حرکت انتهای شیردار قیف جداکننده را به طرف بالا گرفته و به آهستگی شیر آن را باز کنید تا گاز اتر خارج شود در غیر این‌صورت بر اثر ازدیاد مداوم فشار گاز اتر قیف منفجر می‌گردد. عمل تکان دادن را مدت ۴-۳ دقیقه ادامه دهید تا تمام مواد رنگی به اتر نفت منتقل گردد.

۸. بعد از آن قیف را به حال خود بگذارید تا موادرنگی که در اتر نفت حل گشته است فاز جداگانه‌ای را تشکیل داده و در قسمت بالا قرار گیرد.

۹. قسمت تحتانی را جدا کرده و دور بریزید.

۱۰. ۳۰ml متانول ۸۰ درصد به قیف اضافه کنید و به همان روش قبل تکان دهید. سپس آنقدر آب اضافه کنید که تمام موادرنگی به فاز اتر منتقل گردد.

۱۱. قسمت تحتانی را جدا کرده و دور بریزید.

۱۲. برای اینکه تمام استون از اتر نفت جدا گردد ۳۰ml از محلول کلرورسدیم ۱۰ درصد به قیف جداکننده اضافه کنید و خوب تکان دهید.

۱۳. قسمت تحتانی را جدا کرده و دور بریزید. عمل فوق را تکرار کنید.

۱۴. محلول باقیمانده در قیف جداکننده را (اتر نفت به اضافه موادرنگی کلروپلاست) به یک بشر که واجد ۳ گرم سولفات سدیم بی‌آب است انتقال دهید و ۵ دقیقه صبر کنید تا تمام مولکول‌های آب باقیمانده توسط سولفات سدیم جذب شود.

ج: تفکیک رنگ‌های مختلف کلروپلاست به روش کروماتوگرافی ستونی

۱. مقداری اتر نفت خالص اختیار کرده و داخل ستون کروماتوگرافی که قبلاً آمده کرداید بریزید و از پایین مکش ایجاد کنید تا اتر نفت به طرف پایین ستون کشیده شود ولی توجه داشته باشید که هوا به داخل ستون کشیده نشود، زیرا ستون خاصیت جداکنندگی خود را از دست خواهد داد.

۲. پس‌از آن ۱۰ ml از موادرنگی را که استخراج کرده‌اید به ستون اضافه کنید بقیه موادرنگی را نگاه دارید برای آزمایش بعد

۳. بعد از این‌که تمام موادرنگی جذب ستون شد از بالا اتر نفت خالص به ستون اضافه کنید و عمل ایجاد مکش را ادامه دهید. توجه داشته باشید که ستون نباید خشک شود و باید دائماً اتر نفت به ستون اضافه کنید.

۴. حال بتدریج موادرنگی مختلف از هم تفکیک و جدا می‌شوند. اولین رنگ که باید جدا شود کاروتن می‌باشد. وقتی کاروتن به پائین ستون رسید یک لوله آزمایش درون ارلن خلاء قرار داده و کاروتن را در آن جمع‌آوری کنید.

۵. بعد از جدا شدن کامل کاروتن از ستون، محلول ۰/۵ درصد پروپانول در اتر نفت به ستون افزوده عمل مکیدن را ادامه دهید تا کلروفیل a به رنگ سبز مایل به آبی جدا شود. آن‌را در لوله جداگانه‌ای جمع‌آوری کنید.

۶. لوله آزمایش درون ارلن را عوض کرده و عمل ریختن محلول ۰/۵ درصد پروپانول در اتر نفت را ادامه داده تا کلروفیل b به رنگ سبز مایل به زرد جدا شود.

۷. تذکر: اگر کلروفیل b خیلی کند حرکت می‌کند می‌توانید از محلول ۱ درصد پروپانول نرمال در اتر نفت به ستون اضافه کنید.

۸. در بعضی از برگ‌ها گزانتوفیل یافت می‌شود که بعداز کلروفیل b خارج می‌شود.

۹. می‌توانید برای جدا سازی آن از ۲ درصد پروپانول در اتر نفت استفاده کنید.

۱۰. درب لوله‌های آزمایش حاوی موادرنگی را به وسیله چوب‌پنبه خوب بسته و آن‌ها را در تاریکی قرار دهید تا در جلسه آینده طیف جذبی آن‌ها را اندازه بگیرید.

۶. تعیین طیف جذبی مواد رنگی داخل کلروپلاست

تعداد زیادی از عملیات گیاه من جمله فتوسنتز به وسیله نور انجام می‌پذیرد. در واکنش‌های شیمیایی که تحت اثر نور انجام می‌گیرد نور باید نخست به وسیله مادەرنگی جذب گردد و سپس مورد استفاده قرار گیرد. در آزمایش زیر نورهایی که به وسیله موادرنگی کلروپلاست جذب شده و باعث فتوسنتز می‌شود تعیین می‌گردد.

وسایل و مواد لازم:

۱. اسپکتروفتومتر

۲. موادرنگی استخراج شده از آزمایش قبل

روش آزمایش:

طیف جذبی موادرنگی زیر را که از آزمایش قبل نگاهداری نموده‌اید از ۳۶۰ تا ۷۶۰ nm در فواصل ۲۰ nm اندازه بگیرید:

۱. کلروفیل a

۲. کلروفیل b

۳. کاروتن

۴. گزانتوفیل

۵. موادرنگی اصلی قبل از جدا شدن (که آن را اصطلاحاً کلروفیل خام می‌نامیم)

در این آزمایش طیف جذبی هریک از موادرنگی فوق را تعیین می‌نمایید. سعی کنید بهترین نمونه از هرکدام را برای تعیین جذب انتخاب کنید برای محلول شاهد از حلال مربوطه استفاده کنید.

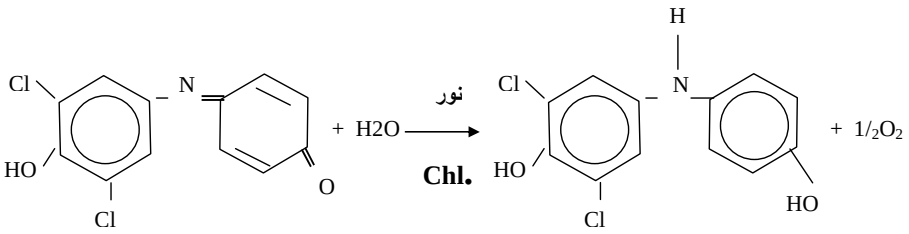
محلول رنگی را طوری رقیق کنید که جذب ماکزیمم آن در نورآبی تقریباً بین ۰/۷ و ۱ باشد.

۷. تعیین مقدار کلروفیل و واکنش هیل:

کلروپلاست را می‌توان طوری از برگ جدا نمود که بعضی از خواص فیزیولوژیکی آن نگهداری شده و از بین نرود.

انرژی نورانی که به وسیله موادرنگی داخل کلروپلاست جذب می‌شود به مصرف انتقال الکترون‌ها به ترکیباتی که خاصیت احیاءکنندگی زیاد دارند می‌شود. به عبارت دیگر نتیجه واکنش‌های فتوشیمیایی تولید ترکیبات احیاءکننده است. برای اولین مرتبه در سال ۱۹۳۰ رابین هیل در انگلستان توانست با استفاده از کلروپلاست استخراج شده Fe^{3+} را به Fe^{2+} احیاء کند. این خاصیت احیاءکنندگی را می‌توان همچنین بوسیله بی‌رنگ شدن ترکیب آبی رنگ *(2,6-DichloroPhenol- IndoPhenol)* و برخی دیگر از ترکیبات که به نام معرف هیل معروف می‌باشد نشان داد.

در طبیعت ترکیب $NADP^+$ در داخل کلروپلاست معروف هیل می‌باشد. در صورتی‌که کلروپلاست با دقت بیشتر و با روش مخصوص از برگ جدا گردد می‌توان فسفوریلاسیون فتوسنتز تثبیت انیدریدکربنیک و خروج اکسیژن را نیز اندازه گرفت. در آزمایش زیر کلروپلاست را از برگ استخراج نموده و خاصیت احیاءکنندگی آن را به وسیله احیاء نمودن معرف فوق *(DCPiP)* مشاهده خواهید نمود این واکنش که در مجاورت نور انجام می‌گیرد به شرح زیر است:



وسائل و مواد لازم:

برگ

معرف *DCPiP* به غلظت $۱/۲\times۱۰^{-۴}$ M

محلول بافرفسفات سدیم به غلظت M ۰/۱ و $pH = ۷/۲$

هاون چینی

سانتری فیوز

نور (لامپ ۱۰۰ وات)

کلرورسدیم به غلظت M ۰/۳۵

پارچه تنظیف

یخ

اسپکترفتومتر

استون

روش آزمایش:

برای اینکه کلروپلاست استخراج شده فعال باشد باید تمام مراحل مختلف استخراج در درجه حرارت نزدیک صفر انجام بگیرد. از این جهت قبل از شروع ظروف شیشه‌ای را در داخل یخ قرار دهید مقداری برگ اختیار نموده و رگبرگ‌های درشت آنرا جدا کنید و سپس ۴ گرم از برگ را وزن کرده و آن را با تیغ قطعه‌قطعه کنید و در هاونی که واجد ۲۰ ml محلول کلرورسدیم می‌باشد و قبلاً در داخل یخ گذاشته‌اید بکوبید. محتویات هاون را از تنظیف (۳) لاعبور داده و عصاره حاصل را در بشر سرد بریزید تفاله داخل تنظیف را بفشارید که عصاره آن بخوبی گرفته شود. برای اینکه قطعات کوچک بافت را از عصاره جدا نمائید محتویات بشر را به لوله سانتریفیوژ منتقل کنید و برای ۵ دقیقه در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتری فیوز کنید. اگر لوله سانتریفیوژ را قبلاً در داخل یخ قرار داده باشید محلول را می‌توان در درجه حرارت اتاق سانتری فیوز کنید بدون اینکه از فعالیت کلروپلاست به طور قابل‌ملاحظه‌ای کاسته شود. محلول سبز فوقانی را به یک لوله سانتریفیوژ سرد دیگر منتقل کنید و برای مدت ۷ دقیقه در ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کنید. سپس محلول فوقانی را بدور ریخته و رسوب را در ۵ ml محلول صفر درجه کلرورسدیم حل کنید. اطراف لوله را با ورقه آلومینیم بپوشانید که نور به کلروپلاست‌ها نرسد و سپس آن را در داخل یخ قرار دهید.از آن‌جایی که غلظت کلروفیل این محلول زیاد می‌باشد به دشواری می‌توان واکنش هیل را اندازه گرفت. از این جهت نخست مقداری نمونه از یک محلول برخواهید داشت و پس از تعیین مقدار کلروفیل آن طوری آن را رقیق می‌کنید که غلظت کلروفیل به mg/ml ۱ درصد برسد.

الف ـ تعیین مقدار کلروفیل محلول کلروپلاست:

مقدار ml ۱ از محلول کلروپلاست را در لوله سانتری فیوز ml ۱۵ بریزید و ml ۸ استون به آن اضافه کنید و خوب بهم بزنید. سپس ml ۱ آب مقطر به آن اضافه کنید و مجدداً بهم بزنید.

محلول را برای مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتری فیوز کنید. جذب قسمت فوقانی را در طول مورج ۶۵۲ به وسیله اسپکتروفتومتر تعیین کنید دستگاه را به وسیله استون بروی صفر تنظیم کنید. از فرمول زیر برای تعیین مقدار کلروفیل در یک میلی‌لیتر استفاده کنید:

$$Chlorophyl\,(mg/ml) = \frac{A(652)}{34/5} \times 10$$

اگر جذب بیشتر از ۱ باشد به وسیله استون آن را رقیق کنید ومجدداً جذب را اندازه بگیرید. بعد از تعیین مقدار کلروفیل محلول استون کلروفیل را به دور بریزید.

ب ـ اندازه‌گیری واکنش هیل :

باقیمانده محلول اولیه کلروپلاست و به وسیله کلرورسدیم صفردرجه طوری رقیق کنید که غلظت نهائی کلروفیل به ۱ درصد میلی‌گرم در میلی‌لیتر برسد. برای اینکه نسبت رقیق کردن را تعیین کنید کافیست که مقدار کلروفیل محلول کلروپلاست را به mg/ml ۱ درصد تقسیم کنید.

مقدار ml۳ از محلول رقیق شده را برای مدت ۲ دقیقه در آب‌جوش حرارت دهید که از آن به عنوان کلروپلاست غیرفعال و کنترل استفاده کنید. چهار عدد لوله اسپکتروفتومتر اختیار کرده و طبق جدول زیر عمل کنید. معرف را به لوله‌ها اضافه نکنید تا اینکه آماده اندازه‌گیری مقدار جذب بشوید.

محلول‌های لازم	لوله ۱ محلول شاهد برای تنظیم صفر اسپکتروفتومتر	لوله ۲ کنترل کلروپلاست غیرفعال در مجاورت نور	لوله ۳ کنترل کلروپلاست فعال در تاریکی	لوله ۴ کلروپلاست فعال در نور
فسفات سدیم ۰/۱M	۱ml	۱ml	۱ml	۱ml
آب مقطر	۳ml	۲ml	۲ml	۲ml
کلروپلاست جوشیده	۱ml	۱ml	-	-
کلروپلاست فعال	-	-	۱ml	۱ml
معرف	-	۱ml	۱ml	۱ml

یک عدد بشر محتوی آب یخ آماده کنید و مانند زیر عمل کنید:

۱. به وسیله لوله شماره ۱ دستگاه اسپکتروفتومتر را در طول موج ۶۰۵ nm بروی صفر میزان کنید.

۲. معرف را به لوله ۲ اضافه کنید و پس از بهم زدن جذب را در ۶۰۵nm اندازه بگیرید و سپس آن را در بشر آب یخ قرار دهید

۳. نتیجه را در جدول زیر یادداشت کنید.

۴. معرف را به لوله ۳ اضافه کنید و پس از بهم زدن جذب را در ۶۰۵nm اندازه بگیرید و بلافاصله آن را در تاریکی داخل آب یخ قرار دهید. این لوله را می‌توانید در ورقه آلومینیم پیچیده و نتیجه را در جدول زیر یادداشت کنید.

۵. معرف را به لوله ۴ اضافه کنید و پس از بهم زدن جذب را در ۶۰۵nm اندازه بگیرید و سپس آن را در داخل آب یخ قرار دهید. به لوله ۲ و ۴ به وسیله لامپ ۱۰۰ وات از فاصله ۲۵ سانتی‌متری نور بتابانید.

۶. نتیجه را در جدول زیر یادداشت کنید.

۷. هر ده دقیقه لوله ۴ را از بشر خارج و پس از خشک کردن جذب را اندازه بگیرید قبل از اندازه‌گیری دستگاه را مجدداً به وسیله محلول شاهد برروی صفر میزان کنید. نتیجه را در جدول زیر یادداشت کنید.

۸. جذب لوله ۲ و ۳ را فقط در شروع و خاتمه آزمایش اندازه بگیرید.

۹. به اندازه‌گیری جذب لوله ۴ آنقدر ادامه دهید تا اینکه دیگر تغییر در مقدار جذب مشاهده نشود. نتیجه را در جدول زیر وارد کنید.

زمان دقیقه	جذب در ۶۰۵			
	لوله ۱	لوله ۲	لوله ۳	لوله ۴
۰				
۱۰				
۲۰				
۳۰				

برای محاسبه مقدار احیاء شده در مجاورت نور از فرمول زیر استفاده کنید:

$$Cr = \frac{C_0}{A_2}(A_3 - A_4)$$

Cr = معرف احیاء شده به مول در لیتر

C_0 = مقدار اولیه معرف ($۰/۲٤\times۱۰^{-٤} M$)

A_2 = جذب لوله ۲ در شروع آزمایش

A_3 = جذب لوله ۳ در خاتمه آزمایش

A_4 = جذب لوله ۴ در خاتمه آزمایش

به سئوالات زیر جواب دهید:

۱. چرا از دو کنترل استفاده کردید؟

۲. چرا هنگام استخراج کلروپلاست درجه حرارت باید صفر باشد؟

۳. چرا از محلول کلرورسدیم M ۰/۳۵ جهت استخراج استفاده شد؟

۴. چه ترکیبی در واکنش هیل احیاء می‌کند؟

۵. چرا در واکنش هیل از محلول بافرفسفات استفاده می‌کنید؟

۶. اهمیت واکنش هیل در چیست؟

۷. DCPiP در فتوسیستم I احیاء می‌شود یا در فتوسیستم II؟

۸. تعیین مقدار قندهای احیاءکننده گیاه به روش نلسن (Nelson):

مواد قندی نظیر گلوکز و فروکتوز با دارابودن عامل آلدیدی $H - c_1 = ۰$ و یا ستونی $c_1 = ۰$ می‌تواند به آسانی به وسیله بعضی مواد اکسید شوند و درضمن آن مواد را احیاء کنند، بنابراین گلوکز و فروکتوز را قندهای احیاءکننده می‌نامند. مثلاً در این آزمایش وجود قندهای احیاء کننده در محلول باعث احیاء cu^{++} به cu^{+} می‌شود و سپس cu^{+} باعث احیاء اسید فسفومولیبدیک موجود در محیط آزمایش می‌گردد که تولید رنگ آبی می‌کند و شدت رنگ تشکیل شده که رابطه مستقیم با مقدار قندهای احیاءکننده در محلول دارد توسط کالرومتر قابل سنجش است.

وسائل و مواد لازم:

۱. محلول مس (برای تهیه این محلول به آخر آزمایش رجوع کنید) .

۲. محلول اسید فسفومولیبدیک به غلظت ۷ گرم در ۱۰۰ آب.

۳. این ترکیب را می‌توان بطور آماده شده خریداری نمود (برای تهیه این محلول به آخر آزمایش رجوع کنید) .

۴. محلول استاندارد گلوکز به غلظت‌های (۱۰۰- ۸۰ - ۶۰ – ۴۰ - ۲۰ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر)

۵. ریشه گیاه

۶. هاون چینی

۷. بشر

۸. استوانه مدرج و بالن ژوژه

۹. کاغذ صافی

۱۰. قیف بلوری (از بوخنرچینی نیز می‌توان استفاده نمود) .

۱۱. ارلن مایر لوله جانبی

۱۲. خرطوم

۱۳. پی‌پیت

۱۴. دستگاه اسپکتروفتومتر

۱۵. لوله آزمایش

۱۶. پیرکس (Pyrex)

روش آزمایش:

الف ـ رسم منحنی جذب

در یک لوله آزمایش مقدار ۲ml از محلول گلوکز $۱۰۰mg^{-۱}$ ریخته وسپس ۲ml محلول سولفات مس به آن اضافه کرده، سرلوله را به وسیله پنبه مسدود کنید و برای مدت ۸ دقیقه در آب‌جوش حرارت دهید. پس از آن که لوله سرد شد به آن ۲ml محلول اسید فسفومولمبیدیک بیافزایید و خوب تکان دهید. حجم محلول لوله را به ml ۱۰ رسانده و آن را درون لوله مخصوص اسپکتروفتومتر ریخته و جذب آن را در طول موج‌های، ۴۰۰ و ۴۲۰ و ... ۷۰۰ nm اندازه بگیرید و ارقام بدست آمده را یادداشت کنید. (محلول شاهد باید به جای محلول گلوکز آب مقطر داشته و بقیه شرایط نظیر آزمایش باشد) .

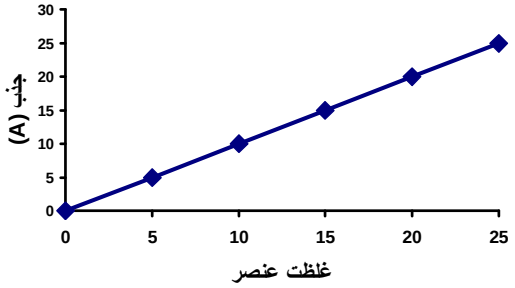
ارقام بدست آمده را به ۲ محور مختصات انتقال داده و منحنی آن را رسم کنید وطول موج نوری را که جذب درآن ماکزیمم بوده یادداشت کنید.

دستگاه اسپکتروفتومتر را با طول موج ماکزیمم تنظیم کنید و توجه داشته باشید که از این به بعد باید این طول موج ثابت باشد.

ب ـ رسم منحنی استاندارد:

تعداد شش لوله آزمایش اختیار کنید و در هر کدام مقدار ۲ml از محلول گلوکز با غلظت‌های معین بریزید. برای تهیه شاهد در یک لوله آزمایش دیگر بجای محلول گلوکز ۲ml آب مقطر بریزید. به هر لوله مقدار ۲ml از محلول سولفات مس اضافه کنید و سرلوله را به وسیله پنبه مسدود کنید و برای مدت ۸ دقیقه در آب‌جوش حرارت دهید. پس از آن که لوله‌ها سرد شدند به هر لوله مقدار ۲ml از محلول اسید فسفومولبیدیک اضافه کنید و خوب تکان دهید. حجم هر لوله را به ۱۰ ml برسانید و جذب را در طول موجی که در آزمایش قبل بیشترین جذب را داشت اندازه بگیرید. منحنی جذب را برحسب غلظت رسم کنید.

توجه کنید که فقط در غلظت‌های پائین جذب برحسب غلظت خط راست می‌باشد. در این آزمایش از چه غلظتی به بالا منحنی از مسیر خط راست منحرف می‌شود؟ رابطه جذب *(A)* با غلظت C، قانون بیر Beer نامیده می‌شود. براساس این قانون جذب رابطه مستقیم با غلظت دارد ولی فقط در غلظت‌های کم (شکل صفحه بعد) .



ج ـ تعیین مقدار مونوساکاریدهای احیاءکننده در گیاه:

۱. مقدار ریشه (برای سهولت کار می‌توانید مقداری بذر در کاغذ حوله‌ای مرطوب بکارید) اختیارکرده و پس از شستشو با آب‌مقطر آن را به ملایمت خشک کنید وسپس ۱گرم از آن را وزن کنید.

۲. ریشه را درون هاون‌چینی قرار داده و بکوبید و ۲۰ml آب‌مقطر به تدریج به آن بیفزایید.

۳. محتویات هاون را به یک بشر منتقل کنید.

۴. هاون و دسته آن را با مقداری آب‌مقطر (در حدود ۱۰ ml) بشویید و به بشر منتقل کنید.

۵. بشر را حرارت دهید و به محض این‌که جوشید آن را بردارید و بهم بزنید.

۶. محتویات بشر را از فیلتر عبور داده به طوری که عصاره از بقیه بافت‌های گیاه جدا گردد.

۷. با افزودن آب حجم عصاره را به ۱۰۰ ml برسانید (در بالن ژوژه)

۸. ۲ml از عصاره را به لوله آزمایش منتقل کرده و پس از اضافه نمودن ۲ml از محلول سولفات مس سرلوله را به وسیله پنبه مسدود کنید و برای مدت ۸ دقیقه در آب‌جوش حرارت دهید در این مرحله از آزمایش cu^{++} به وسیله آلدئید مونوساکارید احیاء می‌شود و تبدیل به cu^{+} می‌گردد که رنگ قرمزآجری دارد. علت مسدود کردن سرلوله آزمایش این است که هوای کمتری در مجاورت محلول باشد که cu 20 به cuo اکسید نشود.

۹. پس از این که لوله سرد شد مقدار ۲ml از محلول اسیدفسفومولبیدیک به آن اضافه کنید و تکان بدهید پس از چند دقیقه رنگ آبی ظاهر می‌شود.

۱۰. حجم محلول را به ۱۰ml برسانید و جذب را در طول موج منحنی استاندارد اندازه بگیرید.

۱۱. از روی منحنی استاندارد مقدار قند را به گرم در لیتر تعیین نمایید.

۱۲. درصد قند را در ریشه محاسبه کنید.

۹. ثبات pH شیره گیاه و طرز کار با pH متر:

pH متر دستگاهی است که غلظت یون هیدرژن (H^+) در محلول را اندازه می‌گیرد.

این دستگاه از pH صفر تا ۱۴ را نشان می‌دهد واز چهار قسمت تشکیل شده است:

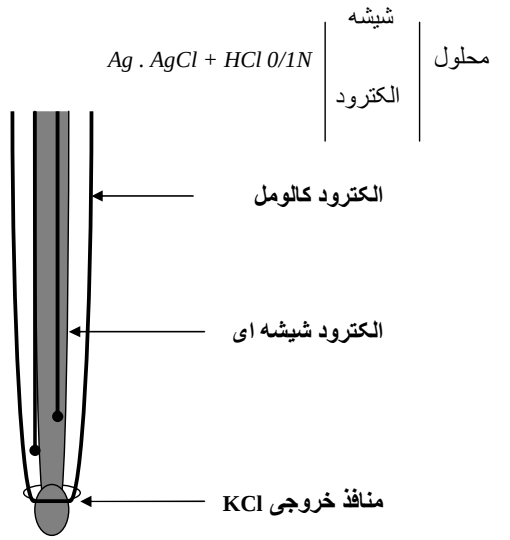
۱. الکترود شیشه‌ای Glass Electrode (الکترود شیشه‌ای درون الکترود کالومل جای می‌گیرد) .

۲. الکترود کالومل Reference Electrode

۳. آمپلی‌فایر Amplifier

۴. ولت‌متر

الکترود شیشه‌ای ساخته شده از نقره و کلرورنقره که در داخل آن اسیدکلرئیدریک به غلظت ۱درصد قرار دارد. انتهای این الکترود از شیشه مخصوصی ساخته شده که نسبت به یون هیدروژن حساسیت دارد. این قسمت از الکترود از طرف داخل با اسیدکلرئیدریک (که غلظت آن همیشه ثابت است) .



تفاوت غلظت یون هیدروژن در داخل و خارج الکترود ایجاد اختلاف پتانسیل می‌کند که این اختلاف پتانسیل بوسیله ولت‌متر دستگاه اندازه‌گیری می‌گردد. ولی قبل از آن که جریان به ولت‌متر برسد اختلاف پتانسیل بوسیله آمپلی‌فایر دستگاه تقویت می‌شود که ولت‌متر قادر به اندازه‌گیری آن باشد.

الکترود کالوس ساخته شده از جیوه وکلرورجیوه $Hg.Hg_2\,Cl_2$ که اطراف آنرا محلول kcl اشباع شده فرا گرفته است. برای آن که جریان برق در شبکه الکتریکی دستگاه کامل بشود مولکول‌های KCl باید از دو منفذ این الکترود دائماً به خارج نفوذ کرده و وارد محلول مورد آزمایش بشوند. به همین دلیل هر چند وقت یک‌بار باید به الکترود کالومل KCl اشباع‌شده اضافه نمود.

احتیاط:

هنگام استفاده از pH متر دقت کنید که به الکترودها ضربه وارد نشود و به دیواره ظرف محتوی محلول آزمایش آزمایش اصابت نکند.

طرز کار:

۱. قبل از شروع بکار دستگاه را بوسیله دکمه Stand By (در برخی از دستگاها به وسیله علامت pH مشخص شده است) روشن کنید که آمپی‌فایر آن گرم بشود (در حدود ۱۰ دقیقه کافیست) .

۲. درجه حرارت pH متر را به وسیله پیچ مخصوصی که روی دستگاه است مطابق درجه حرارت محلول تنظیم کنید.

۳. الکترودها را قبلاً در آب‌مقطر قرار دارند خارج نموده و در محلول بافر استاندارد که ثابت و مشخص دارد قرار بدهید (این محلول قبلاً آماده شده است) .

۴. برای اینکه جریان برق وارد الکترودها بشود دکمه Stand By را چرخانده و آن را بروی دکمه Read قرار بدهید. در این حالت ولت‌متر pH نامعینی را نشان می‌دهد.

۵. به وسیله پیچ مخصوصی که دکمه Asymmetry در بالای آن نوشته نشده است عقربه ولت‌متر را طبق pH محلول بهروی pH موردنظر تنظیم کنید. اگر مثلاً محلول استاندارد دارای pH = ۷ می‌باشد عقربه را بروی ۷ قرار بدهید به این ترتیب دستگاه براساس یک معین میزان شده و آماده برای اندازه‌گیری pH محلول مورد آزمایش است.

۶. قبل از آن که الکترودها را در جهت اندازه‌گیری pH محلول مورد آزمایش از محلول بافر خارج نمایید باید جریان برق را در الکترودها قطع کنید. برای این کار دکمه را از روی دکمه Read بروی Stand By بگذارید.

۷. پس از خارج نمودن الکترودها آن را با آب‌مقطر با دقت بشویید و سپس در محلول مورد آزمایش قرار بدهید.

۸. دکمه را بروی Read بگذارید و pH محلول مورد آزمایش را تا ۱ درصد بخوانید.

۹. هر دفعه که محلول مورد آزمایش را عوض می‌کنید الکترودها را با آب‌مقطر بشوئید.

آزمایش ۱:

نه گرم برگ گیاه (مانند کاهو و یا باقلا) را وزن کرده و آن را با قیچی به قطعات ریز بریده و در هاون بسایید که شیره آن گرفته شود. برای جدا نمودن شیره برگ از تفاله محتویات هاون را در پارچه تنظیف قرار داده و شیره آن را در داخل بشر بریزید. پارچه تنظیف را فشار داده تا آنجایی که امکان دارد عصاره آن را استخراج کنید. سپس تفاله را در هاون قرار داده و با ۲۵ ml آب‌مقطر مجدداً بسایید و صاف کنید و آن را به عصاره قبلی اضافه نمایید. در صورتی که میسر باشد شیره گیاه را به وسیله دستگاه آب‌میوه‌گیری استخراج کنید.

۲۵ ml از شیره تهیه شده را در بشر تمیز ۱۰۰ml ریخته و pH آن را اندازه بگیرید. سپس ۰/۵ml از محلول ۱ N NaOH درصد اضافه کرده و مجدداً pH را اندازه بگیرید. این عمل را ۳ بار تکرار کرده و از دفعه چهارم ۱ ml سود اضافه کنید. آنقدر اضافه کنید که PH محلول به یا ۱۱ برسد. منحنی تغییرات pH را برحسب مقدار سودی که اضافه کرده‌اید رسم کنید.

آزمایش ۲:

عین آزمایش فوق را با آب‌مقطر انجام بدهید. بدین صورت که به‌جای شیره گیاه از ۲۵ ml آب‌مقطر استفاده نموده و سود ۱ N درصد اضافه نمائید و سپس منحنی آن را رسم کنید.

آزمایش ۳:

مقدار ۲۵ ml از شیره گیاه را در بشر ۱۰۰ ml ریخته و pH آن را اندازه بگیرید. طرز عمل عین آزمایش ۱ می‌باشد با این تفاوت که به جای سود از محلول ۰/۱ N HCl استفاده می‌کنید. آنقدر اسید اسید اضافه کنید که pH محلول به ۲ یا ۳ برسد.منحنی تغییرات pH را برحسب مقدار اسید رسم کنید.

آزمایش ۴:

عین آزمایش ۳ با این تفاوت که به جای شیره گیاه از ۲۵ ml آب‌مقطر استفاده باید بکنید. منحنی آن را رسم کنید.

چهار منحنی فوق را با یکدیگر مقایسه کرده ونتیجه بگیرید. علت اینکه شیره گیاه از تغییرات جلوگیری می‌کند چیست؟

احتیاط:

هنگامی که الکترودها را از محلول خارج می‌کنید و در مجاورت هوا قرار می‌دهید باید با چرخاندن دکمه به روی Stand By جریان برق را از الکترودها قطع کنید در غیر این صورت به دستگاه صدمه خواهید زد.

۱۰. مطالعه آنزیم فسفوریلاز

آنزیم‌ها کاتالیزورهای آلی می‌باشند که باعث تسریع واکنش‌های بیوشیمیایی می‌گردند و بدون آن‌ها حیات غیرممکن است. در این آزمایش آنزیم فسفوریلاز را از سیب‌زمینی استخراج کرده و سپس اثر درجه حرارت و pH را بر روی آن مطالعه خواهید کرد.

این آنزیم به عنوان یک کاتالیزور در فعل و انفعال زیر شرکت می‌کند:

$$\text{گلوکز ـ ۱ ـ فسفات} \xrightarrow[\text{فسفریلاز}]{} \text{آمیلوز} + H_3PO_4$$

مواد و وسایل لازم:

۱. سیب‌زمینی.
۲. آب‌مقطر سرد (درحدود صفر درجه سانتی‌گراد)
۳. سولفات آمونیم
۴. بافراسیدمالئیک
۵. (طرز تهیه بافراسیدمالئیک در آخر آزمایش ضمیمه شده است) .
۶. محلول نشاسته
۷. محلول فسفات پتاسیم
۸. محلول یدیدوره یالوگل
۹. یخ
۱۰. دستگاه آب‌میوه‌گیری (در صورت نبودن دستگاه آب‌میوه‌گیری می‌توان از هاون چینی استفاده کرد) .
۱۱. بشر ۴۰۰ml
۱۲. سیلندر مدرج ۱۰۰ ml
۱۳. پارچه تنظیف
۱۴. حمام آب‌گرم $50^{c}o$

۱۵. دستگاه سانتریفوژ

۱۶. لوله آزمایش

۱۷. میله شیشه‌ای بهم‌زدن

۱۸. پی‌پت $۱۰ml$ و $۱ml$

۱۹. دستگاه اسپکتروفتومتر

روش آزمایش:

تذکر: در این آزمایش باید تمام عملیات در داخل یخ انجام گیرد. بنابراین قبل از شروع آزمایش قطعات یخ موجود در روی میز را به قطعات کوچک تقسیم کرده و در ظرف مخصوص (معمولاً ّ پالی اتیلن عایق خوبی است) که برای شما تهیه شده است بریزید و ظروف مورد احتیاج خود را درون آن قرار دهید تا سرد شوند.

الف ـ روش استخراج آنزیم:

۱. در حدود ۸۰ گرم سیب‌زمینی را پوست کنده و آن‌ها را به قطعات کوچک تقسیم کنید.

۲. قطعات سیب‌زمینی را با آب‌مقطر بشویید و بعد آن‌ها را توسط دستگاه آب‌میوه‌گیری که حاوی ۳۰ ml آب‌مقطر سرد می‌باشد خرد کنید. (در صورت نبودن دستگاه آب‌میوه‌گیری در داخل هاون سرد قرار داده آن‌ها را خرد کنید) .

۳. حاصل را درون یک پارچه تنظیف چهارلا ریخته و شیره آن را به داخل یک بشر که در یخ قرار دارد بریزید.

۴. این بشر را برای مدت ۵ دقیقه درون حمام آبگرم 50°C قرار دهید تا آنزیم آمیلاز غیرفعال گردد (آنزیم فسفوریلاز در این درجه حرارت مقاوم است) .

۵. محتویات بشر را به یک سیلندر مدرج انتقال دهید و حجم عصاره را اندازه بگیرید و آن را یادداشت کنید (رسوب سفیدی که در بشر باقی می‌ماند نشاسته می‌باشد آن را با آب‌مقطر شسته دور بریزید) .

۶. مجدداً عصاره را به بشر منتقل کرده و به ازاء هر ۱۰۰ml عصاره مقدار ۲۰ گرم سولفات آمونیم به تدریج به آن اضافه کرده و مرتب محلول را بهم بزنید تا تمام سولفات آمونیم حل شود. این عمل باعث می‌شود که مقداری از پروتئین موجود (غیر از فسفوریلاز) رسوب کند.

۷. حال برای این که مواد رسوبی را کاملاً جدا کنید عصاره را برای مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ کرده و سپس محلول فوقانی را درون یک سیلندر ریخته و آن را در داخل یخ بگذارید و رسوب باقیمانده در لوله‌های سانتریفوژ را دور ریخته لوله‌ها را در داخل یخ قرار دهید.

۸. حجم عصاره داخل سیلندر را یادداشت کنید و محلول را به داخل یک بشر انتقال دهید. حال به ازاء هر ۱۰۰ml از محلول مقدار ۱۵ گرم سولفات آمونیم مانند دفعه قبل به آن اضافه کنید تا تمام سولفات آمونیم حل شود. این بار آنزیم فسفوریلاز رسوب می‌کند.

۹. برای جدا کردن رسوب (آنزیم فسفوریلاز) محلول را برای مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ کرده و مایع را دور بریزید. رسوب قهوه‌ای رنگ باقی مانده پروتئین واجد آنزیم می‌باشد (اگر رسوب سفید مشاهده کردید چیزی نیست جز نشاسته) .

۱۰. تمام رسوب حاصل را در ۱۸ میلی‌لیتر آب‌مقطر حل کنید.

ب ـ اثر حرارت بر روی فعالیت آنزیم فسفوریلاز:

۱. چهار لوله آزمایش انتخاب کرده و آن‌ها را از ۱ تا ۴ شماره‌گذاری کنید و در هر کدام مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر محلول بافر با pH = ۷/۵

۲. ۲/۵ میلی‌لیتر نشاسته

۳. ۰/۵ میلی‌لیتر محلول فسفات پتاسیم ریخته و آن‌ها را برای مدت ۱۰ دقیقه به ترتیب در حرارت‌های ۰°C ، ۲۲°C و 37°C و 60°C قرار دهید تا از نظر حرارتی به حالت تعادل درآیند. سپس به هر کدام از چهار لوله آزمایش مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول آنزیم اضافه کنید تا فعل و انفعال آنزیمی شروع شود و مدت ۱۰ دقیقه در همان شرایط حرارتی صبر کنید.

۴. حال چهار لوله اسپکتروفتومتر اختیار کنید و در هر کدام مقدار ۱ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۱ میلی‌لیتر محلول یدیدوره (لوگل) بریزید.

۵. از هریک از لوله آزمایش‌های محتوی آنزیم مقدار ۱ میلی‌لیتر برداشته به لوله اسپکتروفتومتر اضافه کنید. ایجاد رنگ آبی و شدت آن دلیل بر وجود مقدار نشاسته باقیمانده می‌باشد که هنوز توسط آنزیم تجزیه نشده است.

۶. جذب هر چهار لوله را در طول موج ۶۲۰nm اندازه بگیرید و در جدول زیر وارد کنید. برای محلول شاهد از ۱ میلی‌لیتر آب‌مقطر + ۱ میلی‌لیتر محلول بافر (pH = ۷/۵) + ۱ میلی‌لیتر یدیدوره استفاده کنید) .

۷. جذب هر لوله را در طول موج ۶۲۰ nm اندازه بگیرید و نتایج را در جدول زیر وارد کنید. محلول شاهد مانند قبل است.

لوله شماره ۱	لوله شماره ۲	لوله شماره ۳	لوله شماره ۴۱
$pH = ۳/۵$	$pH = ۵/۵$	$pH = ۷/۵$	$pH = ۹/۵$
جذب ($A = ۶۲۰$)			

طرز تهیه بافر اسیدمالئیک:

برحسب احتیاج آزمایشگاه مقداری مثلاً (۲۰۰ml) محلول اسیدمالئیک به غلظت ۰/۱ M تهیه کنید و با دستگاه pH آن را اندازه بگیرید. سپس مقداری محلول KOH به غلظت ۰/۱ M تهیه کرده و قطره قطره به محلول اسیدمالئیک اضافه کنید تا به دلخواه برسد.

طرز تهیه محلول نشاسته:

مقدار ۱۵۰ میلی‌گرم نشاسته و ۲۲ mg کلرورکلسیم را در ۱۰۰۰ ml آب‌مقطر بجوشانید اگر رسوب داد از صافی عبور دهید و یا آن را برای مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور دردقیقه سانتریفوژ کنید.

۱۱. اثر دما و برخی از مواد سمی بر روی شدت تنفس

تنفس مانند فتوسنتز باعث تبادل بافت گیاه و محیط اطراف آن می‌شود در هنگام تنفس o_2 جذب شده و به مصرف اکسیداسیون مواد آلی می‌رسد و Co_2 آزاد می‌شود در آزمایش زیر هوای فاقد گاز Co_2 از روی بافت گیاهی عبور داده می‌شود و سپس Co_2 حاصل از تنفس گیاه که وارد جریان هوا شده است در محلول KOH جمع‌آوری شده و مقدار آن به وسیله روش تیتراسیون تعیین می‌گردد.

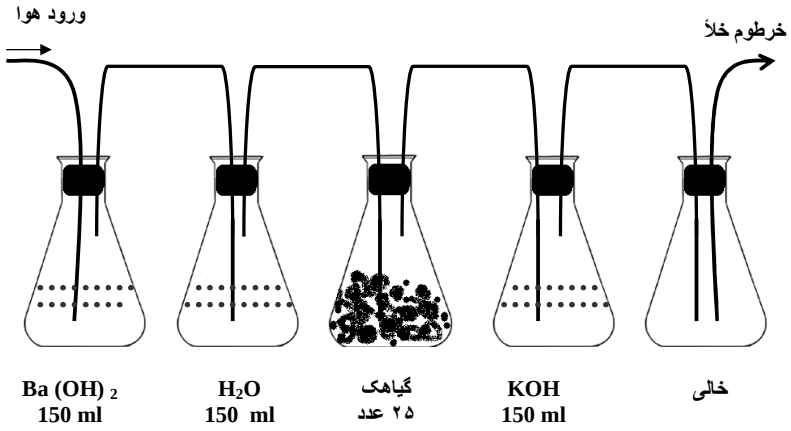
در این آزمایش اثر درجه حرارت و برخی از مواد سمی مانند ازایدسدیم N_3Na و فلوئورسدیم FNa مورد مطالعه قرار خواهند گرفت. ترکیب ازایدسدیم با فلزات سیتوکرم‌ها که در زنجیر تنفسی به کار می‌روند ترکیب شده و به این ترتیب از انتقال الکترون‌ها جلوگیری می‌کند. فلوئورسدیم از فعالیت آنزیم اینولاز که در گلیکولیز به کار می‌رود و همچنین آنزیم‌هایی که فسفر منتقل می‌کنند ممانعت می‌کند.

مواد و وسایل لازم:

۱. PO_4H_2K به غلظت ۰.۵ M
۲. KOH به غلظت ۱N درصد
۳. $Ba(OH)_2$ به غلظت ۰/۱ M
۴. FNa به غلظت ۰/۱ M
۵. ارلن ۵۰۰ml
۶. خرطوم خلأ
۷. HCl به غلظت ۰/۱ N
۸. فنل فتالئین ۱ گرم در ۱۰۰ml الکل اتیلیک ۹۵ درصد
۹. بورت ۵۰ ml
۱۰. دانه لوبیا و یا نخود
۱۱. یخ
۱۲. استوانه مدرج
۱۳. آزایدسدیم ۰/۱ M (N_3Na)

آزمایش ۱:

پنج عدد ارلن ۵۰۰ml اختیار کرده و آن‌ها را به طریق زیر به یکدیگر متصل کنید:



گیاهک دانه نخود باید ۳ یا ۴ روزه بوده و در تاریکی در درجه حرارت آزمایشگاه به عمل آمده باشد. قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که هوا از اطراف لوله‌ها و چوب‌پنبه‌ها وارد ارلن‌ها نمی‌شود. شدت خلأ را طوری تنظیم کنید که ورود هوا به ارلن‌ها حدود ۶۰ حباب هوا در دقیقه باشد. گاز Co_2 آزاد شده از گیاهک دانه‌های نخود به وسیله جریان هوا وارد محلول KOH شده و تبدیل به K_2CO_3 می‌گردد و به این ترتیب مقداری از محلول بازی را خنثی می‌کند. بقیه KOH به وسیله ۰/۱N HCl تیراسیون شده و سپس مقدار CO_2 محاسبه می‌گردد. آزمایش را برای مدت ۶۰ دقیقه ادامه دهید و سپس آن را متوقف نموده و ارلن واحد KOH را تیتراسیون کنید. هنگام تیتراسیون ارلن را تکان دهید. به محض اینکه محلول برای ۵ تا ۱۰ ثانیه بی‌رنگ شد عمل تیتراسیون را متوقف کرده مقدار اسیدی را که اضافه نموده‌اید یادداشت کنید. به عنوان شاهد ۱۵۰ ml دیگر KOH را در ارلن تمیز بریزید و پس از اضافه نمودن ۱۰ قطره از محلول فنل فتالئین آن را تیتراسیون کنید تا بی‌رنگ بشود. وزن ۲۵ عدد گیاهک را تعیین کنید. برای محاسله مقدار Co_2 به میلی‌گرم از فرمول زیر استفاده کنید:

۲۲ × نرمالیته اسید کلرئیدریک (۰/۱) × اسید مصرف‌شده برای گیاهک - اسید مصرف‌شده برای محلول شاهد

عدد ۲۲ هم سنگ گرم (equivalent) CO_2 است.

مقدار CO_2 آزاد شده را برای هر گرم از گیاهک در ساعت محاسبه کنید.

آزمایش ۲:

برای مطالعه اثر درجه حرارت پایین عین آزمایش فوق را انجام بدهید با این تفاوت که ارلن واجد گیاهک را باید داخل آب یخ بگذارید.

آزمایش ۳:

برای مطالعه اثر موادسمی عین آزمایش فوق را انجام بدهید با این تفاوت که در شروع آزمایش به ارلن واجد گیاهک ۱۰ ml محلول KH_2PO_4 و ۵ml FNa و یا N_3Na اضافه کنید. علت اضافه نمودن KH_2PO_4 این است که pH در حدود ده ثابت بماند. این pH برای نفوذ موادسمی فوق به داخل سلول‌ها لازم می‌باشد.

برای آزمایش ۲ و ۳ نیز مقدار CO_2 آزاد شده را برای هر گرم از گیاهک در ساعت محاسبه کنید.

۱۲. رنگیزه‌های فتوسنتزی(Photosynthetic Pigments)، طیف جذبی کلروفیل وکاروتنوئید

۱-مقدمه

گیاهان سبزدر فرایند فتوسنتزانرژی نوری به انرژی شیمیایی تبدیل می کنند.آب وگاز کربنیک به صورت کربوهیدراتهای ساده درمی آیندواکسیزن آزاد می کنند.بخشی ازکربوهیدارتهای حاصل،طی واکنشهای متعددی به لیپیدها،اسیدهای نوکلئیک،پروتئین وسایرمولکولهای آلی که موادساختمانی سلولها، بافتها واندامهای مختلف گیاهان هستند را به وجود می آورند.به طورکلی فتوسنتزشامل دوسلسه واکنش متفاوت است:واکنشهای فتوشیمیایی (نیازمندبه نور) که به جذب انرژی نوری بستگی دارد.واکنشهای شیمیایی (بی نیازازنور) که به تولیدکربوهیدارتها ودیگرموادپروتوپلاسم می انجامد.اولین مرحله درواکنشهای فتوشیمیایی فتوسنتز، جذب نورتوسط رنگیزه ها است.رنگیزه ها مولکولهایی هستندکه پرتوهای مرئی نورراجذب می کنند وبنابراین رنگی هستند.مهمترین ترکیباتی که باعث تبدیل انرژی نورانی به شیمیایی می شوند، رنگیزهایی هستند که درون کلروپلاستها یا کروماتوفورهای گیاهان وجود دارند.

رنگیزهای فتوسنتزی رابه سه گروه کلروفیلها (Chlorophylls) ، کاروتنوئیدها (Cartenoides) ، وفیکوبیلینها (Phycobilines) تقسیم میکنند در جدول (۱) انواع مختلف این مواد، ماکزیمم جذ ب وجود آنهادرگیاهان و جلبکهای مختلف آورده شده است.

۲-ساختمان کلروفیل

کلروفیل مهمترین ماده در عالم گیاهان است.بیان آغاز ویا وجود حیات بدون جذب وتبدیل انرژی نورانی به شیمیایی مشکل است، برخی حیات رایک پدیده فتوشیمیایی می دانند.

کلروفیلهای که باحلالهای مختلف از گیاهان استخراج می شوندباکلروفیلهایی که در کلروپلاست گیاهان دیده می شوند تفاوت دارند.کلروفیل درکلروپلاست به صورت کروموپروتئینی به نام کلروپلاستین (Chloroplastine) بوده وازدوبخش پروستتیک (کلروفیل) وپروتئین (پلاستین) تشکیل شده است.

چهار نوع کلروفیل a، b، c، d درگیاهان شناخته شده است.کلروفیل aدرتمام گیاهان عالی و جلبکها، کلروفیل bدرتمام گیاهان عالی و جلبکهای سبز، کلروفیل c فقط در جلبکهای قهوه ای و دیاتومه ها وکلروفیل d درجلبکهای قرمز یافت می شوند.

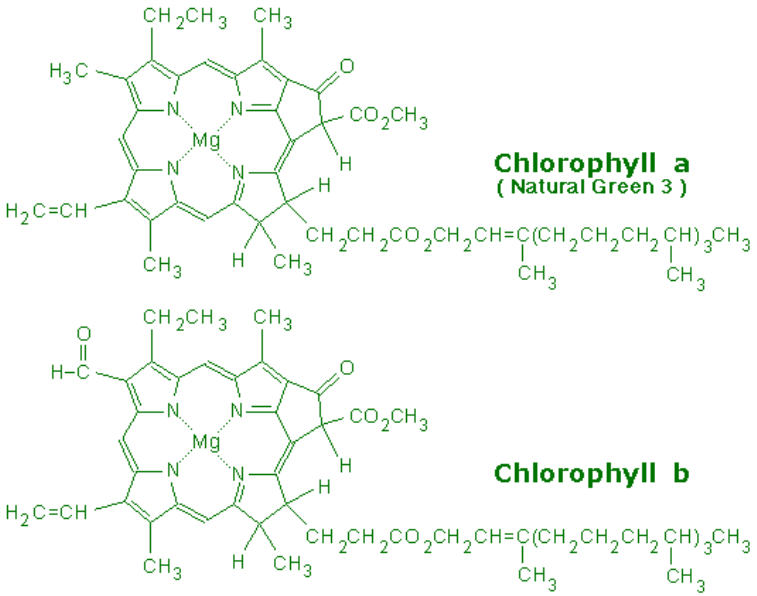
در ساختمان شیمیایی انواع مختلف کلروفیل چهار حلقه پیرول (Pyrole) وجود دارد که به هم پیوسته و حلقه بزرگی به نام پورفیرین (Porphyrin) راتشکیل می دهند.مولکول کلروفیل از یک حلقه پورفیرینی قطبی (Polar) که یک اتم منزیم در وسط آن قرار دارد و یک زنجیره الکلی فیتول (Phytol) و یک حلقه پنجم (سیکلوپنتان) تشکیل شده است.متخصصین میکروسکوپ الکترونی معتقدند که کلروفیل، بین لایه های پروتئینی

ولیپیدی تیغه های کلروپلاستی ساندویچ شده است.بخش پورفیرین ملکول به پروتئین متصل بوده در حالیکه زنجبر فیتولی محلول در چربیهاست ودر داخل لایه لیپیدی گسترده شده است.در کلروفیل b درحلقه پیرول شماره ۲به جای عامل متیل، آلدئید وجود دارد.کلرفیل c فاقد زنجیره الکلی فیتول بوده و ممکن است به جای اتیل در حلقه شماره ۲اتیلن باشد.درکلروفیلb به جای اتیلن ($H_2C=CH_2$) حلقه شماره ۱عامل آلدئید وجود دارد.بنابراین تفاوت ساختمان کلروفیلها مربوط به انشعابات فرع متصل به حلقه های پیرول است. (شکل۱) سیستم های رنگیزه ای باکتریهای فتوسنتزی، اندکی با گیاهان تفاوت دارد.

رنگیزهای کلروفیلی باکتریها، باکتریوکلروفیلها نامیده میشوند.یک گیلوگرم برگ تر، محتوی ۲گرم کلروفیل a (سبز-آبی) ، ۰/۷۵گرم کلروفیل b (سبز-زیتونی) ، ۰/۳۲گرم گزنتوفیل (زرد) و۰/۱۷گرم کاروتن (نارنجی) .

جدول ۱-رنگریزه هایی فتوسنتزی درگیاهان وجلبک ها

نوع رنگیزه	نقطه ماکزیمم جذب (درحلال آلی)	وجود
کلروفیلها		
کلروفیلa	٤٢٠و٤٦٠	تمام گیاهان عالی و جلبکها
کلروفیلb	٤٣٥و٦٤٣	تمام گیاهان عالی وجلبکها
کلروفیلc	٤٤و٦٢٥	دیاتومه ها وجلبکهای قهوه ای
کلروفیلd	٤٥٠و٦٩٠	جلبکهای قرمز
کاروتنوئیدها		
بتا-کاروتن	٤٢٥، ٤٥٠و٤٨٠	گیاهان عالی واغلب جلبکها
آ لفا-کاروتن	٤٢٠، ٤٤٠، ٤٧٠	اغلب گیاهان وبعضی از جلبکها
لوتئول	٤٢٥، ٤٤٥، ٤٧٥	گیاهان عالی وجلبکهای سبز وقرمز
ویولاگزانتول	٤٧٥، ٤٥٠، ٤٢٥	گیاهان عالی
فوکوگزانتول	٤٧٥، ٤٥٠، ٤٢٥	دیاتومه ها وجلبکهای قهوه ای
فیکوبیلینها		
فیکواریترینها	٥٧٦، ٥٤٦، ٤٩٠	جلبکهای قرمز وبعضی ازجلبکهای سبزآبی (سیانوباکتریها)
فیکوسیانینها	٦١٨	جلبکهاب سبزآبی وبعضی ازجلبکهای قرمز
آلوفیکوسیانینها	٦٥٠	جلبکهای سبزآبی وجلبکهای قرمز



شکل۱-ساختمان کلروفیل a و b: کلروفیلb به جای متیل (CH3-) (که با پیکان مشخص شده است) آلدهید (H-C=O) دارد.همچنین اگر اتیلین (H2C=CH2) حلقه شماره۱ رابا آلدهید تعویض کنیم.کلروفیل d حاصل می شود.ضمنا در کلروفیل c ممکن است به جای اتیلن در حلقه شماره ۲، اتیلن باشد.

۳-خواص کلروفیل

کلروفیل به صورت متبلور، سبز مایل به آبی بوده.در آب غیر محلول ولی دراتر، الکل مطلق و یاالکل نسبتا رقیق (برای الکل اتیلی تا حدود ۸۰٪وبرای الکل متیلیک تا حدود ۹۰٪) استن، کلروفرم، بنزن وسولفوردوکربن به شدت حل می شود.هر گاه محلول الکل رابخواهیم به آرامی با آب رقیق کنیم، محلول کلوئیدی کلروفیل حاصل می شود (از نوع SOL) .درمحلولهای حقیقی، ملکولهای کلروفیل آزاد وجدا از یکدیگرند، ولی در محلولهای کلوئیدی (با رقیق نمودن یک محلول الکلی) ، این ملکولها به وسیله بخش چربی پسند خود به یکدیگر می پیوندند و با تشکیل میسل، خاصیت فلوئورسانس خود رااز دست می دهند.

می توان عنصر منیزیوم رابه کمک یکی از اسیدها مثل اسید کلریدریک ازکلروفیل جدا نمود، که در این صورت ماده ای به نام فئوفیتین (Pheophytine) باقی می ماند.این ماده اگر تحت تاثیر استات مس قرارگیرد تولید جسمی می کند که رنگ آن مانند اول سبز می باشد وازاین راه برای نگهداری نمونه های گیاهی در محلولها بدون اینکه تغییر رنگ دهند استفاده می کنند.

مواد قلیایی درسرما باعث جدا شدن متانول (CH3وOH) ودم الکی فیتول ز کلروفیل می شود که به وسیله پیوندهای استری به هسته پورفیرین متصل اند.آنزیم کلروفیلاز که در ا ندامهای سبز گیاه دیده می شودباعث آزاد شدن فیتول می شود.در این صورت ماده ای به نام کلروفیلید (Chlorophylid) به دست می آید.

رنگیزه های گیاهی را از روی قابلیت انحلال آنها درموارد مختلفی به سه دسته تقسیم می کنند.

۱-کلروفیلها در چربیها وحلالهای چربی حل می شوند وقابل صابونی شدن می باشند.

۲-کاروتنوئیدها در حلالهای چربی حل می شوند ولی قابلیت صابونی شدن درآنهاوجود ندارد

۳-انتوسیانها (Anthocanes) وفلاونها (Flavone) درحلالهای چربی حل نمی شوند ولی در آب حل می شوند.

هر رنگیزه می تواند انرژی نوری خاصی را جذب کند.تقریبا همه ماکرومولکولهای بیولوژیک انرزی نوری محدوده طول موج های مرئی، یا کمی پایین تر و بالاتر از آن را جذب می کنند.به عنوان مثال پروتئیین ها طول موج ۲۸۰ نانومتر و اسیدهای نوکلئیک ۲۶۰نانومتر راجذب می کنند.حداکثرجذب کلروفیل a وb دراتربه ترتیب ۶۶۰و۶۴۳ نانومتر است.طیف جذبی کلروفیل aوb نشان می دهد که حداکثر جذب نور هر دو نوع کلروفیل در محدوده نورهای قرمز و آبی است.اماباید به خاطر داشت که طول موج دقیق نور بستگی به نوع حلالی دارد که کلروفیل با آن استخراج می شود.

٤-هدف آزمایش

استخراج جداسازی وقابلیت انحلال ، کلروفیل، کاروتن وگزانتوفیل به وسیله حلالهای مختلف، روش ساده کروماتوگرافی کاغذی (Papper chromatography) و تعیین طیف جذبی به روش اسپکتروسکوپی و اسپکترفتومتری

٥-مواد و وسایل موردنیاز

۱۰gr با فت برگ (اسفناج، چغندر، شیپوری ویاسایربافتهای کلروفیلدار)

هاون چینی متوسط	پیپت ۵و۱۰میلی	۷grپودر خشک برگ
۵۰mlاتانول (۹۶٪)	۱mlاسیدکلریدریک	۲۰mlاتر نفت
5ml پتاس الکلی (۲۰٪)	5m l متانول	5ml استون
5ml اتیل اتر	5ml کلروفرم	5ml آب مقطر
قیف بوخنر	کاغذ صافی واتمن شماره۱	ارلن .شیرخلاء
۱۲عدد لوله آزمایش معمولی	کاغذ کروماتوگرافی	ارلن وشیرخلاء

دکانتور، پایه وگیره دکانتور اسپکتروسکوپ و اسپکترفتومتر

٦-روش کار

٦-١-استخراج کلروفیل، کاروتن وگزانتوفیل

حدود۱۰gبرگ تازه و۱۰اتانول ۹٦٪رادرهاون چینی به ملایمت بسایید تا به خمیر نرمی تبدیل شود.برای رقیق کردن خمیر به اندازه ۳۰mlاتانول اضافه کنید.وهمزمان عمل ساییدن راادامه دهید تاکاملانرم و یکنواخت شود.آن را با قیف بوخنر صاف کنید (برای استخراج کامل رنگیزه ها به اندازه ۱۰برابر وزن برگ الکل لازم است.چدین بار عمل ساییدن و صاف کردن را تکرارنمود)

5mlازاین محلول الکلی (کلروفیل خام) را در یک لوله آزمایش ریخته قطره قطره اسید کلریدریک اضافه تا رنگ قهوه ای زیتونی ظاهر شود.مشخص کنید که این محلول قهوه ای رنگ چه ترکیبی است و طیف جذبی آن را با استپکتروسکوپ مشاهده ویادداشت کنید.

5mlکلروفیل خام رادریک لوله آزمایش ریخته و نواری از کاغذ صافی در داخل لوله درتماس با آن قرار دهید.رنگیزه ها جذب کاغذ شده و درروی آن از یکدیکر جدا می شوند (کروماتوگرافی کاغذی)

15ccمابقی محلول الکلی کلروفیل را در دکانتور بریزید و به همان حجم اتر نفت اضافه کنید و پس از ٥ دقیقه تکان دادن آرام آن را روی حاقه پایه به حال خود بگذارید تا رنگیزه های محلول دراتر (کلروفیل ها و کاروتنوئیدها) از رنگیزه های محلول درالکل جدا شود.برای تسریع در امر جدا شدن می توان از کنار ظرف به طور خیلی آهسته ۱۰cc-٥ آب مقطر وارد دکانتور کرد.پس از مدتی دو بخش می شود.با باز نمودن شیر بخش الکلی پایینی را از بخش اتری جدا کنید و دور بریزید.

به ٥cc محلول اتری حاصل ٥cc پتاس الکلی ۲۰٪بیفرایید و دکانتور را به آهستگی به مدت ۱۰-٥ دقیقه تکان دهید.کلروفیل صابونی شده از کاروتن و گزانتوفیل جدا شده ودر پایین جمع می شود.محلولهای کلروفیلی و کاروتنوئید را در دو لوله جداگانه جمع کنید.

٦-٢-تعیین طیف جذبی کلروفیل و کاروتنوئید

قسمتی از عصاره های حاصل را به نسبت ۱به ۳ با حلال مربوط در دو لوله یا کووت رقیق نموده و ابتدا با اسپکتروسکوپ وسپس با استفاده ازدولوله کووت دیگرمحتوی اترنفت و پتاس الکلی به عنوان رفرانس یا شاهد، جذب محلولهای کلروفیل و کاروتنوئید رقیق شده را به ترتیب در ۷۰۰-٤۰۰و٥٤۰-٤۰۰ نانومتر در فواصل ۳۰و۲۰ نانومتر برای کلروفیل و کاروتنوئید اندازه گیری نمایید.ابتدا باروش کار نوع مشخصی از دستگاه آشنا می شوید، آنچه در زیر آورده شده نمودار یک حالت کلی است.

۱-دستگاه را روشن نموده وروی دکمه انتخاب (Mode) جذب (Absorbance) تنظیم نمایید.

۲-پس از اینکه دستگاه به طور اتوماتیک کالیبره شد، آن را در طول موج ٤۰۰ نانومتر تنظیم نمایید.

۳-لوله شاهد را در دستگاه قرار دهید.ODآن رابا فشار دادن کلید مربوطه صفر نمایید.

٤-محلول مورد آزمایش را گذاشته وجذب آن را اندازه گیری نمایید.

٥-آزمایش را با طول موج های مختلف، هر بار با ۳۰ و۲۰نانوتر اختلاف به ترتیب برای کلروفیل و کاروتنوئید تکرارنمایید و هر بار دستگاه را با شاهد صفر کنید و جذب را در هر طول موج بخوانید.

٦-منحنی تغییرات OD{ (تیرگی نوری) Optical Density} را نسبت به طول موج رسم نمایید.

٦-٣-قابلیت انحلال کلروفیل در حلالهای مختلف

در ۷ لوله آزمایش ۱grپودر خشک شده برگ بریزید و روی آنها به ترتیب ٥cc اتانول، متانول، استون، اتر نفت، اتیل اتر، کلروفروم . آب بریزید.هریک از لوله ها را مدت ۳دقیقه تکان دهید.سپس ۱۰ دقیقه به حال خود بگذارید واز روی رنگ محلول ها درجه حلالیت آنها را نسبت به کلروفیل مشخص کنید.

۱۳. رنگیزه های فتوسنتزی، طیف جذبی کاروتن وگزانتوفیل

۱-مقدمه

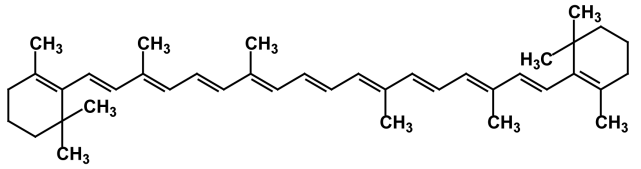
کاروتنوئیدها رنگیزه هایی به رنگ قرمز، نارنجی، زرد و قهوه ای هستند و در تمام سلولهای فتوسنتز کننده همراه با کلروفیل درکلروپلاستها و یا به طور جداگانه در سایرپلاستها (کروموپلاستها (Chromoplaste) ریشه هویج، میوه گوجه فرنگی و گلبرگها) یافت می شوند.ساخته شدن کاروتنوئیدها نیازی به نور ندارند.رنگ زرد برگ نهانداگانی که در تاریکی رشد کرده باشد دلیل وجود این رنگیزهاست، کاروتنوئیدها را می توان به دو گروه کاروتن ها و گزانتوفیل ها تقسیم نمود.در جدول (۱) انواع مختلف این مواد، ماکزیمم جذب، و وجود آنها در گیاهان و جلبکها آورده شده است.

۲-ساختمان کاروتنوئیدها

همه کاروتنوئیدها به استثنای بعضی عموما دارای ٤٠کربن هستند واز ترکیب ۸ مولکول ایزوپرن (Isoprene) با یکدیگر تشکیل می شوند.{فرمول ایزوپرن(C_5H_8) :$H_2C=C-CH=CH_2$} کاروتن ها ساختمان هیدروکربنی دارند و همچنین گزانتوفیل ها که شکل اکسید شده کاروتن ها محسوب می شوند جزء کاروتنوئیدها هستند.

۲-۱-کاروتن ها (Carotenes)

فراوانترین کاروتن ها، در گیاهان عالی، بتا کاروتن (C40H56) است که در کرومو پلاست هویج (بیش از ۹۰٪مجموع کاروتن ها در هویج) و کلروپلاستها دیده می شود.دارای ساختمان شیمیایی متقارن بوده و در آن مونومرهای ایزوپرن به خوبی تشخیص داده میشود.



در روده و اندامهای دیگر جانوران علفخوار، این ماده از وسط (بین کربن 15و′15) به دو قسمت تقسیم می شود وویتامین Aرابه وجود می آورد.بنابراین کاروتن پیش ماده ویتامین یا پرووِیتامین محسوب می شود:

ولی نوع αو′تولید یک ویتامین Aمی کنند. $C_{40}H_{56}+2H_2O \rightarrow 2C_{20}H_{29}OH$

الفا –کاروتن (در هویج) و گاما کاروتن (کلروتیوباکتریها (Chlorothiobacteriales) وبعضی ازجلبکها) ، نسبت به بتا-کاروتن کمتر هستند ودر یکی از دو انتهای فرمول شیمیایی با بتا-کاروتن تفاوت دارند.لیکوپن

(Lycopen) که یکی از رنگیزه های مهم گیاهان (در گوجه فرنگی) است، ترکیبی است متقارن که دارای دو منتهی الیه است.

۲-۱-گزانتوفیلها

گزانتوفیل معمولی یا لوته این (Lutein) ، یا لوتئول (Luteol) در کلروپلاستها و کرومو پلاستها وجود دارد ورنگ زرد گیاهان بی رنگ شده مربوط به آن است.زآگزانتین (Zeaxanthin) دانه های ذرت از بتا-کاروتن، روبی گزانتین (Rubixanthin) و.جود در گل سرخ از گاما-کاروتن و لیکو گزانتین (Lycoxanthin) موجود در گوجه فرنگی از لیکوپن به وجود می آیند.فوکوگزانتین (Fucoxanthin) یکی دیگر از گزانتوفیل هاست که باعث ظهور رنگ قهوه ای (فوکوس) می شود.

۳-خواص کاروتنوئیدها

این رنگیزه ها در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) بر خلاف فیکوبیلینها دارای فلوئورسانس نبوده ولی با جذب انرژی نوری و انتقال آن به کلروفیل باعث ایجاد فلوئورسانس در آن می شوند ومانند رنگیزه کمکی در فتوسنتز شرکت می کنند.به عبارت دیگر این ترکیبات باعث می شوند فتوسنتز در طول موجهایی که کلروفیل قادر به جذب آنها نیست (سبز) ، بتواند صورت بگیرد.از طرف دیگر به عقیده بعضی ار محققان، کاروتنوئیدها با جذب طول موج هایی که باعث اکسیداسیون رنگهای مختلف از جمله کلروفیل می شوند نقش محافظتی را در برابرفتواکسیداسیون بازی می کنند.

فتوسنتز در کلیه اعضای واجد کلروفیل گروه های مختلف گیاهان که دارای کلروفیل aوbو کاروتنوئیدها (گزانتوفیل و کاروتن) هستددیده می شود.بتا-کاروتن با جذب منطقه آبی نور (ماکزیمم در حدود 450nm) و کلروفیلها مسئول وجود دو نقطه ماکزیمم در طیف فتوسنتز هستند که در قرمز (در حدود670nm) قراردارند.سایر رنگیزهای (کاروتنوئیدها) باعث انجام فتوسنتز بین این دو طول موج میشوند، ولی شدت عمل آنها کمتر از کلروفیل ها است.

٤-هدف آزمایش

استخراج وجداسازی کاروتن وگزانتوفیل به وسیله حلال های مختلف و تعیین طیف جذبی به روش اسپکتروسکوپی و اسپکتروفتومتری

٥-مواد ووسایل مورد نیاز

20grهویج رنده شده	هاون چینی متوسط	۲عدد لوله آزمایش
14ccمتانول (۸۰٪)	پیپت10cc، 3عدد	قیف بوخنر
20ccاتانول	کاغذصافی واتمن شماره۱	اسپکتروسکوپ واسپکتروفتومتر

20ccاترنفت　　دکانتور، پایپوگیره دکانتور　　ارلن وشیرخلاء، رنده

٦-روش کار

٦-١-استخراج کاروتن وگزانتوفیل ازهویج

ابتدامقداری هویج رارنده وسپس ٢٠گرم از آن را وزن نموده در هاون چینی ابتدا در١٠cc اتانول ٩٦٪وسپس در حین ساییدن ١٠cc١٠دیگر به آن افزوده، عمل ساییدن را ادامه دهید تا کاملا نرم و یکنواخت شود. (به جای الکل میتوان از استن استفاده کرد) محلول رنگی حاصل رابا قیف بوخنر صاف ودر دکانتور بریزید.

١٥cc اتر نفت وکمی آب به آن بیفزایید وپس از ٥ دقیقه تکان دادن بسیار آرام آن را روی حلقه پایه به حال خود بگذارید.کاروتن و گزانتوفیل از سایر رنگهای محلول درالکل یا استن جداشده جذب اتر میشود.

لایه تحتانی رادوربریزید و به بخش فوقانی١٠cc متانول ٨٠٪اضافه کنید.گزانتوفیل جذب متانول شده وازکاروتن جدامیشود.محلول های گزانتوفیل و کاروتن رادردولوله آزمایش جداگانه جمع آوری کنید.

محلول کاروتن را به نسبت ١به٣ مانند آزمایش قبل رقیق وآماده کنید ومحلول گزانتوفیل به علت رقیق بودن احتیاجی به رقیق نمودن مجدد ندارد.سایر مراحل شبیه مراحل آزمایش شماره ١ می باشد.جذب محلولها راابتدا با اسپکتروسکوپ وسپس با اسپکتروفتومتر در ٥٤٠-٤٠٠ نانومتر ودرفواصل ٢٠نانومتر اندازه گیری و منحنی مربوطه را رسم نمایید.

١٤.　مطالعه تنفس درگیاهان

١-مقدمه

درگیاهان تبادلات گازی معمولا در سطح گیاه یعنی در برگ وساقه های جوان از راه روزنه ها و کوتیکول ودر ساقه وریشه های مسن

از راه عدسک و تارهای کشنده صورت می گیرد.به علاوه در آنها یک اتمسفر داخلی نیز به صورت Meat و حفره (لاکونLacune) وجود دارد که مواد در آنها به آرامی در جریان بوده و تبادلات گازی بین سلئلها و این اتمسفر مطابق قوانین فیزیکی انجام می گیرد.تنفس در گیاهان در موقع روییدن و گل دادن شیدتر است.

١-معرفی تنفس در گیاهان بدون کلروفیل

در ته لوله رو (Reu) چند قرص پتاس قرار دهید و تا نصف لوله گندم در حال رویش بریزید.و دهانه آن را با درب مجهز به یک لوله شیشه ای که انتهای دیگر آن در یک ظرف پر از آب قرار می گیرد ببندید و پس ازمدتی دستگاه را مشاهده و نتیجه حاصل را تفسیر نمایید.

٢-نمایش تنفس بافتها

در یک لوله آزمایش بزرگ مقداری قطعات هویج یا هر بافت زنده دیگر (به ابعاد٥میلی متر مکعب) بریزید.سپس هر یک از لوله ها را بامحلول٠/٠٠٥درصد آبی متیل، تا حدود ٢ سانتیمتر روی نمونه گیاهی پر کرده و دهانه آ« را محکم ببندید تا مانع تماس آن با اکسیژن هوا گردد.پس از آن لوله را در بن ماری ٣٥-٣٠سیلیوس درجه قرار دهید وپس از ٢ ساعت آن را مشاهده کنید.در همین شرایط دو لوله آزمایش دیگر (شاهد) بگیرید ودر یکی مقداری هویج پخته شده و سایر مواد لازم بریزید و در بن ماری قرار دهید و پس از پیان مدت لوله ها را با یکدیگر مقایسه کنید دلیل تغیر رنگ دادن یا نادن هر یک از لوله ها را بنویسید.

تفسیر

در موقع تنفس تحت اثر آنزیم هایی که دهیدروژناز (Dehydrogenase) نامیدهمی شوند هیدروژتن آزاد می گردد.هیدروژت آزاد شده توسط مواد ناقل هیدروژن از جمله NAD و FAD جذب می شود و تبدیل به NADH2 و FADH2 می شود (در مراحل بعدب H2آزاد می شود والکترون از دست می دهد و به صورت یون Hدر می آید و الکترون های آزاد شده توسط عنصر آهن سیتوکرومها به اکسیژن جو منتقل و یون اکسیژن O حاصل می گردد که از ترکیب آن با H آب ایجادمی شود) .اگر در محیط به جای اکسیژن که جاذب هیدروژن

می باشد ماده گیرنده هیدروژن دیگری موجود باشد می توان این کیفیت را مشاهده کرد.بلودو متیلین به صورت اکسیده بهترین ماده برای نشان دادن این کیفیت می باشد، زیرا در حالت اکسیید، رنگین (آآبی) و به صورت احیاء شده بیرنگ است.

۳-معرفی تنفس در جوانه های در حال رویش:برای این کار از رنگ حیاتی تترازولیوم کلراید

{ 2Triphenyl Tetrazolium Chlorid (T.T.C)، 3، 5} که یک معرفی اکسیدرو دوکسیون Oxydoreduction بوده و به حا لت اکسیده بیرنگ و به حالت احیاء شده قرمز رنگ می باَشد استفاده می شود.برای انجام آزمایش ٤٠عدد جوانه گندم در حال رویش را انتخاب کنید و نصف آنها را بچوشانید.سپس تمتم جوانه های چوشانده شده و چوشانده نشده را از طول برش بدهید.به طوری که هر نصفه شامل بخَی از ژمزل و ریشه چه باَشد.بعد چوانه های چوشانده شده و چوشانده نشده را به طور مجزا در دو پتری دیش محتوی معرف T.T.Cقرار دهید و در جای تاریکی بگذارید پس از دو ساعت نتیجه را مشاهده وآن را تفسیر نمایید.

٤-معرفی تنفس و فتوسنتزبه وسیله معرف بی کربنات

برای این منظور چهار ظرف انتخاب کنید ودر هر یک مقدار معینی از معرفی بی کربنات بریزید.بعد در دو ظرف محتوی معرف یک برگ سبز قرار دهید.و یک ظرف را در رَنایی و یک ظرف را درتاریکی قرار دهید و ظرف سوم را بون اضافه کردن کیاه را در هوای آزآد بگذارید. ودر ظرف چهارم به وسیله لوله ای از طق دهان بدمید تا هوا از این طریق وارد ظرف شود و پس از نیم ساعت رنگ محلول های چهار ظرف با هم مقایسه کنید ونتیجه گیری نمایید.

۱۵. کشت بافت گیاهی

۱-مقدمه

برای بررسی تغذیه گیاهان و برآورد کمی نیازهای آنها وکیفی به موادوعناصر مختلف بهترین راه استفاده از محیط های کشت مصنوعی کنترل شده است. این محیط ها به صورت محیط کشت های مایع وغیر مایع می باشند که از نظر اصول محیطهایی هستندکه همه عناصر معدنی ضروری برای رشد گیاه به اندازه کافی درآنها وجود داشته باشد ودر عین حال هیچ ماده غیر ضروری درآنها یافت نمی شود.البته درمورد بافت های گیاهی محیط کشت اختصاصی وجود دارد.

۱-۱-محیط های کشت مایع

پس از آشنایی های اولیه به ترکیب شیمیایی گیاهان و دانستن این اصل که گیاهان سبز سازنده همه مواد آلی ضروری خود هستند این فکر پیش آمد که گیاهان را می توان در محیط هایی رشد داد که از ترکیب املاح ضروری برای رشد گیاهان یعنی عناصری که در پیکر گیاه و توسط تجزیه شیمیایی وجود آنها همیشه دیده می شود منحصرا تشکیل شده باشد.طبیعی است پس از آشنایی با ترکیب چنین محیطی برای اینکه اهمیت هر یک از املاح (یا عناصر) و یا مقدار آنها معلوم گردد با حذف آن ماده ازمحیط کشت و یا تغییر مقدار آن اثری که برای رشدونمو گیاه باقی می گذارد می توان به خوبی نقش کمی وکیفیی آن عنصر را تعیین نمود.با اندازه گیری مقدار رشد گیاهان مختلف در یک محیط کشت ثابت اغلب دیده می شود که گرچه این محیط ها برای ادامه رشد گیاهان کافی وکامل هستند و گیاه میتواند مراحل مختلف زندگی خود رادرآنها بگذراند لیکنعملا احتیاجات گیاهان مختلف به ترکیب شیمیایی محیط کشت تا حدودی از نظر کمی (مقدار و نسبت املاح) و همچنین از نظر کیفی (لزوم یا عدم لزوم وجود بعضی از عناصر) تا اندازه ای با همدیگر فرق داشته و این مطلب به خصوص در مورد کشت های دراز مدت باید مورد توجه قرار گیرد.

تعریف:محیط کشت متعادل به محیطی گفته می شود که عاری ازمعایب بازدارنده رشد (عوامل سمی) بوده و یک موجود گیاهی بتواند در این محیط به زندگی عادی خود ادامه دهد.مثلاآب دریا ازنظر موجودات گیاهی وجانوری که درآن زندگی می کنند محیط متعادل است.

درتهیه محیط های کشت مایع به عواملی مثل فشار اسمزی، PH، ظروف کشت، خالص وقابل جذب بودن موادوتراکم مواد درطول رشد باید توجه کافی نمود.

۱-۲-محیط های کشت جامد

ازآنجا که به طور کلی ریشه گیاهان درمحیط های جامد (خاک) رشد طبیعی تری دارد ازاین رو در اغلب موارد به جای آنکه از محیط کشت مایع استفاده شود از محیط جامد استفاده می گردد.این محیط ها از یک ماده بی اثر وخنثی نظیر ماسه سیلیسی که با اسید شسته شده و تقریبا از سیلیس خالص تشکیل گردیده است ویاموادی که به

هیچ وجه قابل استفاده در جذب نیستند نظیر ورمیکولیت تشکیل گردیده است که به توسط محلول های غذایی مایع آبیاری می گردند.

۱-۳-محیط های کشت نیمه جامد

با افزودن درصد مشخصی آگار به محیط های غذایی مایع می توان شرایط مناسبی برای کشت بافت های گیاهی وباسایرنمونه ها فراهم نمود.

۱-٤-محیط کشت بافت ها

برای بافتهای گیاهی محیط کشت معمولا ساده بوده وشامل همان محیط آبکی است همراه آگاریا بدون آن مورداستفاده قرار می گیرد ودرصورت عاری بودن بافت از دستگاه فتوسنتری فعال باید مقداری ماده عالی (قند) نیز به محیط افزوده گردد تا شرایط رشد طبیعی ایجاد گردد.اگر منظور فقط ازدیاد وزن ورویش بافت باشد محیط احتیاج به عامل دیگری ندارد در حالی که اگر منظوررشد بافت در جهت اندام زایی وتشکیل گیاه کامل باشدافزایش عوامل دیگروبخصوص بعضی از هورمون ها وویتامین ها ضرورت پیدا می کند.از نظر تاریخی برای اولین بار محیط کشت مصنوعی توسط ساکس وسپس محیط کشت کنوپ تهیه گردیدوسپس محیط کشت های هوگلندوآرنون، هویت واشتون ووایت ومازه وژاویلیه مورد استفاده دانشمندان قرار گرفت.

عناصر تشکیل دهنده محیط های کشت همان عناصری هستند که به صورت طبیعی در گیاه موجود میباشد وعبارتند از:

۱-ماکروالمان هاکه شاملNوPوKوMgوCaوSمی باشند.

۲-میکروالمان ها که شامل Fe، Zn، Cu، Al، Ni، Co، Mo، I، F، Br، Li، Ti، Rb، CeوCrکه ٥ عنصر آخر عمومیت ندارند.

۲-روش کار

۲-۱-محیط کشت پایهMS (Murashig and Skoog)

الف-محلول مادرAبا غلظت ۱۰برابر (نمکها۱۰×)

ترکیب	مقدار	
NH4NO3	١٦٥٠٠	میلی گرم در۱۰۰میلی لیترآب مقطر
KNO3	١٩٠٠	میلی گرم در۱۰۰میلی لیترآب مقطر
CaCl2.2H20	٤٤٠٠	میلی گرم در۱۰۰میلی لیترآب مقطر
KH2PO4	١٧٠٠	میلی گرم در۱۰۰میلی لیتر آب مقطر
H3BO3	٦٢	میلی گرم در۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر
MnSO4.H2O	١٦٩	میلی گرم۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر

ZnSO4.7H2O	٨٦	میلی گرم در۱۰۰ میلی لیترآب مقطر
KI	٨/٣ م	یلی گرم در۱۰۰ میلی لیترآب مقطر
Na2MoO4.2H2O2	٢/٥	میلی گرم در۱۰۰میلی لیتر آب مقطر
CuSO4.5H2O	٠/ ٢٥	میلی گرم در۱۰۰میلی لیتر آب مقطر
CoCl4.6H2O	٠/ ٢٥	میلی گرم در۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر
جمع	۱۰۰۰میلی لیتر	

این محلول رادریخچال فریز دردمای ۲۰-درجه سلیسوس، درظرفهای ۱۰۰و۵۰میلی لیتربه ترتیب جهت ساخت یک لیتر ونیم لیتر محیط کشت تقسیم وتازمان استفاده نگهداری می کنیم.

ب-محلول مادرB (۱۰×)

MgSO4.7H2O	به مقدار ۳۷۰۰ میلی گرم در۱۰۰میلی لیترآب مقطر

ج-محلول مادرC (محلول آهن۱۰×)

FeSO4.7H2O	به مقدار۲۷۸میلی گرم در۱۰۰میلی لیترآب مقطر
Na2.EDTA.2H2O	به مقدار۳۷۳میلی گرم در۱۰۰ میای لیتر آب مقطر

برای تهیه محلول مادرC ابتدا FeSO4.7H2O را در 20ml آب مقطر حل نموده وسپس Na2.EDTA.2H2O را در ظرفی جداگانه در 20ml آب مقطردرحالی که حرارت می دهیم (۵۰ درجه سلسیوس) حل می کنیم.سپس ازآن محلول اول رابه دوم اضافه نموده وبعدازسردشدن حجم مخلوط رابا آب مقطربه ۱۰۰میلی لیتر می رسانیم.این محلول را دور از نور و در یخچال نگهداری می کنیم.محلول های مادر B, C در دمای ٤ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری می شود.

د-محلول مادرD (ویتامینها۱۰×)

Thiamine HCI	به مقدار۱میلی گرم در۱۲میلی لیترآب مقطر
Nicotine acid	به مقدار۵میلی گرم در۱٤میلی لیتر آب مقطر
Pyridoxin-HCL	به مقدار ۱میلی گرم در۱۲ میلی لیتر آب مقطر
Glycin	به مقدار ۲۰میلی لیتر در۱۳میلی لیتر آب مقطر

این محلول را پس از تهیه در فریز در دمای ۲۰-درجه سلیسیوس در شیشه های ۵ میلی لیتری نگهداری می کنیم.جهت ساخت یک لیتر محیط کشت ار ۵میلی لیترآن استفاده می کنیم.

محلول مادرE (اینوزیتول۲۵×)

اینوزیتول	به مقدار ۲۵۰۰میلی گرم در۱۲۵میلی لیترآب مقطر

این محلول را پس از تهیه در فریزر در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس در شیشه های ۵میلی لیتر نگهداری شد.جهت ساخت یک لیتر محیط کست از ۵ میلی لیتر آن استفاده می شود.

و-ساکارز

۳۰ گرم ساکارز برای ساخت یک لیتر محیط کشت در موقع ساخت محیط کشت وزن می شود و مستقیما به محیط کشت اضافه می شود.

ز-هورمون های رشد:

هورمون های مختلفی در طی آزمایش ها در محیط های کشت به کار برده می شود که محلول های مادر هر یک به روش زیر تهیه می گردد:

۱-محلول مادر 4-D و2 :۱۰ میلی گرم از ماده فوق را در یک بشر ۲۰میلی لیتری ریخته و سپس چند قطره اتانول ۹۶ درجه (در حدود ۰/۳ میلی لیتر) به آن می افزاییم تا کریستالها حل شوند.سپس به سرعت حجم را در یک بالن ژوژه به صد میلی لیتر می رسانیم.

۲-محلول مادر NAA :۱۰ میلی گرم از NAA را در ته یک بشر ۲۰ میلی لیتر و چند قطره (در حدود ۰/۳ میلی لیتر) محلول سوود یا پتاس یک نرمال به آن اضافه می کنیم، تا کریستالها حل شوند.سپس به سرعت حجم را در یک بالن ژوژه به ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

۳-محلول مادر6BAP:۱۰ میلی گرم از 6BAP را در ٦-٤ میلی اسید کلریدریک نرمال حل می کنیم و سپس با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

٤-محلول مادر Kin: در میلی گرم از کینتین را در ته یک بشر ۲۰ میلی ریخته و چند قطره (در حدود۰/۳ میلی لیتر) محلول سود و یا پتاس یک نرمال به آن می افزاییم تا کریستالها حل شوند، سپس به سرعت آب مقطر در حال هم زدن حجم را در یک بالن ژوژه به ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

۵-محلول مادر LAA:۱۰ میلی گرم LAA را در ته یک بشر ۲۰ میلی ریخته و چند قطره (در حدود ۰/۳ میلی لیتر) محلول سود و یا پتاس یک نرمال به آن می افزاییم تا کریستال ها حل شوند.سپس به سرعت ۹۰ میلی لیتر آب مقطر به محلول فوق افزوده حجم را در یک بالن ژوژه به ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

در اینجا روش تهیه کلیه هورمونهایی را که در محیط کشت ای مختلف به کار برده ایم ذکر کردیم و از ذکر مجدد آنها در شرح سایر محیط ای کشتخود داری می شود.

برای تهیه یک لیتر محیط کشت MS از محلول های مادر به مقادیر زیر استفاده می نماییم:

۱-محلول مادر A	۱۰۰ میلی لیتر	۵-محلول مادر E	۱۰۰ میلی لیتر
۲-محلول مادر B	۱۰ میلی لیتر	٦-ساکارز	۳۰ گرم
۳-محلول مادر C	۱۰ میلی لیتر	۷-آگار آگار	۱۰گرم
٤-محلول مادر D	۵ میلی لیتر		

برای تهیه یک لیتر محیط کشت پایه MS ابتدا مواد فوق را در یک ارلن مایر یک لیتری ریخته سپس در آزمایش های مختلف هورمون ها و مواد تکمیلی به آن اضافه می گردد.حجم نهایی را با اضافه نمودن آب مقطر به یک لیتر می رسانیم.

محلول با استفاده از محلول سود و اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال قبل از اضافه نمودن آگار روی pH ۵/٦تنظیم می کنیم. سپس جهت تهیه محیط کشت جامد ۱۰ گرم آگار- آگار دیفکو را به یک لیتر از محلول فوق اضافه می کنیم و محلول حاصل را تا حل شدن کامل آگار دربن ماری در حال جوش قرار می دهیم.در طی این مدت آن را چند بار هم می زنیم.جهت استریل نمودن، محلول کشت را به اتو کلاو منتقل و در فشار ۱/۰٦ کیلو گرم بر سانتی متر مربع که معدل دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد است به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو می کنیم.پس از اتو کلاو نمودن در حالی که دمای محیط کشت به حدود پنجاه درجه سانتی گراد رسید در زیر دستگاه لامینارایر فلوکابینت به پتری دیش های۲۰×۱۰۰ میلی متری منتقل می کنیم.درون هر پتری دیش ۲۵ میلی لیتر از محیط کشت را می ریزیم.