مقدمه

هدف از نوشتن کتاب آزمایشگاهی فیزیولوژی گیاهی (۲) این است که دانشجویان، ضمن آگاهی از مطالب نظری آن، با بعضی از واکنشهای متابولیسمی که در اندامهای مختلف گیاهان صورت می‌گیرد، به طور تجربی و عملی آشنا شوند. آزمایشهای انتخاب شده در این کتاب در زمینهٔ درس فیزیولوژی گیاهی (۲) است که مباحث فتوسنتز، تنفس و تخمیر را در برمی‌گیرد و با توجه به اینکه درس فیزیولوژی گیاهی (۳) فاقد دستورالعمل آزمایشگاهی است، لذا چند آزمایش ساده هم در مورد موضوعات رشد و نمو گیاهی در این کتاب منظور شده است.

این کتاب شامل ۱۰ کاوش و مجموعاً ۳۳ آزمایش مختلف است. در کاوش ۱ (که شامل ۶ آزمایش است)، چند رنگیزهٔ کلروپلاستی بررسی می‌شود و روشهای مختلف استخراج و طیف جذبی آنها مورد مطالعه قرار می‌گیرد. در کاوش ۲ (که شامل ۱۵ آزمایش است)، تبادلات فتوسنتزی، جداسازی کلروپلاستها، واکنش هیل، تشکیل فرآورده‌های فتوسنتز و اثر عوامل مختلف در فتوسنتز بررسی می‌شود. در کاوش ۳ (که شامل ۴ آزمایش است)، مسائل مربوط به فرایند تنفس، تبادلات تنفس و چند آنزیم تنفسی مورد مطالعه قرار می‌گیرد. در کاوش ۴، تخمیر بررسی می‌شود. کاوش ۵ به اثر جیبرلین برالقای سنتزآلفا آمیلازجو اختصاص دارد. در کاوش ۶، اثر آبسیسیک اسید و بنزیل آدنین بر رشد و خواب گیاه بررسی می‌شود. در کاوش ۷، اثرات سیتوکینین بر رشد و پیری برگهای لوبیا؛ و در کاوش ۸، نقش اُکسین و سیتوکینین در چیرگی رأسی مطالعه می‌شود. در کاوش ۹، اثر تنظیم‌کننده‌های مصنوعی رشد؛ و بالاخره در کاوش ۱۰، القا و رفع خواب جوانه‌ها به وسیلهٔ مواد شیمیایی مورد بررسی قرار می‌گیرد. امید است که دانشجویان، با مطالعهٔ مفاهیم نظری و انجام فعالیتهای عملی پیشنهاد شده در این کتاب، به هدف آموزشی کلی زیر دست یابند:

«آشنایی با مکانیسم برخی از فرایندهای حدواسط گیاهان از جمله فتوسنتز، تنفس تخمیر و رشد و نمو»

کاوش ۱: مطالعهٔ رنگیزهٔ کلروپلاستی و تعیین طیف جذبی آنها

کلروپلاست گیاهان دارای دو نوع رنگیزهٔ مهم است که می‌توانند انرژی مؤثر در فتوسنتز را جذب کنند. این رنگیزه‌ها عبارت‌اند از کلروفیل b,a و کاروتنوئیدهای قرمز، نارنجی و یا زرد. در این کاوش، استخراج رنگیزه‌های کلروفیل b,a و کاروتنوئیدها را به چند طریق بررسی و طیف جذبی آنها را تعیین می‌کنیم.

هدفهای آموزشی: انتظار می‌رود که پس از مطالعهٔ این کاوش و انجام فعالیتهای عملی مربوط به آن بتوانید:

۱ـ رنگیزه‌های مهم گروههای مختلف گیاهی را نام ببرید.

۲ـ ساختار مولکولی رنگیزه‌های مهم گیاهی را توضیح دهید.

۳ـ با انجام آزمایشهای مناسب، رنگیزه‌های مختلف کلروپلاستهای موجود در برگ خشک شده را توسط حلالهای الی جدا کنید.

۴ـ با انجام آزمایشهای مناسب، مواد رنگی کلروپلاست را استخراج کنید و آنها را با روش کروماتوگرافی بر روی: ستون پودر شکر، ستون پودر سلولز، لایهٔ نازک (سیلکارل یا ژل سیلیس) و کاغذ، از یکدیگر جدا کنید.

۵ـ ضمن انجام آزمایشهای مربوط، حلالهای مناسب رنگیزه‌های مختلف را شناسایی کنید و طیف رنگیزه‌ها را توسط طیف ـ نورسنج (اسپکتروفتومتر)[1] مشخص سازید.

1. Spectrophotometer

مفاهیم نظری

کلروپلاستهای تمام گیاهان عالی دارای سه نوع رنگیزه مهم‌اند که می‌توانند انرژی نورانی مؤثر در فتوسنتز را جذب کنند. این رنگیزه‌ها شامل کلروفیل b,a و کاروتنوئیدها هستند. کلروفیل a برای انجام فتوسنتز در تمام گیاهان عالی و جلبکها ضروری است. باکتریهای فتوسنتز کننده فاقد کلروفیل a هستند ولی مادهٔ مشابهی به نام باکتریوکلروفیل[1] دارند. کلروفیل b نیز تقریباً در همهٔ گیاهان سبز، به جز سیانوباکتریها (جلبکهای سبز ـ آبی) و جلبکهای سرخ و قهوه‌ای، یافت می‌شود؛ جلبکهای قهوه‌ای کلروفیل c و جلبکهای سرخ کلروفیل d دارند. جلبکهای قرمز و سبز آبی فیکوبیلین نیز دارند.

در ساختار شیمیائی همهٔ کلروفیلها چهار حلقهٔ پیرول[2] وجود دارد که اتم منیزیم را در مرکز «کی‌لیت»[3] کرده‌اند (شکل ۱ـ۱). پنجمین حلقهٔ ۵کربنی و عامل ۲۰کربنی فیتول[4] به یکی از حلقه‌های پیرول متصل‌اند.

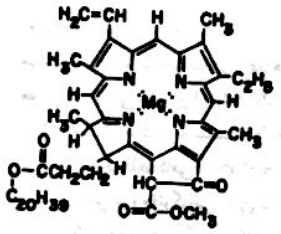
فرمول خام کلروفیل a: $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$، و فرمول خام کلروفیل b $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ است. تنها تفاوت آنها در جایگزینی روی حلقهٔ ۳ است که در کلروفیل a در این موقعیت عامل متیل ($-CH_3$) قرار دارد، در حالی که در کلروفیل b عامل آلدهیدی ($-CHO$) قرار می‌گیرد. در بیشتر گیاهان عالی و جلبکهای سبز، کلروفیل b,a به نسبت ۲:۱ و یا ۳:۱ است.

کاروتنوئیدها ترکیبات ۴۰ کربنی هستند و تعداد زیادی از انواع آنها شناخته شده است. کاروتن‌ها کربوهیدراتهای خالص‌اند. به عنوان مثال، بتاکاروتن به فرمول خام $C_{40}H_{56}$ است. گزانتوفیلها در انتهای حلقه‌ها دارای اکسیژن هستند و فرمول خام بسیاری از آنها $C_{40}H_{56}O_6$ است. کاروتنوئیدها نه تنها به رنگهای متفاوت قرمز، نارنجی و زرد وجود دارند، بلکه بعضی از آنها سبزند و حتی ممکن است صورتی و یا اندکی سیاه رنگ به نظر برسند. کاروتنوئیدها نه فقط در گیاهان بلکه در شاخه‌هایی از جانوران نیز دیده می‌شوند. در گیاهان عالی، کاروتنوئیدها محدود به کلروپلاست نیستند بلکه ممکن است در سایر پلاستیدها مانند کروموپلاست‌های میوه‌ها و قسمتهایی از گل نیز یافت شوند.

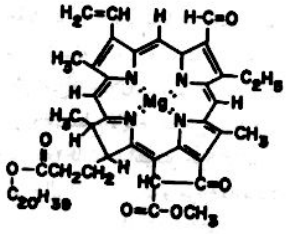
کلروفیلها و کاروتنوئیدها از یک سو با یکدیگر و از سوی دیگر با پروتئین و لیپید موجود در غشای گرانای کلروپلاست ارتباط نزدیک دارند. در حالی که قبلاً براین باور بودند که رنگیزه‌های فتوسنتزی منحصراً در گرانا وجود دارند. مدارک جدید نشان دهندهٔ این واقعیت‌اند که کلروفیل در استرومای لامیلاً نیز وجود دارد.

فرمول کلروفیل a , b، بتا ـ کاروتن به عنوان نمایندهٔ کاروتن، و لوتئین به عنوان نمایندهٔ گزانتوفیل در شکل ۱ـ۱ آمده است.

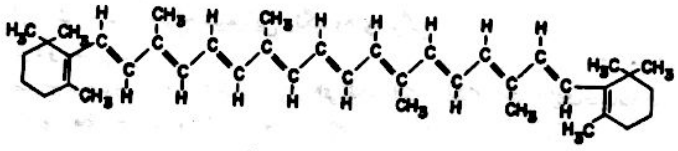
1. bacteriochloropyll 2. tetrapyrolle 3. chelate
4. Phytol



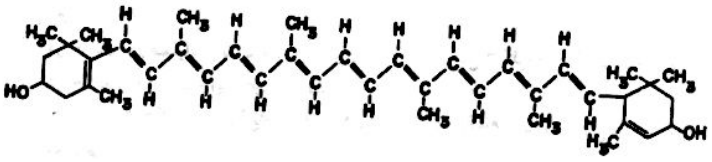
کلروفیل (chlorophyll a)



کلروفیل (chlorophyll b)



بتاکاروتن (β-Carotene)



لوتئین (lutein)

شکل ۱ـ۱ ـ ساختار شیمیایی (فرمول گسترده) چهار رنگیزهٔ کلروپلاستی.

برای جداسازی رنگیزه‌ها به منظور مطالعهٔ آنها از روشهای گوناگون از جمله کروماتوگرافی استفاده می‌شود که به صور گوناگون روی ستون، کاغذ و یا روی لایه‌های نازک و غیره صورت می‌گیرد. کروماتوگرافی لایه‌های نازک روش نسبتاً تازه‌ای مبتنی بر جذب و تفکیک کروماتوگرافی در حد میکرو است که روشهای پیشین کروماتوگرافی ستونی، کاغذی، تبادل یونی و رسوبی را تکمیل می‌کند. در این روش، صفحهٔ شیشه‌ای با لایهٔ نازکی از جاذب پوشانده می‌شود. لایهٔ نازک جاذب در واقع همان ستون آزاد است. نمونه را روی قسمت جاذب به عنوان محلول قرار می‌دهیم و آن را در ظرفی که حاوی مقدار کمی از حلال مناسب است می‌گذاریم. حلال، ضمن حرکت به سمت بالا، مادهٔ قابل حل را از روی سطح لایهٔ نازک می‌شوید و با خود به بالا می‌برد. فقط کافی است که مسافت کمی در حدود ۱۰ تا ۱۵ سانتیمتر حرکت کند.

روش کروماتوگرافی روی لایهٔ نازک هر روزه در حال تکامل است و مرتباً کاربرد تازه‌ای پیدا می‌کند. مهمترین تکاملی که در این زمینه حاصل شده شامل موارد زیر است:

۱ـ تولید تجارتی جاذبهای متنوع

۲ـ تولید تجارتی دستگاهها برای تهیهٔ لایهٔ نازک جاذب روی شیشه.

۳ـ همراه کردن دستگاههای رادیوگرام با کروماتوگرافی روی لایهٔ نازک

فعالیتهای عملی

آزمایش ۱ ـ استخراج شیمیایی رنگیزه‌های برگی

مواد و وسایل لازم:

اسفناج به صورت پودر خشک ـ استون ـ اتر نفت ـ الکل متیلیک ـ اتر اتیلیک ـ پتاس الکلی ـ دکانتور (قیف جداکننده) ـ استوانهٔ مدرج ـ بِشِر.

یادآوری: چون این آزمایش به حلالهای قابل اشتعال نیاز دارد، بنابراین باید از روشن کردن کبریت و آتش در آزمایشگاه مطلقاً خودداری شود.

روش کار

در جریان این عملیات، با استفاده از قابلیت انحلال کلروفیل a، کلروفیل b، گزانتوفیل و کاروتن در حلالهای مختلف، آنها را جدا می‌کنند.

۱ـ ۲/۵ گرم پودر برگهای خشک شدهٔ اسفناج (یا گزنه) را با ۴۰ میلی لیتر استون ۸۰٪ مخلوط کنید.

۲ـ وقتی استون به رنگ سبز تیره درآمد، آن را بر روی پنبه صاف کنید و محلول را برای استفاده در مراحل بعدی نگه دارید.

الف ـ نخستین جداسازی

۱ـ در یک دکانتور، ۵۰ میلی لیتر اتر نفت بریزید و به آن محلول رنگیزه‌های کلروفیلی استون را بیفزایید.

۲ـ آمپول دکانتور را با حرکات چرخش تکان دهید.

۳ـ ۷۰ میلی لیتر آب مقطر را از روی دیوارهٔ آمپول به آن اضافه کنید.

۴ـ دکانتور را با چند حرکت چرخشی تکان دهید.

۵ـ لایهٔ زیرین باید کم رنگتر باشد، بگذارید دو لایه از هم جدا شوند. لایهٔ زیرین را که حاوی استون ـ آب است، دور بریزید.

۶ـ محلول اتر نفت را با ۵۰ میلی لیتر آب مقطر بشویید. آب را دو ر بریزید. بار دیگر این کار را تکرار کنید.

۷ـ به محلول شسته شدهٔ اتر نفت، ۵۰ میلی لیتر الکل متیلیک ۹۲٪ اضافه کنید. دکانتور را با چند حرکت چرخشی تکان دهید (از تنفس بخارات سمی الکل متیلیک احتراز کنید).

۸ـ بگذارید جداسازی صورت گیرد.

۹ـ محلول زیرین حاوی الکل متیلیک را در یک بشر و محلول بالایی اتر نفت را در بشر دیگر جمع کنید. کلروفیل a و کاروتن، در محلول اتر نفت؛ و گزانتوفیل و کلروفیل b، در محلول الکل متیلیک وجود دارند.

ب ـ دومین جداسازی

۱ـ ۵۰ میلی لیتر محلول الکل متیلیک محتوی کلروفیل b و گزانتوفیل را در دکانتور بریزید.

۲ـ ۵۰ میلی لیتر اتر اتیلیک به آن اضافه کنید (در پوش شیشهٔ حاوی اتر را بلافاصله پس از مصرف بردهانهٔ آن بگذارید).

۳ـ با حرکات چرخشی آن را مخلوط کنید.

۴ـ جداسازی صورت نمی‌گیرد، ۵ میلی لیتر آب مقطر از طول دیوارهٔ دکانتور به محلول اضافه کنید. پس از هر بار افزودن آب، آن را تکان دهید. برای ظاهر شدن دو لایه، تقریباً ۲۵ میلی‌لیتر آب لازم است.

۵ـ محلول زیرین الکل متیلیک را دور بریزید، بنابراین دو محلول باقی می‌ماند:

یکی محلول اتر نفت حاوی کلروفیل a و کاروتن که قبلاً در بشر ریخته شده است، و دیگری محلول اتر اتیلیک که حاوی کلروفیل b و گزانتوفیل که در دکانتور باقی مانده است.

ج ـ آخرین جداسازی

I ـ محلول اتراتیلیک

۱ـ در یک استوانهٔ مدرج ۲۵۰ میلی لیتری، ۳۰ میلی لیتر محلول اتر اتیلیک بریزید.

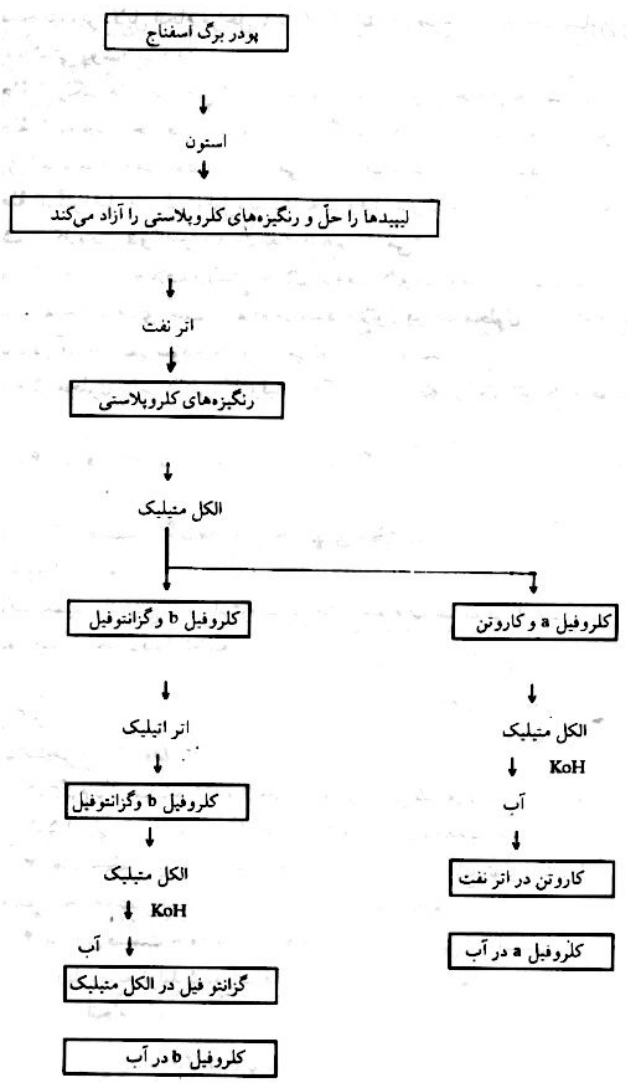
۲ـ به کمک استوانهٔ مدرج دیگر، ۱۰ میلی لیتر محلول پتاس الکلی تازه تهیه شده را از کنارهٔ ظرف در محلول اتر اتیلیک بریزید.

۳ـ آن را تکان دهید و پس از ده دقیقه به آن توجه کنید. تغییر رنگی را که ایجاد می‌شود یادداشت کنید.

۴ـ سپس ۳۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید و تکان دهید. دو لایه جدا می‌شوند. کلروفیل b در آب و گزانتوفیل در الکل اتیلیک وجود دارد.

II محلول اتر نفت

عمل را به همان طریق فوق برای محلول اتر نفت با همان حجمها انجام دهید. در اینجا نیز دو لایه ظاهر می‌شود که در لایهٔ آب، کلروفیل a و در لایهٔ اتر نفت، کاروتن وجود دارد. در طرح زیر، مراحل جداسازی رنگیزه‌های کلروپلاستی خلاصه می‌شود:



توضیحات زیر دلایل انجام مراحل ۱ تا ۶ ذکر شده در طرح را برای جداسازی رنگیزه‌های کلروپلاستی روشن می‌کند:

مرحلهٔ ۱: رنگیزه‌ها باید با حل شدن در استون از سایر مواد یاخته‌ای جدا شوند.

مرحلهٔ ۲: به علت اختلاف قابلیت انحلال رنگیزه ها در اتر نفت، ترجیحاً از استون که حلال بهتری است استفاده می‌شود. استون را می‌توان با آب شست و خارج کرد.

مرحلهٔ ۳: کلروفیل b و گزانتوفیل، نسبت به کلروفیل a و کاروتن، در الکل متیلیک بهتر حل می‌شوند. کلروفیل a و کاروتن در اتر نفت از هم جدا می‌شوند.

مرحلهٔ ۴: به علت اختلاف قابلیت انحلال کلروفیل b و گزانتوفیل در اتراتیلیک، ترجیحاً از متانول که حلال بهتری است استفاده می‌شود. متانول در آب محلول است که در حالی که اتر اتیلیک در آب حل نمی‌شود و متانول را می‌توان با آب شست.

مرحلهٔ ۵: محلول پتاس الکلی، کلروفیل b وگزانتوفیل را که در الکل اتیلیک وجود دارند حل می‌کند.

مرحلهٔ ۶: کلروفیل b در پتاس الکلی حل می‌شود. اگر آب اضافه شود کلروفیل a در آب می‌ماند.

آزمایش ۲ـ تقسیم رنگیزه‌ها بین حلالهای مختلف

مواد و وسایل لازم:

کربنات کلسیم ـ اسفناج تازه ـ استون ـ اتر نفت ـ سولفات سدیم بی آب ـ دکانتور (قیف جدا کننده)ـ قیف بوخنر ـ فیول تخلیه.

روش کار

الف ـ استخراج رنگیزه‌ها

۱ـ ۵ گرم برگ اسفناج راکه قبلاً خرد کرده‌اید باکمی شن و کربنات کلسیم در هاون بسایید.

۲ـ ۲۵ میلی لیتر استون به آن اضافه کنید و مدت ۵ دقیقه بسایید.

۳ـ چند لحظه آن را به حال استراحت بگذارید و سپس مایع تولید شده را در قیف بوخنر که به فیول تخلیه متصل است بریزید. سعی کنید قسمت جامد را در قیف نریزید.

۴ـ بر روی قسمت جامد مانده در هاون، دوباره ۱۵ میلی لیتر استون بریزید و مانند قبل عمل کنید دوباره مایع تولید شده را در قیف بوخنر بریزید. این عمل را برای بار دوم (با ۱۵ میلی لیتر استون) نیز انجام دهید.

ب ـ جداسازی رنگیزه‌ها

۱ـ تمام عصارهٔ محلول در استون راکه به دست آمده است در دکانتور بریزید.

۲ـ ۱۲ میلی لیتر اتر نفت در آن بریزید و درپوش دکانتور را ببندید و مایع را به آرامی ولی به طور مداوم به مدت ۵ دقیقه با حرکات چرخشی تکان دهید در حالی که دکانتور را برمی‌گردانید و شیر را باز می‌گذارید تا فشار درون دکانتور زیاد نشود. دوباره شیر را ببندید و دکانتور را در درون پایهٔ خود قرار دهید.

۳ـ درپوش دکانتور را بردارید و ازکنارهٔ ظرف ۱۵ میلی لیتر آب مقطر به آرامی به آن وارد کنید و آن را مانند قبل با احتیاط تکان دهید و سپس در جای خود بگذارید.

۴ـ ۱۵ دقیقه صبر کنید تا در ظرف دو لایه ایجاد شود.

۵ـ لایهٔ بالایی به رنگ سبز تیره (اتر نفت) دارای کلروفیل و کاروتن، و لایهٔ زیرین به رنگ زرد مایل به سبز (استون مایع) شامل گزانتوفیل است.

۶ـ لایهٔ زیرین را در یک ارلن بریزید.

۷ـ لایهٔ بالایی راکه در دکانتور باقی مانده است پنج بار پیاپی و هر بار تقریباً با ۳۰ میلی لیتر آب مقطر شستشو دهید. در هر شستشو، آب را به آرامی ازکنارهٔ دکانتور به درون آن بریزید و ظرف را آهسته تکان دهید و بگذارید به حال استراحت باقی بماند.

۸ـ لایهٔ زیرین آن را با دقت از دکانتور خارج کنید.

۹ـ تمام اتر نفت موجود در دکانتور را بر روی یک صافی که دارای ۲۰ گرم سولفات سدیم بی آب (So_4Na_2) است و محلول را خشک می‌کند، بریزید.

۱۰ـ اتر نفت را به آرامی در یک صافی که به فیول تخلیه مربوط است بریزید و به این ترتیب تمام محلول حاوی رنگیزهٔ مورد مطالعه را به دست آورید.

۱۱ـ ۳ میلی لیتر از این محلول فوراً به مصرف کروماتوگرافی ستونی می‌رسد و بقیه (لاقل ۴ میلی لیتر) بعداً برای جداسازی حلالهای مختلف به کار خواهد رفت.

ج ـ ادامهٔ جداسازی به وسیلهٔ تقسیم بین حلالهای مختلف

۱ـ باقیماندهٔ محلول رنگیزه در اتر نفت (لاقل ۴ میلی لیتر) را در یک دکانتور تمیز و خشک بریزید.

۲ـ ۵ میلی لیتر پتاس ۵٪ محلول در متانول به آن بیفزایید و مانند قبل آن را به مدت ۵ دقیقه تکان دهید. سپس دکانتور را در پایهٔ خود بگذارید.

۳ـ پس از چند دقیقه، یک میلی لیتر آب مقطر و سپس ۳ میلی لیتر اتر نفت به آرامی اضافه نمایید و مدت ۵ دقیقه آن را تکان دهید.

۴ـ محلول را به مدت ۱۰ دقیقه روی پایه قرار دهید تا دو لایه به شرح زیر تشکیل شود:

ـ لایهٔ بالایی زرد (اتر نفت) شامل کاروتن و گزانتوفیل هاست.

ـ لایهٔ زیرین سبز (پتاس محلول در متانول) شامل کلروفیل‌هاست که صابونی شده‌اند.

۵ـ رنگیزهٔ جدا شده را با اندازه‌گیری به وسیلهٔ اسکپتروفتومتر یا مشاهده در اسپکتروسکوپ، مشخص کنید.

آزمایش ۳ـ استخراج مواد رنگی درون کلروپلاست و جدا کردن آنها به روش کروماتوگرافی ستونی

مواد و وسایل لازم:

۲۰ گرم برگ اسفناج یا هر گیاه دیگر ـ استون ـ اتر نفت ـ آب مقطر ـ شکر ـ سولفات سدیم بی‌آب ـ متانول ۸۰٪ ـ کلرور سدیم ـ محلول پروپانول نرمال ـ لولهٔ شیشه‌ای به طول ۲۵ سانتیمتر و قطر ۲ سانتی‌متر ـ پایهٔ مخصوص نصب لولهٔ شیشه‌ای ـ کاغذ صافی ـ ترازو ـ هاون چینی ـ پارچهٔ تنزیب ـ دکانتور ـ قیچی ـ ارلن ـ لوله آزمایش.

روش کار

الف ـ آماده‌سازی ستون کروماتوگرافی

۱ـ ستون مخصوص کروماتوگرافی را که از یک لولهٔ شیشه‌ای به طول ۲۵ سانتیمتر و قطر ۲ سانتیمتر تشکیل شده، به پایهٔ مخصوص آن وصل کنید.

۲ـ مقدار کمی پودر شکر به ارتفاع تقریبی ۳ سانتی متر در آن بریزید و به وسیلهٔ میلهٔ شیشه‌ای مخصوص آن را به آهستگی بکوبید به طوری که موجب شکستگی ستون نگردد و خوب فشرده شود.

۳ـ سطح شکر فشرده شده را با سوزن مخصوص خوب خراش دهید تا با پودر شکر بعدی که کوبیده می‌شود به صورت یکنواخت در آید و سطح جداگانه‌ای را ایجاد نکند.

۴ـ اعمال فوق را چند بار تکرار کنید تا ارتفاع پودر شکر فشرده شده به ۱۴ سانتیمتر برسد.

۵ـ روی ستون شکر را به ارتفاع ۰/۵ سانتیمتر از پودر سولفات سدیم بی‌آب بپوشانید.

۶ـ در پایان، یک لایه کاغذ صافی را که قطر آن مساوی قطر درونی استوانهٔ ستون است روی سولفات سدیم بگذارید؛ در این حالت ستون آماده است.

ب ـ استخراج مواد رنگی از کلروپلاستهای برگ

یادآوری: چون در این آزمایش با اتر نفت کار می‌کنیم و از طرفی اتر مادهٔ آتش گیر و گاز آن قابل انفجار است، لذا دانشجویان باید توجه داشته باشند که این اعمال دور از شعله و هر گونه جرقه صورت گیرد.

۱ـ مقدار ۵ تا ۲۰ گرم از برگهای سبز اسفناج (یا هر گیاه دیگر) را با ترازو وزن کنید و آنها را با قیچی خرد کرده درون هاون چینی بریزید.

۲ـ ۵۰ میلی لیتر استون به آن اضافه کنید و آن را بکوبید تا خوب نرم شده و یاخته‌های آن متلاشی شوند و در عین حال مواد رنگی کلروپلاستها در استون حل گردد (عمل کوبیدن را طوری انجام دهید که محتویات هاون به خارج نریزد).

۳ـ محتویات هاون را با گذراندن از ۴ لایه پارچهٔ تنزیب صاف کنید.

۴ـ محلول را که از پارچهٔ تنزیب عبور کرده به دکانتور (قیف جداکننده) منتقل کنید.

۵ـ ۵۰ میلی لیتر اتر نفت و ۵۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه کنید.

۶ـ دکانتور را طوری در دست بگیرید که سر آن در کف دست چپ و انتهای آن که دارای شیر است در دست راست و به طرف بالا باشد به طور یکه با دست راست بتوان شیر را باز کرد و بست.

۷ـ دکانتور را به آرامی تکان دهید ولی توجه داشته باشید که پس از هر حرکت، انتهای شیر دار دکانتور را به سمت بالا گرفته و شیر آن را به آهستگی باز کنید تا گاز اتر خارج شود. عمل تکان دادن را به مدت ۱۰ دقیقه ادامه دهید تا تمام مواد رنگی به اتر نفت منتقل گردد.

۸ـ پس از مدتی، دکانتور را به حال خود بگذارید تا تمام مواد رنگی که در اتر نفت حل شده است فاز جداگانه‌ای را تشکیل دهد و در قسمت بالا قرار گیرد.

۹ـ قسمت زیرین را جدا کرده و دور بریزید.

۱۰ـ ۳۰ میلی لیتر متانول ۸۰٪ به دکانتور اضافه کنید، تا تمام مواد رنگی به فاز اتر نفت منتقل شود.

۱۱ـ قسمت زیرین را جدا کرده دور بریزید.

۱۲ـ برای اینکه تمام استون از اتر نفت جدا شود، به اندازهٔ ۳۰ میلی لیتر از محلول ۱۰٪ نمک طعام به دکانتور اضافه کنید و خوب تکان دهید.

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

۱۴ـ محلول باقیمانده در دکانتور (اتر نفت + مواد رنگی کلروپلاست) را به یک ارلن حاوی ۳ گرم سولفات سدیم بی آب انتقال دهید و ۵ دقیقه صبر کنید تا تمام مولکولهای آب باقیمانده توسط سولفات سدیم بی آب جذب شود.

۱۵ـ محلول اتر نفت را در ارلن بریزید.

ج ـ تفکیک رنگهای مختلف کلروپلاست به روش کروماتوگرافی ستونی

۱ـ مقداری اتر نفت خالص را در داخل ستون کروماتوگرافی که قبلاً تهیه کرده‌اید بریزید و از پایین خلأ ایجاد کنید تا اتر نفت به طرف پایین ستون کشیده شود. ولی توجه داشته باشید که مقدار اتر نفت باید آن قدر باشد که وقتی $\frac{2}{3}$ ارتفاع ستون را طی کرد، هنوز مقدار کمی از آن در

بالای سطح کاغذ صافی وجود داشته باشد؛ چون در غیر این صورت هوا به داخل ستون کشیده می‌شود و ستون خاصیت جداکنندگی خود را از دست می‌دهد.

۲ـ پس از اینکه اتر نفت $\frac{2}{3}$ ستون را طی کرد، ۱۰ میلی لیتر از مواد رنگی را که استخراج کرده‌اید داخل ستون اضافه کنید.

۳ـ پیش از اینکه تمام مواد رنگی ستون جذب شود، از بالا اتر نفت خالص به ستون اضافه کنید و عمل ایجاد خلأ را ادامه دهید و توجه داشته باشید که ستون نباید خشک شود و دایماً با اضافه کردن ۳ میلی لیتر اتر نفت، آن را مرطوب نگه دارید.

۴ـ اکنون، مواد رنگی مختلف به تدریج از هم تفکیک و جدا می‌شوند. نخستین مادهٔ رنگی که باید جدا شود کاروتن است. وقتی کاروتن به پایین ستون رسید، یک لولهٔ آزمایش درون ارلن خلأ قرار دهید و کاروتن را در آن جمع‌آوری کنید.

۵ـ پس از تمام شدن کاروتن، لولهٔ آزمایش دیگری را درون ارلن خلأ قرار داده، از بالا محلول پروپانول نرمال در اتر نفت را اضافه کنید و عمل مکیدن را ادامه دهید. کلروفیل a به رنگ سبز مایل به آبی جدا می‌شود.

۶ـ لولهٔ آزمایش درون ارلن خلأ را عوض کرده و عمل ریختن محلول ۰/۵٪ پروپانول نرمال در اتر نفت را ادامه دهید تا کلروفیل b به رنگ سبز مایل به زرد جدا شود.

یادآوری: اگر کلروفیل b خیلی کند حرکت کند، می‌توانید از محلول ۱۰٪ پروپانول نرمال در اتر نفت به ستون اضافه کنید.

۷ـ دهانهٔ لوله‌های آزمایش حاوی مواد رنگی را به وسیلهٔ چوب پنبه ببندید و آنها را در تاریکی قرار دهید تا در جلسهٔ آینده طیف جذبی آنها را اندازه بگیرید.

۸ـ در بعضی از برگها، گزانتوفیل یافت می‌شود که بعداً از کلروفیل b خارج می‌گردد.

آزمایش ۴ـ جدا کردن رنگیزه‌ها به وسیلهٔ کروماتوگرافی ستونی

الف ـ تهیهٔ ستون کروماتوگرافی

ستون مخصوص کروماتوگرافی را با ریختن پودر سلولز واتمن[1] که در یک ستون شیشه‌ای به قطر ۱۵ میلیمتر و ارتفاع ۱۵ سانتیمتر به شدت فشرده شده است، تهیه کنید. پودر سلولز با اتر نفت شسته می‌شود.

1. Watman

ب ـ کروماتوگرافی رنگیزه‌ها

۱ـ درست پیش از آغاز کروماتوگرافی، اتر نفت اضافی ستون را خارج سازید.

۲ـ وقتی که تمام اتر نفت را به درون پودر سلولز نفوذ کرد، با احتیاط به وسیلهٔ پیپت از قسمت بالای ستون ۳ میلی لیتر از رنگیزهٔ موجود در اتر را به درون ستون بریزید. بگذارید اتر نفت به آرامی جریان یابد (یک قطره در هر دو ثانیه).

۳ـ وقتی که تمام محلول رنگیزه در پودر سلولز نفوذ کرد، حدود ۱۰ میلی‌لیتر اتر نفت بر روی ستون بریزید به‌طوری که رنگیزه را با خود به سمت پایین ببرد. برای اینکه مطمئن شوید مهاجرت رنگیزه به خوبی انجام شده است، باز هم اتر نفت اضافه کنید.

نتیجه: رنگیزه‌ها از هم جدا می‌شوند و چهار لایهٔ رنگین مختلف تشکیل می‌گردد. در بالا، نوار سبز رنگ مربوط به کلروفیل b است. نوار دوم به رنگ سبز مایل به آبی مربوط به کلروفیل a است. در زیر کلروفیل a، یک لایهٔ زرد محتوی گزانتوفیل و بالاخره در قسمت زیرین یک لایهٔ نارنجی مربوط به کاروتن دیده می‌شود. نوار دیگری را که کم و بیش مشخص و مربوط به فئوفیتین است نیز می‌توان در زیر آنها مشاهده کرد.

آزمایش ۵ـ جدا کردن رنگیزه‌ها به وسیلهٔ کروماتوگرافی روی لایهٔ نازک[1] (ژل سیلیس یا سیلیکاژل)

مواد و وسایل لازم:

برگ تازهٔ اسفناج ـ استون ـ سولفات ـ کلروفرم ـ هگزان ـ دی اتیل اتر ـ ژل سیلیس یا سیلیکاژل ـ قیف بوخنر ـ صفحهٔ شیشه‌ای ـ پیپت پاستور ـ مخزن شیشه‌ای.

روش کار

۱ـ رنگیزه‌های کلروپلاستی را با ساییدن ۲۵ گرم برگهای تازهٔ اسفناج در ۱۰۰ میلی لیتر استون استخراج کنید. اگر برگهای خشک به کار می‌برید، ۲/۵ گرم برگ خشک را در ۱۰۰ میلی لیتر استون ۸۰٪ در مخلوط کن خوب بسایید.

۲ـ وقتی استون رنگ سبز تیره به خود گرفت، چند گرم Na_2SO_4 را به آن بیفزایید تا آب حاصل از استخراج گرفته شود، بعد عصاره را با استفاده از قیف بوخنر صاف کنید.

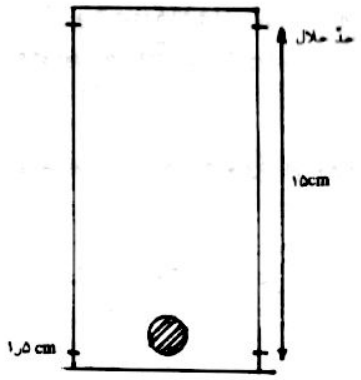
۳ـ عصارهٔ محلول در استون را در دستگاه خشک کنندهٔ دوّار قرار دهید تا استون آن تبخیر شود.

۴ـ رنگیزهٔ خشک شده را در ۱۰ میلی لیتر کلروفرم حل کنید.

1. thin - layer chromatography

۵ـ صفحهٔ شیشه‌ای (۲۰×۵ سانتیمتر) راکه با جاذب پوشانده شده انتخاب کنید. مطابق شکل، درست پایین صفحهٔ شیشه‌ای، ۱/۵ سانتیمتری انتهای آن، یعنی در جایی که می‌خواهید نمونه را قرار دهید، در دو لبهٔ عرض شیشه خراشهای کوچکی ایجاد کنید و در فاصلهٔ ۱۵ سانتیمتری بالای خراش اولیه نیز خراشهای دیگری به وجود آورید. خراش بالا برای مشخص کردن محلی است که حلال باید تا آنجا مهاجرت کند.

۶ـ در مرحلهٔ بعدی، با استفاده از پیپت ۰/۰۱ یا ۰/۱ میلی لیتر و یا پیپت پاستور، مقدار کمی از عصارهٔ استخراج شده را به صورت نقطه‌ای به قطر یک سانتیمتر بین دو علامتی که قبلاً در پایین صفحهٔ شیشه‌ای با خراش مشخص کرده‌اید، قرار دهید. نمونه باید در وسط این دو علامت قرار گیرد و پیپت نیز نباید با جاذب صفحهٔ شیشه‌ای تماس پیدا کند.



کروماتوگرام R_f رنگیزه‌ها

۷ـ نمونه را که به صورت نقطه‌ای روی جاذب شیشه‌ای قرار دارد، با استفاده از پنکه خشک کنید. در صورت لزوم، مجدداً روی این نقطه عصارهٔ استخراج نشدهٔ حل شده در حلّال اضافه کنید و آن را خشک نمایید.

۸ـ صفحهٔ شیشه‌ای جاذب را در محفظه‌ای که حاوی حلّال (هگزان ـ دی اتیل اتر ـ استون به نسبت ۲۰: ۳۰: ۶۰ حجمی) است قرار دهید، عمق حلّال خیلی اهمیت دارد و نقطه‌ای که نمونه روی آن قرار گرفته هرگز نباید زیر سطح حلال قرار گیرد.

۹ـ به‌چگونگی جدا شدن ومهاجرت حلّال خوب توجه‌کنید. وقتی‌که حلّال به ۱۵ سانتیمتری بالای علامت اولیهٔ پایینی رسید، شیشه را ازمحفظه خارج کنید وبگذارید تا خشک

شود.

۱۰ـ ارزش Rf[1] را برای هر کدام از رنگیزه‌ها محاسبه کنید.

۱۱ـ پس از مشاهدهٔ کروماتوگرام و یادداشت کردن اطلاعات لازم، نوارهای تشکیل شده روی سیلیکاژل راکه حاوی یک نوع رنگیزه است با تیغ تیز و تمیز جدا کنید.

۱۲ـ بلافاصله، این قسمتهای جدا شده را جداگانه در لولهٔ سانتریفوژ قرار دهید و به آن ۵ میلی لیتر استون اضافه کنید و لوله را به شدت تکان دهید تا رنگیزه در حلال حل شود و از سیلیکاژل یا هر جاذب دیگر جدا گردد.

۱۳ـ سپس آن را سانتریفوژ کنید تا جاذب ته نشین شود. محلول رویی راکه حاوی رنگیزه است با پیپت از لولهٔ سانتریفوژ خارج کرده آن را در لولهٔ آزمایش قرار دهید و در یخچال نگه دارید تا بعداً مورد استفاده قرار گیرد.

۱۴ـ در مرحلهٔ بعد، غلظت هر رنگیزه را با رقیق یا غلیظ کردن تنظیم کنید وطیف جذبی رنگیزه‌هایی چون کلروفیل a , b بتاکاروتن، نئوگزانتین[2] یا لوتئین را با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه بگیرید. جذب (چگالی اُپتیکی)[3] و یا درصد جذب هرکدام از محلولهای رنگیزه را در طول موج ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر اندازه بگیرید. اگر اسپکتروفتومتری که در اختیار دارید به «دستگاه یادداشت کننده»[4] متصل نیست، درصد جذب را در هر ۱۰ نانومتر با دست اندازه بگیرید و یادداشت کنید.

۱۵ـ منحنی جذبی را رسم کنید و آن را به گزارش خود ضمیمه نمایید.

آزمایش ۶ـ جدا کردن رنگیزه‌های فتوسنتزی به وسیلهٔ کروماتوگرافی کاغذی

مواد و وسایل لازم:

برگ اسفناج یا هرگیاه دیگر ـ استون ـ آب مقطر ـ اتر نفت ـ سولفات سدیم بی آب ـ قیچی ـ کاغذ کروماتوگرافی (کاغذ صافی) ـ مخلوط کن یا هاون چینی ـ دکانتور (قیف جداکننده).

۱ـ Rf فاصلهٔ نقطه‌ای است که نمونه روی صفحه قرار داده شده تا نقطه‌ای که محلول طی کرده است.

2. neoxanthin

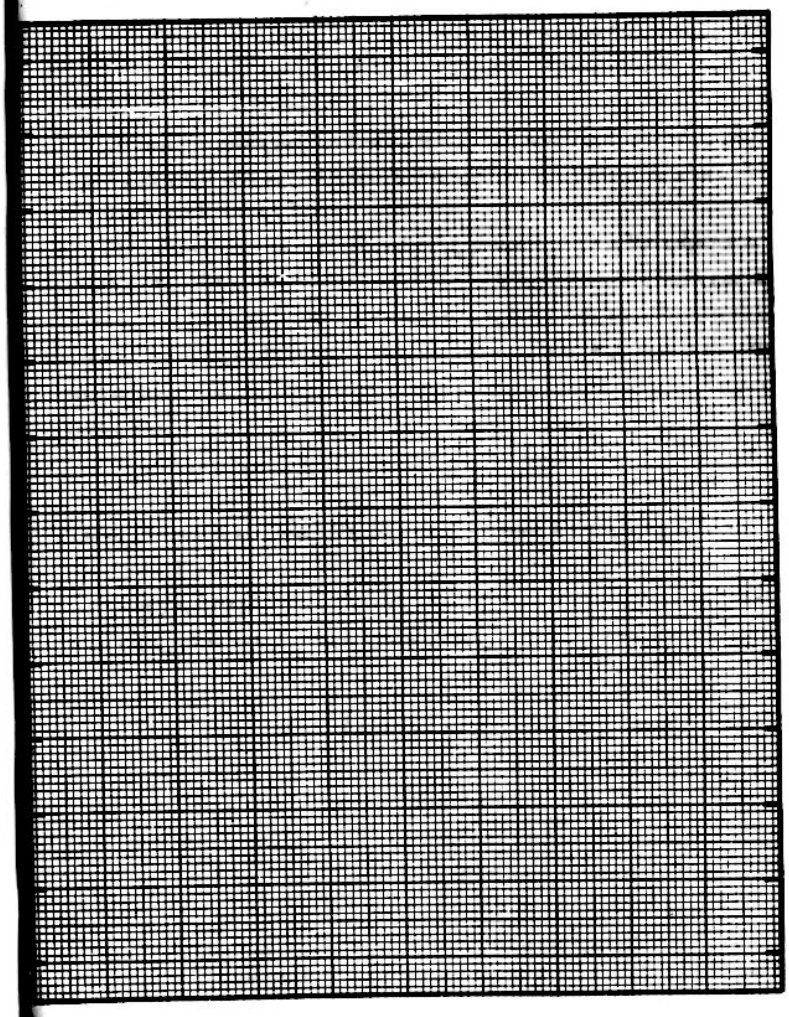
3. Optical density (O.D)

4. recorder

گزارش مربوط به کروماتوگرافی روی لایهٔ نازک

نام.....تاریخ.....گروه.....

طیف جذبی



روش کار

الف ـ استخراج رنگیزه‌ها

برگها را با قیچی خرد کرده و در استون ۹۰٪ بریزید و آن را به مدت ۲ دقیقه در مخلوط کن بسایید و یا این عمل را در هاون انجام دهید. عصاره را با استفاده از قیف بوخنر در قیف جدا کننده صاف کنید. به همان حجم به آن اتر نفت اضافه نمایید و خوب تکان دهید. سه مرتبه با آب بشویید و هر مرتبه محلول مایع را چند دقیقه به حال خود بگذارید. این روش عصاره گیری وقتی به نتیجهٔ مطلوب می‌رسد که برگ در استون خوب ساییده شود و صاف گردد.

ب ـ جداسازی

۱ـ حلاّل مناسبی با این نسبتها تهیه کنید: ۱۰۰ قسمت اتر نفت، ۱۲ قسمت استون ۹۰٪.

۲ـ کروماتوگرافی را به اندازهٔ ۲۵×۲۵ سانتیمتر (مناسبترین اندازه) ببرید، چون می‌توان روی آن چند نقطه قرار داد و آنها را همزمان با یکدیگر به پیش راند:

۳ـ چند قطره از محلول رنگیزهٔ استخراج شده را بر روی کاغذ کروماتوگرافی قرار دهید.

۴ـ مدت ۶ ساعت صبر کنید تا رنگیزه‌ها از هم جدا شوند (همچنین می‌توان کاغذ را به مدت یک شب در حلال قرار داد).

۵ـ ظاهر کردن رنگیزه‌ها ـ در این مدت مادهٔ ظاهر کننده لازم نیست، چون رنگیزه‌ها در نور فرا بنفش از خود فلوئورسانس ساطع می‌کنند و با استفاده از این نور به آسانی می‌توان آنها را مشاهده کرد.

نتایج

رنگیزه‌ها به رنگهای مختلف و در فاصله‌های متفاوت، به شرح زیر، بر روی کروماتوگرام ظاهر می‌شوند:

نام رنگیزه	Rf رنگیزه	رنگ نوار
ـ کاروتن[1]	۰/۹۵	زرد
ـ فئوفیتین[2]	۰/۸۳	زرد ـ خاکستری
ـ (فئوفیتین فرآوردهٔ تجزیهٔ کلروفیل است که همیشه به خوبی دیده نمی‌شود)		
ـ گزانتوفیل (غالباً به صورت ۲ نوار ظاهر می‌شود)	۰/۷۱	زرد ـ قهوه‌ای
ـ کلروفیل a	۰/۶۵	آبی ـ سبز
کلروفیل b	۰/۴۵	سبز

1. carotene 2. Pheophytin

خودآزمایی

۱ـ چه رنگیزه‌هایی در اتر نفت محلول اند؟

۲ـ کلروفیل b در چه ماده‌ای بهتر حل می‌شود؟

۳ـ محلول پتاس الکلی، کدامیک از رنگیزه‌ها را در خود حل می‌کند؟

۴ـ از دو رنگیزهٔ کاروتن و کلروفیل a، کدامیک در آب و کدامیک در اتر نفت باقی می‌ماند؟

کاوش ۲: فتوسنتز

فتوسنتز فرایندی است که در طی آن تعدادی از موجودات زنده برای سنتز مولکولهای آلی از دی‌اکسیدکربن به عنوان منبع کربن، انرژی نورانی را مصرف می‌کنند. این موجودات شامل باکتریها (باکتریهای فتوسنتزکننده) و تمام گیاهان کلروفیل‌دار هستند.

برای انجام فتوسنتز شرایطی لازم است که عبارت‌اند از: نور، CO_2، محیط مایع (برای موجودات زندهٔ خاکزی و آبگیری کافی)، رنگیزه‌ها و آنزیمها.

تظاهرات فتوسنتز شامل جذب CO_2، تصاعد O_2 (بجز باکتریها) و سنتز مواد آلی است. در این کاوش، مرحلهٔ روشنایی فتوسنتز که منجر به تصاعد اکسیژن شده و تحت عنوان «واکنش هیل[1]» نامیده می‌شود، تصاعد اکسیژن، جذب CO_2 و همچنین عواملی که در میزان فتوسنتز مؤثرند، مطالعه و بررسی می‌شوند.

هدفهای آموزشی: انتظار می‌رود که پس از مطالعهٔ این کاوش و انجام عملیات مربوط به آن، بتوانید:

۱ـ فرایند فتوسنتز را تعریف کنید.

۲ـ روش هیل را در بررسی فتوسنتز به طور خلاصه توضیح دهید.

۳ـ با استفاده از روش مناسب، کلروپلاستهای اسفناج را جدا کرده و غلظت کلروفیل را در سوسپانسیون آن محاسبه کنید.

۴ـ با انجام آزمایشهای مناسب، عوامل مؤثر بر فتوسنتز را شناسایی کنید.

۵ـ با انجام آزمایشهای مناسب، توانایی کلروپلاست را در اکسایش آب و آزادسازی اکسیژن نشان دهید.

۶ـ با انجام آزمایشهای مناسب، میزان اکسیژن متصاعد شده توسط گیاه سبز یا جلبک را

1. Robert Hill