

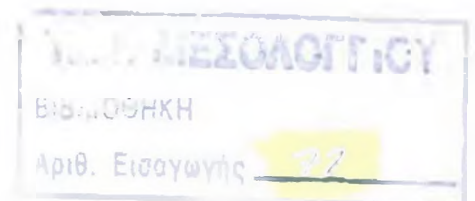
Τ.Ε.Ι. ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ
Σχολή: ΣΤΕΓ
Τμήμα: Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών
και Ανθοκομίας

Βιβλιοθήκη ΤΕΙ/Μ

Απομόνωση και Βιολογική Συντήρηση Πρωτοπλαστών
και Χλωροπλαστών από τα Κύτταρα του Μεσόφυλλου
του Φυτού Spinach Oleraceae (Σπανάκι)

Εισηγητής : Σαλάχας Γεώργιος

Πτυχιακή Εργασία του σπουδαστή Παπασάββα Άγγελου



Μεσολόγγι 2004

ΥΔΡΟΠΟΝΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

ΓΕΝΙΚΑ

Η υδροπονία είναι μέθοδος καλλιέργειας φυτών εκτός εδάφους, σύμφωνα με την οποία οι ρίζες των φυτών αναπτύσσονται εντός στερεών υποστρωμάτων εμποτισμένων με τεχνητό θρεπτικό διάλυμα ή εντός καθαρού θρεπτικού διαλύματος από το οποίο τα φυτά προσπορίζονται τις απαραίτητες για την ανάπτυξη τους ποσότητες νερού και θρεπτικών στοιχείων.

Η καλλιέργεια φυτών εκτός φυσικού εδάφους έχει λάβει χώρα ήδη από τα αρχαία χρόνια. Η πιο γνωστή περίπτωση από την αρχαιότητα, αν και όχι η μοναδική, είναι οι Κρεμαστοί Κήποι της Βαβυλώνας, όπου τα φυτά αναπτυσσόταν πάνω σε αναβαθμίδες γεμάτες με μείγμα άμμου και χώματος. Στα νεώτερα χρόνια η πρώτη αναφορά σε καλλιέργεια φυτών εκτός εδάφους γίνεται από τον Ιρλανδό Robert Boyle κατά το 1966, ο οποίος κατάφερε να καλλιεργήσει ορισμένα είδη φυτών σε φυτοδοχεία γεμισμένα μόνο με φυσικό νερό, χωρίς να υπάρχει κάποιο στερεό μέσο στον χώρο ανάπτυξης των ριζών.

Η υδροπονία όμως με την πλήρη έννοια του όρου μπορεί να θεωρηθεί ότι γεννήθηκε, όταν για πρώτη φορά καλλιεργήθηκαν φυτά μέσα σε τεχνητό θρεπτικό διάλυμα. Οι πρώτοι που παρασκεύασαν θρεπτικά διαλύματα και καλλιεργήσαν φυτά ήταν οι γερμανοί φυσιολόγοι Sachs (1859,1861) και Knop (1859). Σήμερα θεωρείται ότι είναι εκείνοι που με τις έρευνές τους έθεσαν τις επιστημονικές βάσεις της υδροπονίας.

Η υδροπονία βρήκε πρακτική εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα για πρώτη φορά κατά την διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου από τον αμερικανικό στρατό σε ορισμένα άγονα νησιά του Ειρηνικού με σκοπό την παραγωγή νωπών λαχανικών για την κάλυψη των διατροφικών αναγκών των μαχόμενων στρατιωτών στην περιοχή.

Μετά τα τέλη της δεκαετίας του '60 η υδροπονία βρήκε κυρίως πρακτική εφαρμογή μόνο σποραδικά και σε περιορισμένη κλίμακα, κυρίως στην Αμερική και στην Αγγλία. Από τις αρχές της δεκαετίας του '70 το ενδιαφέρον για την χρήση υδροπονικών συστημάτων σε εμπορική κλίμακα αναζωπυρώθηκε διεθνώς και κυρίως στις Σκανδιναβικές χώρες και στην Ολλανδία, όπου

κυριάρχησε η καλλιέργεια σε αδρανή στερεά υποστρώματα και κυρίως σε πετροβάμβακα.

Σύμφωνα με στοιχεία του 1991 (Vogel and Goehler, 1991), στις 8 βόρειες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (εκτός Ελλάδας, Ισπανίας, Ιταλίας και Πορτογαλίας), το 27,6% των εκτάσεων με θερμοκηπιακές καλλιέργειες καλλιεργείται υδροπονικά (46.000 στρέμματα).

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΠΟΝΙΚΩΝ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ

Μια υδροπονική εγκατάσταση από άποψη εξοπλισμού μπορεί να διακριθεί σε τέσσερα επιμέρους τμήματα:

1. Σύστημα παρασκευής θρεπτικού διαλύματος

Περιλαμβάνει:

- I. Την εγκατάσταση παροχής νερού: είναι σημαντικό το νερό να είναι καλής ποιότητας και τα υλικά της εγκατάστασης να μην απελευθερώνουν στο νερό ουσίες ή ιόντα σε συγκεντρώσεις που μπορεί να δημιουργήσουν πρόβλημα στην καλλιέργεια.
- II. Συσκευές καθαρισμού του νερού (φίλτρα νερού): είναι απαραίτητα για τον καθαρισμό του νερού από στερεά σωματίδια, όπως άμμος άργιλος, μικροοργανισμοί κλπ., ώστε να μην δημιουργούνται προβλήματα στο σύστημα παροχής του διαλύματος στα φυτά.
- III. Δοχεία πυκνών διαλυμάτων: είναι μεγάλα δοχεία χωρητικότητας 50-1.000 λίτρων, κατασκευασμένα από υλικό που δεν διαβρώνεται και δεν οξειδώνεται, στα οποία τοποθετούνται τα λιπάσματα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος, με το οποίο τροφοδοτούνται τα φυτά σε ποσότητες πολλαπλάσιες από αυτές που απαιτούνται για να προκύψουν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις.
- IV. Σύστημα αυτόματου ελέγχου: υπάρχει μόνο στους μείκτες λιπασμάτων. Το σύστημα αυτόματου ελέγχου της ανάμειξης νερού και πυκνού διαλύματος και της παροχής του προκύπτοντας τροφοδοσίας αραιού διαλύματος στα φυτά, στην απλούστερη μορφή του είναι ένας ηλεκτρονικός πίνακας εφοδιασμένος με πλήκτρα ή κοχλίες, μέσω των οποίων γίνεται η ρύθμιση του pH και της αγωγιμότητας και έναν ή

περισσότερους χρονοδιακόπτες για τον καθορισμό της συχνότητας και του χρόνου παροχής θρεπτικού διαλύματος στα φυτά.

V. Μονάδα αραίωσης πυκνών διαλυμάτων μπορεί να είναι:

1. *Μια εγκατάσταση αποτελούμενη από μία ή περισσότερες δοσομετρικές αντλίες* : στην πιο απλή της εκδοχή αποτελείται από δύο ή τρεις απλές δοσομετρικές αντλίες συνδεδεμένες σε σειρά ή (σπανιότερα) παράλληλα καθεμιάς με τις άλλες στο δίκτυο άρδευσης. Ο αριθμός των δοσομετρικών αντλιών ισούται με τον αριθμό των δοχείων των πυκνών διαλυμάτων που υπάρχουν.
2. *Ένας αυτόματος μείκτης λιπασμάτων*: είναι πιο πολύπλοκες εγκαταστάσεις, οι οποίες εργάζονται με μεγαλύτερη ακρίβεια και προσφέρουν περισσότερη ευελιξία ως προς τους χειρισμούς του θρεπτικού διαλύματος, ενώ είναι σημαντικά αυξημένες και οι δυνατότητες αυτοματισμών που παρέχουν. Χρησιμοποιούνται στις περισσότερες υδροπονικές μονάδες.

2. Σύστημα παροχής θρεπτικού διαλύματος

Ανάλογα με το είδος του υδροπονικού συστήματος και το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα καλλιέργειας, σε γενικές γραμμές διακρίνουμε τις εξής κύριες περιπτώσεις:

- a. Δεν υπάρχει στερεό υπόστρωμα και το θρεπτικό διάλυμα κυλάει σε υδροροές ή στο κατάλληλα διαμορφωμένο δάπεδο του θερμοκηπίου και ανακυκλώνεται.
- b. Τα φυτά αναπτύσσονται σε στερεό υπόστρωμα, η ανώτερη επιφάνεια, του οποίου δεν βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο σε όλο το μήκος των φυτών.
- c. Σε κάθε γραμμή φύτευσης η επιφάνεια του υποστρώματος είναι ομοιόμορφη και βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο σε όλο το μήκος της.

3. Υποδοχείς φυτών και υποστρωμάτων

Αρχικά ισοπεδώνεται το έδαφος του θερμοκηπίου, εάν αυτό είναι απαραίτητο.

Όταν το διάλυμα διανέμεται στα φυτά μέσω συστήματος στάγδην άρδευσης, η κλίση του εδάφους δεν θα πρέπει να ξεπερνά το 1%, ενώ μπορεί να φθάνει μέχρι και 1,5% όταν το διάλυμα φτάνει στα φυτά μέσω ελεύθερης ροής με τη βοήθεια της βαρύτητας. Πάνω στο ισοπεδωμένο έδαφος του θερμοκηπίου στρώνονται φύλλα πλαστικού πολυαιθυλενίου πάχους 3mm.

4. Υποστρώματα υδροπονίας

Απαραίτητη προϋπόθεση, που καθιστά οικονομικά σκόπιμη την χρήση υποστρώματος αντί της καλλιέργειας στο έδαφος, είναι το υπόστρωμα να είναι σε θέση να επιτελεί όλες τις λειτουργίες που γίνονται από το χώμα και μάλιστα με καλύτερο τρόπο. Η βασική λειτουργία, την οποία καλούνται να επιτελέσουν επιτυχώς τα υποστρώματα, είναι η εξασφάλιση καλής και ισόρροπης θρέψης στα φυτά. Για να είναι σε θέση ένα υπόστρωμα να επιτελεί με τον καλύτερο τρόπο τον ρόλο για τον οποίο προορίζεται, πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- I. Σταθερή δομή, ώστε να μην αποσυντίθεται εύκολα.
- II. Ικανοποιητική αναλογία μεταξύ νερού και αέρα στην κατάσταση της υδατοϊκανότητας.
- III. Ομοιομορφία στην σύσταση, στην εμφάνιση και στην συμπεριφορά από άποψη θρέψης.
- IV. Απαλλαγμένο από παθογόνα, ζωικούς εχθρούς και σπόρους ζιζανίων.
- V. Εύκολο στη χρήση του και γενικά στους καλλιεργητικούς χειρισμούς.
- VI. Σχετικά χαμηλό κόστος.
- VII. Θα πρέπει να είναι χημικά αδρανές ή να διαθέτει μεγάλη ανταλλακτική ικανότητα και κατάλληλο pH, εφόσον είναι χημικά ενεργό.

ΑΡΔΕΥΣΗ ΥΔΡΟΠΟΝΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Στην υδροπονία η παροχή νερού συνδέεται άρρηκτα με τη χορήγηση λιπασμάτων, δεδομένου ότι τα φυτά δεν αρδεύονται ποτέ με καθαρό νερό, αλλά με θρεπτικό διάλυμα. Η ανάγκη να χορηγείται νερό στην υδροπονία είναι πολύ συχνή, ενώ παράλληλα η αρδευτική δόση νερού, που παρέχεται στα φυτά κάθε φορά, θα πρέπει να είναι ανάλογα μειωμένη, εφόσον ο όγκος του διαλύματος και συνεπώς και του θρεπτικού διαλύματος που αντιστοιχεί σε κάθε φυτό είναι δραστικά μικρότερος σε σύγκριση με τις παραδοσιακές καλλιέργειες στο έδαφος.

Η συνολική ποσότητα νερού, που θα πρέπει να χορηγηθεί σε μία υδροπονική καλλιέργεια, συνήθως δεν διαφέρει σημαντικά συγκρινόμενη με τις ποσότητες που παρέχονται σε μία αντίστοιχη καλλιέργεια στο έδαφος, στην οποία χρησιμοποιείται σύστημα στάγδην άρδευσης, εφόσον οι υπόλοιποι παράγοντες (ηλικία φυτών, καιρικές συνθήκες κλπ.) είναι οι ίδιοι. Συχνά μάλιστα στην υδροπονία η κατανάλωση νερού είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με το έδαφος, δεδομένου ότι η εξάτμιση είναι μειωμένη, άρα ο συντελεστής αξιοποίησης του νερού υψηλότερος.

Η ανάγκη τόσο συχνής χορήγησης νερού στα φυτά, που αναπτύσσονται σε υδροπονικές καλλιέργειες, προφανώς απαιτεί την ύπαρξη και του κατάλληλου εξοπλισμού, ώστε να είναι δυνατή η αυτοματοποίηση της άρδευσης, διαφορετικά οι ανάγκες σε δυναμικά διαμορφώνονται σε απαγορευτικά υψηλά επίπεδα. Είναι προφανές ότι τόσο το σύστημα όσο και το πρόγραμμα άρδευσης μιας υδροπονικής καλλιέργειας, έχουν επιτύχει τον σκοπό τους, όταν οι ανάγκες των φυτών σε νερό καλύπτονται πάντα πλήρως, χωρίς να γίνεται σπατάλη νερού και λιπασμάτων.

1. Ρύθμιση προγράμματος άρδευσης

Οι μέθοδοι καλλιέργειας φυτών εκτός εδάφους που έχουν επινοηθεί και εφαρμοστεί κατά καιρούς, είναι αρκετά διαφορετικές μεταξύ τους. Το κάθε επιμέρους υδροπονικό σύστημα έχει τις ιδιαιτερότητές του, οι οποίες συχνά αφορούν και την άρδευση.

Λόγω των σημαντικών διαφορών που υπάρχουν, θα γίνει διάκριση μεταξύ των υδροπονικών καλλιεργειών που λαμβάνουν χώρα σε καθαρό θρεπτικό διάλυμα και αυτών που αναπτύσσονται σε στερεό υπόστρωμα.

α. άρδευση υδροπονικών καλλιεργειών που αναπτύσσονται σε καθαρό θρεπτικό διάλυμα: στα συστήματα αυτά η εισροή νερού στο σύστημα προς αντικατάσταση των ποσοτήτων που καταναλώνονται από τα φυτά, κατά κανόνα ελέγχεται μέσω ενός πλωτήρα. Ο πλωτήρας επιτρέπει την είσοδο νερού στην κεντρική δεξαμενή του θρεπτικού διαλύματος κάθε φορά που η στάθμη του εκεί μέσα πέφτει χαμηλότερα από ένα ορισμένο ύψος. Στη συνέχεια, μέσω κατάλληλου αυτοματισμού προστίθενται στην δεξαμενή ανάλογες ποσότητες λιπασμάτων σε μορφή πυκνών διαλυμάτων και έτσι παράγεται νέο θρεπτικό διάλυμα, το οποίο αναπληρώνει την ποσότητα που στο μεταξύ έχει χορηγηθεί στα φυτά. Από την κεντρική δεξαμενή το θρεπτικό διάλυμα μεταφέρεται με την βοήθεια μιας αντλίας στα καλλιεργούμενα φυτά.

β. άρδευση υδροπονικών καλλιεργειών που αναπτύσσονται σε στερεό υπόστρωμα: στα συστήματα αυτά, το υπόστρωμα κατά την άρδευση είναι σε θέση να συγκρατήσει μια ποσότητα νερού, το μεγαλύτερο μέρος της οποίας είναι διαθέσιμο στα φυτά στο μεσοδιάστημα που ακολουθεί κάθε άρδευση. Επομένως σε κάθε άρδευση το χορηγούμενο νερό θα πρέπει να είναι τουλάχιστον τόσο, ώστε το υπόστρωμα να φθάνει στην υδατοϊκανότητά του. Η χορηγούμενη ποσότητα θρεπτικού διαλύματος σε κάθε νέα άρδευση δε θα πρέπει να είναι ακριβώς ίση με αυτήν που καταναλώθηκε από τα φυτά στο μεσοδιάστημα μεταξύ δύο αρδεύσεων, αλλά κατά 15-30% υψηλότερη, η οποία θα διαφύγει μεν μέσω απορροής από το υπόστρωμα, αλλά δεν αποτελεί άσκοπη απώλεια. Μαζί της θα συμπαρασύρει και θα εκπλύνει και ορισμένα άλατα που έχουν την τάση να συσσωρεύονται στο υπόστρωμα. Αυτά βλάπτουν τα φυτά γιατί δεν απορροφώνται παρά σε πολύ μικρές ποσότητες από τις ρίζες τους.

Όσον αφορά τον χρόνο έναρξης μιας νέας άρδευσης πρέπει να ειπωθεί, ότι τα υποστρώματα δεν θα πρέπει να αφήνονται να χάνουν περισσότερο από 20-30% περίπου του

νερού που περιέχουν, πριν τους χορηγηθεί ξανά θρεπτικό διάλυμα. Αν αφεθούν να χάσουν περισσότερο από 20-30% του νερού τους, πριν ποτισθούν ξανά, από κάποια χρονική στιγμή και μετά υπάρχει κίνδυνος τα φυτά να μην τροφοδοτούνται με νερό σε επαρκείς ποσότητες.

Η διάρκεια των ποτισμάτων θα πρέπει να μην μεταβάλλεται, αλλά να μένει σταθερή. Εκείνο που θα πρέπει να μεταβάλλεται συνεχώς είναι ο χρόνος έναρξης του κάθε ποτίσματος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο χρόνος που απαιτείται για την κατανάλωση μιας δεδομένης ποσότητας νερού από μία καλλιέργεια, είναι συνήθως αρκετά διαφορετικός, τόσο κατά τη διάρκεια ενός 24ώρου, όσο και από ημέρα σε ημέρα, δεδομένου ότι εξαρτάται κυρίως από τη συνεχώς μεταβαλλόμενη ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας και από το εκάστοτε μέγεθος των φυτών.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΥΔΡΟΠΟΝΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Τα διάφορα υδροπονικά συστήματα ταξινομούνται με βάση δύο σημαντικά χαρακτηριστικά:

- α. ανάλογα με το αν το θρεπτικό διάλυμα που απορρέει από το χώρο του ριζοστρώματος συλλέγεται και επαναχρησιμοποιείται ή όχι, διακρίνονται σε κλειστά και ανοιχτά,
- β. με βάση το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα, εφόσον γίνεται χρήση κάποιου υποστρώματος.

1) Καλλιέργεια σε καθαρό θρεπτικό διάλυμα

α. καλλιέργεια σε δοχεία γεμισμένα με θρεπτικό διάλυμα: τα φυτά αναπτύσσονται είτε σε μικρά (ατομικά) είτε σε μεγάλα (ομαδικά) φυτοδοχεία, τα οποία είναι γεμισμένα με θρεπτικό διάλυμα κατάλληλης σύστασης.

Τέτοιου είδους συστήματα χρησιμοποιήθηκαν κυρίως παλαιότερα, όμως δεν βρήκαν εφαρμογή στη γεωργική πράξη, γιατί παρουσιάζουν αρκετά προβλήματα, σπουδαιότερο από τα οποία είναι οι δυσκολίες αερισμού και οξυγόνωσης των ριζών, που

δυσχεραίνουν τη λειτουργία της αναπνοής προκαλώντας σήψεις και καταστροφές στο ριζικό σύστημα των φυτών.

β. σύστημα NFT (Nutrient Film Technique = Τεχνική Λεπτής Θρεπτικής Στοιβάδας): στο σύστημα NFT οι ρίζες των φυτών αναπτύσσονται μέσα σε καθαρό θρεπτικό διάλυμα, το οποίο είναι τρεχούμενο.

Σύμφωνα με τον αρχικό σχεδιασμό του συστήματος NFT, τα φυτά τοποθετούνται γυμνόριζα μέσα σε υδροροές, όπου το ριζικό τους σύστημα κατά το μεγαλύτερο μέρος του καλύπτεται από τη λεπτή στρώση του ρέοντος θρεπτικού διαλύματος, ενώ η ανώτερη επιφάνεια των ριζών έρχεται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα, αλλά παραμένει υγρή λόγω της ανοδικής κατακόρυφης κίνησης του διαλύματος. Στην πράξη τα φυτά δεν τοποθετούνται γυμνόριζα μέσα στις υδροροές, αλλά μαζί με έναν κύβο (ή μπάλα) υποστρώματος.

Το NFT παρουσιάζει όλα τα μειονεκτήματα των κλειστών υδροπονικών συστημάτων, δηλαδή:

- Αναγκαιότητα συχνών αναλύσεων και εκτεταμένων αναπροσαρμογών στη σύνθεση του μετά από κάθε ανάλυση,
- συσσώρευση ιόντων Na και Cl σε περίπτωση που το χρησιμοποιούμενο νερό έχει αυξημένη περιεκτικότητα στα δύο αυτά ιόντα,
- αυξημένο ρίσκο καταστροφής της καλλιέργειας λόγω έλλειψης ενός στερεού υποστρώματος, και
- τον κίνδυνο διασποράς μολυσμάτων σε όλη την καλλιέργεια μέσω του ανακυκλούμενου θρεπτικού διαλύματος σε περίπτωση που προσβληθεί έστω και ένα φυτό.

Απέναντι σε αυτά τα μειονεκτήματα αντιπαρατίθεται κυρίως το πλεονέκτημα του μηδενικού κόστους κτήσης υποστρώματος και της μη επιβάρυνσης του περιβάλλοντος μέσω της υπερβολικής λίπανσης, όπως γίνεται στο έδαφος και στα ανοιχτά υδροπονικά συστήματα.

Η εφαρμογή της υδροπονικής αυτής μεθόδου στη γεωργία, εκτός από μία αρχική περίοδο επέκτασής της, τα τελευταία δέκα χρόνια βαίνει συνεχώς μειωμένα, με εξαίρεση την καλλιέργεια μικρών φυλλωδών λαχανικών, όπως το μαρούλι και το γογγύλι. Η αξία του όμως σαν πειραματική μέθοδος για έρευνα σε θέματα

διατροφής των φυτών (και όχι μόνο) θα παραμείνει αδιαμφισβήτητη και στο μέλλον.

γ. αεροπονία: η αεροπονία είναι μια παραλλαγή της υδροπονίας σε καθαρό θρεπτικό διάλυμα χωρίς την χρήση υποστρώματος. Το θρεπτικό διάλυμα ψεκάζεται με ακροφύσια πάνω στο ριζικό σύστημα που αναπτύσσεται μέσα σε κενά κιβώτια ή φυτοδοχεία, έτσι ώστε ο χώρος να είναι συνεχώς κορεσμένος σε υγρασία. Η ύπαρξη και ανοιχτών υδροπονικών συστημάτων είναι δυνατή, είναι όμως αναπόφευκτη η σπατάλη νερού και λιπασμάτων.

δ. επιδαπέδια υδροπονία (plant plane hydroponics): αρχικά το έδαφος του θερμοκηπίου θα πρέπει να ισοπεδωθεί επιμελημένα, ώστε να μην υπάρχουν κοιλότητες και να αποκτήσεις μία κλίση γύρω στο 1:50 έως 1:75. στη συνέχεια, το έδαφος καλύπτεται σε όλη του την επιφάνεια με φύλλο πλαστικό πολυαιθυλενίου πάνω από το οποίο επιστρώνεται ένα λεπτό φύλλο από ένα απορροφητικό υλικό με τριχοειδής ιδιότητες. Το απορροφητικό φύλλο σκεπάζεται από πάνω σε όλη του την επιφάνεια με ένα κάλυμμα από ασπρόμαυρο πλαστικό πολυαιθυλένιο, με την λευκή πλευρά από πάνω, ώστε να αντανakλά μέρος του ηλιακού φωτός που πέφτει πάνω του. Στη συνέχεια ανοίγονται μικρές τρύπες κατά μήκος νοητών γραμμών, όπου θα τοποθετηθούν τα σπορόφυτα, σε αποστάσεις ανάλογες με την πυκνότητα φύτευσης που επιδιώκεται και διαβρέχεται το απορροφητικό υλικό με θρεπτικό διάλυμα. Μια σειρά από σωλήνες παροχής του θρεπτικού διαλύματος στην ανώτερη (υψηλότερη) άκρη του θερμοκηπίου εξασφαλίζουν την απρόσκοπτη παροχή του θρεπτικού διαλύματος στα φυτά.

Το θρεπτικό διάλυμα μπορεί να συλλέγεται και να επαναχρησιμοποιείται, όταν φθάνει στην χαμηλότερη πλευρά του θερμοκηπίου, οπότε η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε κλειστό υδροπονικό σύστημα ή να απορρέει και να χάνεται στο έδαφος, οπότε η εγκατάσταση λειτουργεί ως ανοιχτό σύστημα.

Μολονότι μέχρι σήμερα έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα στην καλλιεργητική πράξη δεν έχει εξαπλωθεί ακόμη σε μεγάλη κλίμακα.

2) Καλλιέργεια σε κοκκώδη ανόργανα υποστρώματα

α. καλλιέργεια σε άμμο (sand culture): συνήθως χρησιμοποιείται κρυσταλλική άμμος προερχόμενη από την κοίτη ποταμών. Η άμμος τοποθετείται σε ατομικά ή ομαδικά φυτοδοχεία, σε σάκους ή υδροροές, σε ποσότητα 15-20 λίτρων / φυτό. Εναλλακτικά μπορεί να διασκορπιστεί σε ολόκληρη την καλλιεργούμενη επιφάνεια του θερμοκηπίου, εφόσον έχει πρώτα ισοπεδωθεί το έδαφος και έχει επικαλυφθεί με πλαστικό φύλλο πολυαιθυλενίου που φέρνει ανοίγματα αποστράγγισης ομοιόμορφα κατανομημένα σε όλη του την επιφάνεια. Τα φυτά τροφοδοτούνται μέσω ενός συνηθισμένου συστήματος στάγδην άρδευσης. Η άμμος πρέπει να ποτίζεται πολύ τακτικά. Αυτό συνεπάγεται σημαντικές απώλειες σε θρεπτικό διάλυμα και νερό σε περίπτωση που το διάλυμα δεν ανακυκλώνεται.

Τα πλεονεκτήματα της άμμου ως υπόστρωμα υδροπονίας είναι ο καλός αερισμός του ριζικού συστήματος, το φθινό κόστος κτήσης της και η θεωρητικά απεριόριστη διάρκεια ζωής της. Για την αποφυγή εξάπλωσης εδαφογενών ασθενειών θα ήταν καλύτερα να απολυμαίνεται, το οποίο γίνεται εύκολα και απλά με ατμό.

β. καλλιέργεια σε χαλίκι (gravel culture): το χαλίκι είναι ένα χονδρόκοκκο υπόστρωμα. Η χημική του σύσταση ποικίλλει και εξαρτάται από το μητρικό πέτρωμα από το οποίο προέρχεται. Η διάμετρος των κόκκων που χρησιμοποιούνται στην υδροπονία κυμαίνεται μεταξύ 5 και 20 mm. Σαν υπόστρωμα έχει πρακτικά μηδενική ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων και αμελητέα ικανότητα συγκράτησης νερού. Γι αυτό η καλλιέργεια σε χαλίκι συνίσταται μόνο ως κλειστό υδροπονικό σύστημα.

Η τεχνική της εγκατάστασης σε γενικές γραμμές είναι ανάλογη με αυτή που ακολουθείται στην καλλιέργεια σε άμμο. Ανάλογα επίσης είναι και τα πλεονεκτήματα που χαρακτηρίζουν τις υδροπονικές καλλιέργειες σε χαλίκι. Σαν μειονέκτημα, εκτός από την έλλειψη ικανότητας συγκράτησης νερού, πρέπει ακόμη να αναφερθεί και το υψηλό ειδικό βάρος, το οποίο καθιστά την μεταφορά του σε μεγάλες αποστάσεις προβληματική και τους

χειρισμούς κατά την εγκατάσταση της καλλιέργειας δύσκολη και επίπονη, άρα και αρκετά δαπανηρή διαδικασία.

γ. καλλιέργεια σε διογκωμένο περλίτη: ο περλίτης είναι ηφαιστειακό, υαλώδες, αργιλλοπυριτικό πέτρωμα λευκού χρώματος, το οποίο περιέχει και κρυσταλλικό νερό σε ποσοστό 2-6%. Το μέγεθος των κόκκων που συνιστανται για την υδροπονία είναι 3-5 mm. Ποσότητα 4-5 λίτρων ανά φυτό είναι επαρκής για την καλλιέργεια των κυριότερων καρποδετικών κηπευτικών. Ο περλίτης μπορεί να τοποθετηθεί είτε σε σάκους, είτε σε γλάστρες, είτε σε άλλα φυτοδοχεία. Μπορεί επίσης να απλωθεί μέσα σε υδροροές, οι οποίες στη συνέχεια καλύπτονται από πάνω με φύλλο πολυαιθυλενίου. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος είναι η προβλάστηση των σποροφύτων σε κύβους τύρφης ή πετροβάμβακα ή άλλου αποστειρωμένου υλικού και η τοποθέτησή τους κατά την μεταφύτευση πάνω στους σάκους ή στα φυτοδοχεία με τον περλίτη. Η παρασκευή και η παροχή του διαλύματος στα φυτά δεν παρουσιάζει καμία ιδιαιτερότητα σε σχέση με τα άλλα υδροπονικά συστήματα πάνω σε αδρανή υποστρώματα. Ο περλίτης δεν μπορεί κατά κανόνα να χρησιμοποιηθεί για δεύτερη και πολύ περισσότερο για τρίτη φορά, γιατί οι κόκκοι του θρυμματίζονται. Σε γενικές γραμμές η συμπεριφορά του σαν υπόστρωμα για μια καλλιέργεια είναι ικανοποιητική, αρκεί η θρέψη να είναι ενδεδειγμένη. Το μεγάλο πλεονέκτημα σε σχέση με τα άλλα υποστρώματα είναι το φθηνό κόστος του.

δ. καλλιέργεια σε διογκωμένη άργιλο: το μέγεθος των κόκκων για χρήση σε υδροπονικές καλλιέργειες που προτιμάται είναι 4-8 mm. Η διάρκεια ζωής του σαν υπόστρωμα καλλιέργειας είναι πολύ μεγάλη. Έχει μεγάλη ικανότητα συγκράτησης υγρασίας και αέρα. Τα μόνα μειονεκτήματα του είναι το σχετικά υψηλό κόστος του και η αναγκαιότητα καθαρισμού και απολύμανσης κάθε χρόνο πριν από κάθε νέα καλλιέργεια.

Η καλλιεργητική τεχνική που ακολουθείται και ο όγκος υποστρώματος/φυτό είναι σε γενικές γραμμές όμοια με αυτή του περλίτη.

3) Καλλιέργεια σε πλάκες ορυκτοβάμβακα

α. **καλλιέργεια σε πλάκες πετροβάμβακα:** ο πετροβάμβακας είναι ένα ανόργανο ινώδες υλικό. Η καλλιέργεια σε πλάκες πετροβάμβακα είναι η πλέον διαδεδομένη υδροπονική μέθοδος καλλιέργειας σήμερα. Η μεγάλη της εξάπλωση κατ' αρχήν οφείλεται στην ύπαρξη πετροβάμβακα σε αφθονία στις χώρες που πρώτες αναγκάστηκαν να μεταπηδήσουν στην υδροπονία για εμπορική καλλιέργεια κηπευτικών και ανθοκομικών φυτών σε μεγάλη κλίμακα. Εξίσου σπουδαίο ρόλο έπαιξαν βέβαια και οι άριστες ιδιότητες του πετροβάμβακα, που τον καθιστούν ιδεώδες υπόστρωμα για την καλλιέργεια φυτών.

Η άριστη συμπεριφορά του πετροβάμβακα ως υπόστρωμα καλλιέργειας οφείλεται:

- Στην υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού που τον χαρακτηρίζει, σε συνδυασμό με την επίτευξη άριστης αναλογίας μεταξύ αέρα και νερού στο πορώδες του.
- Στο γεγονός ότι το νερό που συγκρατεί ο πετροβάμβακας είναι σχεδόν στο σύνολό του εύκολα διαθέσιμο για τα φυτά, πράγμα που δεν συμβαίνει με τα περισσότερα υποστρώματα.
- Στην χημική του αδράνεια (χημικά συνίσταται από οξείδια διαφόρων οργανικών στοιχείων) που δίνει την δυνατότητα στον καλλιεργητή να καθορίζει και να ελέγχει πλήρως την θρέψη των φυτών που αναπτύσσονται πάνω του μέσω της σύστασης του θρεπτικού διαλύματος.
- Στην πλήρη απουσία παθογόνων, ζωικών εχθρών και ζιζανίων σε οποιαδήποτε μορφή μέσα στην μάζα του (χάρης στον τρόπο παρασκευής του), με συνέπεια να παρέχεται αποτελεσματική προστασία της καλλιέργειας από ζιζάνια και ασθένειες του εδάφους.
- Στην δυνατότητα να υπάρχει και να καθορίζεται εύκολα, όχι μόνο ο όγκος που θα χρησιμοποιηθεί, αλλά και το σχήμα του (πλάκες, κύβοι κλπ.), χωρίς να εξαρτάται κανείς από τα υλικά συσκευασίας του (σάκοι κλπ.) ή υποδοχής του στο χώρο του θερμοκηπίου (γλάστρες, φυτοδοχεία κλπ.).

Για γεωργική χρήση ο πετροβάμβακας διατίθεται σε μορφή πλακών, διαστάσεων αναλόγων με το είδος του φυτού που πρόκειται να καλλιεργηθεί πάνω τους. Συνήθως για τα λαχανικά χρησιμοποιούνται πλάκες διαστάσεων 7,5-15-100 cm, ενώ για τα

ανθοκομικά φυτά οι διαστάσεις είναι τελείως διαφορετικές από είδος σε είδος.

β. καλλιέργεια σε πλάκες υαλοβάμβακα: ο υαλοβάμβακας είναι παρεμφερές υλικό με τον πετροβάμβακα. Όπως ο πετροβάμβακας έτσι και ο υαλοβάμβακας, παράγεται από φυσικές πρώτες ύλες (χαλαζιακή άμμος) μετά από θερμική επεξεργασία στους 1400° C και χρησιμοποιείται κυρίως σαν μονωτικό υλικό.

Η χρήση υαλοβάμβακα ως υπόστρωμα καλλιέργειας μέχρι σήμερα δεν έχει εξαπλωθεί ιδιαίτερα. Οι λόγοι σχετίζονται κυρίως με το κόστος παραγωγής του, το οποίο είναι αρκετά υψηλότερο από αυτό του πετροβάμβακα.

4) Καλλιέργεια σε οργανικά ή μείγματα οργανικών και ανόργανων υλικών

Το πιο συνηθισμένο οργανικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια φυτών εκτός εδάφους είναι η τύρφη.

Η τύρφη είναι φυσικό υλικό. Προέρχεται από την αποδόμηση της υδροχαρούς βλάστησης που φύεται σε ελώδεις περιοχές και γενικότερα σε υγρότοπους.

α. η ξανθιά τύρφη έχει ινώδη μορφή και θεωρείται καλύτερης ποιότητας από την μαύρη, γιατί η δομή της είναι αρκετά σταθερή, με συνέπεια η αποσύνθεσή της να λαμβάνει χώρα με αργούς ρυθμούς. Έχει εκτεταμένο πορώδες, 90-95% του όγκου της, με καλή αναλογία μεταξύ μικρών και μεγάλων πόρων, με συνέπεια να διακρίνεται από μεγάλη ικανότητα συγκράτησης νερού και αέρα. Έχει ικανοποιητική ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων, όμως στην φυτική της κατάσταση τα αρνητικά φορτία των κολλοειδών είναι κορεσμένα κυρίως με ιόντα υδρογόνου, με συνέπεια να είναι φτωχή σε θρεπτικά στοιχεία και να έχει χαμηλό pH (3,5-4). Γι αυτό η ξανθιά τύρφη πριν χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα καλλιέργειας φυτών εκτός εδάφους, είτε αμιγής είτε σε μίγμα με άλλα υλικά, θα πρέπει απαραίτητα να αναμιγνύεται με μια

μικρή ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3) σε ποσότητα 4-6 Kgr/m^3 για την ρύθμιση του pH της.

β. η μαύρη τύρφη βρίσκεται σε πιο προχωρημένο στάδιο αποσύνθεσης από την ξανθιά και γι αυτό δεν έχει τόσο σταθερή δομή. Σε σύγκριση με την ξανθιά τύρφη έχει μεγαλύτερο ειδικό βάρος και πιο περιορισμένης έκτασης πορώδες, με συνέπεια η ικανότητα συγκράτησης νερού και αέρα να είναι μικρότερη. Αντίθετα η ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων της μαύρης τύρφης είναι πολύ μεγάλη.

γ. άλλα οργανικά υλικά, που έχουν κατά καιρούς δοκιμασθεί και χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα υδροπονίας, είναι το πριονίδι, το πυρηνόξυλο, αλεσμένα φύλλα ορισμένων δένδρων (ελιάς, κωνοφόρων), φλοιοί δένδρων, αλεσμένες κληματίδες αμπελιών, άχυρο κλπ.

Κανένα όμως από τα προαναφερθέντα υλικά δεν είναι χημικά αδρανές και γι αυτό κατά την κατάρτιση της σύνθεσης θρεπτικών διαλυμάτων, που προορίζονται για καλλιέργειες σε οργανικά υποστρώματα, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η σύσταση των υλικών αυτών σε διαθέσιμα για τα φυτά θρεπτικά στοιχεία. Εκτός αυτού, τα περισσότερα από τα υλικά, δεν έχουν αρκετά ικανοποιητική συμπεριφορά, όσον αφορά τη συγκράτηση νερού και αέρα, οπότε οι αναλογίες στερεά:υγρή:αέρια φάση που προκύπτουν μετά την διαβροχή τους, συχνά δεν είναι ευνοϊκές για τα φυτά. Τέλος ένα άλλο μειονέκτημα, που αφορά αρκετά από τα παραπάνω υλικά, είναι ότι τα περισσότερα από αυτά πρέπει πρώτα να υποστούν βιολογική αποδόμηση, γνωστή και ως χουμοποίηση, για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα καλλιέργειας. Διαφορετικά υφίσταται κίνδυνος φυτοτοξικότητας λόγω ζύμωσής τους και συνεπακόλουθης αύξησης της θερμοκρασίας στο εσωτερικό τους κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών πάνω τους.

Συχνά τα προαναφερθέντα οργανικά υλικά δεν χρησιμοποιούνται αυτούσια ως υποστρώματα, αλλά σε μείγματα μεταξύ τους ή ακόμη συχνότερα με μείγματα με κάποιο ανόργανο αδρανές υλικό, όπως ο περλίτης, ο βερμικουλίτης κλπ. Ο σκοπός της ανάμειξης μεταξύ τους και ιδιαίτερα με κάποιο ανόργανο υλικό, είναι η βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους και κυρίως της υδατοπερατότητας και της αεροπερατότητάς τους.

Τέλος η διάκριση των υδροπονικών συστημάτων μπορεί να γίνει επίσης και με βάση τα υλικά που χρησιμοποιούνται ως υποδοχείς υποστρωμάτων, με βάση τον τρόπο άρδευσης και με βάση την τεχνική λειτουργία του συστήματος, εφόσον αυτή διακρίνεται από κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ή έναν ιδιαίτερο τρόπο λειτουργίας.

ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ

Κάθε φυτικός οργανισμός προμηθεύεται τα βασικά και απαραίτητα συστατικά για την διατροφή του από το έδαφος. Για όλα τα ζώα και τους περισσότερους μικροοργανισμούς τα συστατικά της διατροφής τους δεν περιέχουν μόνο βασικά χημικά στοιχεία, αλλά ταυτόχρονα και μια πηγή χημικής ενέργειας, μέσω της οποίας ικανοποιούνται οι ενεργειακές τους ανάγκες.

Στα αυτότροφα φυτά η κατάσταση διαφέρει, γιατί οι θρεπτικές τους πηγές (CO₂, H₂O και ανόργανα ιόντα) είναι χαμηλής ενεργειακής κατάστασης και συνεπώς δεν είναι σε θέση να ικανοποιήσουν τις ενεργειακές απαιτήσεις τους. Η αφομοίωση τέτοιον ανόργανων θρεπτικών ουσιών απαιτεί πράγματι ενέργεια. Στα αυτότροφα φυτά οι απαιτήσεις αυτές ικανοποιούνται αρχικώς με την απορρόφηση του φωτός. Η μοναδική αυτή ικανότητα των φυτικών κυττάρων να απορροφούν φωτεινή ενέργεια και να την μετατρέπουν σε χημική είναι μία από τις βασικότερες βιολογικές λειτουργίες. Όλοι οι άλλοι οργανισμοί, με εξαίρεση μερικούς αυτότροφους μικροοργανισμούς, εξαρτώνται από αυτήν την μετατροπή της ενέργειας.

Η μετατροπή της φωτεινής ενέργειας σε χημική συνδέεται στενά με την μετατροπή του CO₂ σε οργανικά συστατικά. Για δεκαετίες και οι δύο αντιδράσεις (μετατροπή της ενέργειας και δέσμευση του CO₂) θεωρούνταν ως μία πολύπλοκη αντίδραση που περιγράφονταν από την γενική εξίσωση:

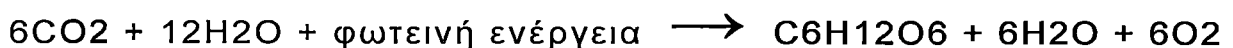


Η αντίδραση αυτή δείχνει κατά βάση ότι η φωτοσύνθεση είναι ο συνδυασμός του CO₂ και του H₂O για τον σχηματισμό διαφόρων υδατανθράκων με την απελευθέρωση οξυγόνου, το οποίο μπορεί να προέρχεται, είτε από το πρώτο, είτε από το δεύτερο ανόργανο συστατικό, που συμμετέχει στην αντίδραση. Επομένως δεν ήταν γνωστός ο δότης του οξυγόνου. Οι περισσότεροι, αν όχι όλοι, ερευνητές στις αρχές του αιώνα μας δέχονταν την άποψη του ολλανδού φυσικού INGENHOUSZ (1796), ότι το CO₂ διασπάται κατά την φωτοσύνθεση για να δώσει άνθρακα και οξυγόνο, με το οξυγόνο να ελευθερώνεται ως αέριο. Κατά συνέπεια η αναλογία των ατόμων του άνθρακα, του υδρογόνου και

του οξυγόνου στα σάκχαρα και το άμυλο βρέθηκε ότι αναλογεί ένα άτομο άνθρακα ανά μόριο νερού (CH₂O) (όπως εξάλλου υποδηλώνει και η ονομασία "υδατάνθρακες"). Επικράτησε λοιπόν η γενική άποψη ότι οι υδατάνθρακες προέρχονται από συνδυασμό των μορίων του νερού και των ατόμων άνθρακα του CO₂ και ότι το οξυγόνο ελευθερωνόταν από την διάσπαση του CO₂.

Την άποψη αυτή ανέτρεψαν οι Ruben, Raudal, Kamen και Hyde οι οποίοι απέδειξαν ότι το νερό και όχι το διοξείδιο του άνθρακα είναι αυτό που διασπάται κατά την φωτοσύνθεση και ότι το CO₂ ανάγονταν σε υδατάνθρακα. Η επιβεβαίωση αυτή έγινε αφού χρησιμοποίησαν νερό με μαρκαρισμένο οξυγόνο (= ισότοπο) για να διαπιστώσουν την προέλευση του απελευθερουμένου αερίου οξυγόνου.

Επομένως η πλήρης εξίσωση της φωτοσύνθεσης έχει ως εξής:



ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗΣ

Για να εξηγηθεί ο μηχανισμός της φωτοσύνθεσης διατυπώθηκαν κατά καιρούς διάφορες απόψεις από πολλούς ερευνητές. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται με σειρά αλληλοδιαδοχικών φυσικών και χημικών φαινομένων, τα οποία δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί, παρά το γεγονός ότι μεγάλη μερίδα ερευνητών εργάστηκε και εργάζεται με το θέμα αυτό. Τελικός σκοπός των διαδοχικών φυσικοχημικών φαινομένων είναι η αναγωγή του CO₂ προς τη θεμελιώδη ομάδα δομής των υδατανθράκων (H-C-OH) με υδρογόνο, που ελευθερώνεται από τη φωτόλυση του H₂O. Η αλυσίδα των επιμέρους αντιδράσεων οδηγεί στο σχηματισμό της τελικής ουσίας, που κατά κανόνα είναι η γλυκόζη, από το CO₂ της ατμόσφαιρας. Μεγάλο μέρος των αντιδράσεων αυτών είναι ανεξάρτητο του φωτός, με άλλα λόγια μπορούν να συμβούν τόσο παρουσία φωτός, όσο και στο σκοτάδι, γι αυτό και χαρακτηρίστηκαν από τον Blackman ως "σκοτεινές

αντιδράσεις” σε αντίθεση προς τις **“φωτεινές αντιδράσεις”**. Οι τελευταίες για να πραγματοποιηθούν προϋποθέτουν την ύπαρξη φωτός και είναι ανεξάρτητες της θερμοκρασίας, ενώ αντίθετα οι **“σκοτεινές αντιδράσεις”** εξαρτώνται από αυτήν.

Έχει βρεθεί ότι οι **“φωτεινές αντιδράσεις”** της φωτοσύνθεσης πραγματοποιούνται πάνω ή μέσα στις μεμβράνες των θυλακοειδών. Τα τελικά προϊόντα των αντιδράσεων αυτών είναι συστατικά υψηλής ενέργειας (ATP και NADPH₂), που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για τη σύνθεση των σακχάρων κατά την διάρκεια των **“σκοτεινών αντιδράσεων”**. Αντίθετα οι **“σκοτεινές αντιδράσεις”** λαμβάνουν χώρα στο στρώμα των χλωροπλαστών.

ΦΩΤΕΙΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Ρόλος των χρωστικών

Το πρωταρχικό βήμα για τη μετατροπή της φωτεινής ενέργειας σε χημική είναι η απορρόφηση του φωτός, που πραγματοποιείται από τις χρωστικές των χρωματοφόρων. Όταν λέμε **χρωστική** εννοούμε κάθε ουσία, που απορροφάει ορατό φως και η οποία φυσικά δεν μπορεί να κάνει καμία φωτοχημική αντίδραση χωρίς να απορροφήσει φως. Κατά συνέπεια οι χρωστικές είναι τα πιο σημαντικά συστατικά της φωτοσύνθεσης. Μερικές χρωστικές απορροφούν όλα τα μήκη κύματος του φωτός και έτσι εμφανίζονται ως μαύρες, άλλες πάλι απορροφούν μερικά μόνο μήκη κύματος, ενώ αντανakλούν τα υπόλοιπα. Η χλωροφύλλη, χρωστική στην οποία οφείλεται το πράσινο χρώμα των φύλλων, απορροφάει κυρίως τα ιώδη και κυανά μήκη κύματος του φωτός, καθώς επίσης και τα ερυθρά, αντανakλά όμως το πράσινο φως και γι αυτό φαίνεται πράσινη. Το πρότυπο απορρόφησης μιας χρωστικής είναι γνωστό ως **φάσμα απορρόφησης** της χρωστικής αυτής.

Μια από τις κλασικότερες αποδείξεις ότι η χλωροφύλλη είναι η κυριότερη χρωστική, που συμμετέχει στη φωτοσύνθεση, είναι το πείραμα του Engelmann. Αν και το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε το 1882, εντούτοις χρησιμοποίησε την αναλογία του παραγόμενου οξυγόνου για να μετρήσει την ένταση

της φωτοσύνθεσης, πράγμα που εφαρμόζουν και οι σύγχρονοι ερευνητές. Ως δείκτη οξυγόνου χρησιμοποίησε οξυγονόφιλα βακτήρια. Τη θέση του διαφράγματος στο μικροσκόπιο που χρησιμοποιούσε, αντικατέστησε με κατάλληλο πρίσμα, το οποίο έριχνε το αναλυμένο φάσμα του λευκού φωτός στο κάτω μέρος μιας αντικειμενοφόρου. Στην αντικειμενοφόρο τοποθέτησε ένα νηματώδες φύκος (*Cladophora*, *Oedogonium* κ.α.) παράλληλα προς το εκτεινόμενο φάσμα και τα οξυγονόφιλα βακτήρια. Τα ευαίσθητα στο οξυγόνο βακτήρια συγκεντρώνονταν κυρίως στις επιφάνειες του φύκους, που η κυανή και η ερυθρά ακτινοβολία. Μάλιστα συγκεντρώνονταν, τόσο πιο έντονα, όσο πιο ισχυρή ήταν η συνθετική δράση της φασματικής περιοχής. Έτσι διαπίστωσε ότι η φωτοσύνθεση εξαρτάται από τη χλωροφύλλη και το είδος του απορροφούμενου φωτός.

Εξίσου καλά διαπιστώνεται η έκλυση οξυγόνου κατά την φωτοσύνθεση και με το εξής πείραμα. Σε μια αντικειμενοφόρο τοποθετούμε ένα νήμα του φύκους *Spirogyra* μαζί με τα οξυγονόφιλα βακτήρια. Αν το φύκος κρατηθεί στο σκοτάδι, τα οξυγονόφιλα βακτήρια θα είναι διασκορπισμένα σε όλη την επιφάνεια. Το ίδιο θα συμβεί, αν το φως πέσει στο κύτταρο, αλλά όχι επάνω στο χλωροπλάστη. Αν όμως το φως πέσει επάνω στο χλωροπλάστη, τότε θα δούμε ότι τα βακτήρια θα συγκεντρωθούν στο φωτιζόμενο μέρος. Προφανώς αυτό είναι αποτέλεσμα απελευθέρωσης του οξυγόνου λόγω φωτοσύνθεσης. Με τον ίδιο τρόπο μπορούμε να δείξουμε ότι η κυανή και η ερυθρή ακτινοβολία του φάσματος είναι φωτοσυνθετικά πιο ενεργές, από ότι οι υπόλοιπες περιοχές.

Φωτοσυνθετικές χρωστικές

Στα ανώτερα φυτά ο πιο δραστήριος ιστός, από φωτοσυνθετική άποψη, είναι ο ιστός του μεσόφυλλου. Τα κύτταρα του μεσόφυλλου, έχουν ένα μεγάλο αριθμό χλωροπλαστών, οι οποίοι εκτός της χλωροφύλλης περιέχουν και άλλες χρωστικές.

Χρωστικές, που συμμετέχουν στις αντιδράσεις, για να “παγιδεύουν” το φως κατά την διάρκεια της φωτοσύνθεσης, είναι οι **χλωροφύλλες** και οι δευτερεύουσες ή συμπληρωματικές χρωστικές, **καροτενοειδή** και **φυκοβιλίνες**. Πέρα από αυτές, χρωστικές όπως η φλαβοπρωτεΐνη, η πλαστοκυανίνη, τα κυτοχρώματα, η φερρεδοξίνη και οι κινόνες, έχουν βρεθεί στους χλωροπλάστες, οι οποίοι όμως κατά πάσα πιθανότητα δεν

συμμετέχουν άμεσα στη συλλογή του φωτός, αλλά μάλλον στη μεταφορά ηλεκτρονίων.

Υπάρχουν περισσότερα του ενός είδη χλωροφυλλών, που διαφέρουν μεταξύ τους μόνο σε λεπτομέρειες της μοριακής τους δομής. Οι χλωροφύλλες που υπάρχουν σε φωτοσυνθετικούς οργανισμούς είναι η *a*, *b*, *c*, *d*, η βακτηριοχλωροφύλλη και αρκετά άλλα παράγωγά τους. Η χλωροφύλλη *a* εμφανίζεται σε όλους τους φωτοσυνθετικούς ευκαριωτικούς οργανισμούς και στα προκαρυωτικά κυανοβακτήρια. Κατά συνέπεια η χλωροφύλλη *a*, θεωρείται βασικός παράγων για τον τύπο της φωτοσύνθεσης, που πραγματοποιείται από τους οργανισμούς αυτών των ομάδων.

Τα τραχεόφυτα, τα βρυόφυτα, τα χλωροφύκη και τα ευγλενώδη φύκη περιέχουν επιπλέον και χλωροφύλλη *b*, η οποία απορροφάει διαφορετικό μήκος κύματος φωτός από ότι η χλωροφύλλη *a*. Έτσι η χλωροφύλλη *b* είναι μια δευτερεύουσα χρωστική που βοηθάει στη διεύρυνση του φάσματος απορρόφησης του φωτός κατά την φωτοσύνθεση. Όταν ένα μόριο της χλωροφύλλης *b* απορροφάει φως, το διεγερμένο μόριό της μεταβιβάζει την ενέργεια σε ένα μόριο της χλωροφύλλης *a*, το οποίο στη συνέχεια τη μετατρέπει σε χημική με τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Γενικώς στα φύλλα των πράσινων φυτών η χλωροφύλλη *b*, αποτελεί το ¼ περίπου της συνολικής περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη.

Η χλωροφύλλη *c* παίρνει την θέση της χλωροφύλλης *b* σε μερικές ομάδες φυτών και ιδιαίτερα στα φαιοφύκη και διάτομα. Στα φωτοσυνθετικά βακτήρια το ρόλο της χλωροφύλλης *a* έχει αναλάβει η **βακτηριοχλωροφύλλη**, η οποία αποτελεί χημική παραλλαγή της βασικής δομής της χλωροφύλλης. Εκτός όμως από τη διαφορά αυτή, διαφέρει και ως προς το φάσμα απορρόφησης, αφού το μέγιστο απορρόφησης βρίσκεται στην υπέρυθρη περιοχή μεταξύ 800-900 nm, την οποία δεν μπορούν να αξιοποιήσουν τα υπόλοιπα αυτότροφα φυτά.

Δύο άλλες ομάδες χρωστικών, που συμμετέχουν στη δέσμευση της ηλιακής ενέργειας είναι τα **καροτενοειδή** και οι **φυκοβιλίνες**. Η ενέργεια που απορροφάται από τις συμπληρωματικές χρωστικές αυτές πρέπει να μεταφερθεί στη χλωροφύλλη *a*, την οποία δεν μπορούν να υποκαταστήσουν στη φωτοσύνθεση.

Πέρα όμως από την λειτουργία τους αυτή, ως χρωστικές, συμβάλλουν και στην προστασία της χλωροφύλλης από την οξειδωση, όταν τα επίπεδα ακτινοβολίας είναι ψηλά και συνεπώς και του O₂.

Τα καροτενοειδή είναι ερυθρές, πορτοκαλί ή κίτρινες λιποδιαλυτές χρωστικές, που βρίσκονται σε όλους τους χλωροπλάστες και τα κυανοβακτήρια, συνδεδεμένες με τη χλωροφύλλη α. Όπως οι χλωροφύλλες έτσι και τα καροτενοειδή των χλωροπλαστών είναι βυθισμένα στις μεμβράνες των θυλακοειδών. Συνήθως βρίσκονται δυο ομάδες καροτενοειδών στους χλωροπλάστες, τα **καροτένια** και οι **ξανθοφύλλες** (οι τελευταίες είναι οξυγονούχα παράγωγα των πρώτων). Τα βήτα καροτένια, που βρέθηκαν στα φυτά, είναι οι κύριες πηγές της βιταμίνης Α, από τις οποίες τροφοδοτείται τόσο ο άνθρωπος όσο και τα ζώα. Στα πράσινα φύλλα το χρώμα των καροτενοειδών καλύπτεται από την πληθώρα των χλωροπλαστών.

Η τελευταία ομάδα των συμπληρωματικών χρωστικών είναι οι **φυκοβιλίνες**, που βρίσκονται στα κυανοβακτήρια και στους χλωροπλάστες των ερυθροφυκών. Αντίθετα προς τα καροτενοειδή, οι φυκοβιλίνες είναι υδατοδιαλυτές και περιλαμβάνουν τις γνωστές χρωστικές **φυκοκυανίνη** (μπλε) και **φυκοερυθρίνη** (κόκκινη).

Απορρόφηση της φωτεινής ενέργειας

Η ηλιακή ακτινοβολία υφίσταται μια πολύπλοκη σειρά μετατροπών φτάνοντας τελικά στη γη με μορφή φωτονίων. Με άλλα λόγια ο ήλιος προμηθεύει σαν ένας τεράστιος πυρηνικός αντιδραστήρας την απαραίτητη ενέργεια στους ζωντανούς επίγειους οργανισμούς. Η ενέργεια αυτή μετασχηματίζεται σε χημική ενέργεια των ενώσεων του άνθρακα χάρη στη δραστηριοποίηση των φυτών και την λειτουργία της φωτοσύνθεσης, η οποία πραγματοποιείται με την βοήθεια πάντοτε της χλωροφύλλης, που δρα ως φωτοδευσμική χρωστική. Πρόκειται για την πρωταρχική πηγή, που ικανοποιεί άμεσα τα πράσινα φυτά και έμμεσα τους ετερότροφους οργανισμούς (μύκητες, ζώα, άνθρωπο και τη πλειονότητα των βακτηρίων), οι οποίοι καταναλώνουν την ενέργεια, που έχουν δεσμεύσει στις οργανικές τους ενώσεις τα αυτότροφα φυτά.

Εδώ όμως δημιουργούνται τα ερωτήματα: 1) Τι θα συμβεί, όταν απορροφηθεί φως από το μόριο της χλωροφύλλης; και 2) Πως θα χρησιμοποιηθεί στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης;

Γνωρίζουμε ότι τα μόρια συγκροτούνται από άτομα, που έχουν θετικός φορτισμένο πυρήνα και από ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια περιστρεφόμενα σε συγκεκριμένες τροχιές γύρω από το πυρήνα. Για να μετακινηθεί ένα ηλεκτρόνια σε τροχιά

μεγαλύτερης απόστασης από το θετικά φορτισμένο πυρήνα, χρειάζεται ενέργεια. Όταν μια μονάδα της φωτεινής ενέργειας απορροφάται από ένα μόριο, η ενέργεια αυτή είναι σε θέση να προκαλέσει την μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου του ατόμου σε τροχιά πιο απομακρυσμένη από τον πυρήνα του ατόμου. Τότε λέμε ότι το μόριο αυτό βρίσκεται σε **κατάσταση διέγερσης**. Η κατάσταση όμως αυτή είναι ασταθής και το ηλεκτρόνιο τείνει να επιστρέψει αμέσως (μέσα σε κλάσμα δευτερολέπτου) στην κανονική του τροχιά. Κατά την διάρκεια της επιστροφής η ενέργεια, που παγιδεύτηκε απελευθερώνεται και μπορεί να αποδοθεί ως μία από τις τρεις μορφές:

- 1) ως **θερμότητα**, να διασκορπισθεί δηλ. υπό μορφή θερμότητας
- 2) ως **φως**, να ξαναεκπεμφθεί σχεδόν ακαριαία ως φωτεινή ενέργεια μεγάλου μήκους κύματος, φαινόμενο γνωστό ως **φθορισμός** (ενώ όταν ξαναεκπέμπεται με κάποια καθυστέρηση είναι γνωστό ως **φωσφορισμός**)
- 3) ως **χημική ενέργεια**, να δεσμευθεί σε ένα χημικό δεσμό, ως χημική ενέργεια, όπως γίνεται στη φωτοσύνθεση.

Είναι πειραματικά επιβεβαιωμένο ότι κατά την διαδικασία της φωτοσύνθεσης, η ενέργεια που διεγείρει το μόριο της χλωροφύλλης χρησιμοποιείται κυρίως στο να προκαλέσει μια χημική αντίδραση, παρά να χαθεί ως φως ή θερμότητα.

Πέραν τούτου η δράση της χλωροφύλλης είναι στενά συνυφασμένη με τη δομή των χλωροπλαστών. Πράγματι αν απομονώσουμε μόρια χλωροφύλλης σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα και αφήσουμε στη συνέχεια να πέσει επάνω τους λευκό φως, τότε τα μόρια της χλωροφύλλης φθορίζουν. Με άλλα λόγια αυτό σημαίνει ότι τα μόρια της χρωστικής απορροφούν φωτεινή ενέργεια και τα ηλεκτρόνια της στιγμιαία ανέρχονται σε ψηλότερο ενεργειακό επίπεδο για να ξαναπέσουν στη συνέχεια σε χαμηλότερο. Κατά την πτώση τους όμως αυτή απελευθερώνουν μεγάλο μέρος της ενέργειάς τους ως φθορίζον φως. Επομένως κανένα από τα είδη του λευκού φωτός, που απορροφήθηκαν από τα μόρια της χλωροφύλλης, τα οποία αποσπάρθηκαν προηγουμένως από τα θυλακοειδή του χλωροπλάστη, δεν έχει μετατραπεί σε κάποια μορφή χρήσιμης ενέργειας για τους ζωντανούς οργανισμούς (π.χ. χημική ενέργεια). Η χλωροφύλλη κατά συνέπεια είναι σε θέση να μετατρέψει τη φωτεινή ενέργεια σε

χημική μόνο, όταν είναι συνδεδεμένη με κάποιες πρωτεΐνες και στερεωμένη σε μία εξειδικευμένη μεμβράνη, όπως είναι τα θυλακοειδή.

ΠΛΑΣΤΙΔΙΑ

Μια χαρακτηριστική κατηγορία κυτταρικών οργανιδίων που απαντάται αποκλειστικά στους φωτοαυτρότροφους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς είναι οι ονομαζόμενοι **πλάστες** ή **πλαστίδια**. Διακρίνονται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες με βάση το χρωματισμό και το λειτουργικό τους ρόλο μέσα στο κύτταρο. Οι κατηγορίες είναι οι παρακάτω:

- Οι λευκοπλάστες
- Οι ετιοπλάστες
- Οι χλωροπλάστες
- Οι αμυλοπλάστες

Παρά τις μεγάλες διαφορές ως προς την δομή και λειτουργία τους, έχει αποδειχθεί ότι προέρχονται από κοινά πρόγονα σωματίδια τα **προπλαστίδια**. Τα προπλαστίδια που ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά το 1950 από τον Strugger, βρίσκονται κυρίως στα μεριστωματικά κύτταρα των κορυφαίων μεριστωμάτων. Πιθανότατα προέρχονται από αρχικά αδιαφοροποίητα σωματίδια με διπλή μεμβράνη, των οποίων η προέλευση δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένη. Είναι ελλειψοειδή σωματίδια διαμέτρου μέχρι 1μ. και περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη, με την εσωτερική μεμβράνη να εμφανίζει μικρές εγκολπώσεις προς το εσωτερικό των προπλαστιδίων που ονομάζεται **στρώμα**. Χαρακτηριστικό των προπλαστιδίων είναι η ικανότητα τους να διαιρούνται καθώς και παρουσία σ' αυτά κόκκων αμύλου και λιπιδίων.

Κατά την πορεία της οντογενετικής εξέλιξης των προπλαστιδίων σε πλαστίδια, η εσωτερική μεμβράνη πτυχώνεται προς το εσωτερικό και οργανώνεται μέσα στο στρώμα σε ιδιόμορφα μεμβρανικά συστήματα με σωληνοειδής ή κυστοειδής σχηματισμούς, ώστε τελικά να σχηματισθούν οι διάφορες μορφές πλαστιδίων, οι οποίες μπορούν να μετατραπούν από τη μία κατηγορία στην άλλη. Η αμοιβαία μετατροπή των πλαστιδίων δεν είναι κυκλική, αλλά πραγματοποιείται κατά τον ακόλουθο τρόπο:

Λευκοπλάστες ή ωχροπλάστες → χλωροπλάστες → χρωμοπλάστες

Ωχροπλάστες ή ετιοπλάστες

Οι ωχροπλάστες αποτελούν μια ιδιάζουσα κατηγορία πλαστιδίων που σχηματίζονται σε φυτά ή φυτικά όργανα που αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι. Η εσωτερική μεμβράνη σχηματίζει σφαιρικού σχήματος προβολές που τελικά αποσπώνται και διατάσσονται στο κέντρο του πλαστιδίου, συγκροτώντας ένα μεμβρανικό σύστημα που ονομάζεται **προελασματοειδές σωμάτιο**. Τα πλαστίδια αυτά έχουν διάμετρο 3μ. και καλούνται **ετιοπλάστες**, δηλαδή χλωρωτικοί πλάστες (επειδή στερούνται χλωροφύλλης). Κατά τον Gunning (1965) το κρυσταλλικό κέντρο του προελασματοειδούς σωματίου αποτελείται από τρισδιάστατο μεμβρανικό σύστημα σωληνίσκων.

Όταν τα χλωρωτικά φυτά φωτισθούν τότε οι ετιοπλάστες μετατρέπονται σε χλωροπλάστες, δηλαδή το προελασματοειδές σωμάτιο μετασχηματίζεται στις ελασματοειδές μεμβράνες στις ελασματοειδές μεμβράνες των θυλακοειδών του κανονικού χλωροπλάστη.

Χλωροπλάστες

Είναι ο πιο χαρακτηριστικός τύπος πλαστιδίων, περιέχουν τις φωτοσυνθετικές χρωστικές χλωροφύλλες και καροτενοειδή και προσδίδουν στα φωτιζόμενα φυτά το πράσινο χρώμα τους. Στα ανώτερα φυτά είναι ορατά με το οπτικό μικροσκόπιο και το σχήμα τους είναι συνήθως φακοειδές με την μεγάλη διάμετρο 4-6 μ. και με την μικρή 3-4 μ. Ένα κύτταρο του μεσόφυλλου περιέχει από 20 έως 80 χλωροπλάστες. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν 400.000 με 500.000 χλωροπλάστες ανά τετραγωνικό χιλιοστό φύλλων. Αντίθετα στα κατώτερα φυτά και συγκεκριμένα στα φύκη το μέγεθος και η μορφή τους παρουσιάζουν πολύ μεγάλη παραλλακτικότητα. Σε ορισμένα φύκη υπάρχουν ένας έως τρεις χλωροπλάστες. Για παράδειγμα στο φύκος *Oedogonium* (σπειρόρυγα), ο μοναδικός χλωροπλάστης είναι ταινιοειδής και ελικοειδής, περιστραμένος, καταλαμβάνοντας όλο το κύτταρο.

• Λεπτή δομή

Οι ώριμοι χλωροπλάστες κατά τον Weier (1967) περιβάλλονται από διπλή εξωτερική μεμβράνη που πιθανότατα αποτελείται από σφαιρικές μονάδες και δεν έρχεται σ' επαφή με τις εσωτερικές μεμβράνες. Στο εσωτερικό των χλωροπλάστων διακρίνονται: 1) η θεμελιώδης άχροη πρωτεϊνική μάζα (στρώμα), εντός της οποίας 2) ευρίσκεται ένα σύστημα ελασματοειδών μεμβρανών που χρηματίζουν τα λεγόμενα θυλακοειδή (thylakoids). Κάθε θυλακοειδής αποτελείται από δύο μεμβράνες που χωρίζονται από ένα ενδομεμβράνιο χώρο και δημιουργούν δισκοειδή πεπλατυσμένα μεμβρανικά κατασκευάσματα που μοιάζουν με θύλακες. Σ' ορισμένες θέσεις τα θυλακοειδή στοιβάζονται το ένα πάνω στο άλλο σαν μια κολώνα νομισμάτων και σχηματίζουν τα **grana**. Μεταξύ τους τα grana συνδέονται με μεμονωμένα θυλακοειδή, δημιουργώντας έτσι ένα συνεχές εσωτερικό μεμβρανικό σύστημα. Σ' ένα τυπικό χλωροπλάστη κάθε granum αποτελείται από 10 – 100 επάλληλα θυλακοειδή και υπάρχουν περίπου 40 – 60 grana σε κάθε χλωροπλάστη.

Σε αντίθεση με τη δομή των μιτοχονδρίων, το σύστημα των εσωτερικών μεμβρανών του χλωροπλάστη δεν φαίνεται με την διπλή εξωτερική μεμβράνη.

Στα θυλακοειδή είναι ενσωματωμένη η χλωροφύλλη και τα καρωτενεοειδή (φωτοσυνθετικές χρωστικές). Οι χρωστικές αυτές συνδέονται με πρωτεϊνικά ενζυμικά συστήματα και άπολες ομάδες, έτσι ώστε να προκύπτουν καθορισμένες διατάξεις πρωτεϊνών – λιπιδίων – χρωστικών. Οι διατάξεις αυτές παγιδεύουν την ηλιακή ενέργεια και την μετατρέπουν κατά την διάρκεια της φωτοσυνθετικής διαδικασίας σε χημική.

Εκτός από το σύστημα των μεμβρανών που περιγράψαμε, οι χλωροπλάστες περιέχουν επίσης αμυλόκοκκους, ριβοσώματα, πλαστοσφαιρίδια (λιποειδούς σύνθεσης), και ινίδια DNA.

Η πιο πάνω περιγραφείσα συγκρότηση του χλωροπλάστη απαντάται στα ανώτερα φυτά και φύκη. Αντίθετα στα μονοκύτταρα κυανοπράσινα φύκη (bluegreen algae) οι φωτοσυνθετικές μεμβράνες προέρχονται από την εξωτερική μεμβράνη και διακλαδίζονται σε ολόκληρο το κύτταρο. Δεν υπάρχουν δηλαδή χλωροπλάστες, αλλά ολόκληρο το κύτταρο μοιάζει σαν ένας χλωροπλάστης. Επίσης στα φωτοσυνθετικά βακτήρια δεν υπάρχουν χλωροπλάστες, αν και εδώ οι φωτοσυνθετικές μεμβράνες συναθροίζονται στα λεγόμενα χρωμοφόρα.

Τόσο τα κυανοφύκη όσο και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια που δεν έχουν χλωροπλάστες, αλλά περιέχουν χλωροφύλλη στα μεμβρανικά τους συστήματα, θεωρούνται ομόλογα συστήματα με τα πλαστίδια.

Υπάρχει η άποψη ότι τα ευκαριωτικά κύτταρα προέρχονται από συμβίωση δύο ή περισσοτέρων ημιαυτόνομων υποσυστημάτων. Έτσι οι χλωροπλάστες που περιέχουν δικό τους DNA, ριβοσώματα και αναπαραγωγικό μηχανισμό, αποτελούν ένα πιθανό τέτοιο υποσύστημα.

Χρωμοπλάστες

Είναι ευρείας διαδόσεως κατηγορία πλαστιδίων και βρίσκονται στα πέταλα των ανθέων, στους καρπούς και σπανιότερα σε άλλα φυτικά όργανα όπως π.χ. στη ρίζα του καρότου.

Οι χρωμοπλάστες αντιπροσωπεύουν το τελικό στάδιο οντογένεσης χλωροπλαστών και λευκοπλαστών. Η μετατροπή αυτή των ενεργών μορφών πλαστιδίων, χλωροπλαστών και λευκοπλαστών σε χρωμοπλάστες είναι πορεία μη αντιστρέψιμη. Γι αυτό οι χρωμοπλάστες θεωρούνται γερασμένα και παρηκμασμένα πλαστίδια χωρίς καμία λειτουργική δραστηριότητα.

Η κύρια χρησιμότητά τους (της λόγω μεγάλης περιεκτικότητάς τους σε καρωτενοειδή) είναι η έντονη χρώση ορισμένων φυτικών ιστών. Για παράδειγμα η έντονη χρώση σε πολλά άνθη και καρπούς προσελκύει τα έντομα και τα ζώα, με αποτέλεσμα την εξυπηρέτηση της επικοινωνίας καθώς και της διάδοσης των σπερμάτων των καρπών.

Κατά την μετατροπή ενός χλωροπλάστη σε χρωμοπλάστη, έχουμε προοδευτική κατάλυση και αποδόμηση των ελασματοειδών μεμβρανών του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Η χλωροφύλλη αποδομείται και αυξάνεται η συγκέντρωση καρωτενοειδών λιπιδίων, υπό μορφή έγχρωμων σφαιριδίων (globuli) ή ατρακτοειδών σωματίων που αποτελούνται από επιμήκεις μεμβρανοειδής σωληνίσκους. Όταν τα καρωτενοειδή παράγονται σε πολύ μεγάλα ποσά κρυσταλλώνονται.

Το σχήμα τους τελικά παραμορφώνεται και οι χρωμοπλάστες εμφανίζονται να είναι επιμήκη ή σφαιρικά σωματίδια με έντονο χρώμα.

Λευκοπλάστες – Αμυλοπλάστες

Οι λευκοπλάστες είναι ένας τύπος πλαστιδίων που εμφανίζονται στον επιδερμικό ιστό των φυτών (υπέργειο και υπόγειο), αλλά και στον παρεγχυματικό ιστό. Έχουν ελάχιστο αναπτυγμένο εσωτερικό μεμβρανικό σύστημα και δεν φέρουν χρωστικές. Είναι άχρωα πλαστίδια, για αυτό και εντοπίζονται δύσκολα χωρίς κατεργασία και χρώση ΚJ.

Οι λευκοπλάστες που βρίσκονται στα αποταμιευτικά όργανα, με αποκλειστική λειτουργία την συσσώρευση αμύλου, ονομάζονται **αμυλοπλάστες**. Το άμυλο σχηματίζεται στο στρώμα των αμυλοπλαστών με την μορφή αμυλοκόκκων, που ποικίλουν σε μέγεθος και αριθμό και τελικά καταλαμβάνουν όλο τον όγκο τους.

Όπως είναι γνωστό, αμυλόκοκκοι δημιουργούνται και στους χλωροπλάστες, όταν φωτοσυνθέτουν έντονα, αλλά είναι πολύ λιγότεροι και μικροί σε μέγεθος.

Μια ιδιαίτερη κατηγορία είναι οι στατόλιθοι που απαντούνται στα γόνατα των βλαστών και στην καλύπτρα της ρίζας

ΥΔΡΟΠΟΝΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΠΑΝΑΚΙΟΥ (Spinacia Oleracia)

Το σπανάκι παραμένει μια παραδοσιακή και καλή συνταγή για πειράματα. Είναι ένα φυτό το οποίο μας έχει βοηθήσει πολύ για να κατανοήσουμε την λειτουργία της φωτοσύνθεσης και άλλων λειτουργιών.

Το σπανάκι είναι φυτό μακράς ημέρας. Γενικά η κρίσιμη για αυτό φωτοπερίοδος είναι 10 ώρες.

Η διάρκεια της ημέρας διαφέρει ανάλογα με τον τόπο καλλιέργειας. Σε διάφορες χώρες όπως την Ολλανδία έχουν γίνει προσπάθειες να βρεθούν κατάλληλα μέρη για την καλλιέργεια του καθ' όλη την διάρκεια του έτους. Στην Β. Αγγλία όπου η ημέρα του καλοκαιριού διαρκεί 21 ώρες είναι δύσκολο να καλλιεργηθεί. Σε αυτές τις συνθήκες το φύλλο δεν θα ξεπερνά το μέγεθος ενός νυχιού και μετά την άνθιση το φυτό θα πεθάνει αμέσως. Αντίστροφα πετυχαίνοντας την σωστή διάρκεια της ημέρας αναπτύσσει "καλό" σπανάκι.

Στην υδροπονική καλλιέργεια του σπανακιού θα υπάρξουν καταστροφές οι οποίες θα οφείλονται βασικά σε λάθη χειρισμού από τον καλλιεργητή, μιας και το σπανάκι δεν ενοχλείτε από εχθρούς εκτός από τις αφίδες. Η χρήση εντομοκτόνων, ακόμη και των ήπιων, απαγορεύεται γιατί δημιουργούν προβλήματα στην φωτοσύνθεση. Η καταπολέμηση γίνεται βιολογικά π.χ. με ladybird (πασχαλίτσα).

Όσο συντομότερη είναι η διαδικασία καλλιέργειας τόσο λιγότερες πιθανότητες έχουμε για να συναντήσουμε προβλήματα κατά την καλλιέργεια.

Η ωρίμανση του σπανακιού από την σπορά διαρκεί περίπου 6 εβδομάδες, εάν οι συνθήκες είναι οι κατάλληλες. Κατά τις 2 πρώτες εβδομάδες το φυτό είναι αρκετά μικρό. Κατά τις επόμενες 3 εβδομάδες το φυτό βρίσκεται σε ραγδαία ανάπτυξη. Τα φύλλα που λαμβάνονται για να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα θα πρέπει να είναι νεαρά.

Αν πειραματίζεσαι στην απομόνωση χλωροπλαστών με φυτά σπανακιού τότε δεν υπάρχει εναλλακτική λύση. Το φυτό αυτό μας δίνει πολύ καλής ποιότητας χλωροπλάστες. Εξάλλου υπάρχει μια τεράστια βιβλιογραφία και δεν αξίζει να ασχοληθείς για να βρεις τις ιδιαιτερότητες στις καλλιέργειες άλλων φυτών.

Επίσης πολύ καλής ποιότητας χλωροπλάστες μπορούμε να πάρουμε και από τα φυτά του μπιζελιού.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΤΟ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟ

- **Θερμοκρασία**

Το σπανάκι είναι φυτό ψυχρής εποχής και αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (αντέχει μέχρι -5°C). Οι άριστες θερμοκρασίες στο θερμοκήπιο τόσο κατά τη διάρκεια της ημέρας όσο και κατά τη διάρκεια της νύχτας ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο του σπανακιού και την ποικιλία, την ηλικία του φυτού, την εποχή, την ένταση του φωτισμού και το επίπεδο του CO_2 .

Υψηλές θερμοκρασίες ευνοούν τη γρήγορη ανάπτυξη των φυτών και νωρίς το φθινόπωρο ή αργά την άνοιξη συχνά ενθαρρύνουν την παραγωγή αδύνατων λεπτών φυτών με μικρό βάρος. Όταν οι υψηλές θερμοκρασίες επικρατούν κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων ανάπτυξης των φυτών έχουν μικρότερη καταστρεπτική επίδραση, απ' ότι στην περίπτωση που τα φυτά είναι μεγαλύτερα. Η θερμοκρασία πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο χαμηλή και κοντά στο άριστο επίπεδο όταν τα φυτά πλησιάζουν την ωρίμανση, για να εξασφαλιστεί η καλύτερη δυνατή ποιότητα.

Γενικά συνίσταται η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της νύκτας να κυμαίνεται από $5-7^{\circ}\text{C}$ πιο χαμηλά από την αντίστοιχη θερμοκρασία της ημέρας και η θερμοκρασία στο σπορείο, όπου τα φυτάρια είναι μικρά, να κυμαίνεται μεταξύ $2-3^{\circ}\text{C}$ πιο υψηλά από τη θερμοκρασία στον κύριο χώρο ανάπτυξης όπου τα φυτά είναι μεγαλύτερα.

- **Φως**

Το φως είναι ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να προσεχτεί ιδιαίτερα όταν η καλλιέργεια γίνεται στο θερμοκήπιο. Ακόμη και όταν το υλικό κάλυψης έχει τα καλύτερα χαρακτηριστικά περατότητας στο φως, μόνο το 70% της συνολικής ποσότητας που φτάνει στην επιφάνεια του υλικού το διαπερνά και από την ποσότητα αυτή μόνο το 70% αξιοποιείται από τα φυτά.

Όταν, επομένως το φως, το χειμώνα είναι περιορισμένο δεν χρειάζονται υψηλές θερμοκρασίες, γιατί δεν μπορεί να τις αξιοποιήσει η καλλιέργεια. Όταν όμως συμβαίνει το αντίθετο (αυξημένη ένταση φωτισμού), τότε και οι θερμοκρασίες πρέπει να ανεβαίνουν και ο εμπλουτισμός με CO₂ αποδίδει σημαντικό όφελος. Επίσης το πότισμα πρέπει να διαμορφώνεται ανάλογα ώστε όλοι μαζί οι παράγοντες αυτοί να συμβάλουν στην αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης και του τελικού μεγέθους των φυτών.

- **Διοξείδιο του άνθρακα (CO₂)**

Αναφέρεται ότι το σπανάκι είναι από τα φυτά που αντιδρούν περισσότερο στην αύξηση του CO₂ στο θερμοκήπιο. Η περιεκτικότητα σε CO₂ της ατμόσφαιρας του θερμοκηπίου το χειμώνα, κατά τη διάρκεια της ημέρας όταν παραμένει κλειστό, παρουσιάζεται χαμηλότερη από το κανονικό. Ως γνωστό, η φυσική περιεκτικότητα του αέρα σε CO₂ είναι 300 ppm και με μία έντονα αναπτυσσόμενη καλλιέργεια στο θερμοκήπιο γρήγορα πέφτει κάτω από 200 ppm. Έχει αποδειχθεί ότι τεχνητή αύξηση της συγκέντρωσης του CO₂ στα 1.000-2.000 ppm:

- a) Επιταχύνει το ρυθμό ανάπτυξης
- b) Πρωιμίζει την παραγωγή
- c) Αυξάνει την παραγωγή

Τα αποτελέσματα από εφαρμογή εμπλουτισμού της ατμόσφαιρας του θερμοκηπίου με CO₂ σε εμπορική κλίμακα έχουν αποδείξει ότι το σπανάκι είναι ιδανικό για μία τέτοια τεχνική. Έχει καλή ανάπτυξη το χειμώνα και με χαμηλό φωτισμό και με χαμηλές θερμοκρασίες.

Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση του CO₂ μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

- i. Επιταχύνεται η ωρίμανση από 10 ημέρες μέχρι μερικές εβδομάδες. Πρακτικό αποτέλεσμα του γεγονότος αυτού είναι ότι μπορεί να αυξηθεί ο αριθμός των καλλιεργειών (σοδειών) τη δεδομένη καλλιεργητική περίοδο.
- ii. Οι αποδόσεις αυξάνονται κατά 40-100% όταν παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η διατροφή, το πότισμα ρυθμίζονται στα άριστα δυνατά επίπεδα,

ώστε η καλλιέργεια να μπορέσει να εκμεταλλευτεί την προσθήκη του CO₂.

- iii. Το CO₂ υποκαθιστά τη δυσμενή επίδραση της μειωμένης έντασης φωτισμού. Μπορούν να εξασφαλιστούν υψηλές αποδόσεις το χειμώνα, ακόμα και όταν η ένταση φωτισμού αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των φυτών.

ΣΥΣΤΑΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ

Η σύσταση του θρεπτικού διαλύματος που χρησιμοποιείται για την άρδευση και θρέψη στις υδροπονικές καλλιέργειες του σπανακιού παρουσιάζει αρκετές διαφορές σε σύγκριση με τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στα καρποδετικά λαχανικά. Οι διαφορές αυτές εντοπίζονται κυρίως στη συνολική συγκέντρωση αλάτων στο θρεπτικό διάλυμα καθώς και στην αναλογία K:Ca. Στα θρεπτικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τη θρέψη του σπανακιού η συνιστώμενη αναλογία N:K είναι ίση με 2 σε όλη την διάρκεια της καλλιέργειας. Όσον αφορά τις αναλογίες μεταξύ των κατιόντων στο διάλυμα, η σχέση K:Ca θα πρέπει να διατηρείται γύρω στο 1,1 ενώ η αναλογία Ca:Mg στο 3. Ένα θρεπτικό διάλυμα με ηλεκτρική αγωγιμότητα μεταξύ 1,5-1,8 dS/m περίπου, κατάλληλο για υδροπονική καλλιέργεια σπανακιού με ανακύκλωση του διαλύματος θα πρέπει σύμφωνα με τους Sonneveld and Straver να έχει την εξής σύσταση:

Μακροστοιχεία

NO ₃ -N:	9,50 Meq/l	(133 ppm N)
H ₂ PO ₄ -Q:	1,00 Meq/l	(31 ppm P)
SO ₄ -S:	2,25 Meq/l	(36 ppm S)
NH ₄ -N:	0,50 Meq/l	(7 ppm N)
K:	5,00 Meq/l	(185 ppm K)
Ca:	4,50 Meq/l	(90 ppm Ca)
Mg:	1,50 Meq/l	(18 ppm Mg)

Ιχνοστοιχεία

Fe:	35 μmol	(2,00 ppm Fe)
Mn:	5 μmol	(0,28 ppm Mn)
Zn:	3 μmol	(0,20 ppm Zn)
Cu:	0,50 μmol	(0,03 ppm Cu)

B: 20 μmol (0,22 ppm B)
Mo: 0,50 μmol (0,05 ppm Mo)

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΩΝ ΑΠΟ ΦΥΛΛΑ ΣΠΑΝΑΚΙΟΥ

ΓΕΝΙΚΑ

Κατά τις δυο τελευταίες δεκαετίες έχουμε γίνει θεατές μιας ραγδαίας προόδου στις τεχνικές της μηχανικής απομόνωσης των χλωροπλαστών. Γενικά η μηχανική απομόνωση χλωροπλαστών έχει επιτύχει στο σπανάκι και στον αρακά.

Βασική προϋπόθεση για να πάρουμε καλά αποτελέσματα είναι ότι πρέπει τα φύλλα του σπανάκιού ή του αρακά να προέρχονται από "πλούσια" φυτά, θα πρέπει δηλαδή τα φυτά αυτά να είναι υγιή, μεγάλα, με υψηλή περιεκτικότητα σε άμυλο ή calcium oxalate.

Πρόσφατα έχουν απομονωθεί μηχανικά αρκετοί συμβατικοί χλωροπλάστες και έχουν διαχωριστεί ενζυμικά από "φτωχό" σπανάκι και από δύσκολα είδη (λουλούδια) τα οποία δεν έχουν αποδειχθεί ακόμη κατάλληλα για μηχανική απομόνωση.

Η μηχανική απομόνωση περιέχει την εκχύλιση του φύλλου σε ένα γουδί. Ένα βασικό σημείο σε όλη την διάρκεια της διαδικασίας που θα πρέπει να προσεχθεί ιδιαίτερα είναι ότι σε όλα τα διαλύματα θα πρέπει να υπάρχει κάποιο σάκχαρο (π.χ. σορβιτόλη), το οποίο είναι απαραίτητο για την ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης, ώστε να μην παρατηρείται η μεταφορά νερού μέσω της ημιδιαπερατής μεμβράνης των χλωροπλαστών. Επίσης στα buffer θα πρέπει να περιέχονται αντιοξειδωτικά και σταθεροποιητής του pH.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Πριν την εκχύλιση ο τεχνητός φωτισμός των φύλλων για 30 λεπτά έδωσε αύξηση της παραγωγής.

Η διαδικασία της εκχύλισης του φύλλου σπανάκιού γίνεται σε γουδί. Σε έναν κόσμο με υψηλό νοητικό επίπεδο αυτό

περιφρονείται και πολύ χρησιμοποιούν μηχανικά μέσα στην διαδικασία της εκχύλισης.

Το διάλυμα της εκχύλισης που θα χρησιμοποιηθεί καταψύχεται μαζί με το γουδί για ένα μικρό χρονικό διάστημα ώστε να δημιουργηθούν κρύσταλλοι που διευκολύνουν στο “άλεσμα” του φύλλου. Επίσης όλα τα διαλύματα που θα χρησιμοποιήσουμε θα πρέπει να έχουν χαμηλή θερμοκρασία ώστε να μην βλάψουμε τους χλωροπλάστες.

Αφού κοπεί το φύλλο σε πολύ λεπτές λωρίδες, τοποθετείται στο πορσελάνινο γουδί και ακολουθεί το πολύ δυνατό και γρήγορο άλεσμα με το γουδοχέρι.

Όταν τελειώσει η διαδικασία της εκχύλισης οι χλωροπλάστες πρέπει να διαχωριστούν από το διάλυμα της εκχύλισης όσο το δυνατόν συντομότερα.

Οι καλοί χλωροπλάστες που ετοιμάστηκαν αποθηκεύονται σε σκοτάδι και σε θερμοκρασία 5°C.

ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΑ

Την διαδικασία της εκχύλισης ακολουθεί η διαδικασία διαχωρισμού των χλωροπλαστών με φίλτρα. Αρχικά το διάλυμα περνά από φίλτρο με διάμετρο 120 μm και στην συνέχεια από φίλτρο με διάμετρο 60 μm .

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

Το στάδιο της φυγοκέντρισης είναι το σημαντικότερο στάδιο σε όλη την διαδικασία της απομόνωσης χλωροπλαστών.

Καταρχήν η φυγόκεντρος που θα χρησιμοποιήσουμε θα πρέπει να επιταχύνει στις 5.000 rpm και να επιβραδύνει μέσα σε 90 sec. Εναλλακτικά μπορούμε να φυγοκεντρίσουμε στις 1.500 rpm, αυτή η ταχύτητα θα πρέπει να διατηρηθεί για 1 λεπτό πριν η φυγόκεντρος αρχίσει να επιβραδύνει. Προτιμάται η φυγοκέντριση να διαρκεί 90 sec ώστε να αποφεύγεται η θέρμανση των χλωροπλαστών.

Ιδανική θα κρινόταν η πρόσβαση σε φυγόκεντρο που θα μας παρέχει και ψύξη. Αν υπάρχει αυτή η δυνατότητα θα πρέπει η φυγόκεντρος να ρυθμιστεί στους 0°C.

Όλες οι παραπάνω ενέργειες αυξάνουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος.

Αν το μεγαλύτερο ποσοστό των χλωροπλαστών δεν χρησιμοποιηθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα αυτό θα αχρηστευθεί. Μια καλή λύση για την αποφυγή μεγάλης ποσότητας ιζήματος θα ήταν η μείωση της αρχικής ποσότητας πριν την φυγοκέντριση.

Κατά την φυγοκέντριση θα πρέπει να τηρείται πάντα η ίδια διαδικασία όσον αφορά την ταχύτητα και την διάρκεια της φυγοκέντρισης γιατί είναι το σημαντικότερο σημείο σε όλη την διαδικασία της απομόνωσης.

Η πλύση των φυγόκεντρων σωλήνων με απορρυπαντικό πρέπει να αποφεύγεται. Η πλύση τους γίνεται μόνο με απεσταγμένο νερό.

ΑΝΑΔΙΑΛΥΣΗ

Οι σβώλοι των χλωροπλαστών που προκύπτουν από την φυγοκέντρωση είναι κολλώδεις, με υψηλή πυκνότητα και για να μεταγγιστούν θα πρέπει να αραιωθούν με διάλυμα αναδιάλυσης. Αυτό γίνεται χωρίς να έχουμε απώλειες.

Το ίζημα θα ήταν καλό να αραιωθεί με 1-2 ml διάλυμα αραιώσης και κατόπιν να τοποθετηθεί στον αναδευτήρα.

ΠΛΥΣΙΜΟ

Σε διάστημα 15 περίπου λεπτών μπορούμε από ένα φύλλο να έχουμε απομονώσει τους χλωροπλάστες και το δείγμα να είναι αρκετά καθαρό, παρόλο που μπορεί να περιέχει υπολείμματα, όπως π.χ. μιτοχόνδρια, τα οποία όμως δεν επηρεάζουν την φωτοσυνθετική διαδικασία.

Οι χλωροπλάστες μπορούν να εκλύουν οξυγόνο στο σκοτάδι αν τους παρέχουμε υπεροξειδίο του υδρογόνου. Αυτό

προέρχεται από την χρησιμοποίηση μολυσμένης καταλάσης (catalase). Το πλύσιμο διαδέχεται μία δεύτερη φυγοκέντρηση που θα απομακρύνει το μεγαλύτερο τμήμα μιας τέτοιας μόλυνσης (η μολυσμένη καταλάση απορροφάται από την εξωτερική μεμβράνη του χλωροπλάστη).

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Οι χλωροπλάστες θα πρέπει να απομονώνονται νωρίς το πρωί πριν να έχουμε συσσώρευση starch, κάτι το οποίο κάνει τον χλωροπλάστη εύθραυστο στην φυγοκέντρηση (σαν σακούλα χάρτινη γεμάτη με πατάτες που αιωρείται γύρω από το κεφάλι σου).

Η εξωτερική μεμβράνη του χλωροπλάστη είναι ανθεκτική στο μηχανικό τράνταγμα αλλά είναι ευαίσθητη, όπως κάθε ημιδιαπερατή μεμβράνη στην ώσμωση (επιτρέπει την είσοδο και έξοδο του νερού).

Θα πρέπει τα διαλύματα που θα χρησιμοποιήσουμε κατά την διάρκεια όλης της διαδικασίας να είναι ισοτονικά ώστε να μην παρατηρηθεί φούσκωμα ή συρρίκνωση των χλωροπλάστων. Η σορβιτόλη προτιμάται για την δημιουργία ισοτονικών διαλυμάτων από τις σακχαρόζη, φρουκτόζη, γλυκόζη γιατί είναι δυσκολότερο να μεταβολιστεί. Επίσης είναι ιδανική για την προετοιμασία διαλυμάτων απομόνωσης χλωροπλάστων σπανακιού με pH 5,5 – 8,5.

Συχνά στα διαλύματα περιέχονται αντιοξειδωτικά όπως το ισοασκορβικό οξύ, το οποίο έτεινε να γίνει υποχρεωτικό χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί ότι είναι απολύτως απαραίτητο. Κυρίως προτιμήθηκε για το ισομερές και επειδή είχε μηδαμινό κόστος στην Μεγάλη Βρετανία.

Το μαγνήσιο, το μαγγάνιο και το EDTA προστίθενται στα διαλύματα για να αποτρέψουν την δημιουργία φωσφορικού άλατος.

Το BSA πρέπει να προστίθεται γιατί παρέχει προστασία ενάντια στις φαινολικές ουσίες.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ ΚΑΙ ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΩΝ

Η ζωτικότητα και η λειτουργική ακεραιότητα των ζωντανών συστημάτων εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες κάτω από τις οποίες βρίσκονται και η περιβαλλοντική τους καταπόνηση κάτω από αντίξοες συνθήκες συχνά οδηγεί στην αποδιοργάνωση και καταστροφή τους. Το περιβαλλοντικό στρες εκδηλώνεται με διάφορες μορφές. Μία απ' αυτές είναι η αύξηση των ελευθέρων ριζών (free radicals) που σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες ενοχοποιούνται και για τη γήρανση και τον εκφυλισμό των κυττάρων. Ο μηχανισμός δράσης τους στηρίζεται στην υπεροξειδωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, κυρίως των μεμβρανικών συστημάτων τόσο του κυττάρου όσο και των υποκυτταρικών οργανιδίων, γεγονός που οδηγεί στην καταστροφή τους.

Η πειραματική απομόνωση φυτικών κυττάρων και υποκυτταρικών οργανιδίων είναι μια χρήσιμη διαδικασία τόσο για ερευνητικούς σκοπούς όσο και για την ιστοκαλλιέργεια, η οποία κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις, οδηγεί στην παραγωγή άνοσου πολλαπλασιαστικού υλικού (σπόρου και μοσχευμάτων).

Η απομόνωση των κυττάρων από τους φυτικούς ιστούς γίνεται με την βοήθεια των ενζύμων πέψης των κυτταρικών τοιχωμάτων, η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση άθικτων πρωτοπλαστών. Η διαδικασία αυτή προκαλεί ένα ισχυρό στρες, το οποίο περιορίζει το χρόνο και το ποσοστό επιβίωσης των απομονωμένων κυττάρων μέσα στα υδατικά διαλύματα απομόνωσής τους. Έτσι χάνουν γρήγορα τη λειτουργικότητά τους και τη φωτοσυνθετική τους ικανότητα, γεγονός που δυσχεραίνει τον παραπέρα χειρισμό τους τόσο για ερευνητικούς σκοπούς όσο και για το μικροπολλαπλασιασμό τους. Με βάση τα τελευταία δεδομένα για την δράση και τον ρόλο των ελευθέρων ριζών, προσπαθήσαμε να βελτιώσουμε τις κλασσικές μεθόδους απομόνωσης και συντήρησης των φυτικών κυττάρων και των χλωροπλαστών στο εργαστήριο (μέσω της μείωσης του οξειδωτικού στρες) χρησιμοποιώντας αναστολείς της δραστηριότητας των ελευθέρων ριζών, όπως τις βιταμίνες C και E,

την ταυρίνη και το βουτυλιωμένο υδροξυτολουένιο (BHT). Επίσης χρησιμοποιήθηκε η τρεαλόζη, ένας δισακχαρίτης της γλυκόζης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κατά την πειραματική διαδικασία τα πειράματα εστιάστηκαν σε δύο κύριες κατευθύνσεις: α) στην απομόνωση και βιολογική συντήρηση φυτικών κυττάρων και χλωροπλαστών και β) στην λυοφιλίωση κυττάρων και χλωροπλαστών.

A) Απομόνωση και βιολογική συντήρηση φυτικών κυττάρων (πρωτοπλαστών) και χλωροπλαστών.

Δοκιμάστηκαν ορισμένα ανθοκομικά φυτά ως προς τη δυνατότητα απομόνωσης κυττάρων από τα φύλλα τους, με τη μέθοδο της πέψης των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η πειραματική μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Χρησιμοποιούνται νεαρά ανεπτυγμένα φύλλα. Περίπου 2 gr φύλλα, από τα οποία αφαιρείται το κεντρικό νεύρο, κόβονται σε λεπτές εγκάρσιες τομές (με μικροτόμο ή ξυράφι) πλάτους 1 mm περίπου.

Ακολουθεί η φάση πλασμόλυσης των κυττάρων. Οι τομές τοποθετούνται για 30 min σε τρυβλία Petri παρουσία διαλύματος πλασμόλυσης (10 ml/τρυβλίο): 25 mM HEPES-KOH, pH 7,8, 0,5M σορβιτόλη, 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM KH₂PO₄, 1mM MgCl₂. Η επώαση αυτή βοηθά στην πλασμόλυση των κυττάρων.

Κατόπιν αφαιρείται το διάλυμα πλασμόλυσης με πιπέττα Pasteur και αντικαθίσταται με το διάλυμα πέψης ή αποικοδόμησης των κυτταρικών τοιχωμάτων: 10 mM Mes-KOH, pH 5,5, 0,5M σορβιτόλη, 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM KH₂PO₄, 1mM MgCl₂, 2% (w/v) κυτταρινάση, 0,25% (w/v) BSA (ορός αλβουμίνης βοδιού). Η πέψη των κυτταρικών τοιχωμάτων διαρκεί 3-4 ώρες. Τα τρυβλία κατά την διάρκεια της πέψης τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας (30°C) και σε χαμηλό φωτισμό. Κατά την διάρκεια της πέψης απελευθερώνονται στο διάλυμα πρωτοπλάστες μεσοφύλλου, επιδερμικών κυττάρων, χλωροπλάστες από θραύσματα κύτταρα, δέσμες και θραύσματα κυττάρων. Ο ρυθμός απελευθέρωσης ελέγχεται με μικροσκοπική παρατήρηση.

Μετά την πέψη συλλέγουμε με μικροπιπέττα Pasteur το εναιώρημα και το διηθούμε περνώντας το από νάιλον φίλτρο

(διαμέτρου πόρων 60 μm). Στο φίλτρο κατακρατούνται τα άπεπτα τεμάχια των φύλλων καθώς και οι δέσμες. Από δω και πέρα όλες οι μεταχειρίσεις γίνονται σε χαμηλή θερμοκρασία (μέσα σε πάγο ή στο ψυγείο) και πού χαμηλό φωτισμό.

Κατόπιν φυγοκεντρείται στα 300 g για 5 min. Μετά τη φυγοκέντρηση οι πρωτοπλάστες περιέχονται στο ίζημα. Απορρίπτουμε λοιπόν το υπερκείμενο και αναδιαλύεται το ίζημα σε 0,5 ml διαλύματος αναδιάλυσης: 25 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 0,6M σακχαρόζη, 1 mM EDTA, 2 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgCl_2 . Οι αναδιαλυμένοι πρωτοπλάστες μεταφέρονται προσεκτικά στο διάλυμα διαχωρισμού: 25 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 0,5M σορβιτόλη, 5,5% (w/v) PEG 8.000, 10% (w/v) Dextran 40.000. Το διάλυμα διαχωρισμού δημιουργεί σε ηρεμία δύο ευδιάκριτες φάσεις.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση επί 10 min σε 1.300 g σε φυγόκεντρο με κεφαλή μεταβαλλόμενης κλίσης. Κατά την φυγοκέντρηση οι πρωτοπλάστες συγκεντρώνονται μεταξύ των δύο φάσεων δεξτράνης-πολυαιθυλενογλυκόλης. Στον πυθμένα πέφτουν χλωροπλάστες και σκουπίδια ενώ στην κορυφή κρατούνται οι πρωτοπλάστες των επιδερμικών κυττάρων.

Κατόπιν συλλέγουμε προσεκτικά τους πρωτοπλάστες από την μεσόφαση χρησιμοποιώντας πιπέττα με διευρυμένο στόμιο και αναδιαλύουμε σε 10 ml διαλύματος αποθήκευσης: 25 mM HEPES-KOH, pH 7,8, 0,6M σορβιτόλη, 0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM KH_2PO_4 , 1mM MgCl_2 .

Φυγοκεντρούμε στα 300 g επί 5 min. Ακολουθούν 2-3 φυγοκεντρίσεις και αναδιαλύσεις, με σκοπό να απομακρυνθούν η PEG, η δεξτράνη και τα ένζυμα που χρησιμοποιήσαμε. Το τελικό ίζημα αναδιαλύεται σε 3-4 ml και φυλάσσεται στο σκοτάδι και στους 4°C.

Μπορούμε να ελέγξουμε την ακεραιότητα των πρωτοπλαστών μικροσκοπικά με τη χρωστική Evans-blue. Η μπλε αυτή χρωστική δεν διαπερνά την μεμβράνη των άθικτων πρωτοπλαστών. Για το σκοπό αυτό, σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα αναμιγνύουμε μικρό όγκο εναιωρήματος με ίσο όγκο διαλύματος της χρωστικής (2,5% w/v). Οι άθικτοι πρωτοπλάστες παραμένουν πράσινοι ενώ οι σπασμένοι χρωματίζονται μπλε.

Επίσης μπορούμε να μετρήσουμε τον αριθμό των πρωτοπλαστών με τη χρήση αιμοκυτόμετρου (Neubauer με απλές γραμμώσεις).

Τα φυτά τα οποία δοκιμάστηκαν ως προς την δυνατότητα απομόνωσης κυττάρων και πρωτοπλαστών είναι τα ακόλουθα:

καλαγχόη (*Kalanchoe deigremontiana*), φίκος (*Phycus sp.*), τριανταφυλλιά (*Rosa sp.*), γαρυφαλλιά (*Carnation*), σπανάκι (*Spinach oleraceae*).

Επιλέξαμε για την συνέχιση των ερευνών τα φυτά καλαγχόη και φίκος και διερευνήσαμε την επίδραση διαφόρων ουσιών στη αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες και στη συντήρησή τους.

Κάναμε δύο παράλληλα πειράματα απομόνωσης κυττάρων, παρουσία 0,5 M σορβιτόλης ή τρεαλόζης σε όλα τα διαλύματα κατά τη διάρκεια της απομόνωσης. Επίσης χρησιμοποιήσαμε και ορισμένους αντιοξειδωτές ή αναστολείς της δραστηριότητας των ελευθέρων ριζών (μείωση του οξειδωτικού στρες) όπως βιταμίνη C (10-20 mM), ταυρίνη (0,5-1mM) και BHT (0,1-0,5 mM). Μετρήσαμε τη ζωτικότητα των απομονωμένων κυττάρων μέσω της φωτοσυνθετικής τους απόδοσης αμέσως μετά την απομόνωση και καθαρισμό τους και μετά από 24 ώρες. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα II.

Η ίδια περίπου πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε αρχικά και για τη απομόνωση των χλωροπλαστών.

Έχοντας το εναιώρημα των πρωτοπλαστών (κύτταρα χωρίς το κυτταρικό τοίχωμα), με μηχανική θραύση των πρωτοπλασματικών μεμβρανών μπορούμε να πάρουμε τους χλωροπλάστες (υποκυτταρικά οργανίδια που περιβάλλονται από παρόμοιας φύσης βιολογική μεμβράνη).

Περάσαμε το εναιώρημα χλωροπλαστών από λεπτό nylon mesh διαμέτρου πόρων 25 μm με τη βοήθεια σύριγγας των 10 ml. Η διάμετρος των πρωτοπλαστών είναι πού μεγαλύτερη των 25 μm (περίπου 100-150 μm), ενώ η διάμετρος των χλωροπλαστών είναι μικρότερη των 20 μm . Πιέζοντας την σύριγγα αργά πήραμε τελικά διάλυμα που περιείχε χλωροπλάστες, θραύσματα μεμβρανών καθώς και άλλα υποκυτταρικά οργανίδια.

Ακολούθησε φυγοκέντριση για 3 min στα 1500 g. Το ίζημα των χλωροπλαστών αναδιαλύθηκε σε 5 ml buffer αναδιάλυσης (παρουσία 0,3 M σορβιτόλης) και τοποθετήθηκε σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα πάνω από 5 ml διαλύματος αναδιάλυσης που περιείχε 32% Percol.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 4 min στα 2000 g. Οι άθικτοι χλωροπλάστες μετά τη φυγοκέντρηση καταβυθίστηκαν (ίζημα στον πυθμένα) ενώ οι σπασμένοι παρέμειναν στο υπερκείμενο. Τέλος, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα αναδιαλύθηκε, παίρνοντας έτσι καθαρισμένο εναιώρημα χλωροπλαστών.

Όλες οι παραπάνω διαδικασίες έγιναν στους 4° C και σε πολύ χαμηλό φωτισμό.

Κατά την απομόνωση των χλωροπλαστών έγιναν επίσης δυο παράλληλα πειράματα παρουσίας 0,3 M σορβιτόλης και 0,3 M τρεαλόζης σε όλα τα διαλύματα κατά την διάρκεια της απομόνωσης.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης οι ίδιοι αντιοξειδωτές ή αναστολείς της δραστηριότητας των ελευθέρων ριζών και στις ίδιες ακριβώς συγκεντρώσεις, όπως και στην περίπτωση των πρωτοπλαστών.

Μετρήθηκε επίσης η ζωτικότητα των απομονωμένων χλωροπλαστών μέσω της φωτοσυνθετικής τους απόδοσης, αμέσως μετά τον καθαρισμό και μετά από 24 h.

B) Λυοφιλίωση κυττάρων και χλωροπλαστών.

Στο δεύτερο στάδιο έγινε προσπάθεια λυοφιλίωσης πρωτοπλαστών και χλωροπλαστών. Για το σκοπό αυτό η τρεαλόζη ή η σορβιτόλη των εναιωρημάτων αντικαταστάθηκε από PEG (πολυαιθυλενογλυκόλη). Κατόπιν, προστέθηκε σε ορισμένα από τα εναιωρήματα ο δισακχαρίτης τρεαλόζη σε συγκέντρωση 50 mM. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η PEG είναι antifreeze και η τρεαλόζη antidry. Κατά την διάρκεια της λυοφιλίωσης (freeze-dry) αναμενόταν η προστασία των πρωτεϊνών – ενζύμων των μεμβρανικών συστημάτων.

Μετρήθηκε και εδώ η ζωτικότητα των πρωτοπλαστών και των χλωροπλαστών πριν και μετά την λυοφιλίωση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δοκιμάστηκαν 4 ανθοκομικά φυτά και το σπανάκι ως προς την απόδοση τους κατά την απομόνωση των πρωτοπλαστών σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα I :

ΦΥΤΟ	ΧΡΟΝΙΚΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΠΕΨΗΣ (h)		
	1,5	2,5	3,5
Καλαγχόη	Μικρή απελευθέρωση	Μεγάλη απελευθέρωση	Πλήρης απελευθέρωση
Γαριφαλιά	-	Μικρή απελευθέρωση	Σημαντική απελευθέρωση
Φίκος	-	Μικρή απελευθέρωση	Μεγάλη απελευθέρωση
Τριανταφυλλιά	-	Μικρή απελευθέρωση	Μικρή απελευθέρωση
Σπανάκι	Μικρή απελευθέρωση	Μεγάλη απελευθέρωση	Πλήρης απελευθέρωση

Πίνακας I: πέψη των φύλλων και απελευθέρωση κυττάρων-πρωτοπλαστών.

Συμπερασματικά, τα καλύτερα αποτελέσματα είχαμε στην περίπτωση της καλαγχόης και του σπανακιού το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τα control πειράματα λόγω της εκτεταμένης χρήσης του ως πειραματόφυτο από άλλους ερευνητές.

Με τα δύο αυτά φυτά συνεχίσαμε τα πειράματα, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά ορισμένους αντιοξειδωτές ή αναστολείς των ελευθέρων ριζών, με σκοπό τη μείωση του αντιοξειδωτικού στρες και έτσι την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης των ζωντανών πρωτοπλαστών. Τα αποτελέσματα που πήραμε φαίνονται στον Πίνακα II :

Φυτό	Προσθήκη αντιοξειδωτή	%φωτοσυνθετική απόδοση παρουσία ωσμορυθμιστή			
		0,5 M σορβιτόλη		0,5 M τρεαλόζη	
		0h	24h	0h	24h
Καλαγχόη	-	100	10±4	100	38±4
	Βιταμίνη C	100	68±7	100	89±3
	Ταυρίνη	100	34±5	100	64±7
	BHT	100	20±3	100	44±6
Σπανάκι	-	100	14±5	100	41±4
	Βιταμίνη C	100	61±4	100	84±3
	Ταυρίνη	100	29±7	100	61±4
	BHT	100	14±3	100	36±2

Πίνακας II: Φωτοσυνθετική απόδοση απομονωμένων κυττάρων παρουσία των ωσμορυθμιστών σορβιτόλη και τρεαλόζη, και παρουσία διαφόρων αντιοξειδωτών (αποτελέσματα 4 διαφορετικών επαναλήψεων).

Ελέγξαμε τη ζωτικότητα των απομονωμένων πρωτοπλαστών μέσω της φωτοσυνθετικής τους απόδοσης για 24 h, παρουσία των ωσμορυθμιστών σορβιτόλης και τρεαλόζης και παρουσία διαφόρων αντιοξειδωτών. Από τα αποτελέσματα αυτά προέκυψε ότι στη περίπτωση της καλαγχόης έχουμε σημαντική διατήρηση της ζωτικότητας των πρωτοπλαστών (68±7%) για 24 h παρουσία σορβιτόλης και βιταμίνης C. Στην περίπτωση της παρουσίας στα διαλύματα συντήρησης ταυρίνης και BHT η ζωτικότητα των κυττάρων εμφανίζεται μειωμένη. Επίσης, σημαντικό εύρημα είναι ότι η απουσία οποιουδήποτε αντιοξειδωτή,

η αντικατάσταση της σορβιτόλης από την τρεαλόζη στα διαλύματα απομόνωσης αύξησε σημαντικά τη ζωτικότητα των πρωτοπλαστών ($38\pm 4\%$ μετά από 24 h).

Συμπερασματικά ο συνδυασμός τρεαλόζης και βιταμίνης C φαίνεται να μειώνει σημαντικά το οξειδωτικό στρες διατηρώντας έτσι σε υψηλά επίπεδα τη ζωτικότητα των απομονωμένων πρωτοπλαστών.

Παρόμοια σειρά πειραμάτων έγινε προκειμένου να δούμε την επίδραση των παραπάνω ουσιών στη διατήρηση της ζωτικότητας των απομονωμένων χλωροπλαστών. Τα αποτελέσματα που πήραμε φαίνονται στον Πίνακα III.

Φυτό	Προσθήκη αντιοξειδωτή	%φωτοσυνθετική απόδοση παρουσία ωσμоруθμιστη			
		0,5 M σορβιτόλη		0,5 M τρεαλόζη	
		0h	24h	0h	24h
Καλαγχόη	-	100	22 ± 7	100	50 ± 9
	Βιταμίνη C	100	78 ± 9	100	96 ± 8
	Ταυρίνη	100	51 ± 5	100	74 ± 9
	BHT	100	38 ± 8	100	65 ± 8
Σπανάκι	-	100	26 ± 6	100	53 ± 7
	Βιταμίνη C	100	76 ± 8	100	91 ± 5
	Ταυρίνη	100	40 ± 7	100	75 ± 8
	BHT	100	26 ± 4	100	50 ± 5

Πίνακας III: Φωτοσυνθετική απόδοση απομονωμένων χλωροπλαστών παρουσία των ωσμоруθμιστών σορβιτόλη και τρεαλόζη, και παρουσία διαφόρων αντιοξειδωτών (αποτελέσματα 4 διαφορετικών επαναλήψεων).

Από τον Πίνακα III φαίνεται ότι η επίδραση των παραπάνω αντιοξειδωτών είναι περίπου ίδια με αυτήν που βρέθηκε στην περίπτωση των πρωτοπλαστών. Στο φυτό καλαγχόη η ταυτόχρονη παρουσία τρεαλόζης και βιταμίνης C διατήρησε σε υψηλά επίπεδα τη ζωτικότητα των χλωροπλαστών.

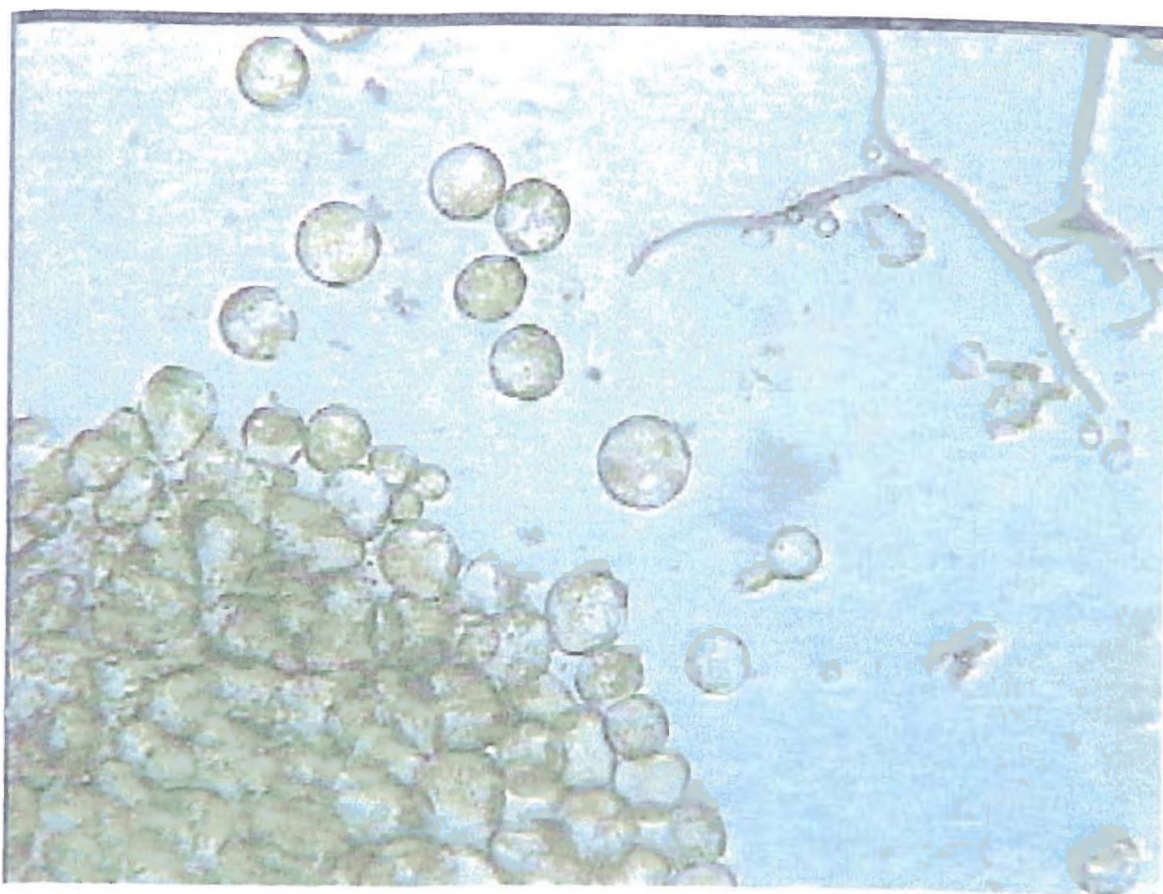
Όσον αφορά την προσπάθεια λυοφιλίωσης κυττάρων και χλωροπλαστών, στα υδατικά τους διαλύματα αντικαταστήσαμε την τρεαλόζη με PEG και προσθέσαμε χαμηλή συγκέντρωση τρεαλόζης (50 mM). Η προσπάθεια λυοφιλίωσης αποσκοπούσε στο να πάρουμε σε ξηρή-αφυδατωμένη μορφή άθικτους τόσο τους πρωτοπλάστες όσο και τους χλωροπλάστες. Με τη λυοφιλίωση ξηραίνεται το δείγμα στους -45°C κάτω από συνθήκες κενού. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε erpendorfs του 1 ml, καταψύχθηκαν στους -20°C για 2 h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στο λυοφιλιωτή προκειμένου να αποξηρανθούν. Παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες για διάστημα 6 μηνών δεν κατέστη η πλήρης (100%) αποξήρανση των δειγμάτων. Δεν επήλθε σε καμία από τις συνεχείς επαναλήψεις ολική αποξήρανση των πρωτοπλαστών και των χλωροπλαστών. Εκ των υστέρων διαπιστώθηκε ότι αυτό οφείλετο στη μη επαρκή πρόψυξη των δειγμάτων και τις υψηλές θερμοκρασίες που επικρατούσαν στο χώρο του λυοφιλιωτή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

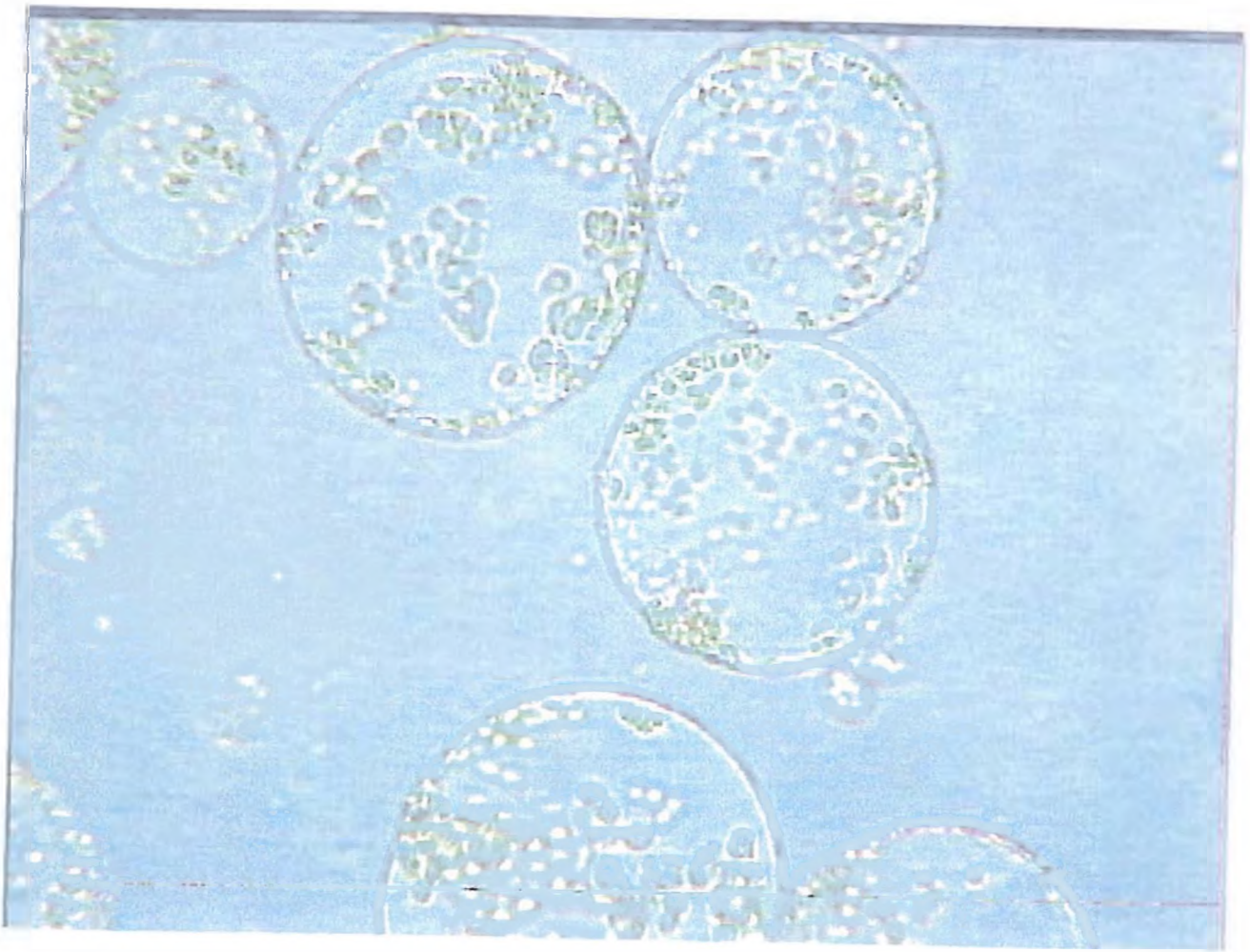
- Blanch C.C and Rouhani I. 1980. Isolation of leaf Mesophyll and Bundle Sheath Cells.
- Higa L.M. and Womersley C.Z. 1993. New insights into the anhydrobiotic phenomenon.
- Illing G.T. Normansell I.D. and Pederly J.F. 1989. Protoplast Isolation and Regeneration in *Streptomyces clavuligerus*.
- Lilley R.M. Fitzerald H.G. and Walner D.A. 1975. Criteria of intactness and the photosynthetic activity of spinach chloroplast preparation.
- Mendes P.C. Million I. Latude P. and Vigneron C. 1997. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen.
- Salahas G., Pselis B., Georgiou G.D. and Gavalas N.a. 1997. trehalose, an extreme temperature protector of phosphoenol – pyruvate carboxylase from *Cynodon dactylon*.
- Καράταγλης Στέλιος 1995. Φυσιολογία Φυτών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

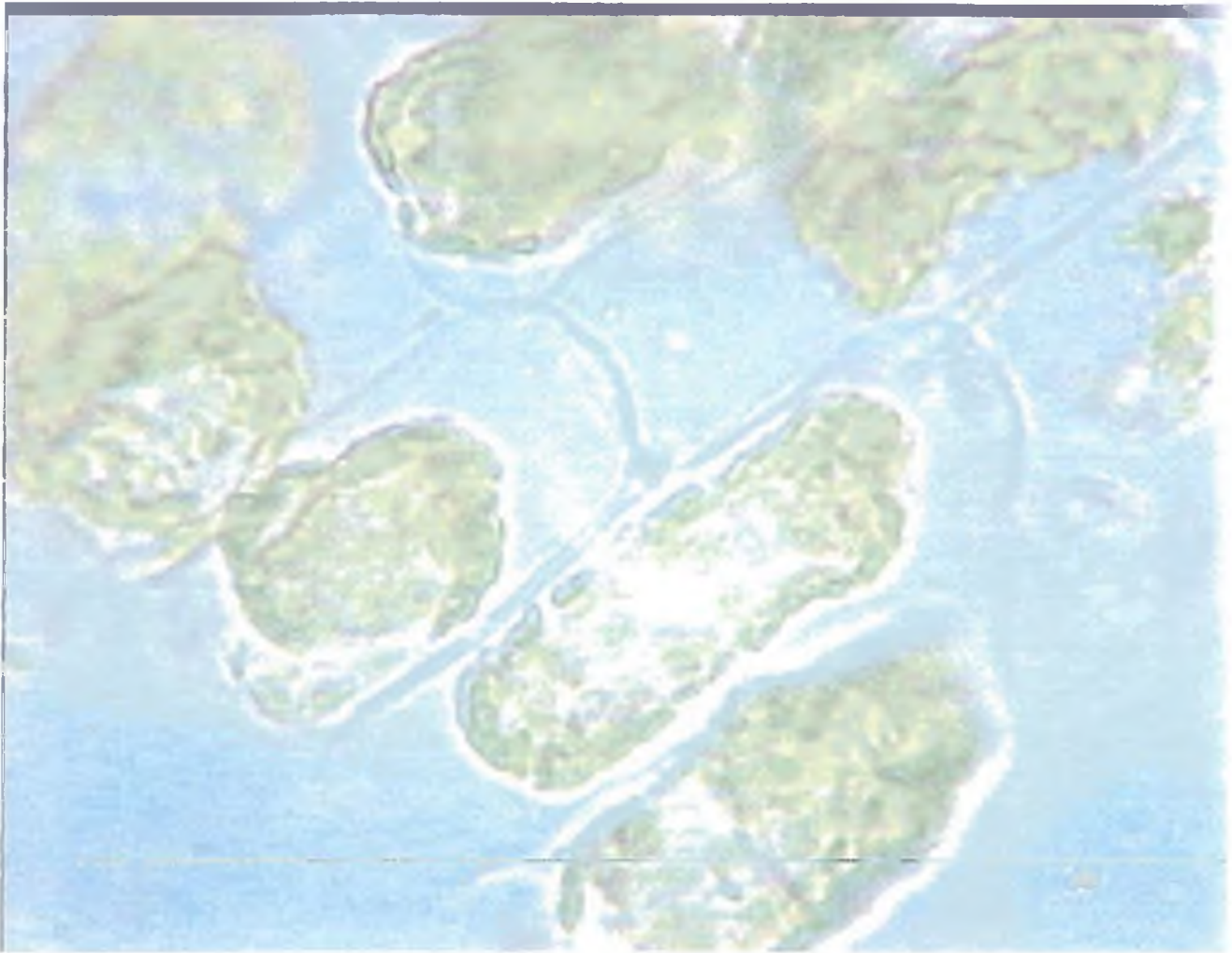
1.	Υδροπονική καλλιέργεια	1
2.	Φωτοσύνθεση	16
3.	Πλαστίδια	24
4.	Υδροπονική καλλιέργεια σπανακιού	29
5.	Απομόνωση χλωροπλαστών από φύλλα σπανακιού	33
6.	Πειραματική διαδικασία απομόνωσης πρωτοπλαστών και χλωροπλαστών	37
7.	Βιβλιογραφία.....	46



Εικ. 1. Διαδικασία της ενζυμικής πέψης των κυτταρικών τοιχωμάτων και σταδιακή απελευθέρωση κυττάρων του μεσοφύλλου από το φυτό *Kalanchoe deigremontiana* (Μικροσκοπική παρατήρηση)



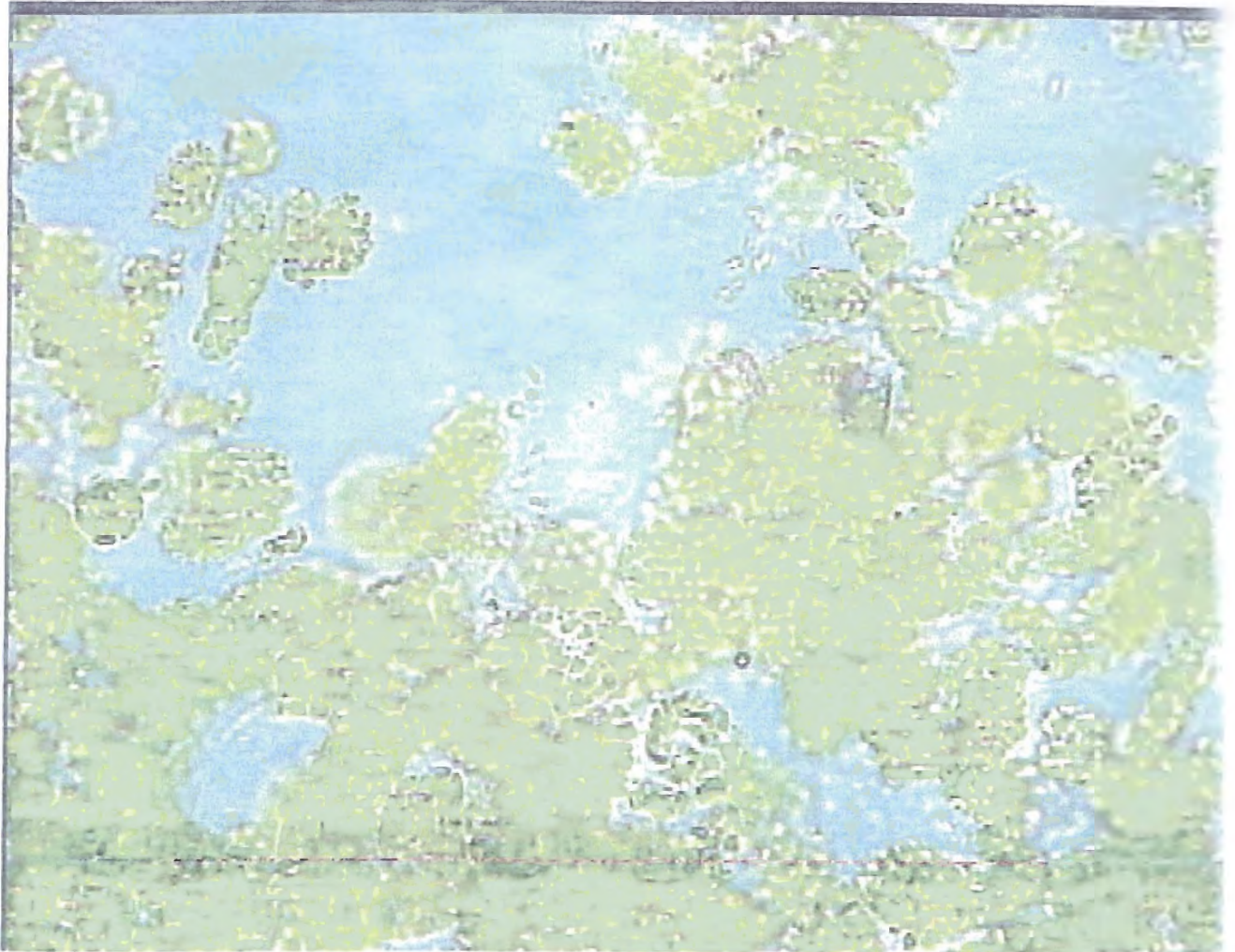
Εικ. 2. Απομονωμένα ζωντανά κύτταρα του μεσοφύλλου του φυτού *Kalanchoe daigremontiana* (Μικροσκοπική παρατήρηση)



Εικ. 3. Διαδικασία της ενζυμικής πέψης των κυτταρικών τοιχωμάτων στο μεσοφυλλό του φυτού *Rhycus sp.* (μικροσκοπική παρατήρηση)



Εικ. 4. Απομονωμένα ζωντανά κύτταρα του μεσόφυλλου του φυτού *Phycus* *sp.* Διακρίνονται οι χλωροπλάστες στο εσωτερικό τους (μικροσκοπική παρατήρηση)



Εικ. 5. Μερικώς αφυδατωμένα κύτταρα και χλωροπλάστες από το φυτό Kalanchoe deigremontiana μετά από λυοφιλίωση. (Μικροσκοπική παρατήρηση)