

Τμήμα Μορ. Βιολογίας & Γενετικής
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΑΘΗΜΑ Ι

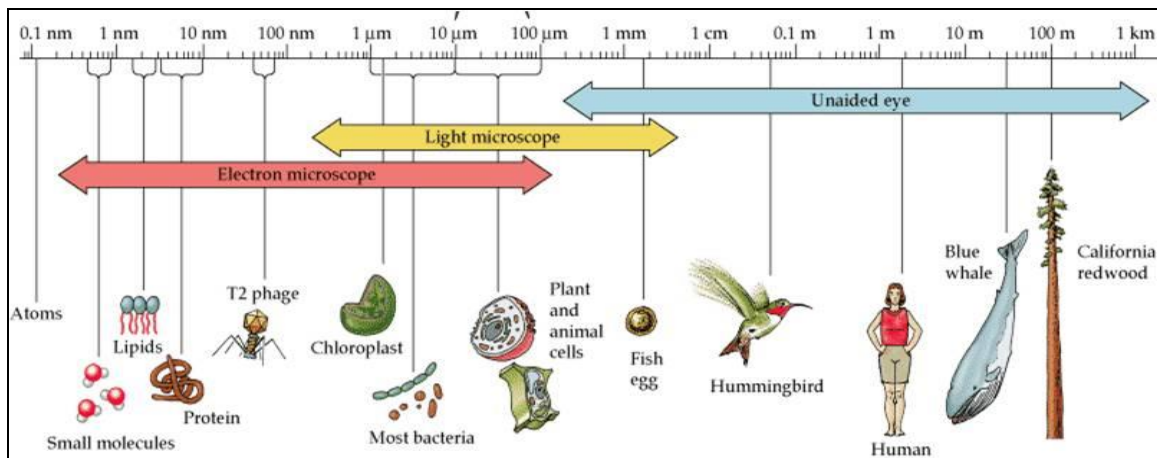
Σημειώσεις και Πρωτόκολλα Εργασίας
για την Ενότητα:
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Επιμέλεια- Συγγραφή:

Δρ. Μαρία Αλεξίου Χατζάκη
Αναπλ. Καθ. Βιολογίας Οργανισμών,
Συστηματικής & Οικολογίας
Δρ. Χρυσή Τσικρικώνα, Ε.Δι.Π.
Δρ. Σωτήρης Μαλάτος, Ε.Δι.Π.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 1^ο – ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

Για τις βιολογικές επιστήμες η ανακάλυψη του μικροσκοπίου αποτέλεσε σημαντικότατο σταθμό για τη μετέπειτα εξέλιξή τους. Αυτό γιατί, πριν από τη χρήση του μικροσκοπίου ένας ολόκληρος βιολογικός «κόσμος», ο κυτταρικός και υποκυτταρικός, παρέμενε παντελώς άγνωστος ως προς τη δομή του. Ένα τυπικό ζωικό κύτταρο είναι περίπου πέντε φορές μικρότερο από το πιο μικρό αντικείμενο που μπορεί να αντιληφθεί το ανθρώπινο μάτι (Εικ.1).



Εικ. 1- Εύρος μεγεθών που γίνονται αντιληπτά από το ανθρώπινο μάτι, από το οπτικό και από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Το μικροσκόπιο εφευρέθηκε το 1590 από τους Ολλανδούς αδελφούς Johan και Zaccharias Jansen, εμπόρους και ερασιτέχνες κατασκευαστές οπτικών. Μέχρι τα τέλη του 17^{ου} αιώνα το μικροσκόπιο βελτιώθηκε και έγινε πιο αποδοτικό χάρις στο έργο του αστρονόμου Robert Hooke (1635-1703) πάνω στην απεικόνιση και περιγραφή φυτικών κυττάρων και του Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) (Εικ. 2), ο οποίος κατασκεύασε πάνω από 400 διαφορετικά μικροσκόπια κατά την ίδια περίοδο.



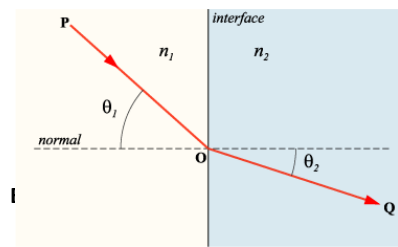
Εικ. 2- Anton van Leeuwenhoek

Από εκείνη την εποχή μέχρι σήμερα έχουν γίνει άλματα ως προς τη βελτίωση της μικροσκοπικής παρατήρησης, με την ανάπτυξη διαφορετικών τεχνικών οπτικής, την τελειοποίηση των φακών και τις διάφορες τεχνικές επεξεργασίας των προς παρατήρηση αντικειμένων. Έτσι έχουν αναπτυχθεί πολλοί διαφορετικοί τύποι μικροσκοπίων, όπως το **μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου, αντίθεσης φάσεων, συμβολής, σκοτεινού πεδίου, φθορισμού, πόλωσης** κ. ά. Ωστόσο όλα τα παραπάνω, παρά τις δυνατότητες που προσφέρουν στον ερευνητή για λεπτομερέστερη και πιο ακριβή παρατήρηση, δεν ξεφεύγουν από συγκεκριμένα όρια μεγέθυνσης που μπορούν να πετύχουν και τα οποία καθορίζονται από την κυματική φύση του ορατού φωτός και το ελάχιστο μήκος κύματός του. Έτσι ένα οπτικό μικροσκόπιο σε καμία περίπτωση δεν υπερβαίνει τη δυνατότητα μεγέθυνσης κάποιων εκατοντάδων φορές και είναι χρήσιμο για παρατήρηση δομών μέχρι περίπου τα 200 nm. Η ανάγκη για ακόμα μεγαλύτερη λεπτομέρεια στην παρατήρηση σε υποκυτταρικό κυρίως επίπεδο οδήγησε στην κατασκευή των πρώτων ηλεκτρονικών μικροσκοπίων το 1939. Ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εκμεταλλεύεται την κυματική φύση των ηλεκτρονίων, σε μήκη κύματος πολύ μικρότερα από αυτά του ορατού φωτός. Έτσι η μέγιστη ανάλυση μπορεί να είναι της τάξεως του 0,1 nm. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία κάνει χρήση των ιδιοτήτων των ηλεκτρονίων καθώς αυτά οπισθοσκεδάζονται από ένα σώμα (**ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης**) ή διέρχονται μέσα από αυτό (**ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης**). Ο τρόπος προετοιμασίας των δειγμάτων για παρατήρηση στο

ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαφέρει σημαντικά από αυτόν των οπτικών μικροσκοπίων και αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της ανάπτυξης της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

Το **οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου** είναι το πιο απλό, αλλά και το πιο βασικό για παρατήρηση, μικροσκόπιο στις βιολογικές επιστήμες. Το ουσιαστικότερο τμήμα του οπτικού μικροσκοπίου είναι το **οπτικό του σύστημα**, δηλαδή ένα σύστημα φακών κατάλληλα τοποθετημένων μεταξύ τους ώστε, όταν από αυτούς περνάει το ορατό φως, να επιτυγχάνεται μεγέθυνση του προς παρατήρηση αντικειμένου. Οι ιδιότητες/δυνατότητες κάθε τέτοιου μικροσκοπίου καθορίζονται από τις ιδιότητες και την ποιότητα των φακών αυτών και κατά συνέπεια σχετίζονται άμεσα με το φαινόμενο της διάθλασης (Εικ.3). Όπως προαναφέρθηκε, το μικρότερο μέγεθος μιας δομής που μπορεί ένα οπτικό όργανο να διακρίνει εξαρτάται από το μήκος κύματος της χρησιμοποιούμενης ακτινοβολίας και **δεν μπορεί να είναι μικρότερο από την ελάχιστη τιμή αυτού**. Στην περίπτωση του οπτικού μικροσκοπίου, το ορατό φως κυμαίνεται από τα 400nm (ιώδες) στα 700nm (ερυθρό).

Η βασική ιδιότητα ενός μικροσκοπίου είναι η **διακριτική του ικανότητα (Δ.Ι.)** η οποία ορίζεται ως η μικρότερη απόσταση μεταξύ δύο αντικειμένων ή σημείων τα οποία μπορούν να διακριθούν ως ξεχωριστά από το μικροσκόπιο. Όπως φαίνεται στην Εικ. 4, η διακριτική ικανότητα εξαρτάται από το μήκος κύματος (λ) του φωτός και το αριθμητικό άνοιγμα (ΑΑ) των χρησιμοποιούμενων φακών.



αποτελεί τον παρανομαστή της εξίσωσης στην Εικ. 4 και είναι συνάρτηση της ικανότητας των φακών να συλλέγουν το φως. Για ξηρούς φακούς η τιμή του δεν μπορεί να υπερβαίνει τη μονάδα, κι έτσι ο τύπος της διακριτικής ικανότητας μπορεί να μετατραπεί για απλοποίηση στο $\Delta.I. = 0,61 \cdot \lambda$. Επομένως η διακριτική ικανότητα ισούται περίπου με τα μισά του μήκους κύματος της χρησιμοποιούμενης ακτινοβολίας. Στην πράξη αυτό σημαίνει ότι τα βακτήρια και τα μιτοχόνδρια με διάμετρο περίπου 500 nm είναι τα μικρότερα αντικείμενα που μπορούν να παρατηρηθούν από το οπτικό μικροσκόπιο.

ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ	
ΕΙΚΟΝΑ	ΦΑΚΟΙ
	<p>Ο αντικειμενικός φακός συγκεντρώνει έναν κώνο φωτεινών ακτίνων για να δημιουργήσει μία εικόνα</p>
	<p>Ο συμπυκνωτικός φακός εστιάζει έναν κώνο φωτεινών ακτίνων επάνω σε κάθε σημείο του παρασκευάσματος</p>
<p>antikeimeno</p> <p>2θ</p> <p>ΦΩΣ</p>	<p>Υπολογίζεται βάσει του τύπου:</p> $\Delta.I. = 0,61 \lambda / n \eta \mu \tau \theta$ <p>όπου:</p> <p>θ = το μισό της γωνίας του κώνου των ακτίνων που συλλέγονται από τον αντικειμενικό φακό από ένα τυπικό σημείο στο παρασκεύασμα</p> <p>n = ο συντελεστής διάθλασης του υλικού που διαχωρίζει το παρασκεύασμα από τον αντικειμενικό και τον συμπυκνωτικό φακό (συνήθως αέρας ή λάδι)</p> <p>λ = το μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου φωτός (για το κοινό φως η συνηθισμένη τιμή είναι 0,53 μm)</p>

Εικ. 4- Διακριτικά χαρακτηριστικά του οπτικού μικροσκοπίου.

Τα βασικά μέρη του οπτικού μικροσκοπίου είναι τα ακόλουθα (Εικ. 5):

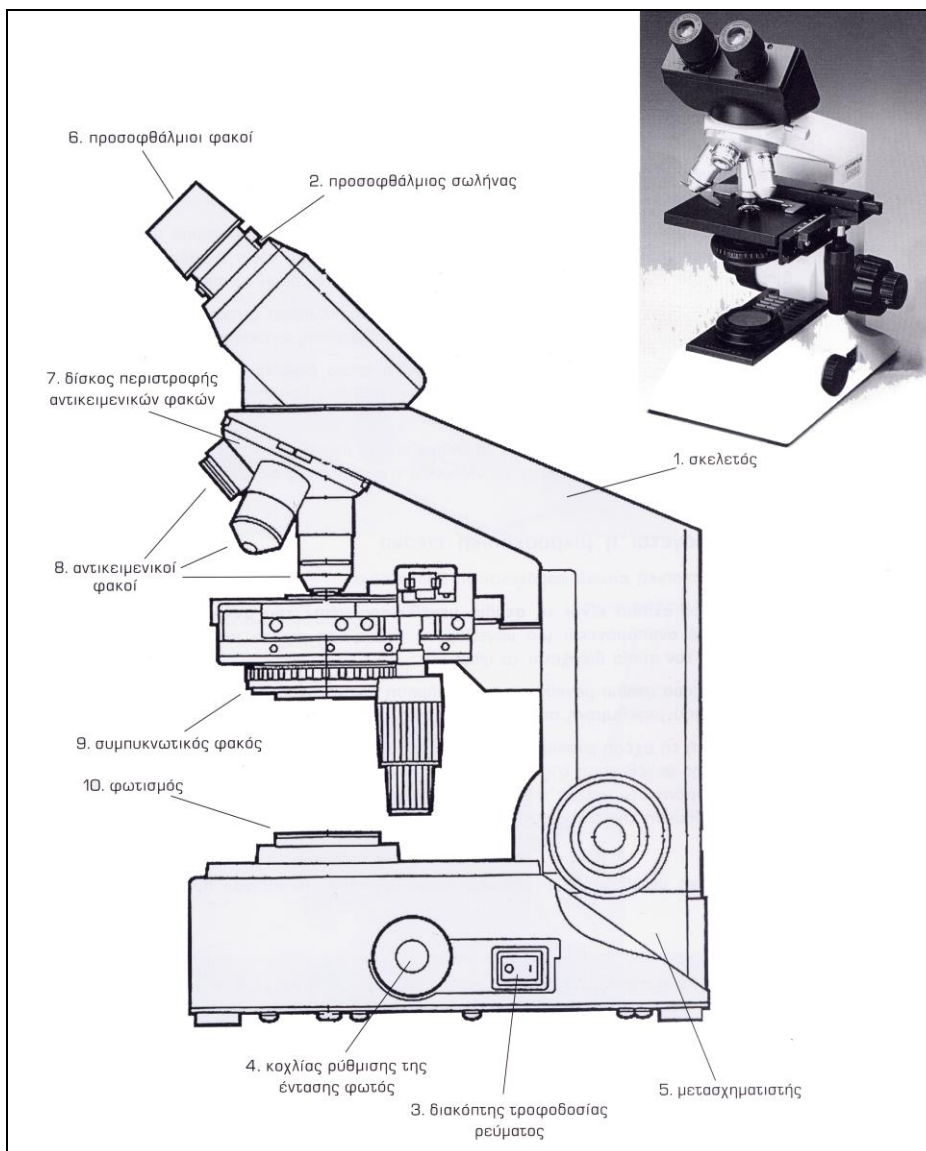
1. **Σκελετός.** Είναι το κεντρικό τμήμα πάνω στο οποίο συναρμολογούνται όλα τα μηχανικά και οπτικά συστήματα του μικροσκοπίου.
2. **Προσοφθάλμιος σωλήνας.** Μέσω του σωλήνα αυτού γίνεται η μικροσκοπική παρατήρηση, καθώς πάνω του προσαρμόζονται οι προσοφθάλμιοι φακοί.
3. **Διακόπτης τροφοδοσίας ρεύματος.** Μέσω αυτού ανάβουμε ή σβήνουμε τη λυχνία.
4. **Κοχλίας ρύθμισης της έντασης του φωτός.** Μας επιτρέπει να ρυθμίζουμε την ένταση του φωτός σε επιθυμητά επίπεδα.
5. **Μετασχηματιστής.** Ελαττώνει την τάση του παρεχόμενου ρεύματος στο επίπεδο που είναι απαραίτητο για τη λειτουργία της λυχνίας χαμηλού δυναμικού (6 Volt).
6. **Προσοφθάλμιοι φακοί.** Είναι οι φακοί που, σε συνδυασμό με τον αντικειμενικό φακό, παράγουν την τελική μεγέθυνση του ειδώλου του αντικειμένου. Οι πιο συνηθισμένες τιμές μεγέθυνσης των προσοφθάλμιων φακών είναι 10x και 20x.
7. **Δίσκος περιστροφής των αντικειμενικών φακών.** Διαθέτει υποδοχές για την τοποθέτηση μιας σειράς αντικειμενικών φακών διαβαθμισμένης μεγέθυνσης. Ο δίσκος περιστρέφεται και «κλειδώνει» κάθε φορά που ένας αντικειμενικός φακός έχει τοποθετηθεί ακριβώς στη σωστή θέση σε συστοιχία με το υπόλοιπο σύστημα, για να πραγματοποιηθεί η παρατήρηση.
8. **Αντικειμενικοί φακοί.** Είναι ο πρώτος φακός που δημιουργεί είδωλο του αντικειμένου σε μεγέθυνση. Οι συνηθισμένες τιμές μεγέθυνσης των αντικειμενικών φακών είναι 4x, 10x, 20x και 100x. Ο τελευταίος πετυχαίνει μεγέθυνση 1000:1 και χρησιμοποιείται **ΜΟΝΟ** με τη βοήθεια ειδικού καταδυτικού λαδιού, το οποίο μπαίνει ανάμεσα στο προς παρατήρηση αντικείμενο και τον αντικειμενικό φακό. Με το λάδι αυτό αυξάνεται ο δείκτης διάθλασης μεταξύ αντικειμένου και φακού, περιορίζεται η εκτροπή των φωτεινών ακτίνων και τελικά επιτυγχάνεται καλύτερη Δ.Ι. του φακού.
9. **Συμπυκνωτικός φακός.** Συγκεντρώνει τη φωτεινή δέσμη και φωτίζει ομοιόμορφα το παρασκεύασμα.
10. **Πηγή φωτός-λυχνία.** Η πηγή φωτός βρίσκεται ενσωματωμένη στη βάση του σκελετού του μικροσκοπίου και μπορεί να μεταβάλλει την έντασή της με τη βοήθεια του κοχλίας ρύθμισης (4).

Πώς παράγεται η μικροσκοπική εικόνα

Η μικροσκοπική εικόνα παράγεται σε δύο στάδια: στο πρώτο στάδιο, ο αντικειμενικός φακός δημιουργεί **ανεστραμμένο είδωλο του αντικειμένου** και στη μεγέθυνση που αναγράφεται πάνω του, ενώ αυτό το είδωλο αναπαράγεται στη συνέχεια από τον αμφιβληστροειδή του παρατηρητή, επιπλέον μεγεθυμένο από τους προσοφθάλμιους φακούς. Έτσι η συνολική μεγέθυνση που προκύπτει στην εικόνα του αντικειμένου είναι το γινόμενο της μεγέθυνσης που δημιουργεί το σετ των δύο φακών, αντικειμενικού και προσοφθάλμιων.

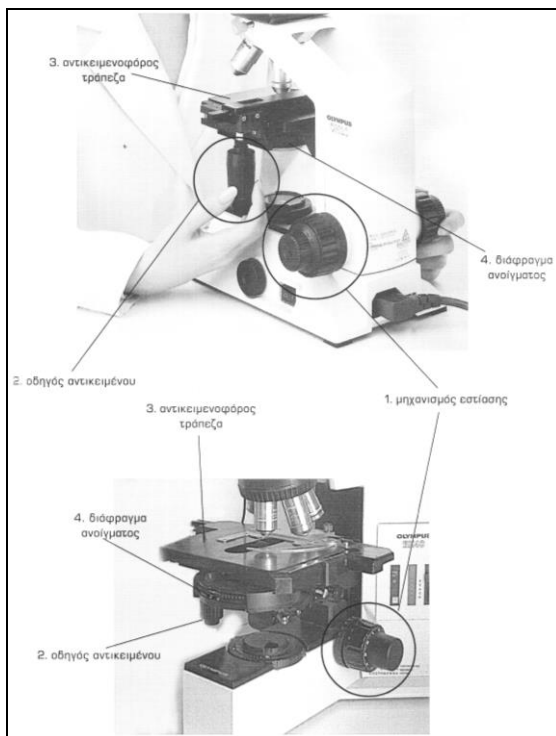
Τα μέρη του μικροσκοπίου που σχετίζονται με την εστίαση του αντικειμένου είναι τα εξής (Εικ. 6):

1. **Μηχανισμός εστίασης.** Οι δύο διπλοί κοχλίες που βρίσκονται εκατέρωθεν του σκελετού κάνουν ακριβώς το ίδιο πράγμα και εξυπηρετούν στο χειρισμό, ανάλογα με το χέρι που είναι ελεύθερο να εκτελέσει την κίνηση. Με την περιστροφή του κοχλίας αυτού η τράπεζα (3) ανεβοκατεβαίνει αλλάζοντας έτσι την καθαρότητα της μικροσκοπικής εικόνας. Κάθε κοχλίας χωρίζεται σε δύο, ένα μεγαλύτερο που επιτυγχάνει πιο απότομες αλλαγές στην εστίαση, και ένα μικρότερο ο οποίος βοηθά στην επιπλέον ρύθμιση της τελικής εστίασης κάνοντας πολύ λεπτές αλλαγές, αφού το αντικείμενο έχει βασικά εστιαστεί από το μεγάλο κοχλίας.



Εικ. 5- Τα μέρη του οπτικού μικροσκοπίου.

- 2. Οδηγός αντικείμενου.** Με κυκλικές κινήσεις επιτρέπει την προοδευτική μετακίνηση του αντικείμενου στους άξονες x και y.
- 3. Αντικειμενοφόρος τράπεζα.** Είναι η θέση πάνω στην οποία τοποθετείται το παρασκεύασμα. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι σταθεροποίησης του παρασκευάσματος, αλλά συνήθως αυτή επιτυγχάνεται με δύο ελάσματα.
- 4. Διάφραγμα ανοίγματος/φίλτρα/συμπυκνωτής.** Έχει τη δυνατότητα να ανοίγει και να κλείνει κυκλικά, αυξομειώνοντας έτσι το άνοιγμα μέσα από το οποίο περνάει το φως και πέφτει στο αντικείμενο. Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζονται το βάθος πεδίου και η αντίθεση (contrast), ανάλογα με το πάχος του αντικείμενου και τους πιθανούς χρωματισμούς του. Στη θέση αυτή πολλά μικροσκόπια φέρουν επιπλέον **φίλτρα** που βοηθούν στην καλύτερη απόδοση και διάκριση της τελικής εικόνας. Επίσης στη θέση αυτή υπάρχει ο **συμπυκνωτής** που αποτελείται από σύστημα βοηθητικών φακών οι οποίοι εξασφαλίζουν τη ροή περισσότερων φωτεινών ακτίνων (ευρύτερος φωτεινός κώνος, πυκνότερη και πιο ευθυγραμμισμένη φωτεινή δέσμη) μέσα από το αντικείμενο.



Εικ. 6- Τα μέρη του οπτικού μικροσκοπίου που αφορούν στην εστίαση.

Άλλα μικροαντικείμενα που χρειάζονται κατά τη μικροσκοπία είναι τα ακόλουθα:

- **Παρασκευάσμα** ονομάζεται κάθε αντικείμενο που προορίζεται για μικροσκοπική παρατήρηση. Η ποσότητα ή το μέγεθος του αντικειμένου αυτού πρέπει να είναι μικρά (π.χ. λεπτές τομές, μικροποσότητες υλικών ή αραιώσεις κυτταρικών διαλυμάτων) ώστε να μπορεί να επιτευχθεί η παρατήρηση. Η παρατήρηση μπορεί να γίνεται άμεσα ή να απαιτεί επιπλέον κατεργασία, ανάλογα με τις ιδιότητες του προς παρατήρηση υλικού και τις ανάγκες του παρατηρητή. Έτσι μπορεί να απαιτείται νέκρωση και στερέωση ή και χρώση του υλικού για την ευκρινή παρατήρηση των υπομονάδων του. Στην πρώτη περίπτωση της μη επέμβασης στα υλικά, μιλάμε για **προσωρινά** παρασκευάσματα, ενώ στη δεύτερη για **ημιμόνιμα** (πρόχειρη κατεργασία) ή **μόνιμα**, τα οποία χρειάζονται ειδικές τεχνικές κατεργασίας που εξασφαλίζουν τη μεγαλύτερη διάρκεια διατήρησης του παρασκευάσματος.
- **Αντικειμενοφόροι πλάκες** είναι γυάλινα πλακίδια μεγέθους συνήθως 27x75mm, πάνω στα οποία τοποθετείται το παρασκευάσμα.
- **Καλυπτρίδες** είναι μικρά τετράγωνα γυάλινα πλακίδια με λεπτότατο πάχος (0,15-0,22 mm) που χρησιμεύουν για την κάλυψη του παρασκευάσματος πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα ώστε να εξασφαλίζεται η σχετική σταθεροποίησή του, η ομοιόμορφη κατανομή του διάμεσου υγρού και η προστασία των αντικειμενικών φακών.
- **Βελόνη / Λαβίδα** είναι μικροόργανα χειρισμού του προς παρατήρηση υλικού για τεμαχισμό, πιάσιμο, μεταφορά και τοποθέτηση.
- **Λεπίδες** αποστειρωμένες ή μη εξασφαλίζουν κατάλληλες λεπτές τομές σε ιστούς ή άλλα υλικά παρατήρησης.
- **Φιαλίδιο νερού.** Το νερό είναι το πιο συνηθισμένο μέσο εμβάπτισης του προς παρατήρηση υλικού. Συνήθως μία σταγόνα αρκεί για να αραιωθεί το δείγμα (αν πρόκειται για κύτταρα), ή για να αποκτήσει ομοιόμορφη εικόνα και να μην ξηραίνεται (αν πρόκειται για ιστούς).
- **Σιφώνι (ή πιπέτα)** είναι τα έμβολα που χρησιμεύουν για τη λήψη μικροποσότητας νερού ή άλλων εργαστηριακών υγρών.

ΓΕΝΙΚΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΡΘΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ

- Ανοίξτε το διακόπτη του μικροσκοπίου.
- Κατεβάστε την τράπεζα στην κατώτατη θέση και γυρίστε το δίσκο ώστε να βρίσκεστε στο μικρότερο αντικειμενικό φακό. Τοποθετήστε και σταθεροποιήστε την αντικειμενοφόρο πλάκα στην τράπεζα με τη βοήθεια των ελασμάτων ή του κάθετου οδηγού αντικειμένου ώστε το παρασκεύασμα να βρεθεί στο κέντρο και κάτω από τον αντικειμενικό φακό.
- Ρυθμίστε τους προσοφθάλμιους σωλήνες με τα δυο σας χέρια ώστε το άνοιγμα μεταξύ των φακών να αντιστοιχεί στο άνοιγμα των ματιών σας. Σαν τελικό αποτέλεσμα θα πρέπει η διπλή εικόνα που παίρνετε από τους προσοφθάλμιους να γίνει μία.
- Το μικροσκόπιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί άνετα από άτομα που φορούν γυαλιά. Είναι στην ευχέρεια του παρατηρητή αν θα προτιμήσει να τα φοράει ή όχι.
- **ΠΡΟΣΟΧΗ:** για την αρχική παρατήρηση χρησιμοποιήστε πάντα τη μικρότερη μεγέθυνση η οποία εξασφαλίζει το μεγαλύτερο οπτικό πεδίο στο παρασκεύασμα κι έτσι διευκολύνεται ο εντοπισμός του δείγματος στο σημείο που ενδιαφέρει περισσότερο και η εστίασή του. Πάντοτε περνάτε από τον μικρότερης στον μεγαλύτερης μεγέθυνσης φακό.
- Ρυθμίστε τη φωτεινότητα της λυχνίας, αν το αντικείμενο σας φαίνεται υπο- ή υπερφωτισμένο.
- Ελέγξτε ότι το διάφραγμα είναι εντελώς ανοιχτό και ο συμπυκνωτικός φακός στο ψηλότερο δυνατό σημείο του.
- Εστιάστε με τη βοήθεια του κοχλία εστίασης και μετακινήστε την τράπεζα δεξιά-αριστερά μέχρι να βρείτε το πιο ενδιαφέρον και καθαρό σημείο στο δείγμα σας. Μπορείτε να αυξήσετε την ευκρίνεια με τη βοήθεια του μικρομετρικού κοχλία.
- Διατηρείτε πρωτόκολλο εργασίας με όλα τα στοιχεία αρχικής επεξεργασίας του δείγματος και τη διαδικασία παρατήρησης. Σε αυτό συμπεριλαμβάνεται και η σχεδίαση της μικροσκοπικής εικόνας, η οποία δεν έχει αξιώσεις καλλιτεχνικού σχεδίου, πρέπει ωστόσο να απεικονίζει με ακρίβεια τις λεπτομέρειες της εικόνας παρατήρησης και τα σημεία που απαιτεί η άσκηση να εντοπιστούν, καθώς και να διατηρεί τις αναλογίες των δομών. Είναι καλό να ξεκινήσετε με τον μικρότερο φακό με τον οποίο έχετε καλύτερη αντίληψη της συνολικής εικόνας, και στη συνέχεια να αποδώσετε περισσότερες λεπτομέρειες, όπως αυτές προκύπτουν από τις μεγαλύτερες μεγεθύνσεις. Θυμηθείτε να φτιάχνετε ευμεγέθη σχέδια: είναι πιο εύκολο να βάλετε μέσα σε αυτά περισσότερες και ευκρινέστερες λεπτομέρειες.

Τα ΜΗ στη μικροσκοπία

MHN ξεβιδώνετε και απομακρύνετε τους φακούς

MHN αγγίζετε τους φακούς ή το παρασκεύασμα στην περιοχή παρατήρησης με τα δάχτυλά σας

MHN μετακινείτε το μικροσκόπιο για να δείξετε κάτι στο διπλανό σας, απλά παραχωρήστε τη θέση σας

MHN ξεκινάτε ποτέ την τοποθέτηση του δείγματος, αν δεν έχετε βεβαιωθεί ότι η τράπεζα είναι κατεβασμένη και ο δίσκος γυρισμένος στον μικρότερο αντικειμενικό φακό

MHN χρησιμοποιείτε τον αντικειμενικό φακό 100x χωρίς τη χρήση καταδυτικού λαδιού

MHN αφήνετε τη λυχνία ανοιχτή και το μικροσκόπιο ξεσκέπαστο μετά το τέλος της παρατήρησης

MHN βγάζετε το δείγμα, εάν πρώτα δεν έχετε κατεβάσει την τράπεζα στο κατώτατο σημείο ώστε να αποφύγετε να αγγίξετε τους αντικειμενικούς φακούς. Γενικά οι αντικειμενικοί φακοί δεν πρέπει να έρχονται ποτέ σε άμεση επαφή με το παρασκεύασμα

Εργαστήριο 1^ο ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1. Παρατήρηση έτοιμων παρασκευασμάτων κρυστάλλων NaCl

- (1) Τοποθετούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα που μας δίνεται στην τράπεζα του μικροσκοπίου, αφού πρώτα βεβαιωθούμε ότι βρίσκεται στο χαμηλότερο σημείο και ο αντικειμενικός φακός είναι αυτός με τη μικρότερη μεγέθυνση (x4).
 - (2) Προσαρμόζουμε τα μάτια μας στους προσοφθάλμιους φακούς και ανεβάζουμε την τράπεζα με τη βοήθεια του πλευρικού κοχλία εστίασης μέχρι να φτάσουμε σε ένα ευδιάκριτο σημείο.
 - (3) Μετατοπίζουμε το πλαίσιο παρατήρησης προκειμένου να βρούμε το σημείο του παρασκευάσματος που μας ενδιαφέρει ή να εντοπίσουμε διαφορετικές θέσεις παρατήρησης.
 - (4) Για πιο εστιασμένη παρατήρηση, αλλάζουμε σε αντικειμενικό φακό μεγαλύτερης μεγέθυνσης ΧΩΡΙΣ να κατεβάσουμε την τράπεζα
 - (5) Αναπροσαρμόζουμε την εστίαση με τη βοήθεια του μεγάλου και του μικρού κοχλία εστίασης.
- ΠΡΟΣΟΧΗ: αφού ολοκληρώσουμε την παρατήρησή μας, ΚΑΤΕΒΑΖΟΥΜΕ την τράπεζα και αφαιρούμε προσεκτικά την αντικειμενοφόρο πλάκα.

2. Παρατήρηση φυτικών κυττάρων

A. Κύτταρα κρεμμυδιού

- (1) Σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα βάζουμε μια σταγόνα μπλε του μεθυλενίου ή Iugol.
- (2) Κόβουμε το βολβό ενός κρεμμυδιού και αφαιρούμε έναν εσωτερικό χιτώνα. Στην εσωτερική πλευρά, χαράζουμε ένα πολύ μικρό τετραγωνάκι με ένα κοφτερό ξυραφάκι. Αφαιρούμε με λαβίδα τη λεπτή μεμβράνη.
- (3) Τοποθετούμε το κομμάτι που αφαιρέσαμε στη σταγόνα της αντικειμενοφόρου πλάκας.
- (4) «Στρώνουμε» το παρασκεύασμα στη σταγόνα (με τη βοήθεια ανατομικής βελόνας), προσέχοντας να μη διπλώσει η μεμβράνη.
- (5) Τοποθετούμε την καλυπτρίδα υπό γωνία, σύροντάς την στο παρασκεύασμα, με τρόπο ώστε να μην δημιουργούνται φυσαλίδες αέρα που θα δυσκολέψουν την παρατήρηση.
- (6) Παρατήρηση στο μικροσκόπιο: Τοποθετούμε το παρασκεύασμα στην τράπεζα και το στερεώνουμε. Παρατηρούμε όπως προαναφέραμε.

B. Αμυλόκοκκοι πατάτας

- (1) Σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα προσθέτουμε 1 σταγόνα κυανό του μεθυλενίου.
- (2) Δημιουργούμε μια πολύ λεπτή τομή σε μια πατάτα. Τοποθετούμε το υλικό στην αντικειμενοφόρο.
- (3) Τοποθετούμε την καλυπτρίδα υπό γωνία, σύροντάς την στο παρασκεύασμα. Παρατηρούμε όπως προαναφέραμε.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 2^ο - ΧΡΩΣΕΙΣ

Οι ζωντανοί ιστοί, λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς τους σε νερό είναι σχεδόν άορατοι στο οπτικό μικροσκόπιο. Τα περισσότερα κύτταρα και κυτταρικές δομές είναι επίσης άχρωμα και αδιαφανή. Αχρωμία σημαίνει ότι τα μόρια που τα αποτελούν δεν απορροφούν σε κανένα μήκος κύματος του ορατού φωτός. Εξαιρέση σε αυτό αποτελούν τα ερυθροκύτταρα, τα μελανοκύτταρα ή φυτικά κύτταρα που περιέχουν κυστίδια με χρωστικές και δίνουν το χρώμα των φύλλων, των πετάλων κλπ. Κατά συνέπεια η παρατήρηση των περισσότερων κυττάρων, ακόμα και με τα πιο προηγμένα μικροσκόπια, είναι αδύνατη. Λύση στο πρόβλημα αυτό δίνουν ο ανοσοφθορισμός ή άλλες μορφές μικροσκοπίας, καθώς και οι διάφορες τεχνικές χρώσης, απομόνωσης, διαχωρισμού και συντήρησης των κυτταρικών δομών που προορίζονται για μικροσκοπική παρατήρηση.

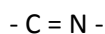
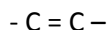
Η χημική ανίχνευση υποκυτταρικών στοιχείων και βιολογικών μακρομορίων μέσα στους ιστούς και στα κύτταρα επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των αρχών και μεθόδων της **ιστοχημείας** και **κυτταροχημείας** αντίστοιχα. Με τη βοήθεια αυτών των δύο κλάδων μπορούμε αφενός να κατανοήσουμε καλύτερα τη σχέση δομής και λειτουργίας σε ιστούς και κύτταρα και αφετέρου να προχωρήσουμε στον ακριβέστερο εντοπισμό βιολογικών μακρομορίων, κάτι που δεν είναι εφικτό με άλλες τεχνικές.

Οι μέθοδοι ιστοχημείας και κυτταροχημείας στηρίζονται στη βασική ιδέα δημιουργίας χημικών δεσμών μεταξύ ενδοκυτταρικών μορίων ή δομών με χρωματιστές ουσίες, που σαν τελικό προϊόν έχει ένα αδιάλυτο χρωματιστό ίζημα ή σύμπλοκο. Προϋποθέσεις για να επιλεγεί μία διαδικασία χρώσης είναι οι ακόλουθες:

1. Να υπάρχει **εξειδίκευση στόχου**, δηλαδή η αντίδραση να γίνεται μόνο μεταξύ της χρωστικής και της συγκεκριμένης χημικής ομάδας/μορίου που μελετώνται.
2. Να υπάρχει **ευαισθησία** στην πειραματική διαδικασία και τις τεχνικές εφαρμογές, ώστε οι χρωστικές να μπορούν να προσδένονται και να ανιχνεύουν ακόμα και μικροποσότητες των ομάδων – στόχων.
3. Μέσα από την πειραματική διαδικασία χρώσης, **να διατηρείται η δομική ακεραιότητα** του ιστού και των κυττάρων.
4. Η όλη διαδικασία να συνοδεύεται από ένα παράλληλο **πείραμα ελέγχου (control)** με τη χρήση θετικών ή/και αρνητικών μαρτύρων. Ο **θετικός** μάρτυρας μας βοηθάει να κρίνουμε ότι η όλη τεχνική επεξεργασία έγινε σωστά και επομένως ο τυχόν μη χρωματισμός του δείγματός μας οφείλεται στην πραγματική απουσία του προς ανίχνευση μορίου και όχι σε κάποιο λάθος χειρισμό. Επίσης, ο **αρνητικός** μάρτυρας μας βοηθά να εντοπίσουμε τυχόν επιμολύνσεις στην όλη διαδικασία ή πιθανές λανθασμένες εφαρμογές στην περίπτωση που δώσει χρώση ή να βεβαιωθούμε ότι ο τυχόν χρωματισμός του δείγματός μας είναι αξιόπιστος.

Οι **κυτταροχημικές εργαστηριακές χρωστικές** είναι συνήθως ιονισμένες αρωματικές οργανικές ενώσεις. Ο ενώσεις αυτές έχουν χρώμα γιατί περιέχουν στο μόριό τους δύο βασικές χαρακτηριστικές ομάδες:

1. **Χρωμοφόρα**, που αποτελούνται από ένα συζυγιακό σύστημα διπλών δεσμών και απορροφούν φως από το ορατό φάσμα. Όταν εισέρχονται σε μια ένωση προκαλούν βαθύχρωμία, μετατόπιση δηλαδή του μέγιστου μήκους κύματος απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη. Ορισμένες φορές ένα τέτοιο χρωμοφόρο αρκεί για να καταστήσει μία ένωση χρωματισμένη, ενώ άλλες φορές απαιτούνται περισσότερα του ενός χρωμοφόρα. Συνηθισμένοι δεσμοί που βρίσκονται στα χρωμοφόρα είναι:



- C = O -

- N = N -

- NO₂

2. **Αυξόχρωμες ομάδες**, που αντιδρούν και ενώνονται με τις χημικές ουσίες του κυττάρου, ενώ ταυτόχρονα λειτουργούν και ως παράγοντες διαλυτοποίησης για τη χρωστική που χρησιμοποιείται. Οι αυξόχρωμες ενώσεις προκαλούν αύξηση στην ένταση της απορρόφησης (άρα και πιο έντονο χρώμα), ενισχύοντας την πολικότητα της χρωστικής με το θετικό ή αρνητικό τους φορτίο. Αυξόχρωμες ομάδες είναι οι:

- NH₃

- COOH

- HSO₃

- OH

Ένας μεγάλος αριθμός αντιδράσεων μεταξύ χρωστικών και κυτταρικών συστατικών – στόχων είναι ηλεκτροστατικής φύσεως. Επομένως, ένα θετικό φορτίο πάνω σε ένα κυτταρικό στοιχείο έλκει μία αρνητικά φορτισμένη χρωστική και αντίστροφα. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες μπορούν να χρωματιστούν τόσο με όξινες όσο και με βασικές χρωστικές, ενώ τα νουκλεϊκά οξέα χρωματίζονται μόνο με βασικές χρωστικές λόγω του πολύ χαμηλού ισοηλεκτρικού τους σημείου¹ (pI=2). Έτσι τις χρωστικές τις διακρίνουμε σε τρεις κατηγορίες:

1. **Βασικές ή κατιονικές**
2. **Όξινες ή ανιονικές**
3. **Ουδέτερες**

Παραδείγματα βασικών χρωστικών είναι το κυανόχρωμο του μεθυλενίου, το πορτοκαλόχρωμο της ακριδίνης, το κρυσταλλικό ιώδες και η βασική φουξίνη. Παραδείγματα όξινων χρωστικών είναι το κυανόχρωμο της ανιλίνης, η εωσίνη, η φλουορεσκεΐνη και η ερυθροσίνη.

Οι αντιδράσεις χρώσης των κατιονικών και ανιονικών χρωστικών δεν είναι ειδικές. Ο τρόπος που βάφεται ένας ιστός από μία ορισμένη χρωστική εξαρτάται από τον τρόπο μονιμοποίησης και έγκλεισής του (βλέπε παρακάτω). Η ένταση της χρώσης εξαρτάται από το pH του διαλύματος. Επίσης, όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός διάστασης με σύγχρονη απελευθέρωση κατιόντων (σε χαμηλό pH) ή ανιόντων (σε υψηλό pH), τόσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της χρωστικής που δεσμεύεται στα υποκυτταρικά συστατικά.

Τα υποκυτταρικά συστατικά, λόγω των ποικίλων ισοηλεκτρικών τους σημείων, αντιδρούν διαφορετικά στις διάφορες χρωστικές, με αποτέλεσμα να βάφονται με διαφορετικά χρώματα. Το φαινόμενο κατά το οποίο μία χρωστική μπορεί να βάψει με διαφορετικό χρώμα διάφορα υποκυτταρικά συστατικά ονομάζεται **μεταχρωμία** και οι αντίστοιχες χρωστικές **μεταχρωματικές**. Από την άλλη, χρωστικές που βάφουν τα διάφορα υποκυτταρικά συστατικά με το ίδιο χρώμα, και μάλιστα το ίδιο χρώμα που έχουν και αυτές, ονομάζονται **ορθοχρωματικές**.

Ιστολογικές και κυτταροχημικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται εκτεταμένα για διαγνωστικούς σκοπούς εκμεταλλευόμενες τις διαφορές στην κατανομή των διαφόρων βιολογικών μακρομορίων σε κύτταρα και ιστούς ανάμεσα στα φυσιολογικά και παθολογικά παρασκευάσματα.

¹ Ισοηλεκτρικό σημείο (pI) ενός μορίου ονομάζεται το pH εκείνο στο οποίο το μόριο παύει να έχει φορτίο. Σε μεγαλύτερης οξύτητας διαλύματα, το μόριο εμφανίζεται ως θετικά φορτισμένο, ενώ σε μικρότερης οξύτητας διαλύματα, το μόριο εμφανίζεται ως αρνητικά φορτισμένο. Το ισοηλεκτρικό σημείο επηρεάζει επίσης τη διαλυτότητα του μορίου. Σε pH ίσο με το ισοηλεκτρικό σημείο, η διαλυτότητα του μορίου γίνεται ελάχιστη και το μόριο μπορεί να διαχωρίζεται από το διάλυμα και να καθιζάνει.

Δημιουργία μόνιμων παρασκευασμάτων. Παλιότερα για τη μονιμοποίηση ιστών χρησιμοποιούνταν συχνά οξέα και οργανικοί διαλύτες, όπως αλκοόλη. Σήμερα η διαδικασία περιλαμβάνει συνήθως επεξεργασία με αλδεΐδες (κυρίως φορμαλδεΐδη και γλουταραλδεΐδη) οι οποίες σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με τις ελεύθερες αμινικές ομάδες των πρωτεϊνών, ακινητοποιώντας έτσι τα μόρια που συνδέονται με αυτές, άρα και τα διάφορα μέρη των ιστών. Η διαδικασία παρασκευής μόνιμων δειγμάτων περιλαμβάνει σε γενικές γραμμές τα ακόλουθα βήματα:

1. **Μονιμοποίηση του ιστού.** Με τη διαδικασία αυτή σταθεροποιούνται οι πρωτεΐνες και διατηρείται η κυτταρική δομή, ενώ ταυτόχρονα προετοιμάζεται το δείγμα για να δεχτεί τη χρώση. Το είδος του μονιμοποιητικού που χρησιμοποιείται διαφέρει ανάλογα με το βιολογικό μακρομόριο που ανιχνεύεται και με την τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια.
2. **Έγκλειση του ιστού.** Με τη διαδικασία αυτή αυξάνεται η σκληρότητα του ιστού και μπορούν έτσι να κοπούν λεπτές τομές. Αρχικά αφαιρείται η περίσσεια νερού που περιέχεται στον ιστό με αιθανόλη. Για παρατήρηση του ιστού σε οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιούνται συνήθως **παραφίνη** ή **ζελατίνη**, ενώ για παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χρησιμοποιούνται **εποξειδικές ρητίνες**. Στη συνέχεια ο ιστός στερεοποιείται με ψύξη ή πολυμερισμό. Επειδή κατά τη διαδικασία της έγκλεισης υπάρχει κίνδυνος να αλλοιωθούν οι κυτταρικές δομές, εναλλακτικά είναι δυνατό το δείγμα να στερεοποιείται με ταχεία κατάψυξη. Μειονέκτημα αυτής της εναλλακτικής μεθόδου είναι η διάρρηξη των κυττάρων λόγω δημιουργίας κρυστάλλων πάγου.
3. **Λήψη λεπτών τομών.** Τα περισσότερα δείγματα ιστών είναι πολύ παχιά για να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο. Για το λόγο αυτό πρέπει να λαμβάνονται λεπτές τομές. Όταν η παρατήρηση γίνεται με οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιούνται μικροτόμοι, ενώ για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χρησιμοποιούνται υπερμικροτόμοι.
4. **Χρώση.** Με βάση τα στοιχεία που αναλύθηκαν παραπάνω επιλέγονται οι κατάλληλοι συνδυασμοί χρωστικών προκειμένου να μπορεί να γίνει η παρατήρηση του παρασκευάσματος.
5. **Καθήλωση των τομών.** Με τη διαδικασία αυτή οι τομές τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Για τη σταθεροποίησή τους χρησιμοποιούνται κολλώδεις ουσίες οι οποίες έχουν τον ίδιο δείκτη διάθλασης με το γυαλί (π.χ. βάλαμο του Καναδά) και έτσι τελικά τα παρασκευάσματα γίνονται μόνιμα πάνω στην αντικειμενοφόρο.

Ο χρωματισμός ενός παρασκευάσματος έχει το μειονέκτημα ότι τα κύτταρα νεκρώνονται μετά από τη διαδικασία της μονιμοποίησης και της χρώσης. Μία ενδιαμέση μέθοδος ανάμεσα στην παρατήρηση σε άχρωμο νωπό υλικό και σε μονιμοποιημένο έγχρωμο παρασκεύασμα, είναι η παρατήρηση με **έμβιες ή ζωτικές (vital) χρωστικές**. Τα κύτταρα σε αυτή την περίπτωση παραμένουν ζωντανά και, ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των χρωστικών, προκύπτει διαφορετικός χρωματισμός των υποκυτταρικών στοιχείων. Για παράδειγμα, η χρωστική ουδέτερο του ερυθρού χρωματίζει το κυτταρόπλασμα, ενώ τα μιτοχόνδρια χρωματίζονται από μια πράσινη χρωστική.

Εργαστήριο 2^ο – ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1. Προετοιμασία και παρατήρηση μόνιμου παρασκευάσματος επιθηλιακού ιστού της γλώσσας μας και φυσιολογικής χλωρίδας του σάλιου (βακτήρια) με χρώση Giemsa 1%.

- (1)** Γράφουμε με μολύβι το όνομά μας σε μια καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα
- (2)** Με μια καθαρή καλυπτρίδα παίρνουμε επίχρισμα κυττάρων από το στοματικό βλεννογόνο σύροντας την ακμή της καλυπτρίδας στη γλώσσα μας.
- (3)** Τοποθετούμε το επίχρισμα στην αντικειμενοφόρο πλάκα και το απλώνουμε ομοιόμορφα.
- (4)** Κρατώντας την αντικειμενοφόρο με τη βοήθεια μιας λαβίδας από την άκρη της, την περνάμε από φλόγα με γρήγορες κινήσεις μέχρι να στεγνώσει τελείως το νερό και να μονιμοποιηθεί το παρασκεύασμα.
- (5)** Εμβαπτίζουμε το δείγμα σε διάλυμα χρωστικής Giemsa 1% για 5 λεπτά.
- (6)** Ξεπλένουμε την περίσσεια χρωστικής κάτω από τη βρύση για περίπου 10 δευτερόλεπτα
- (7)** Παρατηρούμε τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο σάλιο μας και κατά τόπους επιθηλιακά κύτταρα της γλώσσας. Τα βακτήρια που φυσιολογικά υπάρχουν στο βλεννογόνο της γλώσσας και περιμένουμε να παρατηρήσουμε είναι μονόκοκκα, δίκοκκα, βάκιλλοι, στρεπτόκοκκος και ενίοτε σταφυλόκοκκος.

2. Παρατήρηση υφών από διάφορους μύκητες (μούχλες)

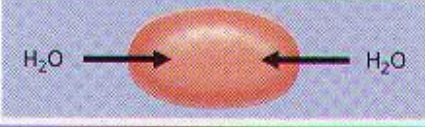
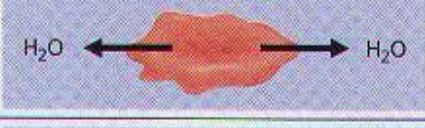
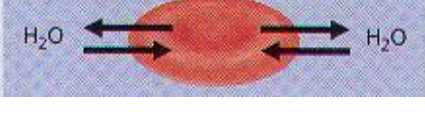
- (1)** Τοποθετούμε δύο σταγόνες κυανού του μεθυλενίου με την πιπέτα πάνω σε μία αντικειμενοφόρο
- (2)** Παίρνουμε προσεκτικά μικρό δείγμα από τη μούχλα του πορτοκαλιού (*Penicillium* sp) και την τοποθετούμε στη μία σταγόνα της αντικειμενοφόρου
- (3)** Επαναλαμβάνουμε το ίδιο με τη μούχλα του καφέ (*Rhizopus* sp)
- (4)** Τοποθετούμε καλυπτρίδες υπό γωνία, σύροντάς τες στα δύο παρασκευάσματα.
- (5)** Παρατηρούμε όπως προαναφέραμε.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 3^ο – ΠΛΑΣΜΟΛΥΣΗ-ΑΙΜΟΛΥΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Α. ΠΛΑΣΜΟΛΥΣΗ

Κάθε κύτταρο περιβάλλεται από την **κυτταρική μεμβράνη** που το χωρίζει από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Η κυτταρική μεμβράνη λειτουργεί ως **φραγμός διαπερατότητας** που επιτρέπει στο κυτταρόπλασμα να διατηρεί σύσταση διαφορετική από εκείνη του εξωκυττάριου υγρού. Τα περισσότερα μόρια που απαντούν σε έμβια συστήματα παρουσιάζουν υψηλή διαλυτότητα στο νερό και χαμηλή σε μη πολικούς διαλύτες με αποτέλεσμα οι βιολογικές μεμβράνες να συνιστούν εξαιρετικό φραγμό για τα περισσότερα υδατοδιαλυτά μόρια που υπάρχουν στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Η μεμβράνη αυτή χαρακτηρίζεται ως **ημιπερατή ή εκλεκτικά διαπερατή** διότι δεν αφήνει να περάσουν όλων των ειδών τα μόρια μέσα στο κύτταρο ή έξω από αυτό.

Το νερό μπορεί να εισέλθει ή να εξέλθει από ένα κύτταρο, ανάλογα με το οσμωτικό δυναμικό του περιβάλλοντός του. Το νερό θα εισέρχεται μέσα στο κύτταρο όταν αυτό βρίσκεται σε **υπότονο** διάλυμα (δηλαδή όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση μιας ουσίας είναι μεγαλύτερη από την εξωκυττάρια για να επέλθει ισορροπία, εισέρχεται νερό) και θα εξέρχεται από αυτό όταν βρίσκεται σε **υπέρτονο** διάλυμα (δηλαδή όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση μιας ουσίας είναι μικρότερη από την εξωκυττάρια εξέρχεται νερό) (**Εικ. 1**).

Condition	Net movement of water	
External solution is hypotonic to cytosol	into the cell	
External solution is hypertonic to cytosol	out of the cell	
External solution is isotonic to cytosol	none	

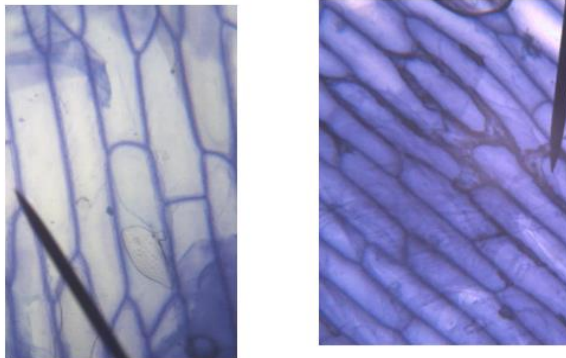
Εικ. 1- Η οσμωτική κατεύθυνση.

Το φαινόμενο της αφαίρεσης νερού από ένα ζωντανό ευκαρυωτικό κύτταρο, όταν αυτό εκτίθεται σε συνθήκες υπέρτονου περιβάλλοντος ονομάζεται **πλασμόλυση**. Κατά την πλασμόλυση παρατηρείται σμίκρυνση των χυμοτοπίων, συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος και αποκόλληση της κυτταρικής μεμβράνης από το κυτταρικό τοίχωμα. Το φαινόμενο της πλασμόλυσης οφείλεται στην εξαγωγή νερού από το κυτταρόπλασμα, που συνεπάγεται ελάττωση του κυτταρικού όγκου (Σχήμα 2). Αν τα κύτταρα που έχουν υποστεί πλασμόλυση τοποθετηθούν ξανά σε καθαρό νερό, παρατηρείται διόγκωση και επαναφορά του κυτταροπλάσματος, με αποτέλεσμα το κύτταρο να συμπληρώσει πάλι το χώρο που ορίζεται από το τοίχωμά του. Το αντιστρέψιμο αυτό φαινόμενο ονομάζεται **αποπλασμόλυση**.

Κατά τη διάρκεια της πλασμόλυσης, το κυτταρόπλασμα παίρνει ποικίλες μορφές, ανάλογα με την τιμή του ιξώδους του. Η κατάσταση στην οποία το κυτταρόπλασμα μόλις αρχίζει να αποκολλάται από το τοίχωμα, χαρακτηρίζεται ως **οριακή πλασμόλυση**. Ο χρόνος που απαιτείται για να αποκτήσει το κυτταρόπλασμα ενός κυττάρου μια πλήρη κυρτή μορφή (ένδειξη ολοκλήρωσης της πλασμόλυσης), αφού εμβαπτιστεί στο πλασμολυτικό διάλυμα, ονομάζεται χρόνος πλασμόλυσης.

Όταν ένα φυτικό κύτταρο βρεθεί σε νερό, το οποίο θεωρείται υποτονικό διάλυμα, ο όγκος του αυξάνεται και ταυτόχρονα πέφτει η οσμωτική του πίεση. Με τη διόγκωση όμως του κυττάρου, το τοίχωμά

του τεντώνεται πράγμα που συνεπάγεται μια ελαστική τάση της μεμβράνης που λέγεται **σπαργή** αντίθετης κατεύθυνσης προς την ωσμωτική πίεση. Η ώσμωση αναστέλλεται, όταν η ελαστική τάση των τοιχωμάτων του κυττάρου εξισορροπήσει την ωσμωτική πίεση. Το φαινόμενο αυτό της διόγκωσης του φυτικού κυττάρου ονομάζεται **σπάργωση** (Εικ. 2).

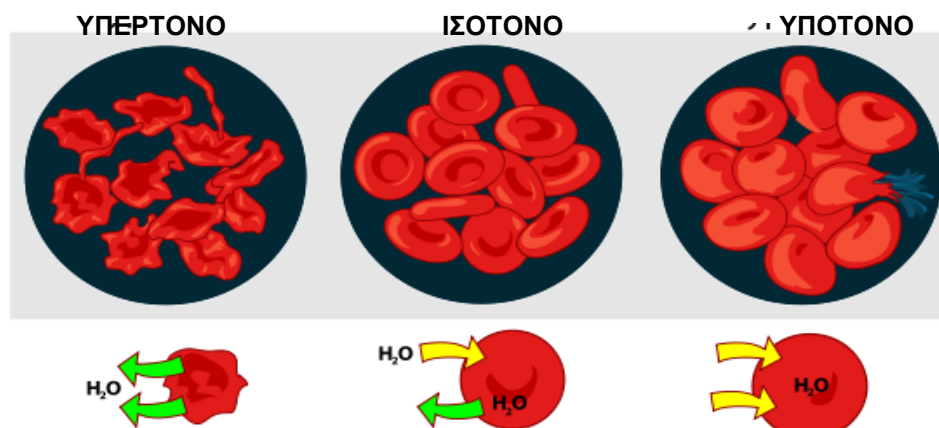


Εικ. 2- Σπάργωση και πλασμόλυση σε κύτταρα από κρεμμύδι.

B. ΑΙΜΟΛΥΣΗ

Η ρήξη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η οποία συνοδεύεται από έξοδο της αιμοσφαιρίνης μέσω των διαρρηγμένων κυτταρικών μεμβρανών τους είναι γνωστή σαν **αιμόλυση**. Το φαινόμενο της αιμόλυσης οφείλεται στην προσθήκη υγρού σε ένα ερυθροκύτταρο, όταν αυτό εκτίθεται σε συνθήκες υπότονου περιβάλλοντος (Σχήμα 3). Όταν τα ερυθροκύτταρα διογκωθούν κατά 1,4 περίπου φορές του αρχικού τους όγκου, κάποια από αυτά λύνονται (διαρρηγνύονται). Η αιμόλυση προκαλείται από πολλούς παράγοντες, που είτε καταστρέφουν τελείως είτε τραυματίζουν απλώς τις κυτταρικές μεμβράνες, είτε προκαλούν ωσμωτικές ανισορροπίες.

Τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούνται συχνά ως παράδειγμα για τις ωσμωτικές ιδιότητες των κυττάρων γιατί λαμβάνονται και μελετώνται εύκολα. Μέσα στα όρια ενός ορισμένου φάσματος συγκεντρώσεων ουσιών, διαλυμένων στο εξωκυττάριο υγρό, το ερυθροκύτταρο συμπεριφέρεται σαν ωσμόμετρο, καθώς ο όγκος του είναι αντιστρόφως ανάλογος προς την συγκέντρωση των ουσιών που είναι διαλυμένες στο εξωκυττάριο υγρό. Σε συγκέντρωση ίση με 154mM ο όγκος των κυττάρων είναι ίδιος με εκείνον που θα έχουν στο πλάσμα. Αυτή η συγκέντρωση NaCl καλείται ισοτονική ως προς το ερυθροκύτταρο. Ισοτονικά διαλύματα NaCl (γνωστά και ως ισοτονικός ορός) χρησιμοποιούνται για ενδοφλέβια χορήγηση υγρών ή φαρμάκων σε ασθενείς.



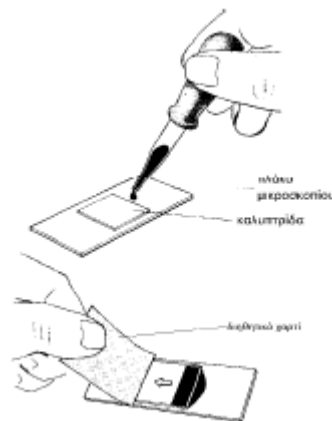
Εικ. 3- Ωσμωτική πίεση σε ερυθροκύτταρα.

Εργαστήριο 3^ο – ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1. Ξεκολλήστε την εσωτερική επιδερμίδα από ένα χιτώννα κρεμμυδιού με μια λαβίδα και κόψτε την σε κομμάτια.



2. Τοποθετήστε κάθε κομμάτι σε μια πλάκα μικροσκοπίου και τοποθετήστε μια σταγόνα από το αντίστοιχο διάλυμα (0,9% NaCl, 10% NaCl). Καλύψτε τα με καλυπτρίδα. Περιμένετε μερικά λεπτά και παρατηρήστε τα στο μικροσκόπιο.
3. Προσπαθήστε να υπολογίσετε το ποσοστό των πλασμουμένων κυττάρων σε κάθε διάλυμα.
4. Με τη βοήθεια ενός διηθητικού χαρτιού προσπαθήστε να αντικαταστήσετε το διάλυμα του NaCl με νερό. Καταγράψτε τις παρατηρήσεις σας.



ΑΙΜΟΛΥΣΗ

1. Σε πλάκες μικροσκοπίου τοποθετήστε δύο σταγόνες από: νερό, 0,9% NaCl, 10% NaCl.
2. Στάξτε μικρή ποσότητα αίματος στο καθένα από τα παραπάνω και καλύψτε με καλυπτρίδα.
3. Περιμένετε μερικά λεπτά.
4. Παρατηρήστε τα δείγματα σας στο μικροσκόπιο. Καταγράψτε τις παρατηρήσεις σας.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 4^ο – ΦΥΤΙΚΟΙ ΙΣΤΟΙ

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διακρίνονται από τα προκαρυωτικά, μεταξύ άλλων, και από το μεγαλύτερο μέγεθός τους, την παρουσία οργανιδίων, κυτταροσκελετού και πυρήνα, σε αντίθεση με τα προκαρυωτικά που δεν διαθέτουν τίποτε από αυτά. Ωστόσο τα οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων δεν είναι ευδιάκριτα στο οπτικό μικροσκόπιο με εξαίρεση τον πυρήνα και ορισμένα κενοτόπια που υπάρχουν στα φυτικά κύτταρα τα οποία μάλιστα φέρουν συχνά χρωστικές, οπότε ανιχνεύονται ακόμα και χωρίς την εφαρμογή κάποιας χρώσης. Έτσι γίνεται δυνατή η παρατήρησή τους χωρίς να είναι απαραίτητη η διαδικασία μονιμοποίησης και χρώσης.

Χαρακτηριστικές δομές των φυτικών οργανισμών είναι τα **στόματα** που υπάρχουν κατεχοχόν στην επιδερμίδα των φύλλων και διαμορφώνονται από τα καταφρακτικά κύτταρα. Επίσης σε εγκάρσιες τομές διαφόρων φυτικών τμημάτων (π.χ. βλαστού, φύλλων ή ρίζας) μπορεί να παρατηρήσει κανείς τη χαρακτηριστική διάταξη διαφόρων κυτταρικών ομάδων που συνιστούν ιστούς όπως το **ξύλωμα** και το **φλοίωμα** (αγωγό σύστημα). Κυτταρικοί τύποι του πρώτου είναι οι τραχεΐδες, τα αγγειακά στοιχεία (αγγεία), το παρέγχυμα και οι σκληρογχοματικές ίνες ενώ του δεύτερου είναι, εκτός από το παρέγχυμα και τις σκληρογχοματικές ίνες, τα ηθμώδη κύτταρα, οι ηθμοσωλήνες και τα σύνδρομα κύτταρα. Η περίμετρος του τρυφερού βλαστού ενός δικότυλου φυτού περιλαμβάνει συνδυασμούς των παραπάνω που λέγονται **ηθμαγγειώδεις δεσμίδες**, ενώ στο εσωτερικό του υπάρχει παρέγχυμα που λέγεται **εντερώνη**. Ηθμαγγειώδεις δεσμίδες βρίσκουμε επίσης σε εγκάρσιες τομές φύλλων, ενώ εκατέρωθεν αυτών παρατηρούμε διαφορετική διάταξη παρεγχοματικών κυττάρων που μπορούν κατά περίπτωση να αποτελούν το **δρυφακτοειδές παρέγχυμα** ή το **σπογγώδες παρέγχυμα**, ανάλογα με την πυκνότητα των κυττάρων. Αναλυτικότερα οι παραπάνω ιστοί και τύποι κυττάρων στα διάφορα τμήματα του φυτού παρουσιάζονται ακολούθως:

ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ

Επιδερμίδα είναι ο ιστός που καλύπτει όλα τα τμήματα του φυτού. Αποτελείται από **μία στοιβάδα** κυττάρων χωρίς μεσοκυττάρους χώρους. Τα επιδερμικά κύτταρα προέρχονται από το πρωτόδερμα (πρωτογενές μερίστωμα) και δεν διαθέτουν χλωροπλάστες (εξάιρεση κάποια σκούφωτα). Εξωτερικά η επιδερμίδα περιβάλλεται από την **εφυμενίδα**, μια κηρώδη, αδιάβροχη στοιβάδα από κυτίνη.

Η επιδερμίδα αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας για το φυτό και μέσω αυτής επιτυγχάνεται:

1. Προστασία από την είσοδο **μικροοργανισμών** (βακτηρίων & μυκήτων), με τη βοήθεια της εφυμενίδας και της μεγάλης συνοχής μεταξύ των κυττάρων της (έλλειψη μεσοκυττάρων χώρων)
2. Προστασία από την **ηλιακή** ακτινοβολία και τη **θερμοκρασία** (μέσω της εφυμενίδας)
3. Προστασία από **έντομα**, με τη βοήθεια τριχών που καλύπτουν την επιφάνειά της. Οι τρίχες αυτές είτε δρουν ερεθιστικά (μη αδενικές τρίχες), είτε εκκρίνουν εντομοαπωθητικές ουσίες, π.χ. στην τομάτα για την απώθηση των αφίδων (αδενικές τρίχες)
4. Έλεγχος της ποσότητας του **νερού** που χάνεται λόγω διαπνοής και της ανταλλαγής αερίων κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης και της αναπνοής (CO₂ & O₂) (μέσω των **στομάτων**)
5. Απορρόφηση νερού και ανόργανων αλάτων που είναι απαραίτητα για την επιβίωση του φυτού με τα **ριζικά τριχίδια** που δημιουργούνται από την επιμήκυνση επιδερμικών κυττάρων της ρίζας.

Στην επιδερμίδα μπορεί να υπάρχουν διαφορετικά είδη κυττάρων όπως τα **καταφρακτικά κύτταρα** των στομάτων και οι **τρίχες**.

Στόματα ονομάζονται τα μικροσκοπικά ανοίγματα που διακόπτουν τη συνέχεια των επιδερμικών κυττάρων ενός φυτού. Αποτελούνται από δύο **καταφρακτικά** κύτταρα που φροντίζουν για το άνοιγμα και κλείσιμο του στοματικού πόρου που βρίσκεται ανάμεσά τους, αλλά και τα **παραστοματικά** κύτταρα, που σε μερικές περιπτώσεις βρίσκονται γύρω από τα δύο καταφρακτικά κύτταρα.

Τα καταφρακτικά είναι διαφοροποιημένα επιδερμικά κύτταρα. Είναι τα μόνα κύτταρα της επιδερμίδας τα οποία έχουν χλωροπλάστες, ενώ τα τοιχώματά τους παρουσιάζουν παχύνσεις οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του στόματος.

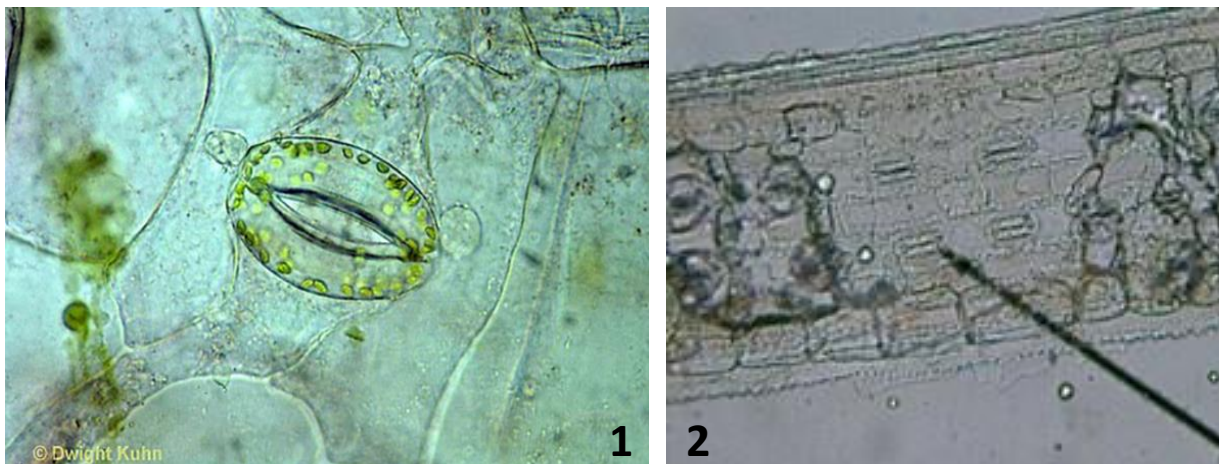
Το σχήμα τους μπορεί να είναι είτε νεφροειδές, είτε σαν αλτήρας. Τα νεφροειδή καταφρακτικά κύτταρα είναι τα πιο κοινά στα φυτά. Σε επιφανειακή όψη, φαίνονται να βρίσκονται σε επαφή στα δύο άκρα τους, αφήνοντας στο μέσον μια οπή, τον **στοματικό πόρο**. Σε εγκάρσιες τομές των κυττάρων αυτών μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι το τοίχωμά τους έχει ανομοιόμορφη πάχυνση.

Τα καταφρακτικά κύτταρα τύπου αλτήρα απαντώνται στα αγρωστώδη και τους πάπυρους (Graminae και Cyperaceae). Τα κύτταρα αυτά έχουν διαφορετική διαδικασία οντογένεσης απ' ό,τι τα νεφροειδή, η λειτουργία τους όμως είναι το ίδιο αποτελεσματική.

Με τη βοήθεια των στομάτων το εσωτερικό του φύλλου επικοινωνεί με το περιβάλλον. Μέσω αυτών γίνεται η ανταλλαγή των αερίων κατά τη φωτοσύνθεση και την αναπνοή (CO_2 , O_2). Όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι δυσμενείς (περίοδοι ξηρασίας), τα στόματα κλείνουν, ώστε να περιοριστεί η διαπνοή και κατ' επέκταση η απώλεια νερού από το φυτό.

Τα στόματα δεν συναντώνται μόνο στα φύλλα, όπου είναι περισσότερο άφθονα στην κάτω επιφάνεια, αλλά και στους νεαρούς πράσινους βλαστούς.

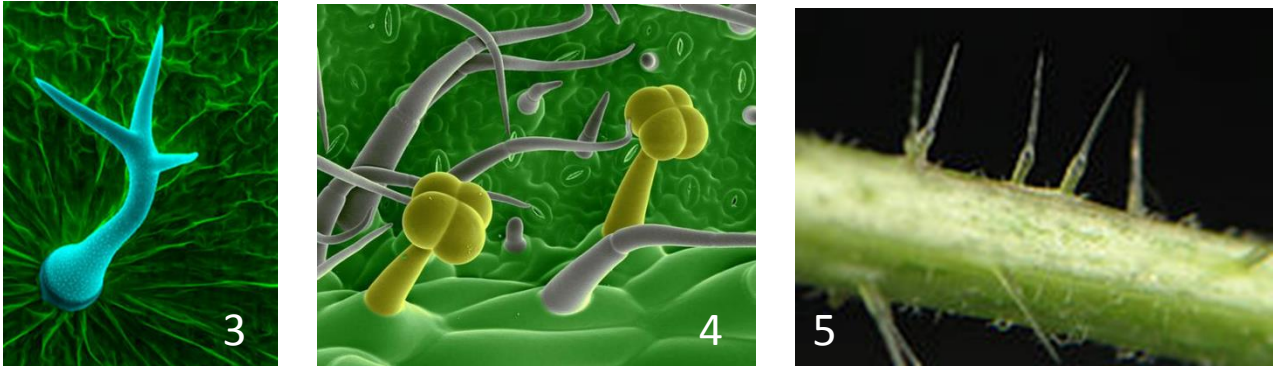
Η θέση των στομάτων δεν είναι ίδια σε όλα τα φυτά: στα φύλλα ορισμένων φυτών, στόματα υπάρχουν τόσο στην άνω όσο και στην κάτω επιφάνειά τους (**αμφιστοματικά φύλλα**). Σε άλλα φυτά, στόματα υπάρχουν μόνο στην κάτω επιφάνεια των φύλλων (**υποστοματικά φύλλα**), ενώ σε φύλλα υδρόβιων φυτών, όπως το νούφαρο, στόματα υπάρχουν μόνο στην άνω επιφάνεια του φύλλου, καθώς η κάτω επιφάνεια είναι βυθισμένη στο νερό (**επιστοματικά φύλλα**).



Εικ. 1- Στόμα με νεφροειδή καταφρακτικά κύτταρα. Διακρίνονται οι χλωροπλάστες μέσα σε αυτά.

Εικ. 2- Στόματα με καταφρακτικά κύτταρα τύπου αλτήρα.

Τρίχες. Σε πολλές περιπτώσεις η επιδερμίδα έχει τρίχες, τα κύτταρα των οποίων παρουσιάζουν σημαντική μορφολογική διαφοροποίηση σε σχέση με τα υπόλοιπα επιδερμικά. Οι τρίχες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις μη αδενικές τρίχες και τις αδενικές τρίχες. Όλες προέρχονται από επιδερμικά κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί διαφοροποίηση.



Εικ. 3- Μονοκύτταρη μη αδενική τρίχα (*A. thaliana*). **Εικ. 4-** Αδενική τρίχα τομάτας. **Εικ. 5-** Αδενική τρίχα τσουκνίδας.

Οι **μη αδενικές** τρίχες μπορεί να είναι μονοκύτταρες ή πολυκύτταρες, η δε μορφή τους παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία. Ο ρόλος τους συνίσταται στο να προσφέρουν προστασία έναντι των φυτοφάγων ζώων, των χαμηλών θερμοκρασιών, καθώς και να περιορίζουν την εξάτμιση του νερού, μειώνοντας την ταχύτητα του ανέμου κοντά στην επιφάνεια του φυτού.

Οι **αδενικές** τρίχες έχουν μεγάλη εξειδίκευση. Η λειτουργία τους μπορεί να εξυπηρετεί άμεσες φυσιολογικές ανάγκες του φυτού ή να σχετίζεται με την αλληλεπίδραση φυτού και περιβάλλοντος. Στη δεύτερη αυτή κατηγορία θα συναντήσουμε τις τρίχες που εκκρίνουν αιθέρια έλαια, τα οποία σε άλλες περιπτώσεις προσελκύουν τα έντομα επικονιαστές, ενώ σε άλλες τα απομακρύνουν (π.χ. στον ευκάλυπτο).

Χαρακτηριστική επίσης είναι και η περίπτωση των τριχών που παράγουν **τοξικές ουσίες**, τις οποίες και εγχέουν καθώς βυθίζονται στο σώμα του ζώου που θα έρθει σε επαφή μ' αυτές (π.χ. της τσουκνίδας).

ΒΛΑΣΤΟΣ

Τον βλαστό αποτελεί το υπέργειο όργανο του φυτού, που φέρει τα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς. Συνήθως είναι επιμήκης, κυλινδρικός και έντονα διακλαδιζόμενος στα πολυετή φυτά. Αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της βιομάζας του φυτού. Μέσω του βλαστού γίνεται η μεταφορά του νερού και των ανόργανων θρεπτικών στοιχείων από τη ρίζα στα φύλλα, καθώς και των προϊόντων της φωτοσύνθεσης (σάκχαρα) κατά την αντίθετη κατεύθυνση. Στα παχύφυτα (κάκτοι), ο βλαστός χρησιμεύει για την αποθήκευση νερού.

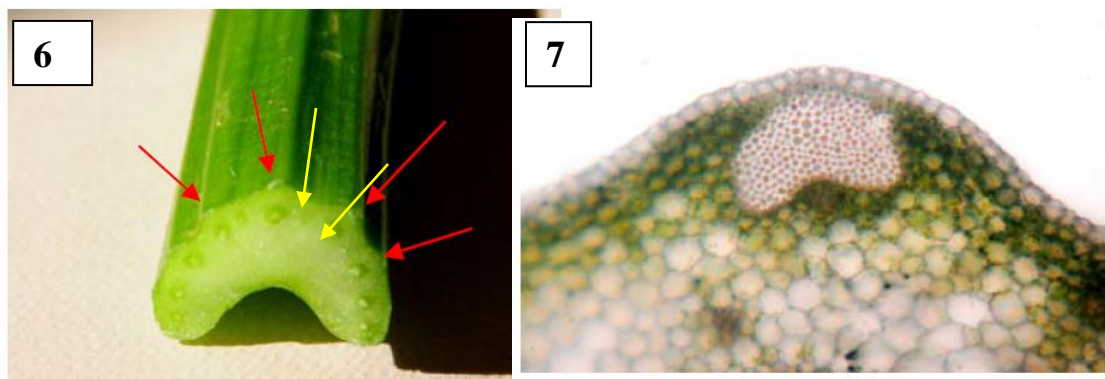
Εκτός από την επιδερμίδα ο βλαστός αποτελείται από μια σειρά διαφοροποιημένων κυττάρων που σχηματίζουν ιστούς όπως το παρέγχυμα, το κολλέγχυμα, το σκληρέγχυμα, το φλοίωμα και το ξύλωμα.

Το **παρέγχυμα** είναι ο πιο κοινός, αρχέγονος ιστός. Η δομή του είναι απλή, με άφθονα κύτταρα. Συμμετέχει σε πολλές & σημαντικές λειτουργίες (φωτοσύνθεση, αποθήκευση οργανικών ουσιών, μεταβολικές διεργασίες) και για το λόγο αυτό παρουσιάζει μεγάλη εξειδίκευση. Τα παρεγχυματικά κύτταρα μπορούν να διαιρούνται και να διαφοροποιούνται υπό συνθήκες (αντικατάσταση οργάνων, επούλωση πληγών).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι παρεγχύματος:

- Χλωροφυλλούχο >> σύνθεση χλωροφύλλης >> φωτοσύνθεση (φύλλα)**
- Αποταμιευτικό >>** τα κύτταρα μεγεθύνονται ώστε να αποταμιεύουν νερό & ουσίες (σπέρματα, υπόγεια τμήματα). Μία κατηγορία αποταμιευτικού παρεγχύματος είναι το υδροφόρο παρέγχυμα, στο οποίο γίνεται αποταμίευση νερού
- Αερέγχυμα >>** πρόκειται ουσιαστικά για κοιλότητες με αέρα >> προσφέρει πλευστότητα σε υδρόβια φυτά

Το **κολλέγχυμα** αποτελείται μόνο από ζωντανά κύτταρα και βρίσκεται κάτω από την επιδερμίδα παρέχοντας στήριξη σε νεαρά όργανα του φυτού. Τα κύτταρά του έχουν παχιά τοιχώματα δομημένα από κυτταρίνη που προσδίδουν αντοχή & ελαστικότητα. Απαντώνται συνήθως σε μη ξυλώδεις βλαστούς, σε μίσχους φύλλων και σε αναπτυσσόμενα τμήματα του φυτού. Οι σκληρές ίνες στο σέλινο αποτελούνται από κολλέγχυμα.



Εικ. 6- Εγκάρσια τομή από βλαστό στο σέλινο. Διακρίνονται οι ηθμαγγειώδεις δέσμες (κίτρινα βέλη) και τα κυρτά επάρματα που διαμορφώνονται από δέσμες κολλεγχύματος εσωτερικά (κόκκινα βέλη). **Εικ. 7-** Οι δέσμες κολλεγχύματος στα κυρτά επάρματα του βλαστού στο σέλινο.

Το **σκληρέγχυμα** αποτελείται από τα πιο ανθεκτικά κύτταρα που διαθέτει το φυτό εξαιτίας της σύνθεσης (από λιγνίνη) και του πάχους των κυτταρικών τους τοιχωμάτων. Προσφέρει στο φυτό αντοχή σε μηχανικές πιέσεις (π.χ. θύελλες) και υποστήριξη του αυξανόμενου βάρους και ύψους του. Πολλά

σκληρεγχοματικά κύτταρα πεθαίνουν όταν ωριμάσουν, όμως τα άκαμπτα κυτταρικά τοιχώματα εξακολουθούν να προσφέρουν στήριξη. Εξαιτίας της λιγνίνης τα κύτταρα είναι τόσο άκαμπτα ώστε δεν μπορούν να ακολουθήσουν την ανάπτυξη του υπόλοιπου φυτού. Έτσι απαντώνται στα μέρη του φυτού που δεν αναπτύσσονται. Η πάχυνση των τοιχωμάτων των σκληρεγχοματικών κυττάρων είναι ομοιόμορφη, ενώ η παρουσία βοθρίων (ανοιγμάτων) επιτρέπει τη δίοδο του νερού & των θρεπτικών στοιχείων. Το σκληρέγχυμα δομεί το μεγαλύτερο μέρος του πυρήνα των φρούτων και του εξωτερικού, σκληρού περιβλήματος των ξηρών καρπών. Είναι υπεύθυνο για την τραχιά υφή του μεσοκάρπιου των αχλαδιών. Επίσης χρησιμοποιείται στην κατασκευή σχοινιών & υφασμάτων (π.χ. λινάρι).

Το κολλέγχυμα μαζί με το σκληρέγχυμα αποτελούν τον **στηρικτικό ιστό**, ο οποίος έχει τη θέση σκελετού για τα φυτά.

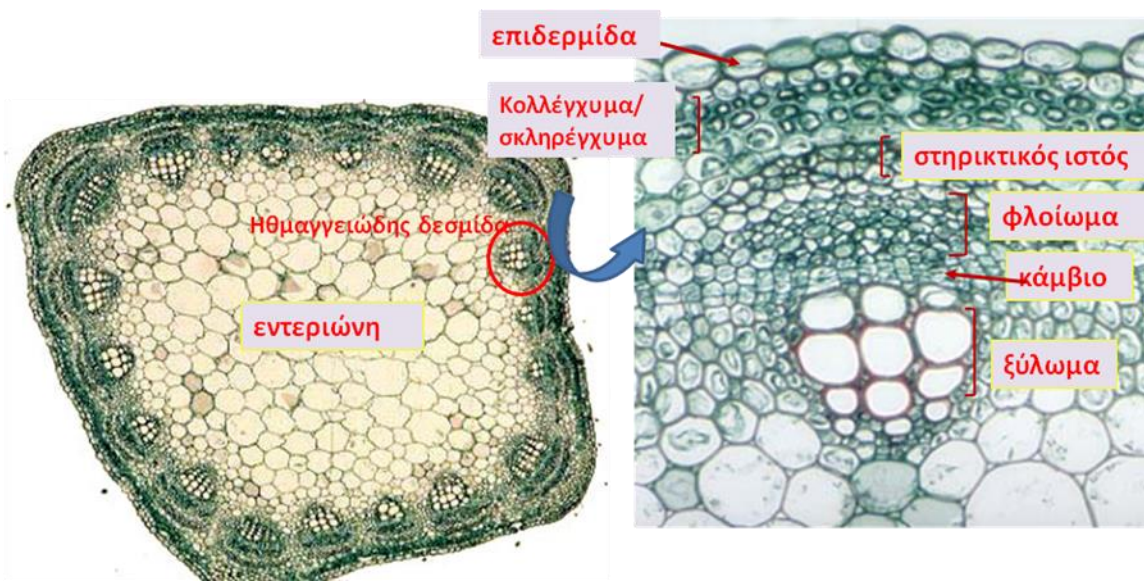


Εικ. 8-9- Σκληρεγχοματικές ίνες στο λινάρι (Εικ. 8) και στον ασφόδελο (Εικ. 9). **Εικ.10-** Σκληρεΐδες (σκληρεγχοματικά κύτταρα) στο αχλάδι.

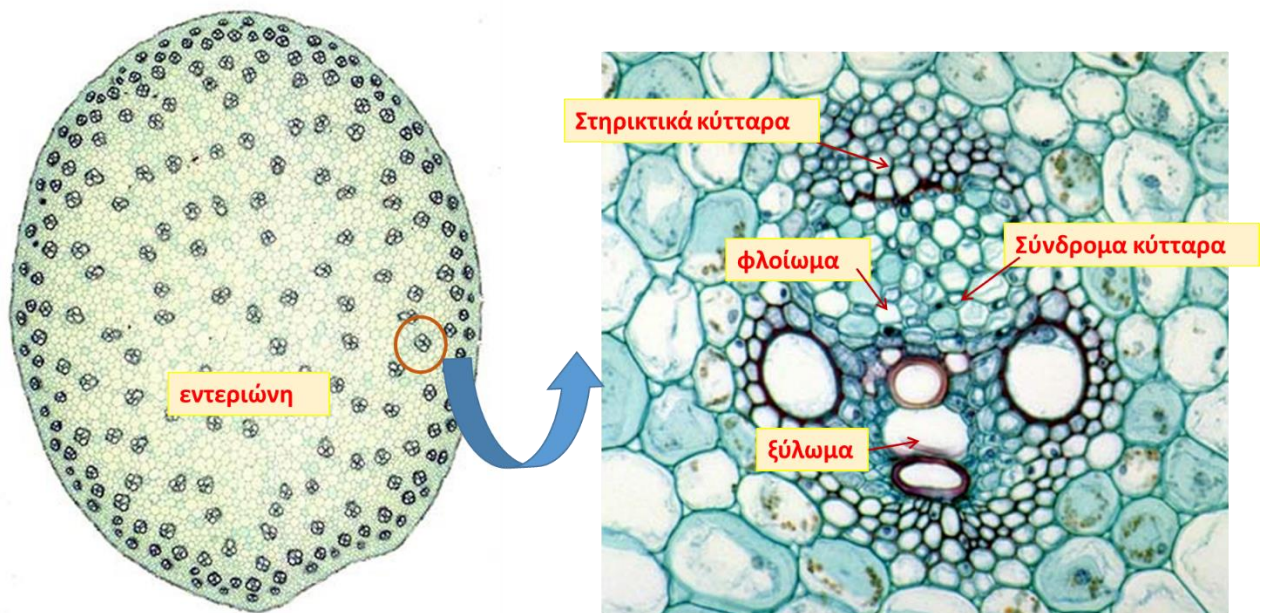
Το **ξύλωμα** είναι ο ιστός που αντλεί το νερό και τα μεταλλικά στοιχεία από τις ρίζες προς τα μέρη του φυτού. Το **φλοιώμα** μεταφέρει τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης από τα φωτοσυνθετικά τμήματα του φυτού προς κάθε κατεύθυνση. Το ξύλωμα και το φλοιώμα διατάσσονται πάντα μαζί και φτιάχνουν επιμήκεις σωλήνες που διαπερνούν το βλαστό, τα φύλλα και το μεγαλύτερο μέρος των ριζών. Μαζί αποτελούν τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες.

Στα δικοτυλήδονα φυτά οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες είναι διαταγμένες περιμετρικά του βλαστού. Εξωτερικά του δακτυλίου των ηθμαγγειωδών δεσμίδων σχηματίζεται ο φλοιός και εσωτερικά η εντεριώνη, που αποτελούνται αντίστοιχα από στηρικτικό ιστό και αποταμιευτικό παρέγχυμα. Σε κάθε δεσμίδα το ξύλωμα βρίσκεται προς το εσωτερικό του βλαστού, ενώ το φλοιώμα προς το εξωτερικό του. Ανάμεσα στο φλοιώμα και το ξύλωμα υπάρχουν μεριστωματικά κύτταρα, που σχηματίζουν το **κάμβιο**. Το κάμβιο συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση των αγωγών ιστών κατά τη δευτερογενή αύξηση του φυτού ώστε να αποτελέσουν ενιαίους ομόκεντρους δακτυλίου που θα οδηγήσουν στην πάχυνση του βλαστού και τη μετατροπή του σε ξυλώδη κορμό.

Στα μονοκοτυλήδονα φυτά οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες είναι διάσπαρτες παντού και επομένως δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ φλοιού και κεντρικής στήλης. Επίσης δεν υπάρχει κάμβιο γιατί στις περισσότερες περιπτώσεις δεν υπάρχει δευτερογενής αύξηση.



Εικ. 11- Δομή βλαστού δικότυλου φυτού.

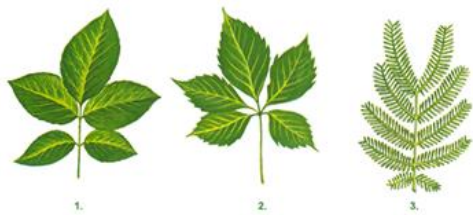


Εικ. 12- Δομή βλαστού μονοκότυλου φυτού.

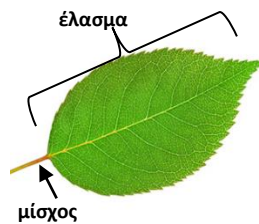
ΦΥΛΛΟ

Είναι το κατεχοχόν φωτοσυνθετικό όργανο του φυτού. Φύεται από το βλαστό και αποτελείται από δύο βασικά τμήματα: το **έλασμα**, συνήθως επίπεδο & πεπλατυσμένο, συλλέκτης ηλιακής ακτινοβολίας και το **μίσχο**, λεπτή στήλη, που συνδέει το έλασμα με το βλαστό και μεταφέρει τον αγωγό ιστό από τον βλαστό στο φύλλο.

Υπάρχουν φύλλα που έχουν περισσότερα από ένα ελάσματα (**σύνθετο** φύλλο), καθένα από τα οποία ονομάζεται **φυλλάριο**.



Εικ. 13- Σύνθετα φύλλα



Εικ. 14- Απλό φύλλο



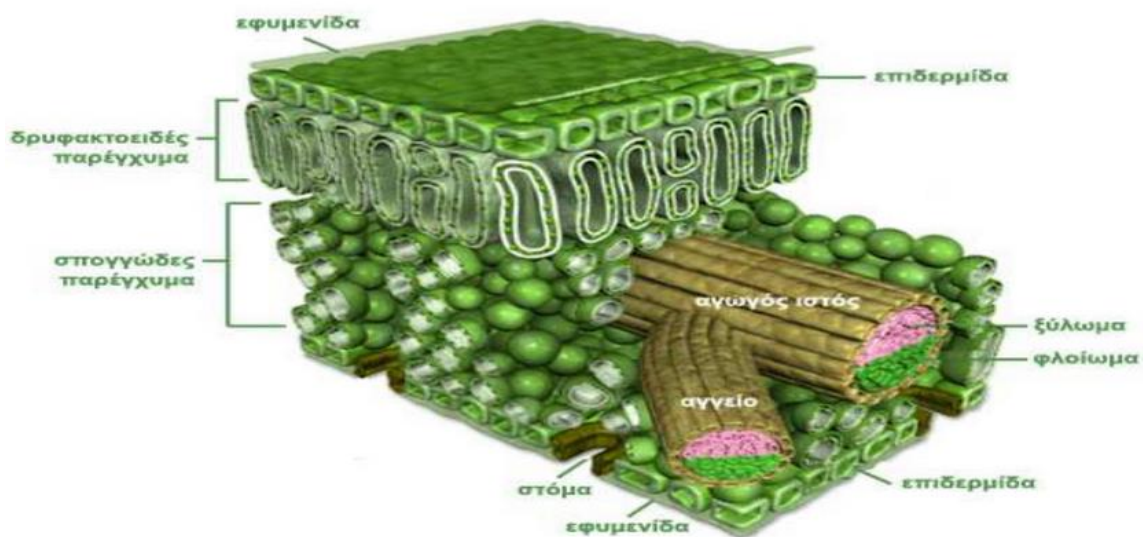
Εικ. 15- φύλλο μονοκότυλου

Ένα άλλο χαρακτηριστικό του φύλλου που παρουσιάζει τεράστια ποικιλία είναι το **σχήμα** του.

Στα δικότυλα φυτά, το έλασμα μπορεί να είναι βελονοειδές, ωοειδές, λογχοειδές, καρδιοειδές, ασπιδοειδές. Η κορυφή του ελάσματος μπορεί να είναι στρογγυλεμένη ή μυτερή, τα δε περιθώρια του φύλλου μπορεί να είναι λεία, πριονωτά, κυματοειδή ή έλοβα.

Στα μονοκοτυλήδονα φυτά η μορφή του φύλλου παρουσιάζει μικρότερη ποικιλομορφία. Τα φύλλα είναι συνήθως άμισχα, επιμήκη, ταινιοειδή και οξύληκτα, ενώ τα νεύρα διατάσσονται παράλληλα κατά μήκος του φύλλου.

Εσωτερική οργάνωση του φύλλου



Εικ.16- Ανατομία φύλλου δικοτυλήδονου φυτού.

Το φύλλο καλύπτεται εξωτερικά από την **επιδερμίδα**, η οποία περιβάλλεται από την **εφυμενίδα**. Ανάμεσα στα δύο στρώματα επιδερμίδας (πάνω & κάτω) συναντάμε το **μεσόφυλλο**, το οποίο αποτελείται από παρεγχυματικό (φωτοσυνθετικό) ιστό. Στα περισσότερα δικοτυλήδονα φυτά ο ιστός αυτός διαφοροποιείται σε **πασσαλώδες** ή **δρυφακτοειδές** παρέγχυμα και σε **σπογγώδες** παρέγχυμα. Τα κύτταρα του πασσαλώδους παρεγχύματος είναι επιμήκη, κυλινδρικά και συγκροτούν έναν πυκνό ιστό με εξαιρετική απόδοση κατά τη φωτοσύνθεση (διαθέτουν το μεγαλύτερο αριθμό χλωροπλαστών).

Αντίθετα, τα κύτταρα του σπογγώδους παρεγχύματος έχουν ακανόνιστο σχήμα και αφήνουν μεγάλους μεσοκυττάριους χώρους ώστε να είναι ανεμπόδιστη η διάχυση του CO₂ σε όλο το φύλλο.

Το μεσόφυλλο διατρέχεται από τον **αγωγό ιστό** (φλοίωμα & ξύλωμα), που μαζί με τις σκληροχυματικές ίνες που τον περιβάλλουν, συγκροτούν τα **νεύρα του φύλλου**.

Στα μονοκοτηλύνδονα φυτά, η ανατομία του φύλλου παρουσιάζει κάποιες διαφορές. Έτσι, το φύλλο των μονοκότυλων είναι **αμφιστοματικό**, το μεσόφυλλο δεν οργανώνεται σε διακριτά μέρη δρυφακτοειδούς και σπογγώδους παρεγχύματος και οι **ηθμαγγειώδεις δεσμίδες** βρίσκονται είτε στο κέντρο του μεσόφυλλου ή αμέσως κάτω από την άνω & κάτω επιδερμίδα.

ΡΙΖΕΣ

Οι ρίζες αποτελούν το υπόγειο τμήμα των φυτών και έχουν ως βασικό ρόλο την άντληση νερού και θρεπτικών από το έδαφος. Κατά περίπτωση οι ρίζες μπορεί να έχουν και άλλο ρόλο, π.χ. φωτοσυνθετικό, αποταμιευτικό, αναπνευστικό, στηρικτικό κ. ά.

Η δομή τους σε μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα φυτά διακρίνεται σε **θυσανώδη** και **πασσαλώδη**. Και στις δύο περιπτώσεις χαρακτηρίζονται από τη μεγάλη αύξηση της επιφάνειάς τους λόγω της ανάπτυξης των πλευρικών ριζών και των ριζικών τριχιδίων και τη συμβίωσή τους με μύκητες (**μυκορυζίδια**) και βακτήρια (**ριζικά φυμάτια**).

Οι αποταμιευτικές ρίζες είναι πολύ κοινές σε διετή φυτά τα οποία, κατά τον πρώτο χρόνο της ζωής τους σχηματίζουν μια πλούσια σε αποταμιεύματα, σαρκώδη ρίζα ενώ το δεύτερο χρόνο, όταν θα ανθίσουν και θα δώσουν καρπό, χρησιμοποιούν τα αποταμιεύματα αυτά για να ενισχύσουν την αναπαραγωγική διαδικασία.

Παρ' ότι όλες οι ρίζες κάνουν αποταμίευση, οι αποταμιευτικές ρίζες έχουν άφθονο αποταμιευτικό παρέγχυμα και χαρακτηρίζονται είτε ως **γογγυλώδεις**, όπως του καρότου (*Daucus carota*), του ραπανιού (*Raphanus sativus*) και του παντζαριού (*Beta vulgaris*), είτε ως **κονδυλώδεις**, όπως της γλυκοπατάτας (*Ipomoea batatas*).

Στις γογγυλώδεις ρίζες του καρότου και του ραπανιού, παρατηρείται ανάπτυξη του υποκοτύλιου και της κεντρικής, πασσαλώδους ρίζας. Το διογκωμένο αυτό αποταμιευτικό όργανο δέχεται μεγάλες ποσότητες θρεπτικών συστατικών από τα υπέργεια φωτοσυνθετικά όργανα και δημιουργεί μια αποθήκη ενέργειας που θα χρησιμοποιηθεί την επόμενη χρονιά για την αναπαραγωγή.



Εικ.17- Εγκάρσια τομή καρότου.

Εργαστήριο 4^ο – ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1. Εγκάρσια τομή φύλλων, επιδερμίδα με στόματα και τρίχες

- (1) Σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα βάζουμε δύο σταγόνες νερού.
- (2) Με τη βοήθεια μιας βελόνας και λαβίδας, τραβάμε και αφαιρούμε ένα λεπτό στρώμα (επιδερμίδα) από την κάτω επιφάνεια του φύλλου που μας έχει δοθεί.
- (3) Τοποθετούμε το κομμάτι που αφαιρέσαμε στη μία σταγόνα της αντικειμενοφόρου πλάκας.
- (4) «Στρώνουμε» το παρασκεύασμα στη σταγόνα (με τη βοήθεια ανατομικής βελόνας) ώστε να μην υπάρχουν αναδιπλώσεις του ιστού.
- (5) Τοποθετούμε την καλυπτρίδα υπό γωνία, σύροντάς την στο παρασκεύασμα.
- (6) Επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία με το δεύτερο φύλλο, κάνοντας σε αυτή την περίπτωση λεπτή εγκάρσια τομή
- (7) Παρατήρηση στο μικροσκόπιο: Τοποθετούμε το παρασκεύασμα στην τράπεζα και το στερεώνουμε. Παρατηρούμε όπως προαναφέραμε.
- (8) Στόχος είναι να παρατηρήσουμε τα καταφρακτικά κύτταρα των στομάτων, τις επιδερμικές τρίχες, την πυκνότητα των κυττάρων στο εσωτερικό στρώμα του φύλλου (κάτω και πάνω επιφάνεια) και το αγωγό του σύστημα (νευρώσεις του φύλλου).

2. Εγκάρσια τομή βλαστού / Εγκάρσια τομή καρότου

- (1) Σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα βάζουμε δύο σταγόνες νερού.
- (2) Με τη βοήθεια του νυστεριού και λαβίδας, κάνουμε μία κατά το δυνατόν λεπτή εγκάρσια τομή σε βλαστό από σέλινο και σε καρότο.
- (3) Τοποθετούμε τις τομές στην αντικειμενοφόρο πλάκα
- (4) Τοποθετούμε καλυπτρίδες υπό γωνία, σύροντάς τες στα παρασκευάσματα.
- (5) Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο όπως προαναφέραμε
- (6) Διαχωρίζουμε τους διάφορους τύπους κυττάρων/ιστών (παρέγχυμα, κολλέγχυμα, φλοίωμα, ξύλωμα, επιδερμικά κύτταρα κλπ)

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 5^ο – ΖΩΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ

Κλείδες ταξινομικής αναγνώρισης. Οι κλείδες αναγνώρισης αποτελούν ένα εύχρηστο εργαλείο της ταξινομικής. Στηρίζονται σε χαρακτηριστικά εξωτερικής μορφολογίας οργανισμών που ανήκουν στην ίδια ευρύτερη ομάδα, αλλά που διαφέρουν λίγο ή πολύ. Τις περισσότερες φορές είναι διχοτομικές, δηλαδή θέτουν μία ερώτηση στην οποία η απάντηση είναι «ναι» ή «όχι». Η απάντηση αυτή καθορίζει και το αν ο χρήστης θα πρέπει να περάσει στο επόμενο βήμα (δηλαδή σε μία νέα ερώτηση) ή θα ολοκληρώσει την αναζήτηση οδηγούμενος στο βασικό ζητούμενο, που είναι το να καταλήξει σε ένα όνομα για τον οργανισμό που θέλει να προσδιορίσει. Οι ερωτήσεις έχουν αριθμούς και γίνονται βαθμιαία. Κάποιες φορές η θετική απάντηση σε ένα μορφολογικό χαρακτηριστικό μπορεί να οδηγήσει το χρήστη πολλά νούμερα πιο κάτω, υπερπηδώντας έτσι πολλές ερωτήσεις, αλλά και ταξινομικές ομάδες. Καταλήγοντας σε μία απάντηση, είναι πάντα καλό να αναζητούμε εικόνες, φωτογραφίες ή άλλα χαρακτηριστικά που επιβεβαιώνουν την τελική επιλογή της ταξινομικής ομάδας.

Εργαστήριο 5^ο – ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- (1) Παρατηρούμε τα εξωτερικά χαρακτηριστικά των οργανισμών που μας δίνονται
- (2) Προσπαθούμε να τους διαχωρίσουμε σε ομάδες ατόμων που μας φαίνονται όμοιες
- (3) Ακολουθούμε την κλείδα αναγνώρισης και κάνουμε επαλήθευση του αρχικού διαχωρισμού
- (4) Αναζητούμε τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά που ομαδοποιούν τους συγκεκριμένους οργανισμούς

ΑΠΛΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΚΛΕΙΔΑ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΑΣΠΟΝΔΥΛΩΝ

- 1α. Σώμα μαλακό χωρίς πόδια και χωρίς κεραίες.....ΣΚΟΥΛΗΚΙΑ
- 1β. Σώμα μαλακό χωρίς πόδια, αλλά με κεραίες.....[ΜΑΛΑΚΙΑ] **2**
- 1γ. Σώμα με αρθρωτά τμήματα..... ΑΡΘΡΟΠΟΔΑ **3**
- 2α. Με κέλυφος.....ΣΑΛΙΓΚΑΡΙΑ
- 2β. Χωρίς κέλυφος..... ΓΥΜΝΟΣΑΛΙΑΓΚΕΣ
- 3α. Έχουν περισσότερα από 10 ζεύγη ποδιών..... [ΜΥΡΙΑΠΟΔΑ] **4**
- 3β. Έχουν 5-7 ζεύγη ποδιών..... [ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΗ] **5**
- 3γ. Έχουν 4 ζεύγη ποδιών.....[ΑΡΑΧΝΙΔΙΑ] **6**
- 3δ. Έχουν 3 ζεύγη ποδιών..... [ΕΝΤΟΜΑ] **10**
- 4α. Από κάθε σωματικό δακτύλιο (=μεταμερές) προβάλλει 1 ζ. ποδιών..... ΧΕΙΛΟΠΟΔΑ
- 4α. Από κάθε σωματικό δακτύλιο (=μεταμερές) προβάλλουν 2 ζ. ποδιών..... ΔΙΠΛΟΠΟΔΑ
5. Έχουν 7 ζεύγη ποδιών και συχνά το σώμα τους γίνεται μπαλάκι..... ΙΣΟΠΟΔΑ
- 6α. Στο πρόσθιο τμήμα του σώματος υπάρχει ένα ζεύγος αρθρωτών άκρων, πλέον των ποδιών..... **7**
- 6β. Κανένα άλλο αρθρωτό εξάρτημα εκτός των ποδιών..... ΑΚΑΡΕΑ
- 7α. Το σώμα είναι ενιαίο..... **8**
- 7β. Το σώμα χωρίζεται σε δύο τμήματα μέσω ενός μίσχου..... ΑΡΑΧΝΕΣ
- 8α. Το σώμα εμφανίζει μεταμέρεια..... **9**
- 8β. Το σώμα δεν εμφανίζει μεταμέρεια και τα πόδια είναι μακριά και λεπτά..... ΦΑΛΑΓΓΙΑ
- 9α. Το σώμα έχει πρόσθιες δαγκάνες και τελειώνει σε μία αρθρωτή μακριά ουρά.....ΣΚΟΡΠΙΟΙ
- 9β. Το σώμα έχει πρόσθιες δαγκάνες αλλά όχι ουρά..... ΨΕΥΔΟΣΚΟΡΠΙΟΙ
- 9γ. Το σώμα δεν έχει πρόσθιες δαγκάνες..... ΓΑΛΕΩΔΗ
- 10α. Σώμα επίμηκες και μεταμερισμένο, με εμφανή τα πόδια..... ΠΡΟΝΥΜΦΕΣ
- 10β. Σώμα με διάφορα εξωτερικά εξαρτήματα (πόδια, κεραίες, φτερά κλπ)..... [ΩΡΙΜΑ ΕΝΤΟΜΑ] **11**
- 11α. Σώμα ενιαίο που καταλήγει σε τρία εξαρτήματα σαν τρίχες..... ΘΥΣΑΝΟΥΡΑ
- 11β. Σώμα με φτερά ή καλυμμένο με άλλα εξαρτήματα..... **12**
- 11γ. Σώμα ενιαίο. Το τρίτο ζεύγος ποδιών πολύ μεγαλύτερο από τα υπόλοιπα, κατάλληλο για άλματα..... ΟΡΘΟΠΤΕΡΑ
- 12α. Σώμα με τα τρία τμήματα (κεφάλι – θώρακας – κοιλιά) σαφώς διαχωρισμένα με μίσχο.....ΥΜΕΝΟΠΤΕΡΑ
- 12β. Το πρώτο ζεύγος ποδιών μεγαλύτερο και με άγκιστρα. Κεφάλι τριγωνικό..... ΔΙΚΤΥΟΠΤΕΡΑ (Μάντιδες)
- 12γ. Τα τρία ζεύγη ποδιών περίπου στο ίδιο μήκος..... **13**
- 13α. Δύο εμφανή ζεύγη φτερών..... **14**
- 13β. Το ένα ζεύγος φτερών τροποποιημένο..... **15**
- 14α. Ιπτάμενα. Φτερά ισομεγέθη, με νευρώσεις..... ΟΔΟΝΤΟΓΝΑΘΑ
- 14β. Ιπτάμενα. Στοματικό μόριο προβοσκιδωτό. Συχνά με κοιλιά που τελειώνει σε κεντρί..... ΜΗΚΟΠΤΕΡΑ
- 14γ. Ιπτάμενα. Χρωματιστά φτερά με χνούδι (λέπια), το πρόσθιο μικρότερο από το οπίσθιο..... ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΑ
- 14δ. Μη ιπτάμενα. Κεφάλι μικρό, κρυμμένο κάτω από το θώρακα. Πεπλατυσμένο σώμα. Φτερά δερματώδη το ένα πάνω στο άλλο ή απουσιάζουν..... ΔΙΚΤΥΟΠΤΕΡΑ (Βλαττίδες)
- 15α. Το πρόσθιο ζεύγος φτερών σκληρό και συχνά κολλημένο (έλυτρα)..... ΚΟΛΕΟΠΤΕΡΑ
- 15β. Το πρόσθιο ζεύγος φτερών δερματώδες, σχηματίζει «σκεπή»..... ΟΜΟΠΤΕΡΑ
- 15γ. Το πρόσθιο ζεύγος φτερών δερματώδες κατά το ήμισυ, εικόνα συνολικά «αρλεκίνου» πάνω στο θώρακα. Στοματικό μόριο προβοσκιδωτό..... ΕΤΕΡΟΠΤΕΡΑ
- 15δ. Το οπίσθιο ζεύγος φτερών έχει μετατραπεί σε αλτήρες («σκουλαρίκια»)..... ΔΙΠΤΕΡΑ

