

Παρατήρηση Κυττάρων Κρεμμυδιού - Π्लाσμόλυση

Τάξη/τμήμα: _____

Ημερομηνία: /___/ ____

Όνομα ομάδας: _____

Μέλη ομάδας: _____

Ερευνητικό ερώτημα: Πώς το περιβάλλον επηρεάζει την κυτταρική οργάνωση ενός φυτικού κυττάρου;

Γνώσεις - Σκοπός

Τα κύτταρα περιβάλλονται από π्लाσματική μεμβράνη, η οποία μεταξύ των άλλων ελέγχει την είσοδο-έξοδο ουσιών. Η μεμβράνη είναι ημιπερατή, δηλαδή επιτρέπει τη μετακίνηση των μορίων νερού όχι όμως και μεγαλομοριακών μορίων. Τα ευκαρυωτικά φυτικά κύτταρα εκτός της π्लाσματικής μεμβράνης διαθέτουν κι ένα δεύτερο εξωτερικό περίβλημα, το κυτταρικό τοίχωμα. Π्लाσματική μεμβράνη και κυτταρικό τοίχωμα είναι σε στενή επαφή. Εσωτερικά υπάρχει το κυτταρόπληγμα και ο πυρήνας, τα οποία είναι άχρωμα και μπορεί να χρωματιστούν με χρήση κατάλληλων χρωστικών. Όταν τα φυτικά κύτταρα τοποθετηθούν σε υπέρτονο διάλυμα (δηλ. διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης σε διαλυμένη ουσία σε σχέση με το κυτταρόπληγμα), μόρια νερού λόγω φαινομένου παθητικής διάχυσης (ώσμωση) μετακινούνται και προς τις δύο κατευθύνσεις, με αυτά που εξέρχονται να είναι πολυπληθέστερα από αυτά που εισέρχονται. Το κύτταρο σταδιακά συρρικνώνεται, η π्लाσματική μεμβράνη αποκολλάται από το κυτταρικό τοίχωμα (π्लाσμόλυση). Το αντίθετο φαινόμενο, δηλαδή η αυξημένη είσοδος νερού ονομάζεται σπαργή.

Οι κάτοικοι κυρίως των πόλεων αδυνατούν να κατανοήσουν, ερμηνεύσουν τη ζωή των φυτών, αδιαφορούν για αυτά, συχνά δεν αντιλαμβάνονται ότι υπάρχουν τριγύρω τους. Αυτό το σύνολο στάσεων ως προς τα φυτά, οι Αμερικανοί βοτανολόγοι Wandersee and Schussler, το 1999, το ονόμασαν «τυφλότητα απέναντι στα φυτά» (plantblindness).

Μικροσκοπία. Αφού τοποθετήσετε το παρασκεύασμα στην αντικειμενοφόρο, εστιάστε, αρχίστε την παρατήρηση σας ξεκινώντας από τη μικρότερη μεγέθυνση (4X) και προχωρώντας προς την μεγαλύτερη. Μετακινήστε το παρασκεύασμα για να δείτε κύτταρα σε μεγαλύτερο εύρος. Η συνολική μεγέθυνση αυτού που βλέπετε υπολογίζεται από το γινόμενο της μεγέθυνσης του προσοφθαλμίου φακού (που είναι πάντα X10) και των διαφόρων αντικειμενικών (4X, 10X, 40X). ΜΗΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΕ ΤΟΝ 4° ΦΑΚΟ (X100), ΘΑ ΚΑΤΑΣΤΡΑΦΕΙ, ΚΑΘΩΣ ΘΕΛΕΙ ΕΙΔΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΓΙΑ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΕΙ.

Σκοπός της εργαστηριακής άσκησης είναι:

- η εξοικείωση με τη διαδικασία της πειραματικής μικροσκοπίας,
- η παρατήρηση κυτταρικών δομών με τη βοήθεια κατάλληλων χρωστικών,
- η διαπίστωση του φαινομένου της π्लाσμόλυσης,
- η καταπολέμηση της «τυφλότητας των φυτών».

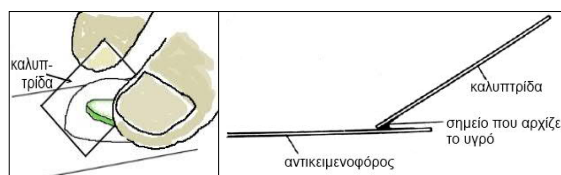
Όργανα και Υλικά που είναι απαραίτητα

1. Όργανα και υλικά μικροσκοπίας.
2. Γυάλινη ράβδος, βομβός κρεμμυδιού, χρωστική Lugol, δ/μα NaCl 10% w/v, διηθητικό χαρτί, π्लाστικό κουτάλι, υδροβολέας – αποιοντισμένο νερό, χρονόμετρο, ύψος ωρολογίου.

Πειραματική διαδικασία

1° Πείραμα: Παρατήρηση φυτικών κυττάρων

Σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα προσθέστε μία σταγόνα νερού. Χαράξτε ένα τετράγωνο στο εσωτερικό ενός χιτώνα κρεμμυδιού, και απομακρύνετε το λεπτό υμένα. Τοποθετήστε τον υμένα πάνω στη σταγόνα, απλώστε τον ώστε να μη διπλωθεί. Τοποθετήστε την



καλυπτρίδα υπό γωνία (δείτε τις παραπάνω εικόνες), ώστε να μη δημιουργηθούν ψυσαλίδες. Με διηθητικό χαρτί απομακρύνετε το πλεονάζων νερό. Μικροσκοπείστε.

✎ Επιλέξτε ένα οπτικό πεδίο (ΟΠ) και σχεδιάστε τα κύτταρα του κρεμμυδιού υποδεικνύοντας τις δομές τους που παρατηρείτε.

Ποιες δομές διακρίνετε;

Τελική Μεγέθυνση: _____

2° Πείραμα: Παρατήρηση φυτικών κυττάρων με χρήση χρωστικής

Επαναλάβετε το 1° πείραμα, μόνο που αντί για νερό χρησιμοποιήστε χρωστική Lugol.

✎ Επιλέξτε ένα οπτικό πεδίο (ΟΠ) και σχεδιάστε τα κύτταρα του κρεμμυδιού υποδεικνύοντας τις δομές που παρατηρείτε.

Ποιες δομές διακρίνετε;

Τελική Μεγέθυνση: _____

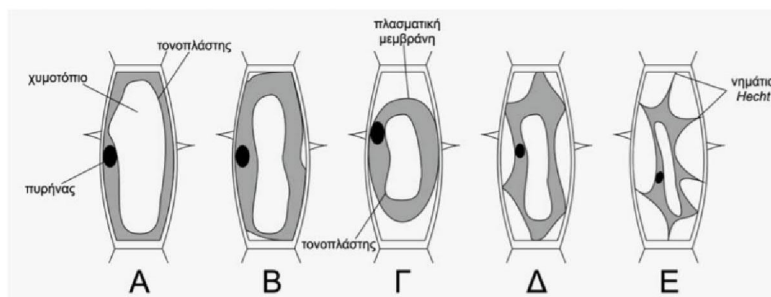
✎ Με τη χρήση της χρωστικής Lugol, υπάρχουν κάποιες δομές ή κυτταρικές περιοχές που είναι πιο ευδιάκριτες; Ποιες; Πώς το εξηγείτε; _____

3° Πείραμα: Παρατήρηση φαινομένου πηλασμόλυσης σε φυτικά κύτταρα

Χαράξτε τετράγωνο στον εσωτερικό χιτώνα κρεμμυδιού, απομακρύνετε το λεπτό υμένα. Τοποθετήστε 2-3 κομμάτια υμένα σε ύαλο ωρολογίου και προσθέστε δ/μα αλατόνευρου 10% w/v, προσέχοντας να μην αναδιπλωθούν, αφήστε τα 5 λεπτά. Μικροσκοπείστε, όπως και στο 2° πείραμα.

✎ Επιλέξτε ένα οπτικό πεδίο (ΟΠ) και σχεδιάστε τα κύτταρα του κρεμμυδιού υποδεικνύοντας τις δομές τους και καταγράφοντας το είδος πηλασμόλυσης (συμβουλευτείτε την παραπάνω εικόνα 1).

Τελική Μεγέθυνση: _____



Εικόνα 1. Μορφές πηλασμόλυσης σε σχηματική απεικόνιση. Α: κύτταρο σε σπαργή, Β: κύτταρο σε κατάσταση οριακής πηλασμόλυσης, Γ: κυρτή πηλασμόλυση, Δ: κοίλη πηλασμόλυση, Ε: σπασμοδική πηλασμόλυση.

4° Πείραμα: Υπολογισμός χρόνου πλάσμούσης

Οι μορφές της πλάσμούσης δεν είναι σταθερές. Μπορεί δηλαδή, κατά την πορεία μιας πλάσμούσης η αποκόλληση στην αρχή να είναι κοίλη και μετά να γίνεται κυρτή. Ως χρόνος πλάσμούσης ορίζεται το χρονικό διάστημα από τη στιγμή που εμβαπτίζεται το κύτταρο στο διάλυμα μέχρις ότου επιτευχθεί η πλήρης κυρτή μορφή. Επαναλάβετε το 3° πείραμα με την εξής διαφορά: τη στιγμή που θα βυθίσετε τον υμένα μέσα στο διάλυμα NaCl, βάλτε ένα χρονόμετρο. Με τη μικροσκόπηση εντοπίστε ένα κύτταρο και σχεδιάστε τη μορφή του σε διαδοχικά στάδια πλάσμούσης σε συνάρτηση με τον χρόνο, ανά 5 λεπτά.

✎ Στον παρακάτω πίνακα στη θέση «Χρόνος» καταγράψτε την ένδειξη του χρονομέτρου, στη θέση «Σχήμα» σχεδιάστε το κύτταρο, στη θέση «Μεγέθυνση» την τελική μεγέθυνση παρατήρησης.

Χρόνος: _____ Σχήμα	Χρόνος: _____ Σχήμα	Χρόνος: _____ Σχήμα	Χρόνος: _____ Σχήμα
Μεγέθυνση: _____	Μεγέθυνση: _____	Μεγέθυνση: _____	Μεγέθυνση: _____

✎ Σχεδιάστε ένα πείραμα για να διαπιστώσετε τι μπορεί να συμβαίνει σε ένα φυτό αν αυτό ποτίζεται με θαλασσινό και όχι με κανονικό νερό.

✎ Αν πιούμε αλατόνερο αντί κανονικού νερού, το πιο πιθανό είναι πως θα αφυδατωθούμε. Δώστε μία πιθανή εξήγηση του φαινομένου συνδυάζοντας το με τη λειτουργία των νεφρών.

✎ Στο νοσοκομείο αρκετές φορές πρέπει να χορηγηθεί σε ασθενή κάποιο φάρμακο που πρέπει να δράσει άμεσα. Γι' αυτό χορηγείται απευθείας στην κυκλοφορία του αίματος (ενδοφλέβια), με τη βοήθεια φυσιολογικού ορού, δηλαδή διαλύματος NaCl 0,9% w/v, το οποίο είναι ισοτονικό με το αίμα. Δώστε μία πιθανή εξήγηση γιατί δεν χορηγούμε απευθείας το φάρμακο αλλά το χορηγούμε με τη βοήθεια φυσιολογικού ορού.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗ

1. Το θαλασσινό νερό περιέχει αλάτι. Όταν πούμε θαλασσινό νερό τα κύτταρά μας λαμβάνουν νερό και αλάτι. Η ποσότητα αλατιού είναι μεγαλύτερη από τις μικρές ποσότητες αλατιού που λαμβάνουμε με ασφάλεια από τις τροφές. Επιπλέον, όταν καταναλώνουμε αλάτι ως μέρος της καθημερινής μας διαίτας, πίνουμε επίσης υγρά, τα οποία βοηθούν στην αραίωση του αλατιού και τη διατήρησης της συγκέντρωσής του σε υγιές επίπεδο. Τα ζωντανά κύτταρα εξαρτώνται από το χλωριούχο νάτριο (άλας) για να διατηρήσουν τις χημικές ισορροπίες και τις αντιδράσεις του σώματος (δηλ τα ερεθίσματα που δέχονται από το περιβάλλον). Ωστόσο, το υπερβολικό νάτριο μπορεί να είναι θανατηφόρο. Τα νεφρά για να μας απαλλάξουν από το σύνολο του πλεονάζοντος αλατιού αν πούμε θαλασσινό νερό, θα πρέπει να ουρήσουμε περισσότερο νερό από ότι πίνουμε. Τελικά, πεθαίνουμε από αφυδάτωση ακόμα και αν διψάμε πάρα πολύ.
2. Οι περισσότερες κυτταρικές δομές (οργανίδια, συστατικά) είναι άχρωμες, οπότε χρησιμοποιούνται διάφορες χρωστικές για να τις παρατηρήσουμε. Οι θετικά φορτισμένες χρωστικές (π.χ. κυανό του μεθυλίου), συνδέονται ισχυρά με αρνητικά φορτισμένα συστατικά (π.χ. νουκλεϊκά οξέα). Οι αρνητικά φορτισμένες χρωστικές (π.χ. Lugol) συνδέονται με θετικά φορτισμένα συστατικά (π.χ. πρωτεΐνες) και έτσι παρατηρούμε ευδιάκριτα τη δομή του κυτταροπλάσματος). Συνήθως η παρατήρηση συνάγεται από την αντίθεση που προκύπτει λόγω της διαφορεικής χρώσης.
3. Η χρήση του αντικειμενικού X100 (καταδυτικός φακός) αποφεύγεται καθώς έρχεται σε επαφή με την καλυπτρίδα του δείγματος και μπορεί να καταστραφεί. Ενδείκνυται μόνο στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί κατάλληλο υλικό επαφής (κεδρέλαιο). Όλοι οι φακοί καθαρίζονται με αλκοόλη 50% και λεπτό βαμβάκερο ύφασμα. Ο καταδυτικός φακός καθαρίζεται άμεσα μετά τη χρήση του.
4. Το πάχος της τομής, δημιουργεί επίπεδα παρατήρησης. Θα πρέπει να εντοπίζετε το καλύτερο δυνατό επίπεδο και να το παρατηρείτε. Συνήθως αποφεύγουμε σημεία της που είναι παχιά η τομή και επομένως παρατηρούμε διάχυτες ή θολές ή απροσδιόριστες εικόνες.
5. Η παρατήρηση γίνεται πάντα ξεκινώντας από τη μικρότερη μεγέθυνση. Εστιάζουμε και στη συνέχεια αλλιάζουμε αντικειμενικό φακό. Δεν μεταβάλλουμε την εστίαση καθώς αλλιάζουμε αντικειμενικό φακό. Στην πρώτη μεγέθυνση ανεβοκατεβάζουμε το δείγμα με τον μεγάλο κοχλία, ενώ από μεγέθυνση σε μεγέθυνση χρησιμοποιούμε το μικρό κοχλία ο οποίος μεταβάλλει το ύψος της τράπεζας με μικρότερο εύρος. Αν η εστίαση χαθεί σε μεγαλύτερη μεγέθυνση ή αν υπάρχει θολότητα στο δείγμα, θα πρέπει να ξεκινήσετε ξανά την μικροσκοπική παρατήρηση από την μικρότερη μεγέθυνση.
6. Συνήθως μπορεί μέσα στην τομή να έχουν εγκλωβιστεί και μη αξιοποιήσιμα στοιχεία, όπως π.χ. φυσαλίδες ή στίγματα σκόνης από τη χρωστική ή τρίχες και τριχίδια άσχετα με την τομή.
7. Καλυπτρίδα υπό γωνία. Την πιάνουμε από το πλάι με τα δύο δάχτυλά μας – αντίχειρας και δείκτης - και ακουμπάμε τη μια της πλευρά στην άκρη της σταγόνας του διαλύματος με το υπό παρατήρηση υλικό και την κατεβάζουμε προσεκτικά, ώστε να καλύψει το παρασκεύασμα, χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα. ΔΕΝ πιάνουμε την καλυπτρίδα από πάνω/κάτω, θα θολώσει από υλικά των δαχτύλων μας.
8. Αν υπάρχουν φυσαλίδες μπορείτε να πατήσετε ελαφρά την καλυπτρίδα με ένα χαρτί, ώστε να απομακρυνθούν όσες περισσότερες δυνατόν.
9. Lugol: 1 γραμμάριο ιώδιο (κρυσταλλικό), 2 γραμμάρια ιωδιούχο κάλιο, 100 ml αποιοντισμένο νερό.
10. Μπλε του μεθυλενίου: 1 γραμμάριο μπλε του μεθυλενίου, 100 αποιοντισμένο νερό.
11. Το οπτικό πεδίο (ΟΠ) είναι ό,τι ακριβώς βλέπουμε σε κάθε μεγέθυνση. Η διάμετρος του ΟΠ για κάθε μεγέθυνση, φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (στην παρένθεση πιο ακριβείς μετρήσεις):

Αντικειμενικός	Διάμετρος οπτικού πεδίου	Μεγέθυνση (10x προσοφθάλμιος)
4x	4.0 mm (4.45)	40x
10x	2.0 mm (1.78)	100x
40x	0.4 mm (0.45)	400x
100x	0.2 mm (0.178)	1000x

Αν γνωρίζετε τη διάμετρο του ΟΠ σε μία μεγέθυνση, μπορείτε να υπολογίσετε τη διάμετρο σε άλλη με τον εξής τύπο: $\text{διάμετρος ΟΠ\#2} = \text{διάμετρος ΟΠ\#1} \times \text{μεγέθυνση\#1} \div \text{μεγέθυνση\#2}$