

فتوسنتز و تنفس

تألیف: دکتر حمیدرضا قاسم‌پور

گروه زیست‌شناسی

دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه

با همکاری: پرستو ناصری و پگاه شادمند

قاسم‌پور، حمیدرضا، ۱۳۳۰ -
فتوسنتز و تنفس / تألیف حمیدرضا قاسم‌پور. -- تهران : مرز دانش ،
۱۳۸۴.

۳۸۷ ص. : مصور، جدول، نمودار.
ISBN: 964-90604-0-5؛ ۳۸... ریال

فهرست‌نویسی براساس اطلاعات فیپا.
کتابنامه: ص. ۳۸۷.

۱. فتوسنتز. ۲. گیاهان -- تنفس. الف. عنوان.

۵۷۲ / ۴۶

۲ف۲ / ۸۸۲ QK

۱۶۵۲۷-۸۴م

کتابخانه ملی ایران

عنوان کتاب: فتوسنتز و تنفس

تألیف: دکتر حمیدرضا قاسم‌پور

ناشر: انتشارات مرز دانش

شمارگان: ۱۵۰۰ جلد

نوبت چاپ: اول

چاپ:

حروف نگار: پگاه شادمند- پرستو ناصری

صفحه‌آرا: علیرضا بهنیا فرد

طرح جلد: مریم شمیرانی، علیرضا بهنیا فرد

بها: ۳۸۰۰ تومان

مرکز پخش:

تهران، خیابان انقلاب، خیابان ابوریحان بیرونی، کوچه عنصری، پلاک ۱۱

تلفن: ۶۶۴۰۳۶۵۰ - ۰۲۱- ۳۷۱۴۰۳۱ - ۹۱۲۰

حقوق چاپ و نشر برای مولف محفوظ می‌باشد.

مقدمه

الف - پدیده فتوسنتز:

پیشگفتار: تنها مکانیسم اساسی و مهم ورود انرژی به دنیای زنده، فتوسنتز می‌باشد. البته موجودات دیگری که بغیر از فتوسنتز می‌توانند سایر ترکیبات را اکسیده نمایند، شناخته شده‌اند ولی از نظر تولید انرژی بسیار ناچیز هستند و اهمیت چندانی ندارند. این دسته شامل باکتریهای شیمیوسنتز کننده می‌باشند و انرژی را با اکسیده کردن مواد معدنی مانند املاح آهن و سولفور بدست می‌آورند و ادامه وجود چنین ترکیباتی نیز بطور غیرمستقیم به فتوسنتز بستگی دارد. بدلیل همین اهمیت فتوسنتز برای زندگی است که فصلها و کتابهای متعددی در مورد این پدیده حیاتی به نگارش درآمده است.

نتیجه نهایی تولید انرژی در اثر اکسیداسیون و احیاء است و در نتیجه ادامه حیات وابسته به تولید انرژی است. فتوسنتز شامل اکسیداسیون و احیاء است و کل جریان عبارت است از اکسیداسیون آب (جدا نمودن الکترون‌ها و آزاد نمودن O_2 به عنوان محصول جانبی) و احیاء CO_2 است که تشکیل ترکیباتی آلی مانند کربوهیدراتها را می‌دهد.

جریان امر بدین قرار است که کلروپلاست گیاه از طریق سیستم رنگدانه‌ای موجود در تیلاکوئید خویش فوتون نور را گرفته و مدت زمانی که الکترون تحت اثر فوتون به حالت تحریک باقی می‌ماند بسیار کوتاه است و با زمانی حدود 10^{-9} ثانیه به حالت اولیه برمی‌گردد و در برگشت انرژی اضافی به راههای مختلف آزاد می‌شود. مراجعه الکترون به حالت اولیه با تأخیر همراه است و در این مسیر از طریق مکانیسم‌های بیولوژیکی درصدی از انرژی اضافی آن گرفته شده و در اعمال حیاتی به جریان می‌افتد. گرفتن این فوتون و تبدیل انرژی آن از انرژی نوری به انرژی شیمیایی منحصر به گیاهان می‌باشد و چنانچه در بالا گفته شد فتوسنتز نامیده می‌شود.

جریان دقیق‌تر عمل به این ترتیب است که الکترون رانده شده توسط نور با فسفوریلاسیون جفت شده و تولید O_2 ، $NADPH+H^+$ و ATP می‌نماید. دو ترکیب ذکر شده اخیر مصرف شده و چرخه ی احیاء CO_2 را به جریان می‌اندازد. دو فاز فتوسنتزی با وجود داشتن مشترکاتی و مشابه بودن با سایر مکانیسم‌های مصرف و انتقال انرژی به نظر می‌رسد که از نظر فضای عمل در کلروپلاست مجزا باشند. اعمال اولیه فتوشیمیایی یعنی به جریان افتادن الکترون و

فتوفسفوریلاسیون به قسمت سیستم داخلی غشاء متصل است (غشاء تیلاکوئید کلروپلاست‌ها) و در آنجا صورت می‌گیرد در حالیکه آنزیم‌های تثبیت کربن در محل استرومای کلروپلاست قرار دارند. البته چنانچه بیان خواهد شد بغیر از $\text{NADPH} + \text{H}^+$ و ATP چندین جریان تنظیم‌کننده دیگر وجود دارند که ارتباط جریان الکترون و تثبیت کربن را برقرار می‌نمایند. از جمله تراوش منگنز در اثر نور از فضای داخلی تیلاکوئید به داخل فضای استروما و نیز قلیائی شدن محفظه‌های استروما تحت اثر برداشت پروتون ناشی از جریان نور به داخل فضای داخلی تیلاکوئید و دیگری فعال یا غیرفعال شدن بعضی از آنزیم‌های متابولیسم کربن تحت اثر نور می‌باشد.

بهر صورت اطلاعات مربوط به مراحل مختلف و مکانیسم عمل فتوسنتز، آسان بدست نیامده و سالها طول کشیده تا بشر توانست تا اندازه‌ای به این مکانیسم‌های پیچیده خلقت، که تقریباً آنها منبع عظیم تولید و ذخیره انرژی است پی ببرد.

باید دانست این فکر که چگونه گیاهان از منابع محیط استفاده می‌نمایند از خیلی سالهای پیش در ذهن بشر بوده است و تنها در این چند دهه اخیر است که پژوهشها به نتایج تقریباً قابل اعتمادی نزدیکتر شده است. چگونگی رسیدن به این مرحله از فهم دانش فیزیولوژی گیاهی را بطور مختصر در تاریخچه ذکر خواهد شد. هدف از نگارش این مجموعه تلفیق دستاوردهای قدیم و آخرین دستاوردهای موجود در مورد فتوسنتز و تنفس در گیاهان می‌باشد.

«حمیدرضا قاسم‌پور»

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۷	مقدمه
۱۶	تاریخچه
۲۰	۱- واکنش هیل
۲۰	۲- تحقیقات فتوسنتزی در سال ۱۹۵۰
۲۱	۳- تحقیقات پس از نیمه قرن بیستم
۲۱	۴- اهمیت فتوسنتز در آینده
۲۲	۵- روش های بررسی فتوسنتزی
۲۲	الف - بررسی گیاه کامل
۲۴	روش مانومتری یا روش وارپورگ
۲۵	اندازه گیری جذب CO_2
۲۵	اندازه گیری جذب CO_2 با کربن رادیواکتیو
۲۶	ب- قطعات برگ
۲۸	ج- کلروپلاست جدا
۳۰	روش جداسازی کلروپلاست
۳۱	فصل اول : نور و فتوبیولوژی
۳۱	اشاره به انرژی نوری و فتوبیولوژی
۳۱	انرژی نوری
۳۲	انرژی تابشی
۳۵	مقیاس های اندازه گیری انرژی تابشی
۳۸	تأثیر انرژی تابشی بر ماده
۴۰	عکس العمل های مهم فیزیولوژیکی گیاهان نسبت به اشعه تابشی
۴۱	تحول زندگی و فتوسنتز
۴۲	فتوشیمی
۴۸	میزان بازدهی
۴۸	رنگدانه های فتوسنتزی
۵۰	کلروفیل ها

۵۴	طیف جذبی عصاره اتری کلروفیل a,b
۵۶	بیوسنتز کلروفیل
۶۱	کاروتنوئید ها
۶۲	گزانتوفیل ها
۶۴	پدیده امرسون
۶۹	فصل دوم: واکنش های نوری فتوسنتز
۶۹	کلروپلاست جایگاه فتوسنتز
۷۰	اثرات تضاد نور بر روی اکسیداسیون سیتوکروم
۷۴	فاز نوری فتوسنتز
۷۸	فتوسیستم های نوری
۸۱	فتوفسفوریلاسیون چرخه ای
۸۴	بعضی از جنبه های کمی واکنش های نوری فتوسنتز
۸۵	۴ کمپلکس یا مجموعه تیلاکوئیدها
۸۶	فتوسیستم II
۸۸	چگونگی اکسیداسیون آب به وسیله ی فتوسیستم II
۹۴	فوتوفتین و دو کوینون پذیرنده ی الکترون از فتوسیستم II
۹۵	حرکت الکترون به داخل مجموعه ی سیتوکروم b_6f باعث انتقال پروتون می شود
۹۹	پلاستوکوینون و پلاستوسیانین ناقل الکترون بین فتوسیستم I و II
۹۹	پلاستوسیانین
۱۰۱	بعضی از علف کش ها جریان الکترون را قطع می کنند
۱۰۳	انتقال پروتون و سنتز ATP در کلروپلاست
۱۱۱	تعمیر و تنظیم ماشین فتوسنتزی
۱۱۲	کاروتنوئیدها عوامل حفاظت نوری
۱۱۳	مشارکت بعضی از گزانتوفیل ها در تعدیل انرژی
۱۱۳	مرکز واکنش فتوسیستم II به راحتی صدمه می بیند
۱۱۴	فتوسیستم I از گونه اکسیژن فعال حفاظت شده است
۱۱۷	فصل سوم: واکنشهای مربوط به تثبیت کربن
۱۱۷	نحوه ورود و جذب CO_2 به داخل کلروپلاست
۱۱۸	مکانیسم باز و بسته شدن روزنه ها

- ۱۲۰ کنترل پتانسیل اسمزی سلول های لوبیایی
- ۱۲۱ جذب یون های پتاسیم توسط سلول های روزنه
- ۱۲۲ یافته های جدید در مورد نحوه ی باز و بسته شدن روزنه ها
- ۱۲۹ فعال شدن پمپ های پروتونی غشاء پلاسمایی سلول های نگهبان توسط نور آبی
- ۱۳۱ تنظیم روابط اسمزی سلول های نگهبان توسط نور آبی
- ۱۳۶ کاروتنوئید زیاکزانترین به عنوان گیرنده نور آبی در سلول های نگهبان
- ۱۴۰ ساکارز محلول اسمزی فعال در سلول های نگهبان
- ۱۴۲ نقش ABA در باز و بسته شدن روزنه ها
- ۱۴۳ اثرات ABA در دو سطح داخلی و خارجی برگ
- ۱۴۸ فعال کردن کانال های کند آنیونی و دیلاریزاسیون طولانی مدت غشاء
- ۱۵۱ جذب انیدرید کرینیک
- ۱۵۶ اثر عوامل محیطی بر روزنه ها
- ۱۵۹ تثبیت و احیاء CO_2
- ۱۵۹ بیوشیمی تثبیت CO_2 و تشکیل مواد قندی در فتوسنتز، استفاده از CO_2^{14}
- ۱۶۲ تولیدات ایجاد در اثر تثبیت CO_2
- ۱۶۴ ترکیبی که با CO_2 جفت می شود
- ۱۶۵ فرمول واکنش های تثبیت CO_2
- ۱۶۶ چرخه ی کالوین
- ۱۶۹ کربوکسیلاسیون ریبولوز دی فسفات توسط آنزیم Rubisco
- ۱۷۱ تولید اجزاء بیوشیمیایی توسط چرخه ی کالوین
- ۱۷۱ تنظیم چرخه ی کالوین
- ۱۷۲ تنظیم فعالیت چرخه کالوین به توسط آنزیم های وابسته به نور
- ۱۷۴ تنفس نوری
- ۱۷۴ تثبیت فتوسنتزی CO_2 و تنفس نوری واکنش های رقابتی
- ۱۷۸ راه متابولیسمی تثبیت CO_2 به طریق C_4
- ۱۸۹ مکانیسم سوم تغلیظ CO_2
- ۱۹۴ تشکیل ساکارز و نشاسته
- ۱۹۶ سنتز نشاسته در کلروپلاست
- ۲۰۰ سنتز ساکارز در سیتوزول

۲۰۱	سنتز ساکارز و نشاسته؛ واکنش هایی رقابتی
۲۰۵	فصل چهارم: فتوسنتز و جنبه های محیطی
۲۰۵	اثر عوامل مختلف بر شدت فتوسنتز و سایر مکانیسم های تثبیت غیر فتوسنتزی
۲۰۶	شدت های فتوسنتزی در گونه های مختلف
۲۰۷	فاکتورهای محیطی که بر فتوسنتز اثر می گذارند
۲۰۹	اثر نور
۲۱۳	به حداکثر رسیدن جذب نور و آناتومی برگ
۲۱۶	کنترل جذب نور به توسط حرکات کلروپلاست و برگ
۲۲۱	تطابق گیاهان در سایه و خشکی
۲۲۷	رقابت گیاهان در دریافت نور خورشید
۲۲۹	چرخه ی گزانتوفیل
۲۳۱	سنتز ایزوپرن و مقابله با گرما در برگ
۲۳۲	ممانعت نوری حاصل از جذب نور زیاد
۲۳۴	ممانعت نوری فعال
۲۳۵	ممانعت نوری مزمن
۲۳۵	اهمیت ممانعت نوری در طبیعت چیست ؟
۲۳۶	وجود CO_2
۲۳۹	پاسخ های فتوسنتزی به CO_2
۲۴۲	غلظت CO_2 اتمسفری در حال افزایش
۲۴۶	اثرات گلخانه ای
۲۴۶	درجه حرارت
۲۵۰	باکتری های فتوسنتزی
۲۵۲	مشخصات کلی فتوسنتزی باکتری ها
۲۵۲	سختی نو در فتوسنتز باکتری های ارغوانی و سبز
۲۵۶	پدیده شیمیوسنتز در میکروارگانیسم ها و مقایسه مکانیسم آن با فتوسنتز
۲۵۹	فصل پنجم: تنفس
۲۵۹	مقدمه تنفس و تخمیر متابولیسم چربی ها
۲۶۵	گلیکولیز: جریانات سیتوزولی و پلاستییدی
۲۶۹	فاز مصرف کننده انرژی در گلیکولیز

- ۲۷۰ راههای جنبی واکنش های گلیکولیز در گیاهان
- ۲۷۱ تامین تخمیری NADH گلیکولیز در فقدان اکسیژن
- ۲۷۲ تنظیم گلیکولیز گیاهی به توسط محصولات آن
- ۲۷۶ مهار پنتوزی و تولید NADPH و متابولیت های سنتز شده حد واسط
- ۲۷۹ کنترل راه اکسیداتیو
- ۲۷۹ چرخه ی اسید سیتریک: یک رخداد در ماتریکس میتوکندری
- ۲۸۰ میتوکندری ها اندامک هایی نیمه مستقل
- ۲۸۱ اکسیده شدن پیرووات در میتوکندری از طریق چرخه ی اسید سیتریک
- ۲۸۶ ویژگی های چرخه ی سیتریک اسید (کربس) گیاهی
- ۲۸۸ زنجیره ی انتقال الکترون و سنتز ATP در غشاء میتوکندری
- ۲۸۸ تسهیل زنجیره انتقال الکترون جریان الکترون ها از NADH به O_2
- ۲۹۱ آنزیم های اختصاصی زنجیره ی انتقال الکترونی میتوکندری های گیاهی
- ۲۹۲ جفت شدن سنتز ATP در میتوکندری با زنجیره ی انتقال الکترون
- ۲۹۷ تبادل مواد و محصولات توسط ناقل ها
- ۳۰۰ هر مولکول ساکارز معادل تولید ۶۰ مولکول ATP در تنفس هوازی
- ۳۰۰ مکانیسم های کاهشنده تولید ATP در گیاهان
- ۳۰۱ اکسیداز جنبی
- ۳۰۴ پروتئین های غیر جفت شونده
- ۳۰۴ رنتون غیر حساس NADH هیدروژناز داخلی (NDin(NADH)
- ۳۰۵ کنترل تنفس، میتوکندری به وسیله ی متابولیت های کلیدی
- ۳۰۶ جفت شدن تنگاتنگ تنفس با سایر راهها
- ۳۰۷ تنفس در گیاهان سالم و بافت ها
- ۳۰۷ تنفس روزنه تقریبی نصف محصولات فتوسنتزی به توسط گیاهان
- ۳۰۸ رخداد تنفس در خلال فتوسنتز
- ۳۰۹ تفاوت در میزان تنفس بافت ها و اندام های مختلف
- ۳۱۰ اساسی بودن میزان عملکرد میتوکندری در خلال نمو دانه گرده
- ۳۱۲ مرگ تنظیم شده سلول
- ۳۱۲ فاکتور های محیطی و تنفسی
- ۳۱۳ اکسیژن O_2

۳۱۴	اشباع آب / اکسیژن پایین
۳۱۵	درجه ی حرارت
۳۱۵	CO ₂ غلظت
۳۱۷	راههای مبادله اکسیژن و CO ₂ در تنفس
۳۱۸	برخورد تنفس و فتوسنتز در روز
۳۱۹	تنفس در اندام‌ها و دوره های مختلف رشد گیاه
۳۲۲	روش های مطالعه ی تنفس
۳۲۳	بررسی تنفس در بافتها و اندام ها
۳۲۳	تنفس در دانه
۳۲۴	متابولیسم چربیها
۳۲۵	ذخیره ی مقدار زیادی انرژی در چربیها و روغن ها
۳۲۶	الئوزومها محل ذخیره ی تری گلیسرول ها
۳۲۷	گلیسرولیپیدهای قطبی عمده ترین لیپید های ساختار غشاء
۳۳۰	افزایش دو کربن در هر چرخش چرخه ی بیوسنتز اسیدهای چرب
۳۳۳	پلاستید ها و شبکه ی آندوپلاسمیک محل سنتز گلیسرولیپیدها
۳۳۵	لیپیدهای غشاء پیش ساز ترکیبات مهم سیگنالینگ
۳۳۵	دانه های در حال جوانه زدن و تبدیل ذخایر چربی به قندها
۳۳۵	تبدیل چربی ها به ساکارز
۳۳۷	هیدرولیز لیپاز
۳۳۷	بتا اکسیداسیون اسید های چرب
۳۳۷	چرخه ی گلیکولیک
۳۳۸	نقش میتوکندری
۳۳۹	میتوکندری های جدا شده گیاه کامل
۳۳۹	طریقه ی اندازه گیری شدت تنفس
۳۳۹	تخمیر در انواع میکروارگانیسمها
۳۴۰	تخمیر الکلی
۳۴۰	تخمیر جور لاکتیک
۳۴۰	تخمیر ناجور لاکتیک
۳۴۰	تخمیر فرمیک

- ۳۴۱ تخمیر اسید بوتیریک
- ۳۴۱ تخمیر پرویولیک
- ۳۴۲ تولید تنفسی مولکول های مورد استفاده در اعمال سنتزی
- ۳۴۲ نوع و سن گیاه
- ۳۴۳ ارتباط تنفس و جذب املاح
- ۳۴۵ کنترل تنفسی (پدیده ی پاستور)
- ۳۴۷ مصرف احتمالی مواد ازنی در تنفس گیاهان (دانه ها)
- ۳۴۸ تنفس در میوه پس از جدا شدن (اشاره به پدیده کلیماکتریک)
- ۳۵۱ فصل ششم : ژنتیک میتوکندری و پلاستیدها
- ۳۵۱ سیستم های ژنتیک میتوکندری و پلاستیدها
- ۳۵۲ میتوکندری ها و کلروپلاست ها محتوی سیستم های ژنتیکی کامل
- ۳۵۴ رشد و تقسیم اندامک مشخص کننده ی تعداد میتوکندری ها و پلاستید ها در سلول
- ۳۵۷ گوناگونی ژنوم میتوکندری ها و کلروپلاست ها
- ۳۵۹ تکامل میتوکندری ها و کلروپلاست ها از همزیستی باکتری ها
- ۳۶۲ ویژگی های منحصر به فرد ژنوم میتوکندری
- ۳۶۴ ژنوم کلروپلاست گیاهان عالی محتوی حدود ۱۲۰ ژن
- ۳۶۵ مکانیسم های غیر مندلی در وراثت ژن های میتوکندری
- ۳۶۹ توارث مادری ژن های اندامکها در بسیاری از موجودات
- ۳۷۱ میتوکندری ها اکثر چربی ها را وارد می کنند، کلروپلاست ها اکثرا چربی ها را می سازند

تاریخچه

زمانی که متوجه اهمیت فتوسنتز و لزوم حتمی آن برای ادامه حیات شویم، بسیار تعجب آور است که این جریان تا قبل از قرون هفدهم و هیجدهم توجهی ناچیز را بخود جلب نموده بود. تا این هنگام کشاورزی بیش از ۱۰/۰۰۰ سال از عمرش می‌گذشت و مباحث علمی در زمینه تولید محصولات در بیش از دو هزار سال قبل به نگارش در آمده بود و یونانیان قدیم اعتقاد داشتند که گیاهان غذا و مواد آلی مورد نیازشان را مستقیماً از خاک می‌گیرند.

براساس این تئوری آنان معتقد بودند که ریشه گیاهان بنحوی قسمتی از خاک را می‌بلعند (مصرف می‌نمایند) و این امر مستقیماً صرف تولید و توسعه گیاه در حال رشد می‌شود. تئوری خوردن خاک زمانی بیشتر مطرح شد که کود دادن به خاک باعث افزایش محصول می‌شد و قرن‌ها این تئوری به قوت خود باقی ماند.

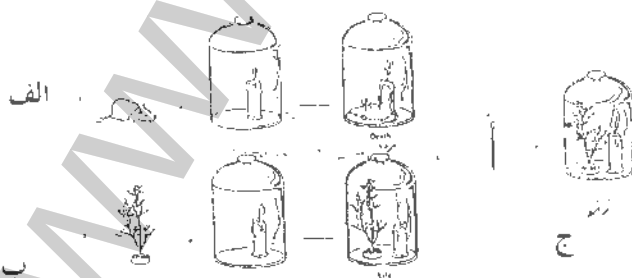
در اوائل قرن ۱۷ آزمایش ساده و مهمی توسط «جین بابتیست وان هلمونت» انجام گرفت و تحت مقاله‌ای منتشر شد. سرتیتر مقاله‌ای که او منتشر نمود چنین بود: با آزمایش مشخص گردید که منشأ همه مواد گیاهی تنها از آب می‌باشد و نه خاک مقاله او چنین ادامه می‌یافت که همه مواد گیاهی بدون تأمل، از عنصر آب ناشی می‌شوند. "من یک گلدان گلی را انتخاب نموده و در آن حدود ۹۲/۴۳ کیلوگرم (۲۰۰ پوند) خاک خشک شده و در کوره حرارت داده شده را ریخته و سپس خاک را خوب آبیاری نموده و یک شاخه بید ۲ کیلوگرمی (۵ پوند) را در آن کاشتم. پس از ۵ سال درخت رشد نموده و به وزن ۷۵ کیلوگرم (۱۶۹ پوند و ۳ اوز) رسید. در این مدت خاک گلدان دائماً با آب باران و یا با آب مقطر آبیاری می‌کردم و گلدان را در زمین فرو برده بودم و برای جلوگیری از نفوذ گرد و خاک و مخلوط شدن این گرد و غبار با خاک گلدان، حاشیه گلدان را با یک ورقه آهنی پوشش داده شده با روی که دارای روزنه‌های قابل نفوذ بیشمار بود، پوشاندم. من وزن برگهای ریخته شده در چهار پائیز را حساب نکردم. بویار خاک گلدان را خشک کردم و دریافتیم که همان ۹۲/۴۳ کیلوگرم (۲۰۰ پوند) منهای چند گرم (۲ اوز) می‌باشد. لذا ۷۵ کیلوگرم چوب، و ریشه تنها از آب ایجاد شده است." باین نتیجه‌گیری "وان هلمونت" که گیاهان خاک خور نیستند، امروز هم موافق هستیم ولی توضیحاتش در مورد چگونگی افزایش وزن، علی‌رغم در نظر گرفتن امکانات علمی دوره ی او هم اکنون از پایه و اساس اشتباه است.

همچنین امروز می‌دانیم که آن چند گرم موادی که از خاک جذب شده بود چقدر برای گیاه حیاتی و مهم می‌باشد. دانش مهمی که وان هلمونت در آن زمان از آن آگاهی نداشت این بود که اتمسفر محتوی گاز است و امر مهمی که گازها در آن دخالت دارند فتوسنتز است. بتدریج نظریه فتوسنتزی با شناخت محصولات اولیه تولید شده توسط گیاه و اطلاعات بیشتری که از مولکولهای سازنده محیط بدست آمد، بنیان‌گذاری شد و پیشرفت نمود.

در سال ۱۶۹۹ میلادی وود وارد (Wood ward) متذکر شد که غیر از آب، گیاهان به مواد دیگری نیز نیاز دارند. پس از کاشت شاخه‌ای نعنای در نمونه‌های مختلف آب که شامل آب باران، آب رودخانه و آب فاضلاب‌های هاید پارک بود، نوشت: گیاهان از آب تشکیل نشده‌اند، بلکه از مواد ویژه بخصوصی مربوط به خشکی (خاک) تشکیل شده‌اند. آزمایشات نشان دادند که مقدار قابل توجهی از این مواد در آب باران، چشمه و رودخانه وجود دارد و قسمت اعظم ساده مایع در گیاه باقی نمی‌ماند و از خلال منافذشان وارد اتمسفر می‌شود. قسمت اعظمی از مواد خشکی (خاک) که با آب مخلوط شده‌اند به داخل گیاه وارد می‌شود.

از آنجایی که ساختمان شیمیایی گاز کربنیک هنوز مشخص نشده بود، در نظر نگرفتن نقش آن در رشد گیاه قابل اغماض است.

بالاخره در (۱۷۳۳-۱۸۰۴) ژوزف پریستلی با انجام آزمایشی نشان داد که اکسیژن مصرف شده توسط حیوانات در مجاورت گیاهان جایگزین شده و خالص می‌گردد (با استفاده از نعنای کاشته شده در محفظه موشها) اگرچه پریستلی تفاوت تبادلات گازی بین حیوانات و گیاهان را تشخیص نداد و به نقش آنها و نیز نقش نور در فتوسنتز پی نبرد.



شکل ۱: نشان دهنده آزمایشات اولیه پریستلی با هواست که مبنایی برای آزمایشات بعدی و کشف تنفس و فتوسنتز شد. شکل (الف): پریستلی از روابط مهم بین شیمی و حیات با کمک موش و شمع پرده برداشت. شکل

(ب): یک شاخه نعناع و یک شمع. چرا شاخه نعناع زنده ماند ولی موش مرد؟ شکل (ج): چرا پس از چند روز که شاخه نعناع در زیر ظرف شیشه‌ای قرار داشت، دوباره می‌توان شمع را روشن نمود؟ آیا موش می‌تواند در هوای تازه ای که دارای اکسیژن شده است (توسط گیاه) تنفس کند؟

بهر صورت باعث تعجب است که تا این زمان توجه بسیار کمی به نقش نور در رشد گیاهان شده بود تا اینکه هیلز (Hales) که غالباً به عنوان پدر فیزیولوژی گیاهی از او نام برده می‌شود تا حدودی به نقش نور در رشد گیاهان توجه کرد. زمانی که در سال ۱۷۲۷ نوشت «گیاهان احتمالاً قسمتی از مواد غذایی‌شان را از برگها و از هوا بدست می‌آورند آیا ممکن نیست نوری که آزادانه به سطوح برگها و گلها وارد می‌شود در بهتر کردن اصول نباتات کمک نماید؟»

ژان اینژن هاوس (Jan Ingen houz, 1730-1799) پس از تکرار کارهای پریستلی موفق شد نشان دهد که این جایگزینی فقط در صورتی انجام می‌پذیرد که اجزاء سبز گیاهان تحت تأثیر نور خورشید قرار گیرند.

وی پیشنهاد کرد گیاهان فقط به خالص کردن هوا نمی‌پردازند، بلکه در نور خورشید، CO_2 را جذب می‌نمایند.

کربن آنرا جهت تغذیه تجزیه کرده و CO_2 را آزاد می‌کند (که البته با توجه به آزمایشات هیل چنانچه بعداً خواهد آمد اکسیژن تولید شده از آب است نه از CO_2).

در خلال سالهای ۱۷۸۸-۱۷۸۲ سن بیر (Senebier) اهمیت هوای تثبیت شده را نشان داد و همچنین تشخیص داد که تولید اکسیژن توسط گیاهان بستگی به حضور CO_2 دارد. در حقیقت هنوز تا مطالعات لاوازیه در مورد ترکیب CO_2 در سال ۱۷۹۶ راه زیادی باقی بود. پس از کشف ترکیب CO_2 بود که اینژن هاوس پیشنهاد کرد که این ترکیب یک منبع مهم کربن برای گیاهان می‌باشد و تا قبل از آن مشارکت CO_2 کاملاً اثبات نشده بود.

تئودور دساسور (Theodore de Sawsure, 1767-1845) که در سال ۱۸۰۴ تحقیقات شیمیایی در زمینه رویش گیاهی را به چاپ رساند، با این نظریه اینژن هاوس موافق بود که دو نوع تبادل گازی اتفاق می‌افتد یکی در روشنایی و دیگری در تاریکی و فقط بافت‌های سبز هستند که عمل جذب CO_2 و تولید O_2 در نور را انجام می‌دهند. همچنین او تا حدودی نقش آب را در فتوسنتز تشخیص داد.

اثبات قانون تبدیل انرژی توسط رابرت مایر (Robert mayer) در سال ۱۸۴۲ یک قدم بسیار بزرگ در روشن شدن مسأله انتقال انرژی در فتوسنتز بوده و بالاخره این مایر بود که اظهار کرد منبع اولیه انرژی که توسط گیاهان و حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرد، خورشید است و انرژی نوری است که در هنگام جذب توسط گیاهان در اثر فتوسنتز به انرژی شیمیایی تبدیل می‌شود.

علیرغم تلاش‌های زیاد دانشمندان، مکانیسم فتوسنتز تا سال ۱۹۰۵ میلادی بصورت یک راز باقی مانده بود. در آن هنگام بود که یک فیزیولوژیست گیاهی انگلیسی به نام بلاکمن (Black man) با نشان دادن اینکه فتوسنتز نه تنها یک واکنش فتوشیمیایی است بلکه یک واکنش بیوشیمیایی نیز می‌باشد، دنیای علم را تکان داد. چنانچه امروزه می‌دانیم واکنش فتوشیمیایی یا واکنش‌های روشنایی بینهایت سریع هستند و به انرژی نورانی احتیاج دارند. از طرف دیگر، واکنش بیوشیمیایی یا واکنش تاریکی از انرژی نورانی مستقل است و با شدت نسبتاً کمی عمل می‌نمایند. لذا بر طبق نظریه بلاکمن، شدت فتوسنتز وابسته به شدت تاریکی است. اگرچه مقاله بلاکمن برای آن زمان غیرعادی می‌نمود ولی هنوز چیز زیادی درباره طبیعت واکنش‌های روشنایی و تاریکی فتوسنتز نمی‌داشتند. ۳۲ سال بعد از کشف بلاکمن اطلاعات جامع‌تری درباره طبیعت واکنش نوری بدست آمد.



در این زمان بود که یک بیوشیمیست انگلیسی به نام هیل (HILL, 1937) نشان داد که کلروپلاست‌های جدا شده در حضور آب و یک پذیرنده هیدروژن مناسب در عدم حضور CO_2 اکسیژن تولید می‌نمایند.

در این رابطه از یک پذیرنده‌ی مصنوعی هیدروژن مانند فری اکسالات پتاسیم می‌توان استفاده نمود. به هر صورت هیل توضیح می‌دهد که تولید اکسیژن بوسیله نور در کلروپلاست‌ها صورت می‌گیرد و بوسیله‌ی عصاره‌ی مایع پودر استونی برگ‌ها تأیید شد.

برگ‌ها دارای یک پذیرنده طبیعی هیدروژن بوده و با در نظر گرفتن دانش امروزی ما این پذیرنده هیدروژن یک پروتئین حاوی منگنز Mn^{++} و چند یون Ca^{++} و Cl^- که به شکل یک آنزیم H_2O دهمیدروژناز عمل می‌نماید. اهمیت آزمایشات هیل در این بود که شواهدی را

نشان داد که تولید اکسیژن مستلزم واکنش نوری است و اکسیژن فتوسنتزی مربوط به گاز کربنیک نیست و مربوط به آب است.



واکنش هیل

ابراز نظریات و تحقیقات ادامه داشت تا در سال ۱۹۵۰ میلادی جامعه بیولوژیکی علمی یک سمپوزیوم در زمینه فتوسنتز و تثبیت گاز کربنیک در شفیلد انگلستان برپا نمود و خلاصه مذاکرات سمپوزیوم در سال ۱۹۵۱ چاپ شد. با اینکار یک سابقه قابل اعتمادی از آزمایشات اصلی و واقعیات را که تحقیقات فتوسنتزی تا نیمه قرن بیستم طی کرده بود بجا گذاشت. طی سالهای پس از آن بسرعت کشفیات بسیاری در زمینه‌های چگونگی انتقال الکترون در عضو فتوسنتز کننده و فتوفسفریلاسیون در کلروپلاست‌ها صورت گرفت. در اینجا به اختصار به ذکر مختصری از تاریخچه سالهای اخیر و کارهای مهمی که تاکنون باعث تغییراتی در گذشته شده و آنچه که در آینده باید معلوم شود می‌پردازیم.

تحقیقات فتوسنتزی تا سال ۱۹۵۰

تحقیقات انجام شده‌ای که در سمپوزیوم گزارش شد شامل کارهایی بر روی سلول کامل بود و فعالترین زمینه‌های تحقیقات در این زمان تعیین ماکزیم کارایی کوانتوم و تشخیص تولیدات اولیه در فتوسنتز توسط آزمایشات با $^{14}CO_2$ بود. در زمینه اول سمپوزیوم، شاهد کشمکش و نظریات گوناگون واربورگ و شاگردانش بویژه امرسون بود. واربورگ و همکارانش در روش مانومتری گزارش دادند که در این روش برای هر مولکول CO_2 مصرف شده یا اکسیژن ایجاد شده در سلولهای کلرولا (*Chlorella*) مابین ۳ تا ۴ کوانتا احتیاج است. نیشی مورا (Nishimura) و همکاران اصرار داشتند که اعداد بدست آمده آنها بین ۸ تا ۱۰ کوانتا بوده است و به روشهای یکدیگر اشکال می‌گرفتند. در زمینه دوم توسط کالوین (Calvin) و همکاران با کمک $^{14}CO_2$ اولین محصول فتوسنتزی یعنی اسید فسفولگلیسیریک را معلوم نمودند.

تحقیقات پس از نیمه قرن بیستم

پس از سمپوزیوم ذکر شده، تحقیقات فتوسنتزی به پیشرفت‌های مهمی دست یافت. خلاصه کارهای انجام شده و زمینه‌هایی که در آن کارهای اساسی انجام گرفت، در چهار زمینه می‌باشد. تحقیقات بعدی با ساول کامل منتهی به مفهوم متقاعد کننده جذب و تحلیل CO_2 در فتوسنتز گردید. تحقیقات دیگر که با کلروپلاست‌های جدا شده انجام گرفت نظری را که در مورد نقش آنها در فتوسنتز داشت عوض کرد و آن زمینه‌ها به این ترتیب میباشند:

- ۱- دریافتند که کلروپلاست‌ها مکان‌های جذب و تحلیل CO_2 هستند.
- ۲- دریافتند که کلروپلاست از لحاظ فتوشیمیایی قادر است نیروی احیایی را که جهت جذب و تحلیل CO_2 لازم دارند تولید نمایند.
- ۳- دریافتند که در کلروپلاست‌ها مکان‌هایی وجود دارد که در آنها نور موجب تشکیل ATP می‌شود.
- ۴- جزئیات عملکرد و تقریباً تمامی آنزیمها، پروتئینها و عوامل در گیر در فتوسنتز و تنفس مشخص شدند.

اهمیت فتوسنتز در آینده

تولید غذای بشر و سایر موجودات زنده دیگر و همچنین حیات آنها بستگی به وجود عملکرد فتوسنتز دارد. کارهای اساسی و مهمی در این زمینه صورت گرفته است و در آینده نیز مسائلی هست که باید در زمینه فتوسنتز از لحاظ تحقیقاتی حل شود. در زمینه اقتصادی و غذایی بشر وابسته به سرمنشأ زنجیره‌های غذایی یعنی گیاهان و در نتیجه مسأله فتوسنتز در گیاهان است و بالطبع کارایی فتوسنتز و تولید بیشتر یکی از مسائلی است که توجه زیادی را بخود معطوف داشته و در حال حاضر تحقیقات زیادی در حال انجام است و در آینده نیز بر روی آن کار خواهد شد.

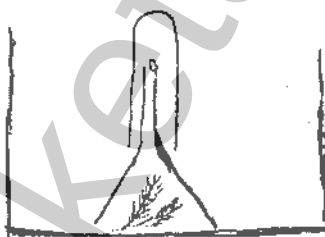
مثلاً کار بر روی گیاهان C_4 و پرورش آنها در جهت تولید و محصول دهی بیشتر در حال انجام است. بهر صورت این مسئله اهمیت خاصی را در اقتصاد کشاورزی جهان و برداشت محصول خواهد داشت که بتوان با منابع محدود آب و زمین حداکثر میزان تولید را بدست آورد.

روش‌های بررسی فتوسنتزی

الف- بررسی گیاه کامل:

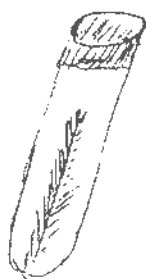
روش‌های متعددی چه از نظر کیفی و چه از نظر کمی برای اندازه‌گیری فتوسنتز در گیاه کامل وجود دارد. در این بحث اشاره مختصری به تعدادی از این روشها کیفی و کمی می‌نماییم:

روش کیفی: یکی از آزمایشات بسیار ساده اولیه در این زمینه تولید اکسیژن در فتوسنتز است. در این روش یک گیاه آبیزی مانند آلوده (*Elodea*) یا میرا فیلوم یا سراتوفیلوم را در یک استوانه پر آب که محتوی CO_2 است قرار می‌دهیم. قبلاً قیف شیشه‌ای را بطور واژگون بر روی گیاه قرار می‌دهیم. در مجاورت نور اکسیژن ایجاد می‌شود که دال بر وجود فتوسنتز در گیاه است (چون در تاریکی فتوسنتز انجام نمی‌گیرد و اکسیژن تولید نمی‌شود) که به روشهای ساده‌ای می‌توان وجود اکسیژن تولید شده را ثابت نمود



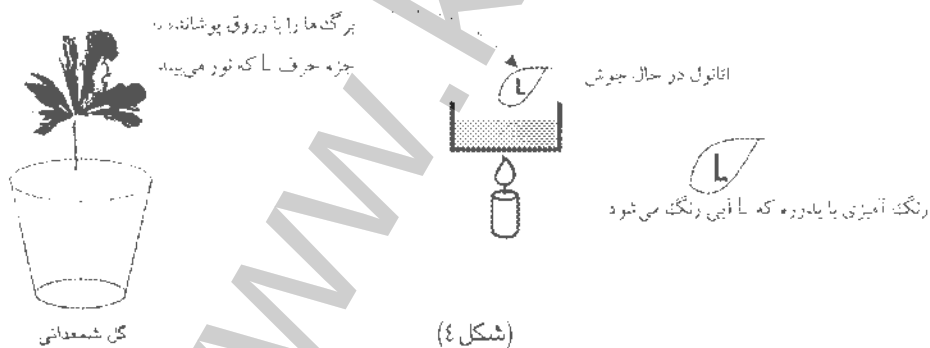
شکل ۲

روش مواد رنگی: بعضی مواد رنگی دارای خاصیتی هستند که پس از احیاء شدن بی رنگ می‌شوند اما چون مجدداً در مجاورت گاز اکسیژن قرار می‌گیرند، اکسیده شده برنگ اصلی خود برمی‌گردند. این مواد را مشتقات بی رنگ شده می‌نامند. از جمله این مواد محلول کارمن زاجی و نیل را می‌توان نام برد که هر دو در مجاورت هیدروسولفیت سدیم بیرنگ می‌شوند و رنگ خود را از دست می‌دهند و چون مجدداً در مجاورت اکسیژن قرار گیرند اکسیژن جذب کرده و رنگی میشوند بواسطه همین خاصیت، مشتقات بیرنگ شده را می‌توان برای نشان دادن عمل فتوسنتز بکار برد. بدین منظور گیاه آلود را در استوانه‌ای شیشه‌ای که حاوی مشتقات بیرنگ شده است فرو می‌بریم و روی آن یک لایه روغنی ریخته و یا با نسکوفیلیم یا پارافیلیم درب آنرا مسدود نموده استوانه را در مقابل آفتاب می‌گذاریم. از گیاه سبز اکسیژن خارج شده و محلول رنگی می‌گردد.



شکل ۳

آزمایش ساکس: برای این آزمایش گیاهی مانند شمعدانی را مدتی در تاریکی قرار داده در این صورت نشاسته موجود در برگها کم کم نقصان یافته و از بین می‌رود. سپس برگها را با زردیخ خوب می‌پوشانیم و فقط منطقه‌ای مشخص (با حروف اول نام فرد آزمایش انجام دهنده) و آن منطقه را در مجاورت نور قرار می‌دهیم. هرگاه پس از مدتی برگها را جدا کرده و در الکل جوش فرو بریم و سپس آنها در محلول ید وارد نماییم خواهیم دید که قسمت نور خورده برگ آبی رنگ می‌شود و این رنگ آبی نشانه تشکیل نشاسته است که دال بر عمل فتوسنتز در برگ و گیاه می‌باشد.



روش شمارش حبابهای اکسیژن: در این روش یک گیاه یا قسمتی از آنرا در یک استوانه شیشه‌ای (معمولاً در یک لوله آزمایش) محتوی محلول رقیق بیکربنات سدیم یا پتاسیم قرار می‌دهیم. لوله آزمایش حامل گیاه را در یک دستگاه محتوی آب در درجه حرارت ثابت (بن ماری) قرار داده و با شمارش حبابهای اکسیژن تولید شده از یک گیاه در یک زمان مشخص

(و با در نظر گرفتن درجه حرارت محیط) تخمین یا تقریبی از شدت فتوسنتز را بدست می آوریم.

با این روش می توان اثر کمی و کیفی درجه حرارت و نور را روی فتوسنتز بررسی و اندازه گیری نمود. برای مثال درجه حرارت بن ماری ممکن است متغیر و نور ثابت نگاه داشته شود و این را به منظور اندازه گیری اثر درجه حرارت در شدت فتوسنتز می توان در نظر گرفت.

حال اگر در مرحله دوم درجه حرارت بن ماری و شدت نور ثابت نگه داشته شود ولی طول موج تغییر نماید، اثر کیفیت نور را می توان بررسی کرد. در صورتی که درجه حرارت بن ماری را ثابت نگه داریم می توانیم اثر کمی نور را با کم و زیاد کردن شدت نور در یک طول موج ثابت اندازه گیری نماییم. یک نمونه گیاه آبیژی مانند الوده آ برای این روش بسیار مناسب است و جزئیات این آزمایش را در اکثر جزوات آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی می توان یافت.

- روش مانومتری یا روش واربرگ:

تکنیک مانومتری یکی از متداولترین و اساسی ترین تحقیقات در فتوسنتز بوده است (امروزه از دستگاه های سنجش الکترونیک ثابت و قابل حمل استفاده میشود) اگرچه از نظر اقتصادی مقرون بصرفه نیست ولی تکنیک نسبتاً ساده ایست و اندازه گیری های بسیار دقیقی را می توان با استفاده از این روش اعمال نمود. مانومتری که به نام دستگاه واربرگ معروف است از همه مانومترهایی که تاکنون ساخته شده اند بیشتر استفاده می شود. یک مانومتر اختلافات شدت فشار گاز را در یک سیستم بسته بررسی و اندازه گیری می کند. اگر حجم گاز مانومتر در اثر ثابت نگاه داشتن درجه حرارت ثابت نگاه داشته شود، هر تغییری در فشار گاز که در اثر موجود زنده (گیاه) ایجاد می شود را می توان با مشاهده بالا یا پایین رفتن مایع (محلول برودوی) در لوله های مدرج مانومتر اندازه گیری و ثبت نمود. بالا یا پایین رفتن محلول دلیل تغییر فشار گاز است و این ناشی از تبدلات گازی بافت یا موجود زنده مورد بررسی است. اندازه گیری فتوسنتز مواد گیاهی (بافت یا سلول) در فلاسک واربرگ به نام فتوسنتز ظاهری نامیده می شود (تبدلات گازهایی که در یک زمان معین انجام می پذیرد).

تحت همان شرایط برای اندازه‌گیری فتوسنتز حقیقی، باید تبدلات گازی در تنفس را نیز اندازه‌گیری نمود. همانطور که می‌دانید بعضی از اکسیژن‌های تولید شده در فتوسنتز در تنفس مصرف می‌شود و بالعکس بعضی از CO_2 های تولید شده در تنفس در فتوسنتز مصرف می‌گردند. معمولاً یک محقق تنفس یک نمونه مشخص را در شرایط حرارتی و محیطی مذکور، در تاریکی اندازه‌گیری می‌نماید. توسط اندازه‌گیری CO_2 ایجاد شده در تنفس بسادگی مشاهده خواهد شد که شدت فتوسنتز ظاهری کمتر از شدت فتوسنتز حقیقی می‌باشد.

- اندازه‌گیری جذب CO_2

سابقاً فیزیولوژیست‌های گیاهی، با گذراندن یک جریان هوا از روی یک گیاه در یک سیستم بسته و سپس گذراندن هوا از یک محلول بازی جذب CO_2 را اندازه می‌گرفتند. تیتراسیون محلول بازی مقدار CO_2 حل شده در محلول را بدست می‌داد. این عمل می‌توانست با کنترل مقدار خروج و ورود گازها، مقایسه‌ای باشد بر میزان CO_2 جذب شده و محاسبه شود. بهر صورت با یافتن روش نوین جذب CO_2 توسط اشعه یمادون قرمز (Inferared) اندازه‌گیری‌ها بسیار دقیق شد.

اساس این روش بر استفاده از توانایی CO_2 در جذب طول موجهای بخصوصی از مادون قرمز قرار دارد. شدت جذب با کاهش غلظت CO_2 در هوا کاهش می‌یابد. خاصیت روش فوق این است که تثبیت فوری غلظت CO_2 در جریان هوایی که از روی گیاه در محفظه بسته می‌گذرد را به ما می‌دهد.

- اندازه‌گیری جذب CO_2 با کربن رادیواکتیو:

CO_2 رادیواکتیو قبلاً جهت مشخص نمودن ترکیبات تولید شده در فتوسنتز در اکثر موارد مورد استفاده قرار می‌گرفت. علاوه بر موارد ذکر شده CO_2 می‌تواند جهت اندازه‌گیری شدت فتوسنتز مورد استفاده قرار گیرد کاهش در میزان رادیواکتیویته می‌تواند مقدار^{۱۴} CO_2 را که در نمونه موجود است را در یک زمان مشخص به ما بدهد که توصیف بسیار دقیقی از شدت فتوسنتز است. همچنین مقدار CO_2 ^{۱۴} جذب شده می‌تواند بطور مستقیم با میزان رادیواکتیویته مواد گیاهی حاصل از فتوسنتز و تحلیل آن بدست آید.

ب- قطعات برگ:

برای مطالعه فتوسنتز در قطعات برگ باید سلولهای موجود در آنها با روشهایی از یکدیگر جدا نمود که بتوان مطالعات را بسادگی بر روی آنها انجام داد. از میان روشهای متعدد مورد استفاده از دو روش معمول نام می‌بریم که یکی روش مکانیکی و دیگری روش آنزیمی است.

۱- روش مکانیکی: این روش در زمره نخستین روشهایی است که برای جداسازی سلولهای فعال فتوسنتزی گیاهان بکار رفته است. در این روش در مرحله اول سلولهای بافت مورد نظر توسط یک محلول غلیظ قندی یا نمکی پلاسمولیز می‌شود. اسمز بالای موجود در محلول باعث می‌شود که سلولهای زنده آب خود را از دست بدهند در نتیجه غشاء پروتوپلاسمی از دیواره سلولی جدا می‌شود. سپس با بافت را خرد می‌کنند و از هم جدا می‌کنند و یا در یک هاون ریخته و با یک دسته هاون به نرمی له می‌کنند (Gnaname and- kulandavetu- 1969) در بعضی از روشها به بافت برشهایی داده می‌شود و پروتوپلاسم در داخل محلول معلق می‌گشت (Cocking 1972) - عیب این روشها این است که معمولاً فقط تعداد کمی از سلولهای دارای پروتوپلاسم را جهت آزمایش فراهم می‌نماید.

۲- روش آنزیمی: در دهه ۱۹۷۰ بجای روشهای مکانیکی، روشهای آنزیمی جایگزین شد. در این روشها به توسط مخلوط خام آنزیمهای بدقت انتخاب شده، پکتین دیواره میانی سلولهای برگ را هیدرولیز (بوسیله پکتیناز) و سپس به کمک سلولاز دیواره سلولزی را نیز هیدرولیز کرده و پروتوپلاستها را آزاد می‌نمودند. در این روش جهت انجام کارها ابتدا عمل پلاسمولیز را انجام داده و پس از طی دو مرحله جداگانه یا توأم عمل جداسازی انجام می‌گرفت. در مرحله اول بافتها در پکتیناز خام خیسانده می‌شدند که با کمک تکان دهنده‌های مکانیکی، سلولها آزاد می‌شدند. سپس تحت اثر آنزیم سلولاز دیواره سلولی هضم و پروتوپلاست را آزاد می‌نمودند. (Cocking 1972) - بیشتر روشهایی که امروز مورد استفاده قرار می‌گیرند بر پایه کارهای (Takebe et al. 1968) استوار است. او با بهره‌گیری موفقیت‌آمیز از روشهای پیشین با نحوه جداسازی سریع سلولهای مزوفیل برگ تنباکو را در مقادیر زیاد تولید نمود. در این روش بافتهای برگ همراه پکتیناز قارچی و در یک محیط هیپرتونیک (Hypertonic) خیسانده می‌شوند. سلولهای بدست آمده از لحاظ شکل ظاهری دست نخورده بنظر می‌رسند و قادرند که در صورت آلوده شدن ویروس موزائیک تنباکو را سنتز نمایند.

در سال ۱۹۷۱، Jensen و همکارانش روش جداسازی سلولهای مزوفیل برگ تنباکو را بکار بردند و با مناسب نمودن شرایط ترکیبات محیطی PH و نور میزان تثبیت فتوسنتزی CO_2 را در این سلولها افزایش دادند. سلولهای مزوفیل فوق قدرت تثبیت CO_2 را به مدت ۲۰ تا ۲۵ ساعت در نور تابانده شده و با درجه فتوسنتزی بیش از $58 \mu \text{mol CO}_2$ در ازاء هر میلی گرم کلروفیل در هر ساعت بطور مداوم از خود نشان دادند.

Berly و Cataldo (1974) با دادن تغییراتی در روشهای ذکر شده توانستند مقادیر زیادی از سلولهای مزوفیل برگ تنباکو را با قدرت بسیار بالای فتوسنتزی (۱۲۰ تا ۱۵۰ میکرومول CO_2 برای هر میلی گرم کلروفیل) در ساعت تهیه نمایند. بعلاوه با این روش رگبرگهای کوچکتر را آزاد کرده و از محیط خارج نمودند. نحوه عمل در این روش بدین ترتیب است که ابتدا قطعات برگ را به مدت ۱/۵ تا ۳ ساعت در پکتیناز قرار می دهیم تا هضم صورت گیرد و سپس با استفاده از یک مخلوط کن و با چرخش ۳۰ سیکل بر ثانیه قسمت اعظم سلولها آزاد می شوند. استفاده از این مخلوط کن نیروی جداسازی لازم برای جدا نمودن مقدار بسیار زیادی (۸۰ تا ۹۰ درصدی) سلولهای فعال مزوفیل را از تور رگبرگهای کوچک فراهم می آورند.

روش دیگری توسط Outdaw و همکارانش در سال ۱۹۷۶ بکار گرفته شده است. در این روش جهت اندازه گیریها، سلولهای نردبانی و اسفنجی پارانثیم در برگچه های *Vicia faba* جدا گردیدند. روش کار بدین ترتیب بود که ابتدا اپیدرم تحتانی جدا گردید. سپس با پکتیناز خیسانده شد و مخلوطی آماده با ۹۵ درصد سلولهای مزوفیلی جمع شد. پس از خیساندن بیشتر تور آوندی جدا گردید و بشره فوقانی چسبیده به سلولهای نردبانی باقی ماند و با خیساندن بیشتر سلولهای نردبانی نیز آزاد گردیدند.

افراد دیگری مانند Paul و Bassham (1977) در روش بالا تغییراتی دادند. آندو قبل از شروع آزمایش یک دوره تاریکی را جهت تطبیق گیاهان مورد آزمایش اعمال می نمودند. در روشهای بکار گرفته شده فوق، درجه تنفس سلولها در پاسخ به فشاری که توسط خیساندن ایجاد می شود افزایش یافته و در فتو سنتز کاهش ایجاد می گردد که برای رسیدن به درجه بالای تثبیت CO_2 می بایستی که مخلوط سلولها را حداقل ۱۲ ساعت قبل از مراجعه آنها را نور در تاریکی نگاه داشت تا سازش حاصل نمایند. در صورت انجام چنین کاری درجه بالای تثبیت CO_2 که برای مدت ۸۰ ساعت پایدار خواهد ماند مشاهده می گردد. لازم به

توضیح است که سلولها در تاریکی و در ۸ درجه سانتیگراد و در نور و ۲۲ درجه سانتیگراد بودند و جهت انجام آزمایش کاملاً آماده بودند ولی بیش از آنچه گفته شد زنده نماندند. Servaites و ogran (1977) از تکنیک توأم بهم زن و پکتیناز استفاده کردند و پیشرفت قابل ذکری در تکنولوژی جداسازی سلول ارائه نمودند. آنها با استفاده از این روش قادر بودند ۵۰ تا ۷۵ درصد سلولهای مزوفیل برگ لوبیای سویا را در ۱۵ دقیقه آزاد نمایند. سلولهای جدا شده در یک محیط فیزیولوژیکی شامل سوربیتول (۲٪ تا ۳٪، مول) توانستند از تکانهای جداسازی جان سالم بدر برده و درجه بالایی از فتوسنتز را نشان دهند. لازم به توضیح است که آزمایش بر روی برگهایی انجام شد که ۱ تا ۲ روز قبل از جداسازی آنها از گیاه در سایه نگهداری شده بودند صورت میگیرد.

ج- کلروپلاست جدا:

جداسازی کلروپلاستهای سالم: چنانکه می دانید مطالعات جدید فتوسنتزی در محیط غیر زنده با مطالعات و آزمایشات هیل (۱۹۳۷) آغاز شد، هیل دریافت که عمل تولید فتوشیمیایی O_2 را می توان با کلروپلاستهای جدا شده و در فقدان تثبیت CO_2 (در حالیکه گیاه، CO_2 تثبیت نمی کند) نشان داد. در زمان حاضر تکنیکهای جداسازی کلروپلاست آنچنان توسعه یافته است که بعنوان یک کار معمول از برگهای اسفناج و نخود، کلروپلاست سالم را جدا می کنند. این کلروپلاستهای جدا شده قادرند تمامی فتوسنتز یعنی تولید O_2 و تثبیت CO_2 تا مرحله تولید نشاسته و قندهای فسفات را نشان دهند. در فتوسنتز به توسط کلروپلاستها ما فقط به نور، CO_2 و H_2O و P_i احتیاج داریم. با حضور موارد ذکر شده و کلروپلاستهای جدا شده ما می توانیم شدت فتوسنتز نزدیک به گیاه کامل را مشاهده نماییم. برای نشان دادن تثبیت CO_2 در کلروپلاستهای جدا شده در حضور نور می بایستی که غشاء خارجی آنها و محتویات استروما و لاملای داخلی سالم باشد و در حقیقت محتویات استروما باید با لاملا همراه باشد یا به آن اضافه شود.

دوباره سازی کلروپلاست: در سال ۱۹۷۲ یک فیزیولوژیست گیاهی به نام هال (Hall) در رابطه با کلروپلاستهای جدا شده با توجه به مشخصات مورفولوژیکی و اعمال آنها، طبقه بندی مفیدی را نوشت که بقرار زیر است:

تیپ A: کرویلاست‌های کامل با غشاء خارجی سالم که اعمال انتقال مواد را نشان می‌دهند. آنها CO_2 را بدون اضافه نمودن مواد خارجی (بجز فسفات) تثبیت می‌نمایند (۵۰ تا ۲۵۰ میکرومول برای هر میلی‌گرم کلروفیل در هر ساعت).

تیپ B: کرویلاست‌های سالم با دیواره‌های خارجی و استروما که برای هر میلی‌گرم کلروفیل شدت تثبیت CO_2 کمتر از میکرومول در هر ساعت است.

تیپ C: کرویلاست‌های شکسته شده با سیستم لامالایی کمی متورم و بدون غشاء خارجی و استروما که تثبیت CO_2 در این کرویلاستها بسیار جزئی است.

تیپ D: لامالای آزاد شده از کرویلاست (از کرویلاست‌های کامل تیپ A بتوسط تحریک اسمزی آماده شده است) که در یک محیط ایزوتونیک (*Isotonic*) قرار داده شده است. غشاء خارجی و استروما جدا و برداشته شده است ولی هنوز مقدار بسیار کمی در محیط کشت بطور پراکنده وجود دارد.

تیپ F: ذرات ریز داخل کرویلاست که بوسیله پاره نمودن فیزیکی یا شیمیایی غشاء کرویلاست آماده شده است.

تیپ F: قطعات کرویلاست با دیسک‌های متورم و قیلاکوئیدهای نامنظم که اغلب جهت مطالعه مسیر انتقال الکترون در فتوفسفوریلاسیون بکار می‌روند.

قاسمپور و گف (۱۹۹۸) از تکنیک مخلوط آنزیم‌ها استفاده نمودند. پس از ضد عفونی برگ‌ها، برگ‌ها را به قطعات کوچکی خرد نموده و در مخلوطی از پگتولاز ۲ درصد و سلولزین ۱ درصد که محتوی ۰/۰۵ BSA گرم (بوین سیرم آلبومین) در ۱mM کلرور کلسیم و MES (5mM) (۲- [n مرفولینوم اتان سولفونیک اسید) در PH برابر ۵/۶ را برای هضم نسبی دیواره ی سلولی به مدت حدود ۱۷ ساعت در اتاق سرد (در ۴-۰) و سپس در مخلوط جدید از همان مخلوط آنزیمی ذکر شده به مدت ۴-۶ ساعت مجدداً در ۴-۰ قرار دادند. سلول‌هایی با دیواره هضم شده را از یک فیلتر تور مانند با فضاهایی به ابعاد حدود ۲mm، با فشار آرام یک دسته هاون شیشه‌ای ساخته شده از میکروپیپت‌های یکبار مصرف را ایجاد نمودند و سپس آنها را در ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ نموده و با MES به غلظت ۵ mM سلول‌ها را به حالت معلق درآوردند و جهت آزمایشات مختلف مورد استفاده قرار دادند.

- روشهای جداسازی کلوپلاستها:

آماده سازی و جدا نمودن کلوپلاستها بعلت شکننده بودن غشاء خارجی باید سریع و آرام انجام پذیرد. روش له کردن بافتهای برگي در هاون و با استفاده از دسته هاون، کمی خشن بوده و به کلوپلاستها صدمه می‌رساند. جهت جلوگیری از صدمه زیاد از یک مخلوطکن (مثلا وارينگ يا سوروال) که برگها را خیلی سریع خرد می‌نماید و حداقل پارگی و صدمه را دارد، استفاده می‌شود.

یک روش دیگر استفاده از یک هموژنیزاتور (همگن کننده) مانند پلی‌تورن که نتایج خوبی را بدست می‌دهد می‌باشد. این دستگاه در حدود ۱ تا ۲ ثانیه بافتها را از یکدیگر جدا می‌کند و زمینه خوبی از کلوپلاستهای سالم را به ما می‌دهد.

با استفاده از روشهای بالا پس از خرد کردن برگ، محلول را از داخل یک فیلتر دولایه به نام میروکلاس (Mirocloth) فیلتر می‌کنند. قطعات بزرگ برگ و سلولهای بزرگتر از کلوپلاست بر روی فیلتر باقی مانده و کلوپلاستها از آن عبور می‌کنند. پس از اتمام مراحل جداسازی ۲۰ سی‌سی از محلول کلوپلاستهای جدا شده را در لوله‌های ۵۰ میلی‌لیتری سانتریفیوژ ریخته و برای مدت ۸۰ تا ۱۰۰ ثانیه با دور 600g در هتاء درجه سانتریگراد سانتریفیوژ می‌کنند.

به علت اینکه کلوپلاستها دارای غلظت زیاد دانه‌های نشاسته هستند و ممکن است دانه‌های نشاسته دیواره‌های خارجی کلوپلاستها را پاره نمایند. زمان سانتریفیوژ می‌بایستی کوتاه باشد. با اتمام سانتریفیوژ قشر بالایی را که محتوی اجسام شناور و از کلوپلاستهای آزاد شده و پاره غنی می‌باشد را دور ریخته و سپس به آرامی ۲ تا ۳ میلی‌لیتر از محتوی به جداره یک لوله آزمایش از نیمه پایینی جدا می‌نماییم. باقیمانده به سانتریفیوژ را با داخل و خارج کردن آرام یک میکروپیپت به داخل لوله بحالت معلق در می‌آوریم و سپس دوباره سانتریفیوژ می‌کنیم. کلوپلاستهای محلول را که دارای تعداد زیادتری از کلوپلاستهای مجتمع هستند تا شروع آزمایش و تحقیق در داخل یخ نگهداری می‌کنیم. برای اطمینان از سالم بودن کلوپلاستها می‌توان آنها را توسط میکروسکوپ فازکنتراست بررسی و مشاهده نمود.