

NO: 25909.



Πανεπιστήμιο Πειραιώς  
Τμήμα Πληροφορικής

**Ανάπτυξη Προηγμένων Μετρητικών Συστημάτων & Τεχνικών  
για Ηλεκτροφυσιολογικά Φαινόμενα**

Διδακτορική Διατριβή

του

Κωνσταντίνου Ι. Καλοβρέκτη

Πειραιάς, Μάρτιος 2011





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΕΙΡΑΙΩΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΕΙΡΑΙΩΣ

ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ

για την απόκτηση Διδακτορικού  
Διπλώματος του Τμήματος Πληροφορικής

**Κωνσταντίνου Καλοβρέκτη**

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΗΓΜΕΝΩΝ ΜΕΤΡΗΤΙΚΩΝ  
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΓΙΑ  
ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ

*Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :*

**Επιβλέπων :**

**Ευάγγελος Φούντας**

Καθηγητής Πανεπιστημίου Πειραιώς

**Μέλη :**

**Γεώργιος Τσιχριντζής**

Καθηγητής Πανεπιστημίου Πειραιώς

**Χρήστος Λύκας**

Λέκτωρ

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

*Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή :*

**Θεόδωρος Παπαηλίας**

Καθηγητής Τ.Ε.Ι. Πειραιώς

**Αριστείδης Σαλουνάκης**

Καθηγητής Πανεπιστημίου Πειραιώς

**Γεώργιος Τσιχριντζής**

Καθηγητής Πανεπιστημίου Πειραιώς

**Ευάγγελος Φούντας**

Καθηγητής Πανεπιστημίου Πειραιώς

**Δημήτριος Αποστόλου**

Επίκουρος Καθηγητής

Πανεπιστημίου Πειραιώς

**Νικόλαος Μιγελακάκης**

Επίκουρος Καθηγητής

Πανεπιστημίου Πειραιώς

**Χρήστος Λύκας**

Λέκτωρ Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



## ***Ευχαριστίες***

Πρώτα –πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής που αποτελείται από τον καθηγητή κ. Ευάγγελο Φούντα Πρόεδρο του Τμήματος Πληροφορικής του Πανεπιστημίου Πειραιά (επιβλέποντα), τον καθηγητή κ. Γεώργιο Τσχιχριντζή και τον Λέκτορα κ. Χρήστο Λύκα για τη συνεχή υποστήριξη που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής στο Πανεπιστήμιο Πειραιώς, οι γνώσεις των οποίων καθώς και οι συμβουλές τους με την συνεχή παρουσία τους αποτελούσαν πυξίδα στην όλη πορεία μου για την εκπόνηση της διατριβής αυτής. Θα ήθελα να ευχαριστώ ακόμη τους καθηγητές, Α. Σαπουνάκη, Θ. Παπαηλία και τους επίκουρους καθηγητές Δ. Αποστόλου και Ν. Μιχελακάκη που δέχτηκαν να είναι μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη γυναίκα μου Γεωργία Τσαγιάννη για την υποστήριξη και την ενδυνάμωση που μου παρείχε όλο αυτό το χρονικό διάστημα μέσα από την αγάπη της.

*Καλοβρέκτης Κωνσταντίνος*



## Πρόλογος & δομή διατριβής

Ως ηλεκτροφυσιολογία ορίζεται το επιστημονικό αντικείμενο της μελέτης ηλεκτρικών ιδιοτήτων των βιολογικών κύτταρων και των ιστών για την περιγραφή ηλεκτροφυσιολογικών φαινομένων μέσω τεχνικών καταγραφής. Ειδικότερα η ηλεκτροφυσιολογία είναι μια καθιερωμένη επιστήμη που ασχολείται με την μελέτη των ενδογενών ηλεκτρικών ρευμάτων στα κύτταρα καθώς και με τα αποτελέσματα των ρευμάτων αυτών.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή προτείνεται η ανάπτυξη ενός προηγμένου μετρητικού συστήματος για την διερεύνηση ηλεκτροφυσιολογικών φαινομένων σε φυτικούς οργανισμούς. Κάθε ζωντανός οργανισμός παράγει διάφορους τύπους ενδοκυτταρικών και μεσοκυττάρων ηλεκτρικών σημάτων τα οποία αξιοποιούνται ποικιλοτρόπως σε πολλές εμπορικές και ερευνητικές εφαρμογές (ιατρική, μηχανολογία, αεροναυπηγική κλπ).

Στον κανόνα αυτό υπόκεινται και οι φυτικοί οργανισμοί, στους οποίους πολύ λίγη δουλειά έχει γίνει μέχρι στιγμής και αυτή περιστασιακά, για τη διερεύνηση, τη ταυτοποίηση και την αξιοποίηση των αντίστοιχων ηλεκτρικών σημάτων που παράγουν, ενώ είναι σε μηδενικό επίπεδο η συσχέτισή τους με τους παράγοντες που τα προκαλούν, όπως η προσβολή από ασθένειες και εχθρούς, η έλλειψη ή η τοξικότητα θρεπτικών στοιχείων, η έλλειψη νερού και η επίδραση των κλιματικών παραμέτρων (θερμοκρασία, η υγρασία και ηλιακή ακτινοβολία).

Με την ανάπτυξη του συστήματος που προτείνεται στην παρούσα εργασία γίνεται δυνατή η καταγραφή και η ερμηνεία των ηλεκτρικών σημάτων στα φυτά. Στην παρούσα εργασία γίνεται επίσης διερεύνηση των σταδίων που μεσολαβούν από την εφαρμογή του ερεθίσματος και την παραγωγή του ηλεκτρικού σήματος μέχρι την τελική αντίδραση του φυτού στο συγκεκριμένο ερέθισμα.

Ο τομέας εφαρμογής των αποτελεσμάτων της παρούσης εργασίας αφορά στη γρήγορη διάγνωση και την κάλυψη των αναγκών των καλλιεργειών με χρήση των βιοσημάτων, όταν ακόμα δεν έχουν εμφανιστεί συμπτώματα καταπόνησης από την επίδραση βιοτικών (προσβολή από εχθρούς ή ασθένειες) ή αβιοτικών παραγόντων (έλλειψη νερού ή θρεπτικών στοιχείων, υψηλά ή χαμηλά επίπεδα φωτισμού, θερμοκρασίας, υγρασίας ή αλατότητας). Αυτό κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικό γιατί

βοηθά στην έγκυρη αντιμετώπιση του προβλήματος, στην αύξηση της παραγωγής και στην αναβάθμιση της ποιότητας του παραγόμενου προϊόντος.

Η διατριβή περιλαμβάνει έξι (6) κεφάλαια :

Στο **κεφάλαιο 1** παρουσιάζονται θέματα βασικής θεωρίας βιοσημάτων και εννοιών ηλεκτροφυσιολογίας στους φυτικούς οργανισμούς.

Στο **κεφάλαιο 2** αναπτύσσονται θέματα σχεδίασης συστημάτων καθώς και θέματα απόκτησης και επεξεργασίας βιοηλεκτρικών σημάτων. Ειδικότερα εξετάζονται τα είδη των ηλεκτροδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αισθητήρες σε ένα σύστημα λήψης βιοσημάτων, οι επιμέρους διατάξεις που συνθέτουν το σύνολο του συστήματος (ενισχυτής, φίλτρο χαμηλών συχνοτήτων, αναλογικός ψηφιακός μετατροπέας) και οι τεχνικές επεξεργασίας των αποκτηθέντων δεδομένων.

Στο **κεφάλαιο 3** παρουσιάζεται η στρωματοποιημένη δομή του πρωτοκόλλου IEEE 802.15.4 για την ανάπτυξη ασύρματων αισθητήρων. Στο κεφάλαιο αναπτύσσονται ζητήματα της στοιβάς του πρωτοκόλλου καθώς και οι λειτουργίες με τις οποίες επιτυγχάνεται ο έλεγχός της.

Στο **κεφάλαιο 4** παρουσιάζεται η ανάπτυξη ενός προηγμένου συστήματος απόκτησης βιοηλεκτρικών σημάτων για τη μελέτη ηλεκτροφυσιολογικών φαινομένων σε φυτικούς οργανισμούς καθώς και οι πειραματικές μέθοδοι και διατάξεις που εφαρμόστηκαν για: α) την αξιολόγηση του συστήματος και β) την συσχέτιση των ηλεκτροφυσιολογικών φαινομένων με τα αίτια που τα προκάλεσαν.

Στο **κεφάλαιο 5** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων και γίνεται η απαιτούμενη ανάλυση και συζήτηση ώστε να εξαχθούν τα απαραίτητα συμπεράσματα.

Στο **κεφάλαιο 6** συνοψίζονται τα συμπεράσματα της διατριβής και αναφέρονται ενδεικτικά θέματα για τη περαιτέρω συνέχιση της έρευνας.

Τέλος παρατίθεται βιβλιογραφική αναφορά των δημοσιεύσεων και βιβλίων που χρησιμοποιήθηκαν ως υπόβαθρο στην παρούσα διατριβή των.



# Ανάπτυξη Προηγμένων Μετρητικών Συστημάτων & Τεχνικών για Ηλεκτροφυσιολογικά Φαινόμενα

---

## Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

---

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

#### Εισαγωγή στην ηλεκτροφυσιολογία των φυτών

1.1 Ορισμός-εισαγωγή.....	1
1.2 Υπόβαθρο φυσιολογίας των φυτικών οργανισμών.....	3
1.2.1 Το φυτικό κύτταρο.....	4
1.2.2 Η δομή του φύλλου.....	10
1.3 Ηλεκτροφυσιολογία των ανώτερων φυτικών οργανισμών.....	12
1.4 Αβιοτική και Βιοτική καταπόνηση.....	13
1.4.1 Αβιοτική καταπόνηση.....	13
1.4.2 Ορισμός βιοτικής καταπόνησης.....	15
1.5 Σημαντικοί ορισμοί και τύποι βιοσημάτων των φυτών.....	16
1.5.1 Δυναμικό ηρεμίας- ανάπαυσης.....	19
1.5.2 Δυναμικό Δράσης.....	20
1.5.3 Δυναμικό μεταβλητότητας.....	21
1.5.4 Ερεθίσματα γέννησης σημάτων AP & VP.....	22
1.5.5 Διαφοροποίηση μεταξύ AP & VP σήματος.....	22
1.5.6 Μέτρηση του AP & VP σήματος.....	24
1.6 Μοντελοποίηση δυναμικού μεμβράνης.....	26
1.7 Κανάλια μετάδοσης βιοηλεκτρικών σημάτων.....	30
1.8 Ηλεκτροχημική διασύνδεση σε φυτικούς οργανισμούς.....	33
1.9 Ταχύτητα μετάδοσης ηλεκτροφυσιολογικών σημάτων.....	37
1.10 Κιρκαδικός ρυθμός και ηλεκτροφυσιολογία των φυτών.....	38
1.11 Ηλεκτροφυσιολογική συμπεριφορά του φλοιώματος.....	39
1.12 Ο ρόλος των ηλεκτρικών σημάτων στην επικοινωνία ρίζας-βλαστού.....	41
1.13 Ο ρόλος των ηλεκτρικών σημάτων στη περίοδο της γονιμοποίησης και άνθισης.....	42
1.14 Ο ρόλος των ηλεκτρικών σημάτων στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης.....	43
1.15 Ο ρόλος των ηλεκτρικών σημάτων στις επιδράσεις των περιβαλλοντικών συνθηκών.....	45
1.16 Ο ρόλος των ηλεκτρικών σημάτων στις επιθέσεις των εντομών.....	47
1.17 Ο ρόλος των ηλεκτρικών σημάτων στις επιδράσεις χαμηλών και υψηλής πεδίων τάσης.....	47
1.18 Ο ρόλος των ηλεκτρικών σημάτων σε φαινόμενα συντονισμού ηλεκτρομαγνητικών πεδίων.....	50
1.19 Σύνοψη της ηλεκτροφυσιολογίας στα φυτά.....	51

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### Απόκτησης και επεξεργασία βιοηλεκτρικών σημάτων

2.1	Εισαγωγή .....	55
2.2	Δημιουργώντας επαφή με το φυτό.....	57
2.3	Χαρακτηριστικά ηλεκτροδίων .....	58
2.3.1	Καμπύλη αναφοράς .....	59
2.3.2	Ακρίβεια ανίχνευσης.....	59
2.3.3	Απόκριση κατά Nernst.....	59
2.3.4	Ποτενσιομετρικός συντελεστής επιλεκτικότητας .....	59
2.3.5	Χρόνος απόκρισης .....	59
2.3.6	Διακριτική ικανότητα (resolution).....	60
2.3.7	Σφάλμα επαναληψιμότητας .....	60
2.3.8	Αξιοπιστία (Reliability) .....	60
2.3.9	Ολίσθηση (drift).....	60
2.3.10	Χρόνος ζωής .....	61
2.4	Τύποι ηλεκτροδίων .....	61
2.4.1	Ηλεκτρόδια πρώτου τύπου.....	61
2.4.2	Ηλεκτρόδια δευτέρου τύπου.....	61
2.4.2.1	Κατασκευή ηλεκτροδίων Ag/AgCl .....	63
2.4.3	Ηλεκτρόδια μεμβράνης.....	64
2.4.4	Ηλεκτρόδια αναφοράς .....	66
2.4.5	Ηλεκτρόδια Καλομελά.....	66
2.5	Συστήματα απόκτησης βιοσημάτων .....	67
2.5.1	Ο Ενισχυτής.....	67
2.5.2	Αναλογικό φίλτρο.....	68
2.5.3	Αναλογικός σε ψηφιακό μετατροπέας.....	70
2.5.3.1	Κβαντισμός και κωδικοποίηση.....	71
2.5.3.2	Θεωρία δειγματοληψίας.....	72
2.5.4	Λογισμικό επεξεργασίας βιοσημάτων .....	75
2.6	Τεχνικές Μετρήσεων βιοσημάτων.....	75
2.6.1	Τεχνική μέτρηση σε επίπεδο δυναμικού μεμβράνης (MP).....	75
2.6.2	Τεχνική μέτρηση των δυναμικών δράσης και ανάπαυσης.....	77
2.6.3	Τεχνική των ηλεκτρικών σημάτων μέσα στο φλοιόωμα .....	78
2.7	Τεχνικές επεξεργασίας βιολογικών σημάτων .....	79
2.7.1	Πεδίο επεξεργασίας των σημάτων στο χρόνο .....	80
2.7.2	Πεδίο επεξεργασίας στατιστικής σημαντικότητας .....	81
2.7.2.1	Διαδικασίες για την επεξεργασία μίας ομάδας τυχαίων τμών.....	81
2.7.3	Πεδίο επεξεργασίας ισχύος.....	83
2.7.3.1	Ταχύς μετασχηματισμός Fourier .....	86
2.7.3.2	Αυτοσυσχέτιση .....	87
2.7.3.3	Μη παραμετρικές τεχνικές.....	90
2.7.4	Πεδίο επεξεργασίας στο επίπεδο παραμέτρου – χρόνου.....	91
2.7.4.1	Μετασχηματισμός Fourier Βραχέως Χρόνου.....	92
2.7.5	Κυματοειδή (wavelets) .....	94
2.7.5.1	Σχηματική απεικόνιση ανάλυσης κυματιδίου.....	96

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

#### Πρωτόκολλο ZigBEE για ασύρματους αισθητήρες

3.1 Εισαγωγή .....	99
3.2 Ασύρματα προσωπικά δίκτυα χαμηλού ρυθμού LR-WPAN.....	100
3.2.1 Σχηματισμός δικτύων αστέρα.....	103
3.2.2 Σχηματισμός δικτύων r2p.....	103
3.3 Δομή υπερπλαισίου.....	105
3.4 Πρότυπο μεταφοράς δεδομένων .....	106
3.4.1 Μεταφορά δεδομένων από συσκευή RFD προς συντονιστή FFD .....	107
3.4.2 Μεταφορά δεδομένων από συντονιστή FFD προς συσκευή RFD .....	108
3.4.3 Διότιμη μεταφορά δεδομένων.....	109
3.5 Αρχιτεκτονική του LR-WPAN IEEE 802.15.4 .....	110
3.5.1 Το φυσικό επίπεδο (PHY) .....	111
3.6 Υλικό συστήματος ασύρματου αισθητήρα ZigBEE.....	118
3.7 Δίκτυα ZigBEE .....	119
3.7.1 Σύνδεση τελικών σημείων .....	120
3.7.2 Μηχανισμός μεταφοράς δεδομένων .....	121
3.8 Σωρός ZigBEE (ZigBEE Stack) .....	122
3.8.1 Στρώμα εφαρμογής (APL).....	124
3.8.2 Το υποεπίπεδο υποστήριξης της εφαρμογής (APS) .....	125
3.8.3 Το επίπεδο δικτύου .....	128
3.8.4 Το επίπεδο ZigBEE DEVICE OBJECT .....	128
3.8.5 Το επίπεδο ZigBEE Device Profile Layer .....	128
3.8.6 Το επίπεδο ελέγχου πρόσβασης στο μέσο μετάδοσης MAC.....	128
3.9 Αρχεία του ZigBEE Stack .....	129
3.9.1 Αρχεία διαχείρισης συσκευών FFD και RFD.....	129
3.9.2 Ρουτίνες διαχείρισης σωρού ZigBEE .....	130
3.9.3 Ρουτίνες CallBack (CallBack Functions) .....	133

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

#### Υλικά και μέθοδοι

4.1 Υλικά.....	135
4.2 Αισθητήρας Ag/AgCl .....	137
4.3 Μονάδα ενισχυτή υψηλής εμπέδησης αισθητήρα Ag/AgCl.....	138
4.4 Μονάδα φίλτρου αντι-αναδίπλωσης (anti-alias filter).....	141
4.5 Μονάδα απόκτησης δεδομένων (DAQ).....	142
4.6 Κώδικας επεξεργασίας, απεικόνισης και καταγραφής βιοσημάτων.....	142
4.7 Ασύρματο ενσωματωμένο σύστημα μέτρησης βιοηλεκτρικών.....	143
4.8 Πειραματικές διατάξεις.....	150
4.8.1 Μεθοδολογία αξιολόγησης του αισθητήρα επαφής Ag/AgCl.....	150
4.8.1.1 Πειραματική διάταξη για τη μελέτη επίδρασης του μεγέθους και της θέσης του αισθητήρα επάνω στο φυτό .....	150
4.8.1.2 Πειραματική διάταξη για τη μελέτη επίδρασης του μεγέθους του φύλλου στο πλάτος του σήματος.....	152

4.8.3 Μεθοδολογία διερεύνησης της επίδρασης διαφορετικών ερεθισμάτων στο εύρος και την τιμή του βιοσήματος .....	153
4.8.4 Μεθοδολογία διερεύνησης επίδρασης της μεταβολής της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας (PAR) στη μορφολογία του βιοσήματος	156
4.8.5 Πειραματική διάταξη για τη συγκριτική μελέτη βιοσημάτων ληφθέντων με ενσύρματο και ασύρματο σύστημα απόκτησης δεδομένων .....	158

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### Αποτελέσματα / Συζήτηση

5.1 Αξιολόγηση του αισθητήρα επαφής Ag/AgCl.....	160
5.1.1 Αποτελέσματα επίδρασης του μεγέθους και της τοποθέτησης των αισθητήρων επάνω στο φυτό .....	160
5.1.2 Αποτελέσματα επίδρασης της απόκρισης του αισθητήρα συναρτήσει μεγέθους του φύλλου .....	163
5.2 Επίδρασης της μεταβολής της EC του νερού άρδευσης στο πλάτος του βιοσήματος.....	164
5.3 Μελέτη ηλεκτροφυσιολογικών φαινομένων στην απόκριση διαφορετικών ερεθισμάτων και συσχέτιση φάσματος – φαινομένου .....	171
5.4 Μελέτη επίδρασης του βιοσήματος σε μεταβολή της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας (PAR) .....	179
5.5 Χρήση σχεδιασμένου ενσωματωμένου συστήματος έναντι ενσύρματου συστήματος απόκτησης βιοσημάτων.....	185
5.5.1 Ασύρματο και ενσύρματο σύστημα απόκτησης βιοσημάτων .....	185
5.5.2 Επίδραση σήματος θορύβου στο σχεδιασμένο ασύρματο ενσωματωμένο σύστημα .....	188

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### Συμπεράσματα- Προτάσεις

6.1 Συμπεράσματα .....	190
6.2 Προτάσεις .....	192
Βιβλιογραφία.....	194

# 1

## Εισαγωγή στην ηλεκτροφυσιολογία των φυτών

### 1.1 Ορισμός-εισαγωγή

#### *Ηλεκτροφυσιολογία*

*Ηλεκτροφυσιολογία (Electrophysiology)*, σύνθετος όρος από τις ελληνικές λέξεις: ήλεκτρον (ēlektron), φύσις-φύση (physis), και του επιθήματος της αρχαίας ελληνικής (τμήμα της λέξης που κατά την παραγωγή προστίθεται στο τμήμα της ρίζας -λογία, (logia). Ως ηλεκτροφυσιολογία ορίζεται το επιστημονικό αντικείμενο της μελέτης ηλεκτρικών ιδιοτήτων των βιολογικών κύτταρων και των ιστών για την περιγραφή ηλεκτροφυσιολογικών φαινομένων μέσω τεχνικών καταγραφής. Ειδικότερα η ηλεκτροφυσιολογία είναι μια καθιερωμένη επιστήμη που ασχολείται με τη μελέτη των ενδογενών ηλεκτρικών ρευμάτων στα κύτταρα καθώς και με τα αποτελέσματα των ρευμάτων αυτών.

Αρκετά βραβεία Νομπέλ έχουν απονεμηθεί σε ερευνητές του επιστημονικού πεδίου της ηλεκτροφυσιολογίας, συμπεριλαμβανομένων εκείνων των Eccles , Hodgkin και Huxley το 1963, Neher και Sakman το 1991 και MacKinnon το 2003. Ο τομέας της ηλεκτροφυσιολογίας περιλαμβάνει μετρήσεις ηλεκτρικών δυναμικών δράσης (action potential) ή ρευμάτων σε ιονικά κανάλια ή σε ολόκληρους ιστούς για την ανίχνευση, επεξεργασία, καταγραφή και συσχέτιση τους με βιολογικά φαινόμενα.

Η γέννηση του κλάδου της πειραματικής ηλεκτροφυσιολογίας συνδυάζεται στενά με την ανακάλυψη τεχνικών μέτρησης. Οι πρώτοι ερευνητές που ασχολήθηκαν σε αρχαϊκό επίπεδο με τα ηλεκτρικά φαινόμενα και τις βιολογικές συσχετίσεις τους ήταν οι Sauvages (1706-1767), ο S. Hales (1677-1761), ο J.A. Nollet (1700-1770) και ο προγενέστερος Pierre Bertholon de ST Lazare (1742-1791).

Ιδιαίτερος σταθμός της πειραματικής ηλεκτροφυσιολογίας αποτελούν τα πειράματα του Luigi Galvani 1791 στην έρευνα του γνωστή ως “animal electricity” όπου παρατήρησε τη συστολή των βατραχοπόδαρων με εφαρμογή ηλεκτρικών φορτίων (Galvani 1791). Στο πέρασμα των αιώνων όλο και περισσότεροι ερευνητές ασχολήθηκαν με το αντικείμενο της ηλεκτροφυσιολογίας καθιερώνοντας την ως επιστημονικό κλάδο κυρίως στον τομέα της ιατρικής.

Το 1895 ο W. Einthoven ανέπτυξε την τεχνική της ηλεκτροκαρδιογραφίας (ECG) για την καταγραφή της ηλεκτρικής δραστηριότητας των μυών της παλλόμενης καρδιάς και της συσχέτιση της με παθολογικά φαινόμενα κερδίζοντας το Νομπέλ ιατρικής το 1924, και το 1934 ο H. Berger ανέπτυξε την μέθοδο του ηλεκτροεγκεφαλογραφήματος (EEG) (Grey Walter 1954; Brazier 1962) συμβάλλοντας στην διαδικασία της ψυχολογικής διαγνωστικής. Η συσχέτιση βιολογικών φαινομένων όπως της εφίδρωσης με της διαφοροποιήσεις της ηλεκτρικής αντίστασης του δέρματος στο πλαίσιο της ηλεκτροφυσιολογίας έδωσε το έναυσμα για νέα εργαλεία διάγνωσης στα ψυχολογικά τεστ που έχουν στενή σχέση με την συναισθηματική κατάσταση του ατόμου οδηγώντας σε έρευνες για την ανίχνευση ψεύδους (ανιχνευτής ψεύδους) αποτελώντας εργαλείο της σύγχρονης ποινικής έρευνας ανιχνευτής ψεύδους.

Τα αποτελέσματα όλων των επιστημόνων στο πέραμα των αιώνων έδειξαν ότι κάθε ζωντανός οργανισμός παράγει διάφορους τύπους ενδοκυτταρικών και μεσοκυττάρων ηλεκτρικών σημάτων τα οποία αξιοποιήθηκαν αλλά και

αξιοποιούνται ποικιλοτρόπως σε πολλές εμπορικές και ερευνητικές εφαρμογές (ιατρική, μηχανολογία, αεροναυπηγική κλπ). Στον κανόνα αυτό υπόκεινται και οι φυτικοί οργανισμοί, στους οποίους πολύ λίγη δουλειά έχει γίνει μέχρι στιγμής και αυτή περιστασιακά, για τη διερεύνηση, τη ταυτοποίηση και την αξιοποίηση των αντίστοιχων ηλεκτρικών σημάτων που παράγουν, ενώ είναι σε μηδενικό επίπεδο η συσχέτιση τους με τους παράγοντες που τα προκαλούν, όπως η προσβολή από ασθένειες και εχθρούς, η έλλειψη ή η τοξικότητα θρεπτικών στοιχείων, η έλλειψη νερού και η επίδραση των κλιματικών παραμέτρων (θερμοκρασία, η υγρασία και ηλιακή ακτινοβολία).

Η μελέτη της σχέσης των φυτικών οργανισμών με το περιβάλλον αποτελεί βιοηλεκτροχημικό φαινόμενο και έχει άμεση επιρροή στον έλεγχο της αύξησης και της ανάπτυξης των φυτών. Υπάρχουν πολλά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι τα φυτά αποκρίνονται με την παραγωγή ηλεκτρικών σημάτων στην αλλαγή των περιβαλλοντικών παραμέτρων, ιδιαίτερα όσων επηρεάζουν τη θρεπτική και φυσιολογική ανάπτυξή τους όπως στις αλλαγές της φωτεινής ακτινοβολίας, της οσμωτικής πίεσης, της θερμοκρασίας, της κοπής, της μηχανικής διέγερσης και της διαθεσιμότητας νερού.

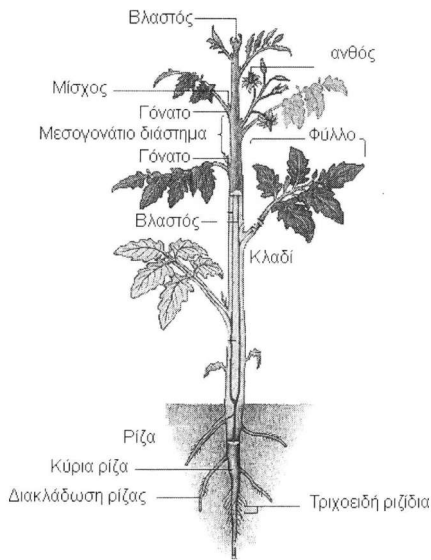
## 1.2 Υπόβαθρο φυσιολογίας των φυτικών οργανισμών

Ένας φυτικός οργανισμός δομείται από τέσσερα βασικά τμήματα: τις ρίζες, τους βλαστούς, τα φύλλα και τα άνθη (σχ1.1), η ανάπτυξη των οποίων συμβαίνει σε όλη τη διάρκεια της ζωής του φυτού. Ο κύριος ρόλος της ρίζας είναι να απορροφά τα θρεπτικά συστατικά από το χώμα (στοιχεία και νερό) για την τροφή του φυτού.

Το τμήμα του βλαστού είναι υπεύθυνο για την μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων από την ρίζα στο όλο σύνολο του φυτού αλλά και όλων των παραγόμενων σακχάρων που (προκύπτουν μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης των φύλλων) προς τη ρίζα.

Τα φύλλα δημιουργούνται σε σημεία του βλαστού που καλούνται γόνατα ή κόμποι. Το τμήμα του βλαστού μεταξύ δύο γονάτων καλείται μεσογονάτιο διάστημα (σχ1.1). Μεταξύ βλαστού και φύλλου σχηματίζεται ένας οφθαλμός από τον οποίο θα σχηματισθεί ένα νέο κλαδί. Μέσα από μία σειρά κυτταροδιαρρέσεων στο σημείο του

ανοίγματος των οφθαλμών αναπτύσσεται και το φύλλο. Τα φύλλα μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης απορροφούν  $\text{CO}_2$  και Φωτοσυνθετική Ενέργεια μέσω των οποίων παράγουν οργανικές ουσίες. Φωτοσυνθετική Ενέργεια ή PAR (Photosynthetic Active Radiation) καλείται η ακτινοβολία η οποία εκφράζει την ενέργεια ανά δευτερόλεπτο μεταξύ 400 και 700 nm ανά μονάδα εμβαδού ( $\text{W/m}^2$ ). Τέλος υπεύθυνα για την γονιμοποίηση των φυτών είναι τα άνθη.



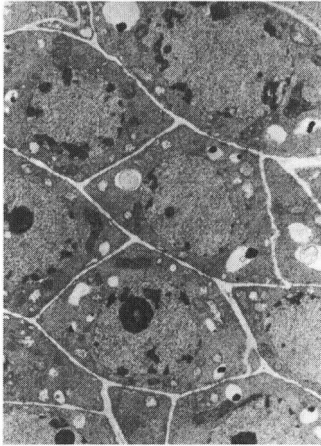
**Σχήμα 1.1:** Φυτική δομή.

### 1.2.1 Το φυτικό κύτταρο

Όλοι οι βιολογικοί οργανισμοί αποτελούνται από κύτταρα. Κύτταρο καλείται το μικρότερο δομικό συστατικό της έμβιας ύλης. Το κύτταρο αποτελεί τη βιολογικά δομική μονάδα που εκδηλώνει το φαινόμενο της ζωής και αποτελείται από μια ομάδα μορίων σε δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους σε μια αναλογία κατά προσέγγιση από: νερό 75-85%, πρωτεΐνες 10-20%, λιπίδια 2-3%, υδατάνθρακες 1% και ανόργανα υλικά (οξέα, βάσεις, άλατα) 1%. Μεταξύ όμως των ζωντανών ειδών (ζωικών,



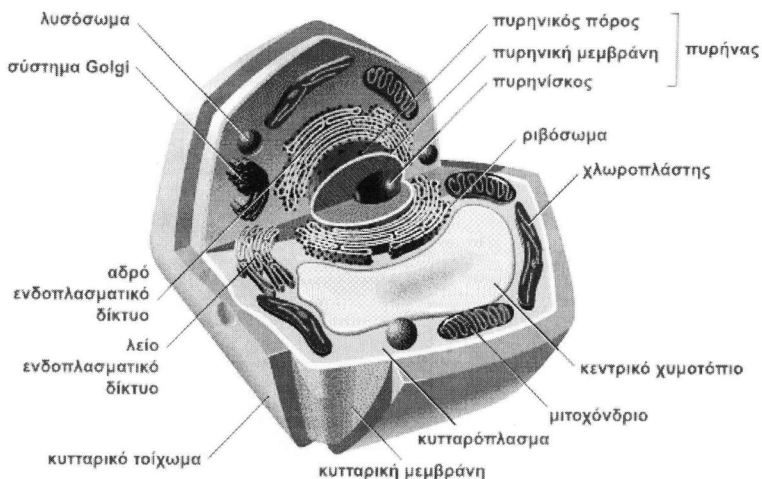
φυτικών) τα κύτταρα διαφέρουν ω προς κάποια βιολογικά χαρακτηριστικά τους. Ειδικότερα για τα φυτικά κύτταρα σε σχέση με τα ζωικά οι βιολογικές διαφορές εστιάζονται ως προς το κυτταρικό τοίχωμα, τη φωτοσύνθεση στους χλωροπλάστες τη συχνή χρήση των χυμοτοπιών και την σύνδεση των κυττάρων μέσω πλασμοδεσμών. Το μέγεθος ενός φυτικού κυττάρου ποικίλει σε σχέση με το είδος του φυτικού οργανισμού (σχ1.2).



Σχήμα 1.2: Μεγέθυνση κύτταρων φυτού ντομάτας

Το μέρη (σχ.1.3) από τα οποία αποτελείται ένα φυτικό κύτταρο είναι:

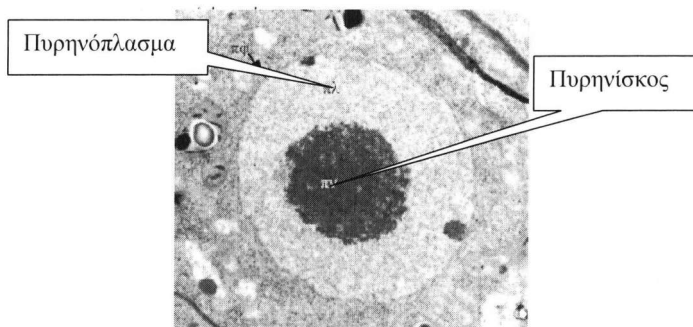
1. Ο πυρήνας
2. Το ενδοπλασματικό δίκτυο
3. Το σύμπλεγμα Golgi
4. Τα χυμοτόπια
5. Οι χλωροπλάστες
6. Τα λυσοσώματα
7. Τα ριβοσωμάτια
8. Τα μιτοχόνδρια
9. Το κυτταρικός σκελετός
10. Η κυτταρική μεμβράνη



Σχήμα 1.3: Δομή φυτικού κυττάρου

### 1. Ο πυρήνας

Το εσωτερικό του πυρήνα σε σχήμα σφαιρικό ή ωοειδές με πορώδη επιφάνεια περιλαμβάνεται από το πυρηνόπλασμα, στο οποίο περιέχονται το σύνολο σχεδόν του DNA ένας ή περισσότεροι πυρηνίσκοι και διάφορες χημικές ενώσεις (νουκλεοτίδια, ένζυμα, πρωτεΐνες κ.ά.). Ο πυρηνίσκος αποτελείται από RNA και DNA και είναι υπεύθυνος για την δημιουργία των rRNA. Ο πυρήνας βάση των πληροφοριών που έχει στη δομή του ορίζει τις κυτταρικές λειτουργίες, διπλασιάζει το γενετικό υλικό για τη γέννηση νέων κυττάρων κ.α. (σχ1.4)



Σχήμα 1.4: Πυρήνας φυτικού κυττάρου (Φωτ. Κ. Φασσέας).

## 2. Το ενδοπλασματικό δίκτυο

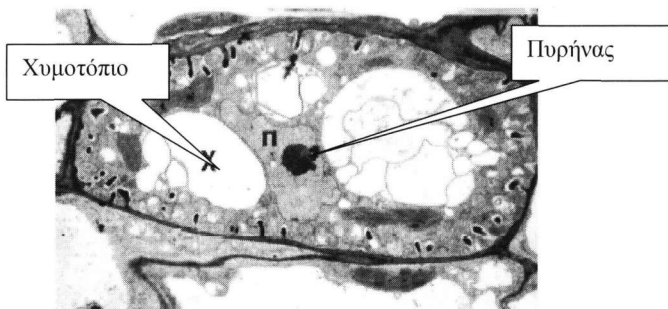
Το ενδοπλασματικό δίκτυο (λείο και αδρό) είναι ένα σύνολο αγωγών και κύστεων μέρος του ενδομεμβρανικού συστήματος μέσα στο κυτταρόπλασμα. Σκοπός του ενδοπλασματικού δικτύου είναι η μεταφορά ουσιών μέσα στο κυτταρόπλασμα.

## 3. Σύμπλεγμα Golgi

Το σύστημα Golgi έχει ως σκοπό τη συγκέντρωση και την τροποποίηση των πρωτεϊνών που παράγονται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο.

## 4. Χυμοτόπιο

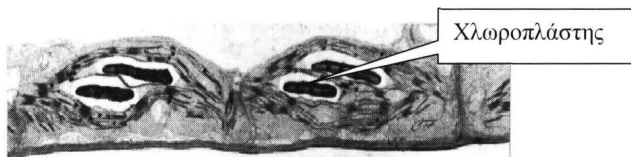
Τα χυμοτόπια είναι κυστίδια θρεπτικών ουσιών (π.χ. σακχαρόζης) με υδάτινη μεμβράνη λειτουργώντας ως αποθήκες ενέργειας (σχ1.5).



Σχήμα 1.5: Πυρήνας και χυμοτόπιο κυτάρου (Φωτ. Κ. Φασσέας).

## 5. Χλωροπλάστες

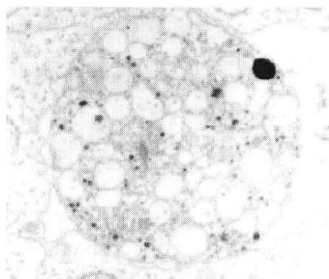
Οι χλωροπλάστες είναι οργανίδια στα οποία λαμβάνει χώρα η διαδικασία της φωτοσύνθεσης(σχ1.6).



Σχήμα 1.6: Χλωροπλάστες (φωτ. Κ. Φασσέας).

## 6. Λυσοσώματα

Τα λυσοσώματα στη σύνθεση τους περιέχουν πεπτικά υδρολυτικά ένζυμα για την πέψη τροφών που έχουν μπει στο κύτταρο και τη διάσπαση εξωκυτταρικών στοιχείων με τη διαδικασία της φαγοκύτωσης για τη δημιουργία ενζύμων στο κύτταρο (σχ1.7).



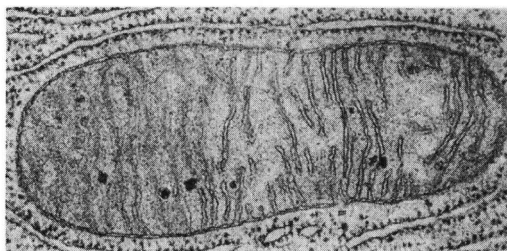
Σχήμα 1.7: Λυσόσωμα φυτικού κυττάρου (Φωτ. Κ. Φασσέας).

## 7. Ριβοσώματα

Τα ριβοσώματα συμβάλουν στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης.

## 8. Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια ο ρόλος των οποίων είναι οι ενεργειακή μετατροπή των βιολογικών μακρομορίων για την απόδοση ενέργειας στο κύτταρο (σχ1.8).



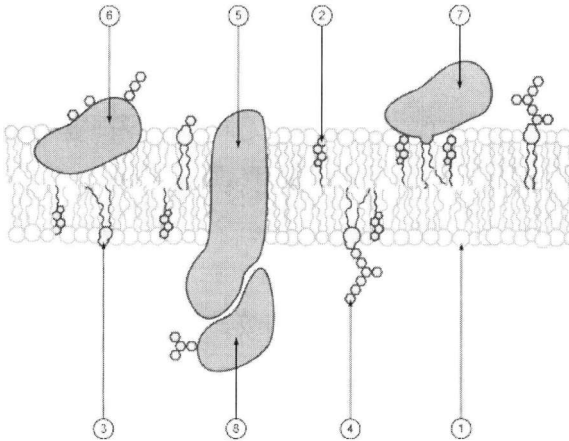
Σχήμα 1.8: Μιτοχόνδριο

## 9. Κυτταρικός σκελετός

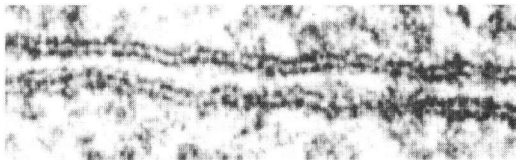
Ο κυτταρικός σκελετός είναι ένα πλέγμα μικροϊνιδίων με τη βοήθεια του οποίου συγκρατούνται όλα τα δομικά στοιχεία του κυττάρου.

### 10. Κυτταρική μεμβράνη

Στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου υπάρχει η κυτταρική μεμβράνη ή πλασματική μεμβράνη η οποία αποτελείται από πρωτεΐνες, λιπίδια και φωσφολιπίδια. Ο σκοπός την κυτταρικής μεμβράνης είναι η συγκράτηση του κυττάρου σε σταθερό σχήμα (σχ1.9). Εκτός της κυτταρικής μεμβράνης συναντάμε και ένα επιπρόσθετο περίβλημα από πολυσακχαρίτη κυτταρίνης που καλείται κυτταρικό τοίχωμα. Χαρακτηριστικό της κυτταρικής μεμβράνης είναι η ημιπερατότητα της, επιτρέποντας σε ορισμένες ουσίες μέσω ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης στα εξωτερικά άκρα της μεμβράνης να εισέρχονται και να εξέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου. Επίσης μέσω της κυτταρικής μεμβράνης γίνεται μετάδοση μηνυμάτων μεταξύ των κυττάρων και του περιβάλλοντος, καθώς επίσης μεταφορά και αποθήκευσης ενέργειας (σχ1.10).

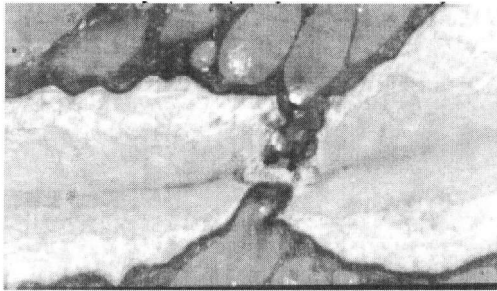


**Σχήμα 1.9:** Δομή κυτταρικής μεμβράνης Φωσφολιπίδια, 2. Χοληστερόλη, 3. Γλυκολιπίδια, 4. Σάκχαρα, 5-8 Πρωτεΐνες.



**Σχήμα 1.10:** Δύο μοναδιαίες μεμβράνες (Φωτ. Κ. Φασσέας).

Το 1972 οι S. Singer και G. Nicholson πρότειναν το μοντέλο του 'υγρού – μωσαϊκού', σύμφωνα με το οποίο μόρια πρωτεϊνών σε σχηματισμό μωσαϊκού δημιουργούν την επιφάνεια της μεμβράνης. Η κυτταρική μεμβράνη λόγω άνισης κατανομής των ιόντων μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης είναι φορτισμένη αρνητικά σε σχέση με το εσωτερικό του κυττάρου. Τέλος μεταξύ των κυττάρων συναντάμε τις πλασμοδέσμες. Οι πλασμοδέσμες είναι δομές πλάτους 20 - 40 nm που εκτείνονται μεταξύ κυττάρων μέσω των οποίων μεταφέρονται ιόντα και μόρια, επιτρέποντας την επικοινωνία των κυττάρων (σχ1.11).

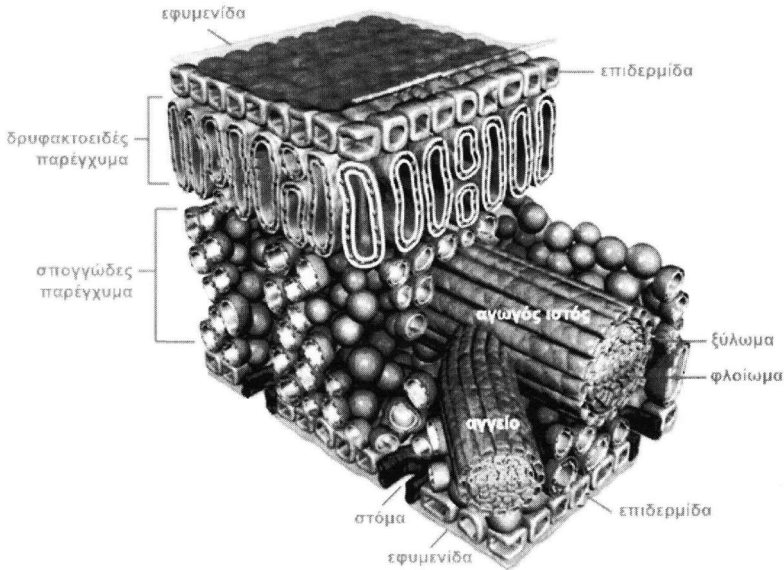


**Σχήμα 1.11:** Πλασμοδέσμες (Φωτ. Κ. Φασσέας).

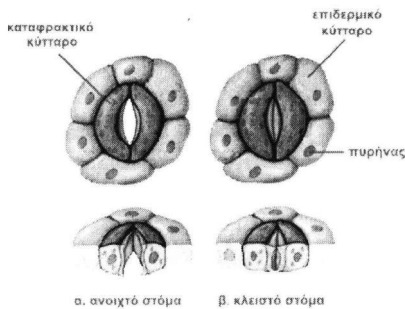
### 1.2.2 Η δομή του φύλλου

Ένα φύλλο αποτελείται από το μεσόφυλλο το οποίο βρίσκεται μεταξύ της άνω και κάτω επιδερμίδας. Όπως απεικονίζεται στο σχήμα 1.12 το μεσόφυλλο διασχίζεται από ένα αγωγό σύστημα ενώ το διάστημα μεταξύ της άνω και κάτω επιδερμίδας αποτελείται συνήθως από ένα φωτοσυνθετικό παρέγχυμα (δρυφακτοειδές και σπογγώδες) με κύτταρα πλούσια σε χλωροπλάστες, με τα οποία το φυτικό κύτταρο επιτελεί τη μοναδική για τη ζωή διαδικασία, τη φωτοσύνθεση. Τέλος πάνω από την επιδερμίδα βρίσκεται η εφυμενίδα που έχει ως σκοπό τη προστασία του φύλλου από απώλεια νερού. Το ξηλώμα του φύλλου αποσκοπεί στη μεταφορά του νερού και των ανόργανων αλάτων στο φύλλο ενώ το φλοίωμα αποτελεί το αγωγό σύστημα για τη μεταφορά των ουσιών της φωτοσύνθεσης. Το αγωγό σύστημα αποτελεί την 'νεύρωση' του φύλλου. Κατά μήκος του ξηλώματος διακλαδίζονται αγγεία (αγωγά στοιχεία του ξηλώματος) και οι ηθμοσωλήνες (αγωγά στοιχεία του φλοιώματος). Τα

στόματα των φύλλων έχουν συνήθως νεφροειδές σχήμα και βρίσκονται στην κάτω επιδερμίδα του φύλλου. Τα στόματα είναι οργανικά στοιχεία με τα οποία το φύλλο πραγματοποιεί τις ανταλλαγές αερίων,  $\text{CO}_2$ , και  $\text{O}_2$  με τη διαδικασία της διαπνοής. Κατά την διάρκεια της διαπνοής ο μεσοκυττάριος χώρος του στόματος ανοίγει και κλείνει (σχ1.13). Ο ρυθμός απώλειας νερού επιτυγχάνεται με τη μέτρηση της διαπνοής του φυτού.



**Σχήμα 1.12:** Τομή φύλλου.



**Σχήμα 1.13:** Άνοιγμα και κλείσιμο στομάτων.

### 1.3 Ηλεκτροφυσιολογία των ανώτερων φυτικών οργανισμών

Το 1791 ο Luigi Galvani παρουσίασε τα πρώτα στοιχεία ενός ηλεκτρικού σήματος ως συστατικό που βοηθούσε στην μυϊκή συστολή (Galvani, L. 1791). Πολλές έρευνες άρχισαν να πραγματοποιούνται μετά την ανακοίνωση του Galvani όπως του Alexander von Humboldt (1797) που πραγματοποίησε περίπου 4000 πειράματα σε ζώα (όπως και στον εαυτό του) καθώς και σε φυτά.

O Botting, D. (1973) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η βιοηλεκτρική φύση των ζώων και των φυτών είναι βασισμένη στις ίδιες αρχές. Αργότερα ο Emile du Bois-Reymond χρησιμοποίησε ένα γαλβανόμετρο για να μετρήσει το ηλεκτρικό δυναμικό ανάμεσα στην άθικτη επιφάνεια και την κοπή ενός σημείου των ινών του φυτού (πρώτη ακατέργαστη καταγραφή της δυνατότητας των μεμβρανών). Διαπιστώθηκε από αυτή την έρευνα ότι τα μηχανικά και ηλεκτρικά ερεθίσματα προκαλούν ένα γρήγορο αρνητικό σήμα. Τα πειράματα αυτά ήταν η πρώτη οργανική καταγραφή των αποκαλούμενων δυναμικών δράσης (action potential). Τα επόμενα 30 έτη, τα δυναμικά δράσης μετρήθηκαν σε δύο ευαίσθητα φυτά *Dionaea muscipula* (Venus fly trap)(Burdon-Sanderson, J. 1873) and *Mimosa pudica* (Kunkel, K.A.J.1878; Bose, J.Ch. 1907; Bose, J.Ch.1926).

Το 1881 το μεγαλύτερο μέρος εργασίας του Darwin C (Darwin 1881), περιλάμβανε φυτά που παγίδευαν έντομα, όπως το ευαίσθητο φυτό *pudica Mimosa*, το οποίο είχε πολύ γρήγορες αντιδράσεις και αποτελούσε το πιο δημοφιλές φυτό για αυτές τις μελέτες. Μέχρι περίπου το 1880 θεωρούσαν ότι τα αποτελέσματα των ηλεκτρικών σημάτων ήταν κοινά για τα φυτά και τα ζώα, πράγμα που αποτελούσε τον μόνο μηχανισμό που ήταν γνωστός για τη μεσοκυττάρια επικοινωνία σε οποιοδήποτε σύστημα διαβίωσης. Εντούτοις, αμέσως μετά από την εργασία του για τα ηλεκτρικά σήματα, ο Darwin C έθεσε ως αίτημα την ύπαρξη όχι μόνο χημικών διεργασιών αλλά ηλεκτρικών σημάτων και στα φυτά.

Στο γύρισμα του εικοστού αιώνα με την ανακάλυψη των ζωικών ορμονών και την εμφάνιση του τομέα της ενδοκρινολογίας έγινε αποδεκτό ότι τόσο τα ζώα όσο και τα φυτά είχαν και τους δύο τύπους σημάτων. Η εργασία για τα ηλεκτρικά σήματα στα φυτά συνεχίστηκε στον εικοστό αιώνα, ειδικά στην Ινδία (Bose and Das, 1925) διαπιστώνοντας ότι τα ηλεκτρικά σήματα προκαλούνται από χημικές διεργασίες



(Gunar.I.I. & Sinykhin.A.M. 1963; Pickard 1973), όμως η ύπαρξη ηλεκτρικών σημάτων τουλάχιστον στα «κανονικά» φυτά ήταν αμφισβητήσιμη.

Κατά συνέπεια, η έρευνα για τα ηλεκτρικά σήματα στα φυτά βρέθηκε σε αδιέξοδο, με αποτέλεσμα να σταματήσουν και οι χρηματοδοτήσεις για δύο δεκαετίες. Εντούτοις, και παρά αυτήν την έλλειψη χρηματοδότησης ο τομέας αυτός ασχολείται πάλι μ' αυτό το θέμα τα τελευταία εικοσιπέντε χρόνια και πιστεύεται ότι όντως τα φυτά εκπέμπουν ηλεκτρικά σήματα. Αυτό προήλθε από την συνειδητοποίηση ότι τα «κανονικά» φυτά μπορούν να έχουν πολύ γρήγορες συστηματικές αντιδράσεις σε διεργασίες των φυτικών γονιδίων (Davies και Schuster 1981a; Davies και Schuster 1981b).

Αναφορά για τη θεμελιώδη ύπαρξη των ηλεκτρικών σημάτων αν όχι σε όλους τους οργανισμούς τουλάχιστον στους περισσότερους των φυτών περιλαμβάνονται σε άρθρα από το «Πρώτο Συμπόσιο στην Νευρολογία των Φυτών» (“First Symposium in Plant Neurobiology”), (<http://izmb.de/zellbio/volkmann/index.html>) (Baluska et al. 2006).

Στη σύγχρονη εποχή πολλές ερευνητικές μελέτες σημείωσαν σημαντική πρόοδο στη σύνδεση των ηλεκτρικών σημάτων με φυσιολογικά φαινόμενα των φυτικών οργανισμών σε θέματα διαπνοής, φωτοσύνθεσης (Gunar & Sinykhin 1963; Koziolek et al. 2003), γωνιμοποίησης (Sinykhin & Britikov 1967; Spanjers 1981), μεταφορά φλοιώματος (Opritov 1978; Fromm & Eschrich 1988; Fromm and Bauer 1994) και διεργασιών άμυνας των φυτών σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες του περιβάλλον τους (Wildon et al. 1992; Malone et al. 1994; Herde et al. 1995, 1996; Volkov & Haak 1995; Stankovic & Davies 1996, 1998; Volkov 2000). Στην συνέχεια εξετάζουμε την επίδραση βιοτικών και αβιοτικών καταστάσεων στην ηλεκτροφυσιολογία των φυτών.

## **1.4 Αβιοτική και Βιοτική καταπόνηση**

### **1.4.1 Αβιοτική καταπόνηση**

Μία σημαντική διάκριση των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων των φυτών από άλλους σύνθετους πολυκύτταρους οργανισμούς είναι ότι τα φυτά είναι στατικοί οργανισμοί και έτσι δεν μπορούν να δραπετεύσουν από τις περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Η

αβιοτική καταπόνηση είναι η αρχική αιτία της απώλειας συγκομιδών παγκοσμίως (μείωση παραγωγής περισσότερο από 50%). Οι αβιοτικές καταπονήσεις, όπως η ξηρασία, η αλατότητα, οι ακραίες θερμοκρασίες, η χημική τοξικότητα και η οξειδωτική πίεση είναι σοβαρές απειλές στη γεωργία, με άμεσο αποτέλεσμα την επιδείνωση των καταστροφών του περιβάλλοντος (Wang et al. 2003).

Η αβιοτική καταπόνηση οδηγεί συχνά στις μορφολογικές, φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές αλλαγές που έχουν επιπτώσεις στην ανάπτυξη των φυτών και την παραγωγικότητα. Αν και σαφώς διαφορετικοί παράγοντες στο φυσικό χαρακτήρα τους (αλατότητας του νερού, της ηλιακής ακτινοβολία, της θερμότητα και της υγρασίας), κάθε ένας από τους παραπάνω επιδρά και ενεργοποιεί συγκεκριμένες αντιδράσεις των φυτών ενεργώντας στο μηχανισμό σημάτων των κυττάρων, γεγονός που έχει αντίκτυπο στην ισορροπία των ιόντων σε όλη τη πλασματική μεμβράνη, οδηγώντας στην αλλαγή του διαμεμβρανικού δυναμικού ( $V_m$ ) (Knight & Knight 2001; Zhu 2001, 2002)

Η αξιολόγηση του πλασματικού διαμεμβρανικού δυναμικού ( $V_m$ ) των φυτικών κυττάρων είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την αποκρυπτογράφηση των διαφόρων γεγονότων τόσο για τις βιοτικές όσο και για τις αβιοτικές επιδράσεις. Γενικά, οι παραλλαγές του διαμεμβρανικού δυναμικού εξαρτώνται από τη μη ισορροπημένη διανομή ιόντων στη πλασματική μεμβράνη (Wang et al. 2003).

Κάτω από αβιοτική καταπόνηση τα φυτά μπορεί ν' αντιδρούν στη θερμότητα (Dat et al. 1998; Larkindale & Knight 2002), στη UV ακτινοβολία (Brosche & Strid 2003), στη φωτοαναστολή (*photoinhibition*) (Muller-Moule et al. 2003), στη πίεση βαρέων μετάλλων (Pinto et al. 2003). Όλοι αυτοί οι παράγοντες έχουν αντίκτυπο στην ισορροπία των ιόντων σε όλη τη πλασματική μεμβράνη, και ως εκ τούτου στο διαμεμβρανικό δυναμικό. Δεδομένου ότι οι ιοντικές ροές μέσω των καναλιών επηρεάζουν άμεσα το διαμεμβρανικό δυναμικό μπορούν να θεωρηθούν σημαντικοί παράγοντες που προκαλούν ηλεκτρικά σήματα.

Το ερέθισμα που προκαλεί αλλαγή στο διαμεμβρανικό δυναμικό και τα κύματα διέγερσης που διαβιβάζουν πληροφορίες από το ένα μέρος των φυτών σε ένα άλλο μπορούν να μεταβιβαστούν με υψηλή ταχύτητα διάδοσης, που στη σόγια, μπορεί να φθάσει σε 40m/s (Shevstova et al. 2001).

### 1.4.2 Βιοτική καταπόνηση

Ως πρωτεύοντας παραγωγός στην τροφική αλυσίδα, τα φυτά είναι η πηγή του άνθρακα, της πρωτεΐνης, των βιταμινών και των ανόργανων αλάτων για όλους τους ετεροτροφικούς οργανισμούς, από τα βακτηρίδια μέχρι τους ανθρώπους. Κατά συνέπεια μπορεί να καθοριστεί η βιοτική καταπόνηση ως πίεση που τίθεται στα φυτά από οργανισμούς. Τα τελευταία χρόνια έχει προσδιοριστεί η μοριακή βάση των βιοτικών αντιδράσεων καταπόνησης στα φυτά. (Maleck et al. 2000, Karpinski et al. 2003).

Εκτός της βιοτικής καταπόνησης, η πιο μελετημένες καταπονήσεις είναι οι μικροβιακές μολύνσεις και η επίθεση χορτοφάγων. Εκατομμύρια χρόνων συνεχούς αλληλεπίδρασης μεταξύ των φυτών και των χορτοφάγων παθογόνων επέτρεψαν την εξέλιξη των αμυντικών μηχανισμών και από τις δύο πλευρές, δίνοντας την ικανότητα στα φυτά να αντιδράσουν στις διάφορες επιδράσεις του περιβάλλοντος και των χορτοφάγων:

α) με την παραγωγή τοξικών όπλων (όπως δευτεροβάθμιοι μεταβολίτες) και

β) με την ικανότητα ν' ανιχνεύουν και να αποκρίνονται γρήγορα σε μία πιθανή ζημία του ιστού, με την ενεργοποίηση των σημάτων και των γονιδίων ή με το να προσελκύσουν αρπακτικά που θα τα απαλλάξουν από τα χορτοφάγα αυτά.

Από την άλλη πλευρά τα χορτοφάγα και τα παθογόνα μικρόβια έχουν την ικανότητα να αποτοξινωθούν από τα δηλητήρια αυτά, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μεταφοράς σημάτων ή και την ενεργοποίηση των γονιδίων των φυτών. Τα παθογόνα μικρόβια μπορούν να επιτεθούν στα φύλλα, τους μίσχους ή τις ρίζες.

Τα τρέχοντα πρότυπα των μηχανισμών αντίδρασης των φυτών ενάντια στη μόλυνση από παθογόνα μικρόβια είναι βασισμένα στα ζωικά πρότυπα και έχουν συνδεθεί πρόσφατα με το φωτοασθητήριο δίκτυο και τη σύνθετη εμπλοκή οξυγόνου στο φωτοσύστημα II (PSII) (Abbink et al. 2002). Μεγάλη πρόοδος έχει σημειωθεί στην κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους τα φυτά ανιχνεύουν και αμύνονται ενάντια στα παθογόνα μικρόβια. Κατά συνέπεια, τα φυτά κατέχουν βιοχημικούς

αμυντικούς μηχανισμούς που αποτρέπουν ή μειώνουν την περαιτέρω ζημία τόσο από την αβιοτική όσο και τη βιοτική πίεση.

Σε όλο αυτό, το πρώτο εμπόδιο μεταξύ του φυτού και του εισβολέα του είναι η πλασματική μεμβράνη. Η αλλαγή της ισορροπημένης ροής των διαφόρων ιόντων και των οργανικών οξέων/ μορίων παράγει μια γρήγορη αντίδραση που μπορεί να οριστεί ως ένα από τα πρώτα γεγονότα που συμβαίνουν μετά από μια βιοτική επίθεση. Η αποπώλωση του διαμεμβρανικού δυναμικού ( $V_m$ ) είναι μια από τις πρώτες αντιδράσεις της πλασματικής μεμβράνης και εξαρτάται κυρίως από την εκροή ανιόντων που ακολουθείται από την απελευθέρωση ασβεστίου στα εσωτερικά στρώματα. Κατά συνέπεια η ηλεκτροφυσιολογία είναι πράγματι ένα πολύτιμο εργαλείο για να μελετηθεί και να κατανοηθεί η αντίδραση στο αρχικό στάδιο της αλληλεπίδρασης των φυτών με άλλους οργανισμούς, καθώς και να αξιολογηθεί το διαμεμβρανικό δυναμικό ( $V_m$ ).

Οι αντιδράσεις των φυτών σε επίθεση χορτοφάγων είναι σύνθετη και περιλαμβάνει μια σειρά σημάτων, που οδηγούν στην ενεργοποίηση των πολλαπλών αμυντικών στάσεων. Πρόσφατα, οι Maffei και Bossi (Maffei et al. 2004) παρουσίασαν νέες απόψεις ότι η επίθεση χορτοφάγων επάνω σε ένα φύλλο φασολιού Lima συνδέεται με μια ισχυρή αποπώλωση διαμεμβρανικού δυναμικού στη ζώνη δαγκωμάτων που προκαλεί ένα κύμα της διάδοσης αποπώλωσης του  $V_m$  σε όλο το επιτιθέμενο φύλλο. Επίσης η παρουσία προνυμφών μετέβαλε το διαμεμβρανικό δυναμικό.

## 1.5 Σημαντικοί ορισμοί και τύποι βιοσημάτων των φυτών

Ένα ερέθισμα (stimulus) είναι οτιδήποτε μπορεί να προκαλέσει την αντίδραση μέσα στο φυτό, ενώ ένα σήμα είναι οτιδήποτε παράγεται και διαβιβάζεται από τα φυτά σε απάντηση σ' εκείνο το ερέθισμα. Κατά συνέπεια το ερέθισμα δίνεται εξωτερικά στο φυτό, ενώ το σήμα πρέπει να παραχθεί μέσα στο φυτό. Στη συνέχεια το ίδιο το σήμα γίνεται ερέθισμα, όταν φτάνει στον προορισμό του και προκαλεί την αντίδραση του φυτού. Για παράδειγμα όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό δυναμικό στο φυτό μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή ενός ηλεκτρικού σήματος, το οποίο ονομάζεται δυναμικό δράσης (action potential AP) και διαβιβάζεται μέσω του φυτού. Αυτό το διαβιβαστικό

ηλεκτρικό δυναμικό συσχετίζεται την εισροή ασβεστίου μέσα στο κυτταρόπλασμα ακολουθούμενο από μίξη χλωρίου και καλίου.

Αυτά τα υποσυστατικά του AP σήματος, όπως το αυξανόμενο κυτοσολικό ασβέστιο, γίνονται ερεθίσματα που προκαλούν την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C. Η φωσφολιπάση C φτάνει στην πλασματική μεμβράνη, όπου γίνεται ερέθισμα και προκαλεί την απελευθέρωση των μεταβολιτών του φωσφορικού άλατος. Αυτά τα μεταβολικά σήματα ( $IP_3$ ) μπορούν έπειτα να δράσουν σαν ερέθισμα και να προκαλέσουν την απελευθέρωση περισσότερου ασβεστίου από τα ενδοκυτταρικά στρώματα. Τα σήματα  $IP_3$  μπορούν να ενεργήσουν ως ερεθίσματα διαμορφώνοντας την γονιδιακή συμπεριφορά (Davies & Stankovic 2006).

*Σημείωση: Τριφωσφορική ινοσιτόλη ή ινοσιτόλη  $IP_3$ , μαζί με διακυλογλυκερόλη (DAG), δημιουργούν μόριο 'μηνύματος' σε ρόλο μεταγωγής σήματος και λιπιδίων σηματοδότησης σε βιολογικά κύτταρα.*

Συνεπώς η ακολουθία που μεταβιβάζει πληροφορίες είναι:

---

**ερέθισμα → σήμα = ερέθισμα → σήμα = ερέθισμα → σήμα**

---

*Σημαντικός στόχος των σύγχρονων ερευνών για τα ηλεκτρικά σήματα στα φυτά είναι να αποκρυσταλλωθούν όσο το δυνατόν περισσότερα από τα παραπάνω βήματα.*

Η σειρά των εμφανιζόμενων ηλεκτρικών σημάτων στα φυτά βάση των παραπάνω γεγονότων, περιλαμβάνει:

1. **Το δυναμικό ηρεμίας ή ανάπαυσης.**
2. **Το δυναμικό δράσης** (action potential AP), συμπεριλαμβανομένου του φυσικού δυναμικού δράσης (spontaneous action potential-SAPS) (Pickard 1973; Gradmann and Mummert 1980; Simons 1981; Wayne 1994; Ksenzhek and Volkov 1998; Davies 2004).
3. **Το μεταβλητό δυναμικό** (variation potential VP) καλούμενο και ως αργό κύμα (slow wave-SW, Stahlberg and Cosgrove 1996).

4. **Τη μεταβατική τάση** (voltage transient VT) ή τάση αιχμής (voltage spikes VS) (Pickard 1984a,b; Krol and Trebacz 1999).
5. **Το δυναμικό ρυθμικής ηλεκτρικής δραστηριότητας** (rhythmical electrical activity REA) (Mitsumo and Sibaoka 1989; Antkowiak et al. 1991; Davies et al. 1991).

Λόγω της ακολουθίας των βιοχημικών γεγονότων:

---

**ερέθισμα → σήμα = ερέθισμα → σήμα = ερέθισμα → σήμα**

---

όλες αυτές οι ηλεκτρικές δραστηριότητες περιλαμβάνουν αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης (membrane potential MP) των κύτταρων. Ειδικότερα αναφερόμαστε σ' εκείνες τις αλλαγές του δυναμικού μεμβράνης (MP), οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα την διαβίβαση σημάτων σε μεγάλες αποστάσεις (long distances) κάτω από την ακολουθία με μορφή ροής ιόντων:

**ερέθισμα → αντίδραση**

Αυτή η ροή ιόντων κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης προκαλεί μερικές αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης (MP) οι οποίες μπορούν να συνδυαστούν με τις μεταβολές των παραπάνω ηλεκτρικών δυναμικών. Ιδιαίτερα αναφερόμενοι στα κύτταρα της ρίζας, τα οποία εμφανίζουν μεγάλο αριθμό ιόντων που μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη, οι μεταβολές στο δυναμικό της μεμβράνης συνδέεται με ισχυρές μεταβολές ηλεκτρικών σημάτων.

Οι μηχανισμοί και οι διαβιβάσεις της μετάδοσης των AP ή VP των φυτών έχουν ερευνηθεί από διάφορους ερευνητές (Davies, 1987; Julien et al., 1991; Stankovic & Davies, 1996; Stankovic et al., 1998; Dziubinska et al., 2003; Dziubinska et al., 2001; Volkov et al., 2005). Όταν τα ηλεκτρικά σήματα (διακυμάνσεις) παράγονται μόνο τοπικά και δεν μεταφέρονται στα άλλα μέρη του φυτού, που ορίζεται ως ηλεκτρική δυνατότητα (LEP) (Lou, 1996). Η LEP είναι μια υπό όρους απάντηση που προκαλείται από φυσικές παραλλαγές των παραγόντων όπως το νερό, το λίπασμα, ο φωτισμός, η θερμοκρασία και η υγρασία (Leng, 1998; Hu, 2003). Παρόλο που το

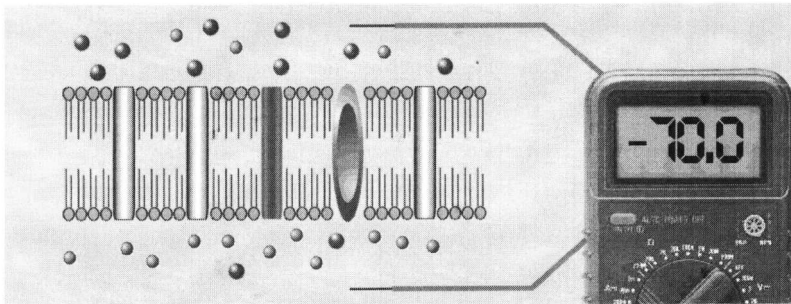
LEP δεν μπορεί να μεταφερθεί επηρεάζει σημαντικά τη φυσιολογική κατάσταση του φυτού (Ren et al., 1993).

Στη συνέχεια εστιάζουμε κυρίως στα τρία πιο σημαντικά σήματα μεγάλης απόστασης: δυναμικό ανάπαυσης ή ηρεμίας, δυναμικ δράσης (action potential AP), και μεταβλητό δυναμικού (variation potential VP), για τα οποία έχουν γίνει ενδοκυτταρικές καταγραφές (Wayne 1994) και μπορούν να οριστούν ως ηλεκτρικά σήματα λόγω των προκαλούμενων ερεθισμάτων από αυτά.

### 1.5.1 Δυναμικό ηρεμίας- ανάπαυσης

Δυναμικό ηρεμίας καλείται το δυναμικό η διαφορά δυναμικού κατά μήκος των μεμβρανών των κυττάρων σε συνθήκες ηρεμίας. Το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης οφείλεται στην μεγάλη διαφορά των αρνητικών φορτίων έναντι των θετικών ιόντων με την συγκέντρωσή τους στην εξωτερική και εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης αφήνοντας ηλεκτρικά ουδέτερο το ενδοκυττάριο σύστημα. Το δυναμικό ηρεμίας έχει αρνητική φόρτιση με τιμή πλάτους της τάξης των mV (σχ1.14). Η τιμή του δυναμικού ηρεμίας της μεμβράνης προσδιορίζεται από:

1. τη διαφορά στη συγκέντρωση ιόντων μεταξύ ενδοκυττάρου και εξωκυττάρου χώρου.
2. το βαθμό διαπερατότητας της μεμβράνης στα διάφορα ιόντα.



Σχήμα 1.14 : Δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης.

### 1.5.2 Δυναμικό Δράσης

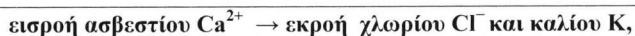
Το δυναμικό δράσης (AP) είναι το μόνο σήμα μεγάλης απόστασης, το οποίο μπορεί να θεωρηθεί «γνήσιο» ηλεκτρικό σήμα (Pickard 1973; Gradmann and Mummert 1980; Simons 1981; Wayne 1994; Ksenzhek and Volkov 1998; Davies 2004). Κύριο χαρακτηριστικό του δυναμικού δράσης είναι η επαναληψιμότητα του με σταθερό πλάτος και ταχύτητα μετάδοσης (Zawadzki et al. 1991; Dziubinska 2003).

Το δυναμικό δράσης αυτοδιαβιβάζεται και η παρουσία του εξαρτάται από τα ιοντικά κανάλια του φυτού και της πύλης καναλιών (κανάλι ασβεστίου) (voltage-gate cannals VGC), τα οποία ανταποκρίνονται στις αλλαγές του δυναμικού μεμβράνης (MP).

Κάθε κύτταρο περιέχει μια τάση πύλης καναλιού η οποία μπορεί να παράγει και να μεταφέρει ένα δυναμικό δράσης λόγω της μεταβλητότητας στα επίπεδα ασβεστίου (Tester 1990; Wayne 1994, Fisahn et al. 2004).

Έρευνες δείχνουν ότι η αύξηση του ασβεστίου δεν προέρχεται από την πλασματική μεμβράνη, αλλά απελευθερώνεται από τα εσωτερικά στρώματα και ίσως προκαλείται από την διεργασία  $IP_3$  (Plieth et al. 1998; Biskup et al. 1999; Wacke and Thiel 2001).

Μελέτες που αφορούν την παραπάνω διεργασία έχουν γίνει για γιγαντιαία φυκοκύτταρα (giant algal cells) (Wayne 1994; Shimmen 1997) στο φυτό *Mimosa* (Samejima and Sibaoka 1980) και ακόμη σε δέντρα όπως στην ιτιά (Fromm and Spanswick 1993) καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η αλλαγή στο δυναμικό μεμβράνης MP προκαλεί την ίδια παρακάτω ακολουθία γεγονότων η οποία επαναλαμβάνεται κατά μήκος των κυττάρων:



Στα φυτά με αγγεία, η αρχική οδός μετάδοσης ενός σήματος AP σε μεγάλη απόσταση είναι το φλοίομα (Eschrich et al. 1988; Fromm and Spanswick 1993; Dziubinska et al. 2001; Dziubinska 2003), από το οποίο όλα τα κύτταρα με σύνδεση στο φλοίομα είναι πιθανό να «ενημερωθούν» και να αποκριθούν στο πέρασμα ενός σήματος δυναμικού δράσης AP.



Το δυναμικό μεμβράνης των φυτικών κύτταρων είναι αρνητικό. Η εισροή ασβεστίου προκαλεί την αποπόλωση, δηλαδή λιγότερο αρνητικό εσωτερικό δυναμικό το οποίο ενισχύεται από την εκροή χλωρίου, και έπειτα εξουδετερώνεται από την εκροή καλίου. Η μεταβλητότητα αυτή δημιουργεί το δυναμικό δράσης. Μόλις ισορροπήσει το μεταβλητό μεμβράνης MP, υπάρχει μια περίοδος καθυστέρησης, κατά την οποία ένα άλλο AP μπορεί να παραχθεί ή να διαβιβαστεί. Αυτό οφείλεται στην προσωρινή αδρανοποίηση του ενός ή του άλλου ιοντικού καναλιού, (κανάλι ασβεστίου VGC). Η μεταφορά σήματος AP σε μεγάλη απόσταση συμβαίνει πρώτιστα στο φλοιώμα και στο φύλλωμα (Davies et al. 1991; Malone 1994, 1996; Mancuso 1999). Η αποπόλωση του κυψελοειδούς δυναμικού των μεμβρανών παραγάγει ένα AP σήμα, που στα ανώτερα φυτά μπορεί διαδίδεται σε μεγάλες αποστάσεις μέσω του φλοιώματος και των πλασμοδεσμών.

### 1.5.3 Δυναμικό μεταβλητότητας

Αντίθετα από το δυναμικό δράσης (AP) που χαρακτηρίζεται ως αυτοδιαβιβαστής, το δυναμικό μεταβλητότητας (VP) είναι μια τοπική αλλαγή στο MP, ως αποτέλεσμα της μετάβασης κάποιου άλλου σήματος (Malone 1994, 1996; Malone et al. 1994a,b; Stankovic et al. 1998; Mancuso 1999). Εντούτοις, η τοπική αλλαγή στο MP πρέπει πάλι να είναι το αποτέλεσμα ιοντικών ροών κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης, αλλά όχι μέσω καναλιού ασβεστίου (VGC), διαφορετικά αυτό θα παρήγαγε ένα σήμα δυναμικού δράσης AP. Το δυναμικό μεταβλητότητας οφείλεται:

- α) σε φαινόμενα τάσης (tensions) και
- β) σε φαινόμενα μεταφοράς χημικών ουσιών.

Δεδομένου ότι το δυναμικό μεταβλητότητας (VP) εξαρτάται από τα ιοντικά κανάλια, (αλλά όχι το VGC), οι αλλαγές σε αυτό, κάτω από φαινόμενα τάσης εξαρτιούνται από τα μηχανοευαίσθητα κανάλια (mechanosensitive channels MSC), ενώ οι αλλαγές που οφείλονται σε φαινόμενα χημικών μεταφορών εξαρτιούνται σε ενεργά κανάλια συμπλοκών (ligand-activated channels LAC) (Roblin and Bonnemain 1985; Davies et al. 1991; Stahlberg and Cosgrove 1995, 1996; Stankovic et al. 1997, 1998; Stankovic and Davies 1997b; Stahlberg et al. 2005).

### 1.5.4 Ερεθίσματα γέννησης σημάτων AP & VP

Ένα σημαντικό ζήτημα αφορά τη διερεύνηση των ειδών των ερεθισμάτων που μπορούν να γεννήσουν σήματα δυναμικού δράσης και δυναμικού μεταβλητότητας. Οι σχετικές ερευνές έχουν κατηγοριοποίηση τα ερεθίσματα σε:

1. μη καταστροφικά και
2. καταστροφικά ερεθίσματα

Τα μη καταστροφικά προκαλούν δυναμικά δράσης (AP) ενώ τα καταστροφικά ερεθίσματα δυναμικά μεταβλητότητας (VP). Το μη καταστροφικό ερέθισμα που προκαλεί το AP περιλαμβάνει ηλεκτρική διαταραχή, μεταβολές φωτεινότητας (Trebacz and Zawadzki 1985), φαινόμενα ψύξης, μεταβολής θερμοκρασίας (Pyatygin et al. 1992). Κάθε ερέθισμα καταστροφής όπως φαινόμενα πληγής των ιστών προκαλούν εμφάνιση σημάτων μεταβλητού δυναμικού (Dziubinska 2003). Παρ' όλα αυτά η γέννηση ενός δυναμικού μεταβλητότητας και ενός δυναμικού δράσης είναι συνδεδεμένη μεταξύ των καθώς ένα καταστροφικό φαινόμενο μπορεί να δημιουργήσει λόγο της εισροής ασβεστίου, εκροής χλωρίου και καλίου αλλαγή στο δυναμικό μεμβράνης MP και τη γέννηση δυναμικού δράσης.

### 1.5.5 Διαφοροποίηση μεταξύ AP & VP σήματος

Ο καταλληλότερος τρόπος διαφοροποίησης μεταξύ αυτών των σημάτων όπως παρουσιάστηκε στον ηλιάνθο (Davies et al. (1991) αποτελεί τη διάκρισης ως προς:

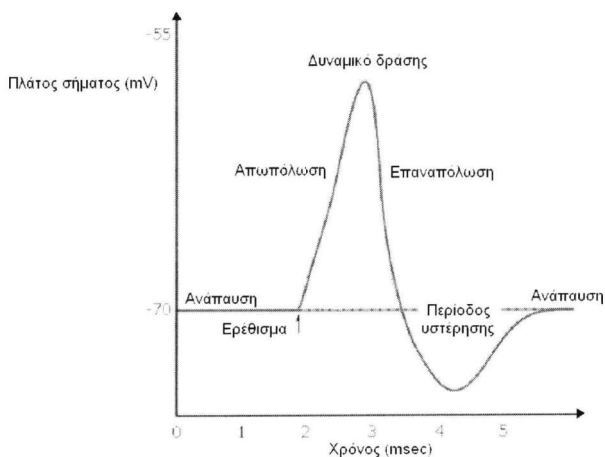
- Τη μορφή του σήματος (δυναμικό αιχμής ή μεταβλητό δυναμικό) ,
- Την ταχύτητα μετάδοσης (χρόνος διάρκειας της μεταβολής)
- Τη σταθερότητα (το πλάτος του σήματος)

Το δυναμικό δράσης AP αποτελείται από μία έντονη άνοδο (rising), μια αιχμή (peak) και από μια γρήγορη επιστροφή (falling rising) στο πλάτος του σήματος. Ένα δυναμικό μεταβλητότητας (όπως δηλώνει και η ονομασία τους) αποτελείται από

απότομη άνοδο που οφείλεται σε διέγερση δυναμικού δράσης και από μια μεταβολή πλάτους στο χρόνο.

Η διάδοση κάθε δυναμικού ακολουθείται από υστέρηση (absolute refractory period.) (σχ1.15) κατά τη διάρκεια της οποίας ένα δεύτερο δυναμικό δεν μπορεί να προκύψει (Volkon et al. 2002c). Το δυναμικό μεταβλητότητας (VP) συνεπώς είναι τελείως διαφορετικό από το δυναμικό δράσης (AP) και επομένως η διαφοροποίηση μεταξύ τους πρέπει να είναι σαφής.

Έχει καταγραφεί ότι η εμφάνιση δυναμικού μεταβλητότητας (VP) παρουσιάζει αλλαγές στην παραμόρφωση του ιστού (συστολή/ χαλάρωση) σε όλα τα φυτά. (Davies et al. 1991; Stahlberg and Cosgrove 1995; Mancuso 1999). Η εκδοχή αυτή επιτρέπει την συσχέτιση της μεταβολής της γεωμετρίας του ιστού με το δυναμικό μεταβλητότητας μέσω αισθητήρων ανίχνευσης θέσης (position sensing transducers (PST)). Η ύπαρξη δυναμικών δράσης AP δεν επιφέρει μεταβολή της γεωμετρίας του ιστού (Davies et al. 1991; Stankovic et al. 1998). Συνεπώς κάθε πειραματική διαδικασία θα πρέπει να γίνεται κάτω από σταθερές παραμέτρους αφού υπάρχει μια λεπτή γραμμή μεταξύ του δυναμικού μεταβλητότητας (VP) και του δυναμικού δράσης (AP). Οποιαδήποτε αλλαγή στο MP, συμπεριλαμβανομένου αυτού που προκαλείται από ένα δυναμικό μεταβλητότητας (VP), μπορεί να προκαλέσει ένα δυναμικό δράσης (AP).



**Σχήμα 1.15:** Αποπόλωση και επαναπόλωση δυναμικού δράσης.

### 1.5.6 Μέτρηση του AP & VP σήματος

Η μέτρηση στο δυναμικό μεμβράνης MP για την ανίχνευση οποιαδήποτε αλλαγής (από σήματα δυναμικού δράσης και δυναμικού μεταβλητότητας), πραγματοποιείται με την βοήθεια ειδικών ηλεκτροδίων διάτρησης (piercing electrodes) ή ηλεκτροδίων επαφής (surface contact electrodes).

Το ηλεκτρόδιο απόκτησης του δυναμικού συνδέεται με συσκευή καταγραφής η οποία φέρει μονάδα ενίσχυσης δεδομένο του μικρού πλάτους των προς καταγραφή δυναμικών. Λόγω του μικρού πλάτους τους ο ενισχυτής θα πρέπει να φέρει είσοδο υψηλής εμπέδησης για την ανίχνευση των μικρών μεταβολών του σήματος.

Τα ηλεκτρόδια επαφής έναντι των ηλεκτροδίων διάτρησης έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν προκαλούν ζημιά στους ιστούς. Το μειονέκτημα όμως αυτών των ηλεκτροδίων επαφής είναι ότι περιέχουν χλωριούχο κάλιο (KCl), το οποίο μετά από σύντομο χρόνο στεγνώνει, με αποτέλεσμα ν' αλλάζει η ιοντική κατάσταση της περιοχής που μετρείται. Κατά συνέπεια αυτά τα ηλεκτρόδια επαφής χρησιμοποιούνται μόνο για μετρήσεις που διαρκούν λίγες ώρες.

Τα ηλεκτρόδια διάτρησης (ασήμι, λευκόχρυσος) παρουσιάζουν το μειονέκτημα δημιουργίας πληγής στον ιστό. Τα ηλεκτρόδια διάτρησης παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ημέρες και ίσως για εβδομάδες δίχως να αλλάζουν αρκετά την ιοντική κατάσταση της περιοχής του ιστού (Zawadzki et al. 1995). Και τα δύο ηλεκτρόδια μετρούν την ιοντική συγκέντρωση στην περιοχή του ηλεκτροδίου.

Πειραματικές καταγραφές σε φυτά έχουν δείξει ίδιες καταγραφές αποτελεσμάτων και από τους δύο τύπους ηλεκτροδίων.

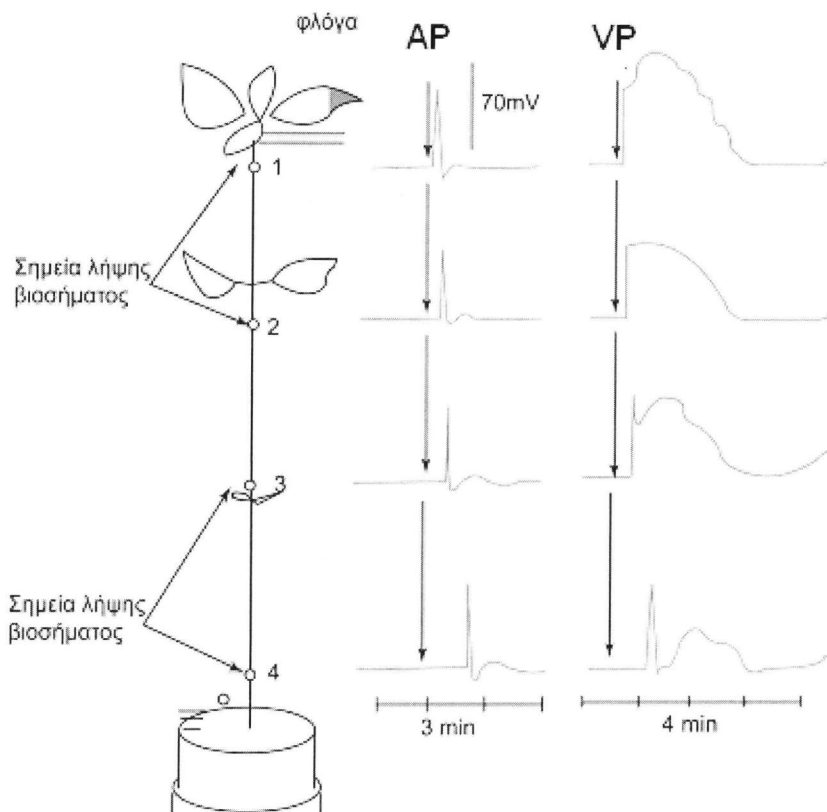
Προκειμένου να ληφθούν μετρήσεις, πρέπει να υπάρξει ένα κλειστό κύκλωμα. Για το λόγο αυτό απαιτείται ένα άλλο ηλεκτρόδιο αναφοράς. Αυτό το ηλεκτρόδιο μπορεί να είναι ηλεκτρόδιο γείωσης τοποθετημένο στο χώμα, ή ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς τοποθετημένο σε σημείο αναφορά στο φυτό. Στην περίπτωση χρήσης ηλεκτροδίου γείωσης η μέτρηση των δυναμικών αλλαγών μετράται μονοπολικά ως προς τη γη (reference ground signal), ενώ στη περίπτωση χρήση ηλεκτροδίου αναφοράς σε κάποιο σημείο του φυτού η μέτρηση των δυναμικών αλλαγών μετράται με διαφορική συνδεσμολογία.

Μια άλλη μέθοδος μέτρησης των δυναμικών μεμβράνης είναι η χρήση μικροηλεκτροδίου (Shabala, 2006). Το μικροηλεκτρόδιο πρέπει να εισαχθεί με μεγάλη προσοχή μέσα στο κυτταρόπλασμα ενός μεμονωμένου κυττάρου, έτσι ώστε να μετρηθεί το MP που προκύπτει από ένα ηλεκτρικό σήμα. Αυτά τα ηλεκτρόδια χρησιμοποιήθηκαν αρχικά στα γιγαντιαία κύτταρα των φίκων (Wayne 1994). Ο κύριος περιορισμός αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως σε υποδερμικά κύτταρα, και σε μεμονωμένα κύτταρα των τριχοειδών της ρίζας (Tester 1990).

Ένα άλλο ηλεκτρόδιο μέτρησης των δυναμικών μεμβράνης είναι το ηλεκτρόδιο δόνησης (vibrating probe electrode) το οποίο απαιτείται λουτρό εμβάπτισης. Χαρακτηριστικό του ηλεκτροδίου είναι η δυνατότητα μέτρησης συγκεκριμένων ιόντων τα οποία συμμετέχουν στην γέννηση των δυναμικών δράσης AP και μεταβλητότητας VP.

Όλες αυτές οι μέθοδοι μέτρησης δε θα είχαν νόημα αν δε μπορούσαν να αποτυπωθούν με κάποιο τρόπο. Έτσι, τα προηγούμενα έτη παρατηρήθηκε αυξανόμενη χρήση των υπολογιστών που εξοπλίζονται με κάρτες καταγραφής στοιχείων, αναλογικούς/ψηφιακούς μετατροπείς και προγράμματα χειρισμού στοιχείων όπως το LabVIEW (Volkov 2000; Pickard 2001; Volkov et al. 2005).

Στο σχήμα 1.17 απεικονίζονται το δυναμικό δράσης και μεταβλητότητας στον ηλιάνθο (Davies et al. (1991)). Το φυτό υπέστη σε πρώτη φάση ηλεκτρική διέγερση με τάση 5 V για χρονικό διάστημα 1 sec σε σημείο 5 εκατ. κάτω από το χαμηλότερο σημείο λήψης του δυναμικού μέσω ηλεκτροδίου διάτρησης. Σε δεύτερη φάση το φυτό υπέστη θερμική διαταραχή (έγκαιμα) από φλόγα στην άκρη ενός φύλλου. Τα ηλεκτρόδια διάτρησης τοποθετήθηκαν κατά μήκος του μίσχου ενώ ένα ηλεκτρόδιο γείωσης τοποθετήθηκε στο χώμα. Οι ηλεκτρικές αντιδράσεις του φυτού στο ηλεκτρικό ερέθισμα γέννησε δυναμικό δράσης (AP) το οποίο παρουσιάζεται ως αιχμή στο γράφημα του σχήματος 1.17 με την ένδειξη AP. Οι ηλεκτρικές αντιδράσεις στο ερέθισμα θερμότητας προκάλεσαν ένα δυναμικό μεταβλητότητας (VP) και ένα δυναμικό (AP) το οποίο παρουσιάζεται μεταβολή τάση στο χρονικό γράφημα με την ένδειξη VP. Χαρακτηριστικό των δύο σημάτων αποτελεί ο χρόνος μεταβολής τους. Παρατηρούμε από τα καταγραμμένα αποτελέσματα ότι ένα δυναμικό δράσης (AP) έχει μικρότερη χρονική διάρκεια από ότι το δυναμικό μεταβλητότητας.



**Σχήμα 1.16:** Δυναμικό δράσης και μεταβλητότητας στον ηλιάνθο.

## 1.6 Μοντελοποίηση δυναμικού μεμβράνης

Τα κύτταρα των φλοιωμάτων στα φυτά μέσω της μεμβράνης διαδίδουν τα δυναμικά δράσης (Hille 2001). Αυτές οι διαδιδόμενες διεγέρσεις μοντελοποιούνται μέσω μη γραμμικών εξισώσεων (φαινομένων αντίδρασης-διάχυσης). Θεωρητικά οι αλλαγές στις μορφές και τις ταχύτητες των διαδιδόμενων σημάτων μπορούν να υπολογιστούν από κατάλληλες αλλαγές των παραμέτρων στις αντίστοιχες μη γραμμικές διαφορικές εξισώσεις (Volkov and Mwesigwa 2001a). Οι Hodgkin και Huxley (1952) ανέπτυξαν ένα μοντέλο μεμβρανών (ζωικών νευρώνων) που βασίστηκε σε πειραματικά στοιχεία

από μελέτες σε ζωικά κύτταρα μέσω μεθόδων καθήλωσης τάσης (voltage-clamp). Το μοντέλο υπολογίζει τα ιόντα  $K^+$ ,  $Na^+$  και το σύνολο των ιόντων που κινούνται παθητικά μέσω της μεμβράνης καλούμενο ως ιοντικό ρεύμα διαρροής. Το μοντέλο αυτό καλείται μοντέλο H-H. Το ρεύμα της μεμβράνης σύμφωνα με το μοντέλο ο H-H αποτελεί άθροισμα ιοντικών ρευμάτων σύμφωνα με την σχέση:

$$I_M = C_m \frac{dV}{dt} + I_K + I_{Na} + I_L$$

όπου,

$C_m$  : η χωρητικότητα της μεμβράνης,

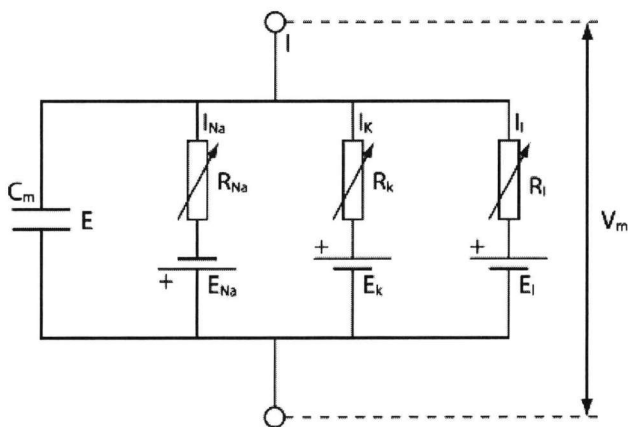
$V$  : τάση μεμβράνης

$I_K$  : το ιοντικό ρεύμα καλίου,

$I_{Na}$  : το ιοντικό ρεύμα νατρίου

$I_L$  : το ιοντικό ρεύμα διαρροής που φέρεται από άλλα ιόντα που κινούνται παθητικά μέσω της μεμβράνης.

Το δυναμικό ανάπαυσης για κάθε είδος ιόντος αντιμετωπίζεται σαν μπαταρία. Μία μεταβλητή αντίσταση διαμορφώνει το βαθμό στον οποίο το κανάλι είναι ανοικτό (σχ1.17).

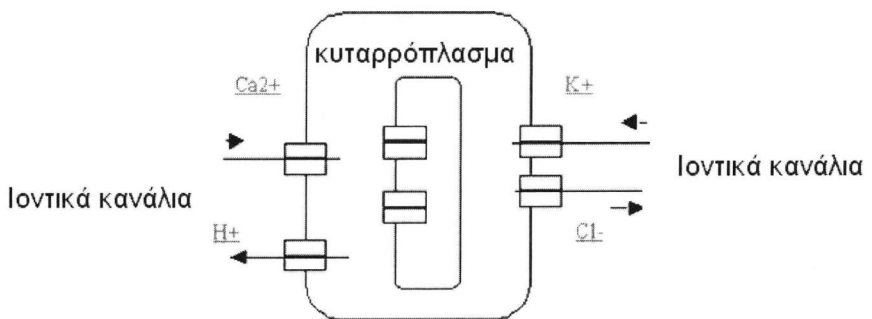


Σχήμα 1.17: Μοντέλο H – H

Αντίθετα από τα ζώα, υπάρχουν σημαντικές διαφορές της βιοηλεκτρικής δραστηριότητας μεταξύ των ειδών ή των ατόμων των φυτών σε ερεθίσματα. Προς το τέλος της δεκαετίας του '80, διαπιστώθηκαν διάφορα πρότυπα της ηλεκτρικής δραστηριότητας του ιονικού καναλιού των φυτικών κυττάρων. Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί λίγες μελέτες για την ποσοτική περιγραφή της ηλεκτρικής δραστηριότητας των φυτικών κυττάρων. Οι Fromm και Spanswick (1993) διαπίστωσαν ότι η ηλεκτρική διέγερση των φυτών ακολουθείται από ιοντικές μετατοπίσεις που είναι οι πιο εντοπιστικοί στα κύτταρα φλοιωμάτων.

Μέσω ανάπτυξης της τεχνικής καθήλωσης τάσης σε μονοκύτταρες και μονοκάναλες καταγραφές, τα ενδοκυτταρικά (intracellular) και τα εξοκυτταρικά (extracellular) ιονικά στοιχεία ( $K^+$ ,  $Na^+$  και ιονικού ρεύματος) των φυτικών κυττάρων μπορούν να μοντελοποιηθούν.

Το μοντέλο που παριστάνει τον ιονικό μηχανισμό για το δυναμικό μεμβράνης παρουσιάζεται στο σχήμα 1.18.



Σχήμα 1.18: Μοντέλο H – H για τα φυτά

Το πρότυπο H-H τροποποιείται με χρήση του ιόντος  $Cl^-$  αντί ιόντων  $Na^+$  που συναντάμε στα ζώα (Trebacz et al., 1997). Ο ρυθμός μεταβολής του δυναμικού της μεμβράνης ( $V$ ) δίνεται από την σχέση:

$$I_{stim} = C_m \frac{dV}{dt} + \sum I_j$$

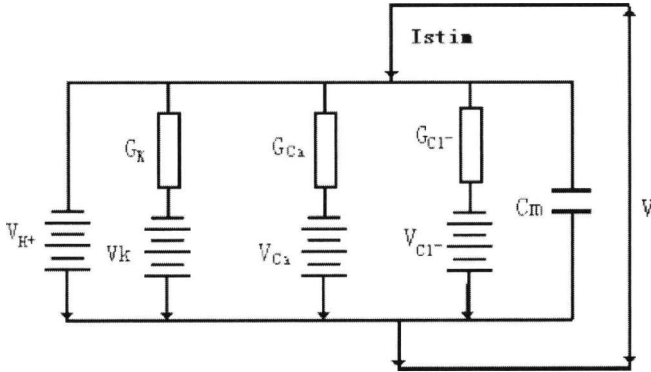


όπου,

$C_m$  : η χωρητικότητα της μεμβράνης,

$V$  : τάση μεμβράνης

$I_j$  : ιονικά ρεύματα ( $I_K$ , καλίου,  $I_{Ca}$ , ασβεστίου,  $I_L$  ρεύματα ιόντων  $Cl^-$  και πρωτεΐνης μεμβρανών  $H^+$  (pump) που μεταφέρουν τα πρωτόνια με παθητικό τρόπο μέσω της μεμβράνης.



**Σχήμα 1.19:** Ηλεκτρικό ισοδύναμο μοντέλου H-H.

Τα ιονικά ρεύμα που καθορίζονται από τις αντίστοιχες πύλες, λαμβάνεται ως λύση σε ένα συνδυαστικό σύστημα γραμμικών διαφορικών εξισώσεων. Τα ιονικά ρεύματα και η αλλαγή της τάσης  $V$  επηρεάζουν την ιονική πύλη και το αντίστοιχο ρεύμα. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται για την επίλυση των διαφορικών εξισώσεων βασίζεται στην μέθοδο των Runge-Kutta. Σύμφωνα με τα δημοσιευμένα στοιχεία ως, η τιμή της μέτρησης του δυναμικού μεμβρανών είναι συχνά αρνητική και δίνεται από την εξίσωση Goldman-Hodgkin-Katz.

$$V_m = \Delta V + \frac{RT}{F} \ln \frac{H_i}{H_o}$$

όπου,

$\Delta V$  : το δυναμικό διάχυσης της μεμβράνης (Taiz and Zeiger, 1998).

$R$  : διαπερατότητα μεμβράνης για  $K^+$

T: διαπερατότητα μεμβράνης για  $\text{Ca}^{2+}$

F: διαπερατότητα μεμβράνης για  $\text{Cl}^-$ .

$\text{H}_i$  και  $\text{H}_o$  : η εσωτερική και η εξωτερική συγκέντρωση  $\text{H}^+$  .

## 1.7 Κανάλια μετάδοσης βιοηλεκτρικών σημάτων

Οι ηλεκτροχημικές διεγέρσεις ως χαρακτηριστικό των ζωντανών οργανισμών αποδείχθηκε μέσω ακριβών μετρήσεων ότι η φύση παράγει ηλεκτρικά πεδία με τα οποία πραγματοποιείται μετάδοση ενός σήματος από ένα βιολογικό σύστημα σε ένα άλλο.

Ειδικότερα για τους φυτικούς οργανισμούς η μελέτη αυτών των διεργασιών αποτελούν βιοηλεκτροχημικά φαινόμενα τα οποία έχουν άμεση σχέση με την πορεία ανάπτυξης των φυτών (Volkov, 1999). Τα φυτά έχουν πολλές παραμέτρους ώστε να έχουν προσανατολισμό στο εξωτερικό ερέθισμα. (E.A. Liberman, S.V. Minina, 1996). Κάθε ζωντανό φυτικό κύτταρο λαμβάνει συνεχώς πληροφορίες σχετικές με το περιβάλλον του και ελέγχεται από ένα μοριακό υπολογιστή (molecular stochastic computer –MC), ο οποίος λειτουργεί με κώδικα μόριων (DNA, RNA, πρωτεΐνες). Το πρόγραμμα αυτό αποθηκεύει έναν τετρανήφιο κωδικό που αντιστοιχεί στα μόρια του DNA. Ο MC λειτουργεί με μοριακές λέξεις που έχουν σαφής διεύθυνση.

Στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης μέσω των πολλών υποδοχέων πρωτεΐνης, προκαλούνται αλληλεπιδράσεις σχεδόν με όλα τα ζωτικής σημασίας μόρια. Σε κάθε ερέθισμα που προκαλεί καταπόνηση στα φυτικά κύτταρα, τα ένζυμα της μεμβράνης αντιλαμβάνονται τις βιοχημικές αντιδράσεις και επιταχύνουν τη σύνθεση αιθυλενίου και ένζυμων. Η επίδραση αυτή στη ζωή των κυττάρων καλείται ερεθισμός (excitability) (O.S. Ksenzhek, A.G. Volkov, 1998). Αποτέλεσμα τις ιδιότητας αυτής των κυττάρων είναι η ενεργειακή αλλαγή σε συνάρτηση με τους παράγοντες του περιβάλλοντος και οι οποίοι καλούνται ερεθιστικοί παράγοντες (irritants). Συνεπώς τα φυτά είναι σε συνεχή εξισορρόπηση με τον εξωτερικό κόσμο.

Ο συντονισμός των εσωτερικών διαδικασιών και η ισορροπία τους με το περιβάλλον γίνεται άμεσα με την υπερδιέγερση των φυτικών κυττάρων η οποία οφείλεται στην υψηλή ευαισθησία του πρωτοπλάσματος και όλων των κυτταρικών οργανιδίων σε κάθε φυσικό και ηλεκτροχημικό γεγονός (Volkov, 1999). Αυτές οι

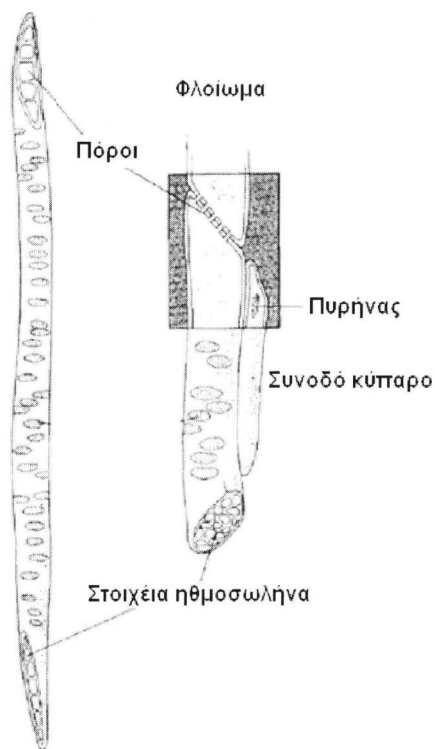
πρωτοπλασματικές δομές μέσω ερεθιστικών παραγόντων μελετήθηκαν σε σχέση με την επίδραση περιβαλλοντικών συνθηκών. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τον μηχανισμό με τον οποίο ηλεκτρικά σήματα μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τόσο βιοφυσικές και βιοχημικές διεργασίες σε απομακρυσμένους ιστούς (Volkov και Haack 1995). Επίσης τόσο τα μηχανικά (π.χ. κοπή), όσο φυσικά (π.χ. ηλιακή ακτινοβολία) ή και τα χημικά εξωτερικά ερεθίσματα δεν δρουν μόνο στο χώρο της εμφάνισης τους αλλά παρατηρήθηκε ότι η διέγερση μπορεί επίσης να μεταφερθεί κατά μήκος ολόκληρου του φυτού (Volkov και Haack 1995).

Η ταχύτητα μεταφοράς των σημάτων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η ένταση του ερεθίσματος, η θερμοκρασία, η ο μηχανικός τραυματισμός κ.α.. Επίσης η κατάσταση από προηγούμενες διεγέρσεις συντελούνε στην διαμόρφωση της ταχύτητας μετάδοσης του ερεθίσματος. Οι ταχύτητες της διάδοσης των βιοηλεκτρικών σημάτων έχουν τιμές από 0.05 έως 4000  $\text{cm s}^{-1}$  και είναι αιρετά υψηλές ώστε να υπάρξει ταχεία επικοινωνία και ανταπόκριση. Η ταχύτητα της διάδοσης και το πλάτος της δυναμικής δράσης εξαρτάται επίσης από τον τύπο του εξωτερικού ερεθίσματος (A.M. Sinukhin, E.A. Britikov, 1967).

Η αντίδραση της διέγερσης μπορεί να έχει κατεύθυνση από την κορυφή ενός στελέχους, προς τις ρίζες του φυτού ή και αντίστροφα με διαφορετικό βαθμό έντασης. Η μεταφορά της διέγερσης έχει ένα πολύπλοκο χαρακτήρα, ο οποίος συνοδεύεται από μια εσωτερική αλλαγή στα κύτταρα και στους ιστούς. Αυτά τα βιοηλεκτρικά ή ηλεκτροφυσιολογικά σήματα προκύπτουν από την επίδραση διαφόρων χημικών ενώσεων όπως των αλάτων, των θρεπτικών διαλυμάτων και από την εμφάνιση φυσικών παραγόντων, όπως τις αλλαγές του κλίματος, τα οσμωτικά φαινόμενα, τα επίπεδα φωτισμού, στους τραυματισμούς τις μηχανικές διεγέρσεις κ.α..

Τα βιοηλεκτρικά ή ηλεκτροφυσιολογικά σήματα μπορούν να ανιχνευθούν σε απομακρυσμένα σημεία του φυτού μετά το φαινόμενο της επίδρασης του ερεθισμού (O.S. Ksenzhek, A.G. Volkov, 1998).

Ένα μέσο για τη διαβίβαση των εν λόγω ηλεκτρικού σήματος αποτελεί ένας σωληνοειδής αισθητήρας στο φλοιόωμα του φυτού που αποτελεί μια συνέχεια των μεμβρανών του πλάσματος.



**Σχήμα 1.20:** Φλοιώμα μετάδοσης ηλεκτρολυτών.

Το φλοιώμα είναι ένας ηλεκτρικός αγωγός για μεταφορά των βιοηλεκτροχημικών σημάτων σε μεγάλες αποστάσεις. Από ηλεκτροχημικής άποψης, οι δομές του φλοιώματος και του ηθμού μπορούν να σκιαγραφηθούν ως ένα σωλήνας γεμισμένος με ηλεκτρολύτες. Το μήκος ενός άξονα ή φλοιώματος μπορεί να είναι αρκετά μέτρα και η διάμετρος του περίπου 1 έως 100  $\mu\text{m}$  (σχ1.20). Το φλοιώμα παρουσιάζει ρόλο αγωγού των βιοηλεκτροχημικών σημάτων για την μεταφορά τους σε μεγάλες αποστάσεις. Αποτελείται από δύο τύπους κυττάρων:

- α) τα στοιχεία ηθμοσωλήνων (sieve-tube elements) και
- β) τα συνοδά κύτταρα (companion cells)

Τα στοιχεία ηθμοσωλήνων είναι επιμηκυσμένα κύτταρα με πολυάριθμους μικρούς πόρους μέσω των οποίων τα βιοηλεκτροχημικά στοιχεία μπορούν να περάσουν. Αυτά συνδέονται σε κάθετη σειρά, γνωστή ως ηθμοσωλήνες (sieve tubes). Πολλοί ερευνητές εξετάζουν την συμμετοχή των δυναμικών δράσεις στην μεσοκυττάρια και ενδοκυττάρια επικοινωνία καθώς και στην ρύθμιση των φυσιολογικών διεγέρσεων των φυτών. Σημαντικά συμπεράσματα μπορούν να βγουν από την μελέτη των χαρακτηριστικών μετάδοσης των δυναμικών δράσης όπως της μεταβολής του πλάτους του βιοσήματος της διάρκειας, της κατεύθυνσης, της αλλαγής πολικότητας και του ρυθμού εξάπλωσης του ηλεκτρικού δυναμικού.

## 1.8 Ηλεκτροχημική διασύνδεση σε φυτικούς οργανισμούς

Ο λόγος για τον οποίο τα φυτά έχουν ηλεκτρικά σήματα είναι ότι επιτρέπουν την πολύ γρήγορη μετάδοση πληροφοριών, έτσι ώστε όλο το φυτό να «ενημερώνεται» αμέσως ακόμα και αν μόνο μία περιοχή έχει διαταραχθεί. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την ανίχνευση και την απάντηση στον κίνδυνο, ο οποίος ανιχνεύεται σε μία θέση και το φυτό «προειδοποιείται». Μία τέτοια γρήγορη ανταπόκριση είναι σημαντική με τους ιούς, που μπορούν να εισχωρήσουν από μία «πληγή», εκτός αν γίνει μία γρήγορη αντεπίθεση από το ίδιο το φυτό.

Οι αντιδράσεις σε μία υποθετική επίθεση από ιό πρέπει να είναι γρήγορες, συστηματικές και να συντονιστούν έτσι ώστε τα κατάλληλα κύτταρα να έχουν και την κατάλληλη αντίδραση. Τα πληγωμένα κύτταρα στέλνουν ένα σήμα τόσο στα παρακείμενα όσο και στα απόμακρα κύτταρα, τα οποία αποκρίνονται με τη παύση της κυτταροπλασματικής ροής, επιβραδύνοντας την ενδοκυτταρική μετακίνηση των ιόν (σταματώντας τη μετάδοση των ηλεκτρικών σημάτων από κύτταρο σε κύτταρο).

Προφανώς, μερικές από αυτές τις αντιδράσεις δεν μπορούν να εμφανιστούν στο σήμα που διαβιβάζουν τα κύτταρα, αφού αυτά είτε είναι νεκρά είτε στερούνται των πυρήνων και σημαντικών δομικών και κυτοσελικών (cytoskeleton) στοιχείων.

Μία εύλογη εξήγηση για το λόγο που υπάρχουν δύο διαφορετικά ηλεκτρικά σήματα είναι ότι το ένα συμπληρώνει το άλλο και το καθένα δίνει τις δικές του απαντήσεις στις διάφορες καταστάσεις. Επίσης τα δύο σήματα προκαλούν διαφορετικές αντιδράσεις, έτσι ώστε τα αποτελέσματά τους να είναι συμπληρωματικά

και να απαντούν στο ερώτημα γιατί μία «πληγή» προκαλεί τον συνδυασμό ενός VP και ενός AP σήματος. Ακόμη, το VP που διαβιβάζεται μέσω του ξηλώματος είναι αποτελεσματικότερο κατά τη διάρκεια της ημέρας, ειδικά υπό συνθήκες υψηλής διαπνοής, ενώ το AP προκαλείται ευκολότερα τη νύχτα. Αν και οι Burdon-Sanderson από το 1873 περιέγραψαν τα δυναμικά δράσης (APs) σε φυτά *Dionea* και επίσης ο Bose το 1906 περιέγραψε την ύπαρξη δυναμικών δράσεις σε φυτά *Mimosa*, η επιστημονική κοινότητα δεν ανταποκρίθηκε άμεσα με συνέχιση των θεωρητικών και πειραματικών μελετών.

Αυτή η μειωμένη ανταπόκριση των επιστημών σε αυτό τον τομέα οφείλεται λόγω στο ότι τα δυναμικά δράσης δεν συσχετίστηκαν με φαινόμενα διεργασιών όπως της φωτοσύνθεσης με αποτέλεσμα να επικρατήσει η άποψη ότι τα φυτά δεν έχουν κανένα νεύρο ή μυ συνεπώς δεν παρουσιάζουν ηλεκτρική δραστηριότητα.

Και όμως για μερικούς επιστήμονες, η ύπαρξη των δυναμικών δράσεις APs σε φυτά *Dionea* και *Mimosa* αλλά και η ανακάλυψη των μηχανικών υποδοχών σε πολλά φυτά (Haberlandt 1890, 1906) αποτέλεσαν το επιστημονικό θεμέλιο για έρευνα των δομών που θα μπορούσαν να διευκολύνουν τη γρήγορη διάδοση των σημάτων.

Περίπου το 1900, αρκετοί ερευνητές που άρχισαν να μελετούν με μεγαλύτερη προσοχή τις ιδιότητες του πλάσματος που διασχίζει τα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων υποστήριξαν την άποψη ότι αυτά μπορούν να θεωρηθούν ως νεύρα. Ο Haberlandt μετά από έρευνες σε αυτό τον τομέα πρότεινε ότι οι μόνες νευρικές δομές των φυτών ήταν οι αγγειακές δέσμες, ιδίως στο φλοιώμα (Haberlandt 1914). Στο ίδιο κατέληξε και με πιο πρόσφατη επαναξιολόγηση ο Baluska και ο Hlavacka το 2005.

Η μηχανική ομοιότητα των διεγέρσεων στα φυτικά κύτταρα και τα νεύρα των ζώων δείχθηκε με τη σύγκριση των δυναμικών δράσης των φυτών *Nitella* και των νευρώνων των καλαμαριών (Cole and Curtis 1938, 1939). Τα ηλεκτρικά σήματα μπορούν να παραχθούν σε οποιοδήποτε σημείο της συμπλαστικής συνέχειας (*συμπλαστική συνέχεια (symplast)* καλείται η εσωτερική πλευρά μεμβράνης πλάσματος) από περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως οι αλλαγές στη θερμοκρασία, πληγή κ.α.

Στο πρώτο στάδιο, η πλασματική μεμβράνη αποπολώνεται με μια διαδικασία γνωστή ως σχηματισμός του δυναμικού δεκτικότητας, π.χ. από μηχανική υποκίνηση όπως παρατηρείται στο *Chara* (Kishimoto 1968). Το δυναμικό δεκτικότητας είναι ένα ηλεκτρικό αντίγραφο του ερεθίσματος που διαρκεί για όσο χρονικό διάστημα το

ερέθισμα είναι παρόν. Ένα δυναμικό δράσης προκαλείται όταν το ερέθισμα είναι αρκετά μεγάλο ώστε να αποπολώσει τη μεμβράνη. Στη συνέχεια, το δυναμικό δράσης, που χαρακτηρίζεται από μια μεγάλη παροδική αποπόλωση, επιτρέπει τη γρήγορη μετάδοση πληροφοριών μέσω των πλασμοδεσμών.

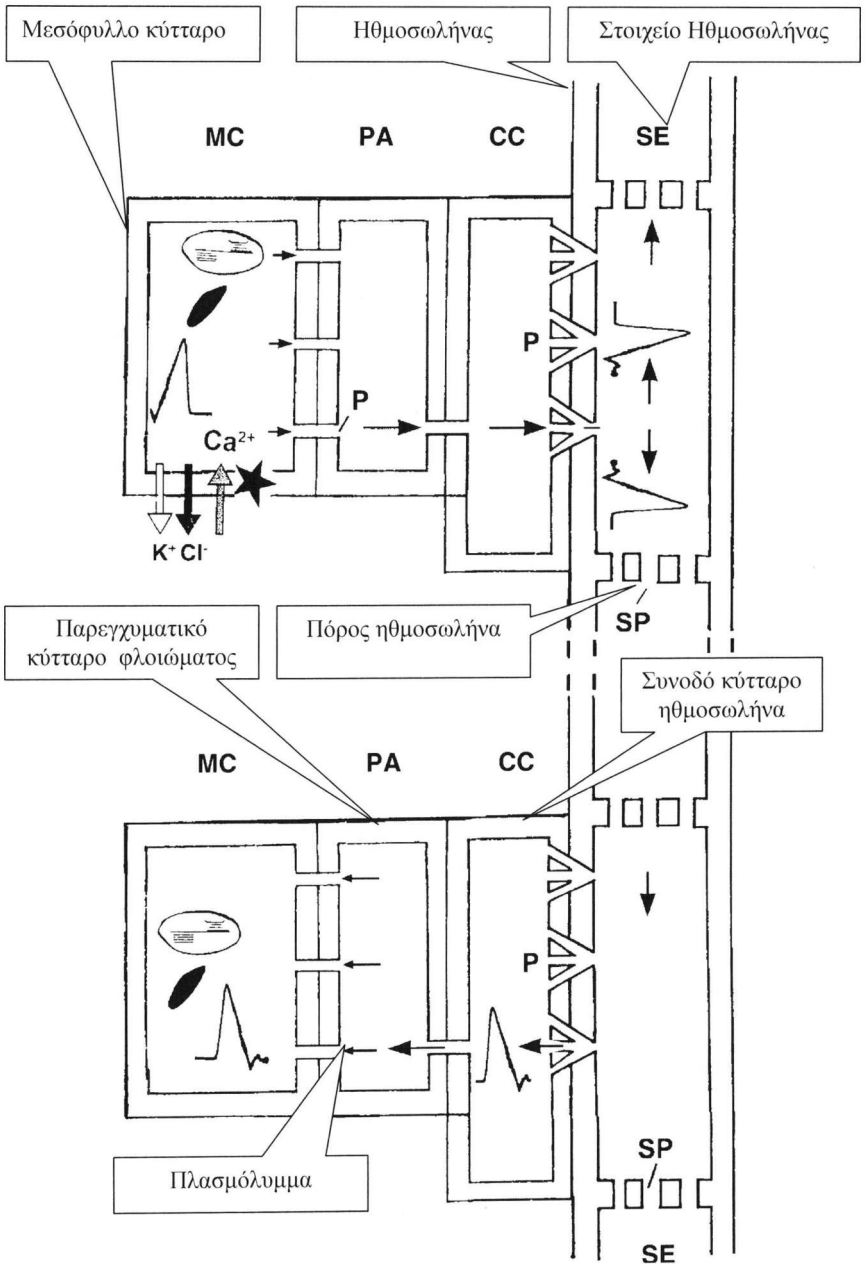
Ένα δυναμικό δράσης παράγεται από συγκεκριμένα ερέθισμα και ταξιδεύει με σταθερή ταχύτητα και μέγεθος (Zawadzki 1991). Η ηλεκτρική σύζευξη μέσω των πλασμοδεσμών καταδείχθηκε σε πολλά είδη όπως το *Nitella* (Spanswick και Costerton 1967), το *Elodea*, τη *Avena* (Spanswick 1972) και το *Lupinus* (van Bel και van Rijen 1994) δείχνοντας ότι οι πλασμοδέσμες λειτουργούν ως ηλεκτρονόμοι στο δίκτυο σημάτων μεταξύ των κυττάρων.

Για τη μεταφορά των ηλεκτρικών σημάτων σε μεγάλες αποστάσεις μέσα στο φυτό, απαιτούνται μεταφορείς χαμηλών συνδέσεων αντίστασης, οι οποίοι επεκτείνονται συνεχώς σε ολόκληρο το φυτό. Το σύστημα ηθμοσωληνών (sieve tube system) φαίνεται να πληρεί αυτούς τους όρους, για τη μετάδοση των ηλεκτρικών σημάτων, μέσω της συνοχής της πλασματικής μεμβράνης καθώς επίσης και της έλλειψη στοιχείων χυμοτοπίων (vacuoles) (Evert 1973).

*Εν περιλήψη, η μετάδοση σημάτων μέσα στα φυτά εξαρτάται από την ηλεκτρική αγωγιμότητα των πλασμοδεσμών σε κατεύθυνση κάθετη προς αυτές καθώς επίσης και από τον υψηλό βαθμό ηλεκτρικής σύζευξης μέσω των πόρων των ηθμοσωληνών στη διαμήκη κατεύθυνση.*

Για παράδειγμα η διέγερση μέσω ερεθίσματος από το κρύο ή την αφή προκαλεί την εισροή ασβεστίου σε ένα ζωντανό κύτταρο, π.χ. ένα μεσόφυλλο κύτταρο (mesophyll cell) (σχ1.20). Αφότου αποπολώνεται το δυναμικό των μεμβρανών κάτω από ένα ορισμένο επίπεδο, ένα δυναμικό δράσης δημιουργείται λόγω εκροής χλωρίου και καλίου.

Το σήμα διαδίδεται μέσω των δικτύων πλασμοδύματος (P) στο παρεγγετικό κύτταρο του φλοιώματος και στην συνέχεια μέσω των συνοδών κυττάρων (companion cells-CC) των στοιχείων ηθμοσωληνών (sieve element- SE) (SE/CCs) μέσω του ηθμοσωληνα το σήμα διαβιβάζεται σε μεγάλες αποστάσεις. Οι πόροι κόσκινων (SP) με τις μεγάλες διαμέτρους τους παρουσιάζουν μικρή αντίσταση για μια γρήγορη διάδοση των ηλεκτρικών σημάτων κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης των στοιχείων των ηθμοσωληνών.



Σχήμα 1.20: Μετάδοση σημάτων μέσω πλασμοδεσμών



## 1.9 Ταχύτητα μετάδοσης ηλεκτροφυσιολογικών σημάτων

Ο όρος τακτισμός περιγράφει την συμπεριφορά της αντίδρασης που παρουσιάζουν τα φυτά απέναντι σε εξωτερικά, φυσικά ή χημικά, ερεθίσματα. Τα ερεθίσματα αυτά μπορούν να είναι το φως, η θερμοκρασία, η βαρύτητα, η υγρασία, ορισμένες χημικές ουσίες, κτλ. (Wagner et Al 1997, Trebacz και Sievers 1998).

Υπάρχουν δύο είδη τακτισμού: ο θετικός και ο αρνητικός τακτισμός. Ο θετικός τακτισμός χαρακτηρίζεται από κίνηση προς το ερέθισμα, ενώ ένας αρνητικός τακτισμός χαρακτηρίζεται από κίνηση για απομάκρυνση από αυτό. Ο τακτισμός παίρνει ιδιαίτερο όνομα ανάλογα με το είδος του ερεθίσματος από το οποίο προκαλείται (π.χ. θερμοτακτισμός, χημειοτακτισμός) κτλ.

Οι Szmelcman και Adler (1976) παρατήρησαν τις αλλαγές στο δυναμικό των μεμβρανών κατά τη διάρκεια του βακτηριακού χημειοτακτισμού. Ο Martinac (1987) ανίχνευσε ευαίσθητα στη πίεση ιοντικά κανάλια στο φυτό *Escherichia coli*, που σημαίνει ότι αυτά τα κανάλια έχουν μια οσμωτική λειτουργία, πράγμα που συμβαίνει και στα μονοκύτταρα άλγη όπως το είδος *Acetabularia* (Mummert και Gradmann 1976).

Για να μπορέσουν τα φυτά να αποκριθούν γρήγορα σε φαινόμενα τακτισμού έχουν αναπτύξει ένα είδος 'νευροδιαβιβαστών' για την μετάδοση ηλεκτρικών σημάτων μέσα στο φλοιώμα επιτρέποντάς του να μεταφέρει επιτυχώς πληροφορίες σε μεγάλες αποστάσεις μέσα στον ιστό του. Σε αντίθεση με τα χημικά σήματα όπως οι ορμόνες, τα ηλεκτρικά σήματα είναι σε θέση να διαβιβάσουν γρήγορα τις πληροφορίες καλύπτοντας μεγάλες αποστάσεις.

Τα περισσότερα δυναμικά δράσης των φυτών που μελετώνται μέχρι τώρα έχουν μια ταχύτητα με εύρος από 0,01 έως 0,20 m/s. Έχουν όμως καταγραφεί και περιπτώσεις δυναμικών δράσεις που έφθασαν σε ταχύτητα μετάδοσης μέχρι 30m/s, παρόμοιες με την ταχύτητα των δυναμικών δράσης στα νεύρα (Volkov 2000).

Επίσης βρέθηκε ότι τα διακομικά κύτταρα του φυτού Characean αποκρίνονται στην ηλεκτρική διέγερση κατά τρόπο παρόμοιο με εκείνο που επιδεικνύεται από τους σκελετικούς μυς μετά από ηλεκτρική διέγερση των νευρωνικών κυττάρων. (Hörmann 1898).

Σε φυτά κολοκυθιάς η μετάδοση των ηλεκτρικών σημάτων μέσω των ηθμοσωληνών (sieve tubes) των κύτταρων του φλοιώματος, μεταξύ ενός αναπτυσσόμενου φρούτου και ενός μίσχου ώριμου φύλλου, έφτασε στη μέγιστη ταχύτητα των 10cm/s. (Eschrich et al. 1988).

Είναι προφανές ότι καμία χημική ουσία δεν είναι ικανή να κινείται τόσο γρήγορα κατά την διαδικασία απορρόφησης της (assimilate flow). Καθώς επίσης δεν οφείλεται σε κανένα υδραυλικό σήμα λόγω ότι δεν θα ήταν σε θέση να μεταφέρουν κωδικοποιημένα θετικά ή αρνητικά σήματα για την υπερπόλωση ή την αποπόλωση, αντίστοιχα.

### **1.10 Κιρκαδικός ρυθμός και ηλεκτροφυσιολογία των φυτών**

Ο κιρκαδικός ρυθμός είναι ο κατά προσέγγιση 24ωρος κύκλος που παρουσιάζει η δραστηριότητα ζωτανών οργανισμών, όπως ζώων, φυτών, μυκήτων μέχρι και βακτηρίων. Το όνομα του κιρκαδικού ρυθμού (circadian rhythm) δημιούργησε ο Φράντζ Χάλμπεργκ, στα μέσα του 20ου αιώνα και προέρχεται από την λατινική λέξη *circa* που σημαίνει «περίπου» και *diem* που σημαίνει «ημέρα», δηλαδή «ρυθμός μιας ημέρας περίπου». Σημαντικό ρόλο στον κιρκαδικό ρυθμό παίζει το ερέθισμα του φωτός, το οποίο επαναφέρει κάθε μέρα το βιολογικό ρολόι, αλλά ο κιρκαδικός ρυθμός παρουσιάζεται ακόμη και αν δεν υπάρχει διαφοροποίηση στο φωτισμό.

Η περιοδικότητα του ρολογιού καθορίζεται γενετικά και παρέχει το χρονικό πλαίσιο για τα φυσιολογικά φαινόμενα που είναι απαραίτητα για την προσαρμογή των οργανισμών και των πληθυσμών στους περιβαλλοντικούς περιορισμούς. Το κιρκαδικό ρυθμικό κύτταρο είναι ένας υδρο-ηλεκτροχημικός ταλαντωτής που οδηγείται ή που συγχρονίζεται από τον καθημερινό σκοτεινό/ φωτεινό κύκλο.

Ο κιρκαδικός ρυθμός στο ενδοκυτταρικό ρεύμα ενός μονού κυττάρου, όπως παρατηρήθηκε από τους Novak και Sironval (1976) στο φυτό *Acetabularia*, προκύπτει πιθανώς από τη μεταφορά στοιχείων μεταξύ των μιτοχονδρίων, των γλωροπλαστών και της γλυκόλυσης.

Σημειώνοντας τον κιρκαδικό ρυθμό στο ενδοκυτταρικό ρεύμα του φυτού *Acetabularia* (Novak and Sironval 1976) και τον ημερήσιο ρυθμό στο δυναμικό ανάπνοσης των μεμβρανών στο φυτό *Chenopodium*, (Wagner et al. 1998), όπως

ειπώθηκε και πριν, φαίνεται πιθανό ότι ένας κερκαδικός ρυθμός στη βιοηλεκτρική ενέργεια μπορεί να έχει μεγάλη σημασία στον κερκαδικό ρυθμό που συντονίζει όλο το φυτό και ρυθμίζει τις αλλαγές της δραστηριότητας της μεμβράνης. Ο κερκαδικός ρυθμός στο ενδοκυτταρικό ρεύμα προκύπτει πιθανώς από έναν κερκαδικό ρυθμό στον ενεργειακό μεταβολισμό και τη ρύθμιση των διαδικασιών μεταφοράς στη πλασματική μεμβράνη (Mayer and Fischer 1994; Mills et al. 1994; Pickard 1994).

### 1.11 Ηλεκτροφυσιολογική συμπεριφορά του φλοιώματος

Οι Burdon-Sanderson ήταν οι πρώτοι που μέτρησαν τα ηλεκτρικά σήματα, (Burdon-Sanderson, J. 1873) και δημιούργησαν μια σημαντική συλλογή δεδομένων για την μέτρηση και το χαρακτηρισμό των ηλεκτρικών σημάτων που μεταδίδονται σε μεγάλη απόσταση στα φυτά. Ειδικότερα, η μελέτη της ηλεκτρικής δραστηριότητας στα κύτταρα characean και στα πιο πρόσφατα πειράματα στα κύτταρα guard που χρησιμοποιούν την μέθοδο καθήλωσης τάσης (patch clamp) έχουν δημιουργήσει μια ισχυρή βάση για την κατανόηση του ηλεκτροφυσιολογικού φαινομένου σε κυτταρικό επίπεδο. Οι πληροφορίες για τα ιονικά κανάλια και τους μεταφορείς είναι διαθέσιμες και από τις γονιδιωματικές έρευνες και από τα ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά των κυτταρικών δραστηριοτήτων.

Διαμεμβρανική πρωτεΐνη καλείται η πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη μετακίνηση δύο ή περισσότερων διαφορετικών μορίων ή ιόντων δια μέσου μιας μεμβράνης φωσφολιπιδίων όπως της πλασματικής μεμβράνης. Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου ZmSUT1 που εντοπίζεται στη πλασματική μεμβράνη του κυττάρου και στους ημθοσολήνες (sieve tube) του φλοιώματος είναι σε θέση να ελέγχει τόσο τη προς λήψη σακχάρων μέσα στο φλοιόωμα των ώριμων φύλλων όσο και τη μεταφορά τους από το φλοιόωμα μέσα στους ιστούς.

Η χρήση της τεχνικής καθήλωσης τάσης (patch-clamp) αποκάλυψε ότι το ρεύμα της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης τύπου ZmSUT1 εξαρτάται από την κατεύθυνση των σακχάρων, τη τιμή του pH καθώς επίσης και από το δυναμικό των μεμβρανών (Carpaneto et al. 2005) καταδεικνύοντας, ότι το φλοιόωμα παρουσιάζει ιδιότητες που συντελούν στην χημική και ηλεκτρικής επικοινωνίας μέσα στα φυτά.

Επίσης μελέτες σε πληγωμένο φυτό τομάτας, έδειξαν ότι η διαβίβαση των ηλεκτρικών σημάτων συνδέεται άμεσα με το φλοιώμα (Rhodes 1996), ρυθμίζοντας την επαγωγή την δραστηριότητα των ανασταλτικών παραγόντων πρωτεΐνης σε μέρη του βλαστού που είναι απομακρυσμένα από την πληγή.

Η μεταβολή του δυναμικού τω μεμβρανών του φλοιώματος περιλαμβάνει τρεις ιοντικούς μηχανισμούς.

1. Ο πρώτος ιοντικός μηχανισμός μεταφοράς, αρμόδιος για την αποπόλωση, είναι βασισμένος στο χλώριο (chloride) του οποίου η εκροή αυξάνεται κατά τη διέγερση της μεμβράνης (Gaffey and Mullins 1958 Oda 1976)
2. Ο δεύτερος ιοντικός μηχανισμός είναι βασισμένος σε ένα ιόν που περιλαμβάνεται στη διέγερση της πλασματικής μεμβράνης, το ασβέστιο, για το οποίο οι μελέτες έδειξαν ότι η αιχμή του δυναμικού δράσης εξαρτώνται την συγκέντρωση του ασβεστίου στο κύτταρο (Beilby and Coster 1979; Lunevsky et al. 1983).
3. Ο τρίτος ιοντικός μηχανισμός είναι βασισμένος στο φαινόμενο η εκροή καλίου από το κύτταρο η οποία αυξάνεται κατά τη διέγερση της μεμβράνης (Spyropoulos 1961, ODA 1976).

Οι ιοντικές διαδικασίες μεταφοράς που εξετάσαμε παραπάνω και που δημιουργούν προϋποθέσεις απαραίτητες για την παραγωγή ενός δυναμικού δράσης, ερευνήθηκαν αρχικά στα πράσινα φύκι της οικογένειας Characaea (Tazawa 1987). Αυτές οι ιοντικές μετατοπίσεις κατά τη διάρκεια ενός δυναμικού δράσης επιβεβαιώθηκαν με μια μέθοδο που χρησιμοποιεί ενέργεια-διασποράς μικροανάλυσης με ακτίνες X. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εισροή του ασβεστίου καθώς επίσης και του καλίου και η εκροή του χλωρίου αποτελούν μέρος της διαδικασίας παραγωγής των δυναμικών δράσης (Fromm and Spanswick 1993) και την μεταφορά του σήματος.

*Ολοκληρώνοντας καταλήγουμε ότι στα ανώτερα φυτά τα ηλεκτρικά σήματα διαβιβάζονται από κύτταρο σε κύτταρο μέσω των πλασμοδεσμών, ενώ η διάδοση σε*

*μεγάλες αποστάσεις κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης των ηθμοσωλήνων (sieve tubes) γίνετε μέσω των ιοντικών καναλιών.*

## **1.12 Ο ρόλος των ηλεκτρικών σημάτων στην επικοινωνία ρίζας-βλαστού**

Τα ‘μη-υδραυλικά’ σήματα μεταξύ της ρίζας και του βλαστού των φυτών που αναπτύσσονται σε ξηρό χόμα έχουν προκαλέσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Δεδομένου ότι τα φυτά που αναπτύσσονται σ’ αυτές τις συνθήκες παρουσίασαν κλείσιμο των στομάτων και αναστολή της ανάπτυξης των φύλλων, τα μη-υδραυλικά σήματα από τις ρίζες σηματοδοτούν τις αλλαγές στα φυτά με το πότισμα του χώματος (Davies and Zhang 1991). Κατά συνέπεια, τα στόματα εμφανίζονται να είναι σε θέση να λάβουν τις πληροφορίες από το ποτισμένο χόμα ανεξάρτητα από το δυναμικό του βρεγμένου φύλλου.

Δεδομένου ότι η ταχύτητα μιας χημικής ουσίας στο φλοιόωμα είναι σχετικά αργή 50-100cm/h, (στοιχεία για την υπόθεση ότι οι πληροφορίες μεταβιβάζονται με χημικά σήματα λήφθηκαν με προσδιορισμό των ιόντων του φυτικού χυμού, του pH, των αμινοξέων και των ορμονών (Schurr και Gollan 1990)) γεννήθηκε το ερώτημα πώς είναι ικανό το φύλλο να αντιδράει γρήγορα στη μεταβαλλόμενη κατάσταση ενυδάτωσης τους χώματος με βάση αυτά τα σήματα.

Οι πειραματικές μετρήσεις των ηλεκτρικών σημάτων ρίζας - βλαστού λήφθηκαν από ενδοκυτταρικές μετρήσεις του δυναμικού σε φυτό αραβόσιτου ύψους 80cm. Το φυτό υποβλήθηκε σε έναν κύκλο ξηρασίας 5 ημερών παρουσιάζοντας μια μείωση στη λήψη CO<sub>2</sub>, ενώ η διαφορά δυναμικού μεταξύ δύο σημείων της επιφάνειας παρουσίασε μια ημερήσια μεταβολή που φάνηκε να συσχετίζεται με τη παρουσία ύδατος στο χόμα. Μετά το πότισμα του χώματος αυξήθηκαν οι τιμές των CO<sub>2</sub> και του διαπνεόμενου από τα φυτά H<sub>2</sub>O και αναπτύχθηκε δυναμικό δράσης στα φύλλα. (Fromm and Fei 1998).

Αυτό αποδεικνύει ότι οι ηθμοσωλήνες (sieve tubes) χρησιμεύουν ως ένας διάυλος για τα ηλεκτρικά σήματα. Το δυναμικό των μεμβρανών των sieve tubes αποκρίθηκε γρήγορα στο πότισμα των ξηρών φυτών. Τα αποτελέσματα επομένως δείχνουν ότι η

ηλεκτρική επικοινωνία ρίζας-βλαστού διαδραματίζει έναν ουσιαστικό ρόλο στο συντονισμό των λειτουργιών τις ρίζας και των φύλλων.

### 1.13 Ο ρόλος των ηλεκτρικών σημάτων στη περίοδο της γονιμοποίησης και άνθισης

Σημαντικό ρόλο παίζουν τα ηλεκτρικά σήματα ακόμη και στη διέγερση της ωοθήκης των φυτών κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης. Οι Sinyukhin και Britikov (1967) κατέγραψαν ένα δυναμικό δράσης στα φυτά *Lilium martagon* και *Incarvillea grandiflora* λίγα λεπτά αφού τοποθέτησαν γύρη στους λοβούς.

Επίσης ηλεκτρικές αλλαγές του δυναμικού μετρήθηκαν σε λουλούδια *Lilium longiflorum* 5-6 ώρες μετά από τη γονιμοποίησή τους (Spanjers 1981). Κανένα σήμα δεν ήταν ανιχνεύσιμο κατά την εφαρμογή της «νεκρής» γύρης ή της γύρης άλλων ειδών. Τα διαφορετικά ερεθίσματα που εφαρμόζονταν προκαλούσαν τα συγκεκριμένα ηλεκτρικά σήματα που διαδίδονταν προς την ωοθήκη με ταχύτητες 1,3-3,5cm/s.

Το ερώτημα που γεννιέται είναι πως τα ηλεκτρικά σήματα προκαλούν βιοχημικές αντιδράσεις. Τα τελευταία μπορούν να επιτευχθούν μέσω των υπομοριακών αλλαγών των ιόντων  $K^+$ ,  $Cl^-$ , και  $Ca^{2+}$  που είναι αρμόδια για την παραγωγή των δυναμικών δράσης. Σύμφωνα με τον Davies (1987) οι τοπικές αλλαγές στην ιοντική συγκέντρωση μπορεί να οδηγήσει στις τροποποιημένες δραστηριότητες των ενζύμων στον κυψελοειδή τοίχο, στο πλασμαόλημα (plasmalemma) και στο κυτταρόπλασμα.

Όπως παρατηρήθηκε σε πειράματα σχετικά με τον έλεγχο άνθισης οι ενδογενείς ηλεκτρικές δραστηριότητες των φυτών μπορούν να επηρεάσουν ένα εξωτερικό ηλεκτρικό ρεύμα. Συγκεκριμένα στο φυτό μακράς-ημέρας *Spinacia oleracea* (Montavon and Greppin 1983, 1986) καθώς επίσης και στο φυτό μικρής-ημέρας *Chenopodium* (Adamec et al. 1989; Machackova et al. 1990; Machackova and Krekule 1991) η φωτοπεριοδική επαγωγή των λουλουδιών θα μπορούσε να εμποδιστεί από την εφαρμογή άμεσου ηλεκτρικού ρεύματος (συνεχές ρεύμα) μέσω ηλεκτροδίων. Το συμπέρασμα ήταν ότι το συνεχές ρεύμα παρεμπόδιζε πιθανώς τη μετάδοση του ερεθίσματος από την εστία που αυτό δημιουργήθηκε (Adamec and Krekule 1989a,b; Adamec et al. 1989).

## 1.14 Ο ρόλος των ηλεκτρικών σημάτων στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης

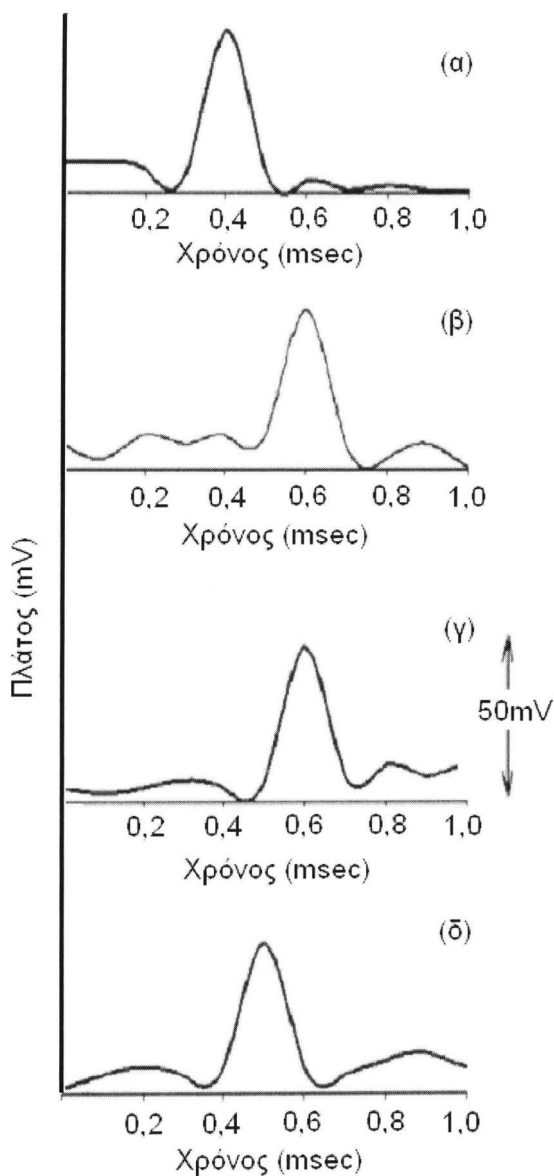
Το μεγαλύτερο μέρος των μελετών, για τις λειτουργίες των ηλεκτρικών σημάτων στα φυτά, επικεντρώνονται σε βιοτικές αντιδράσεις όπως για παράδειγμα η αντίδραση του φύλλου από θερμική καταπόνηση η οποία προκάλεσε δυναμικό μεταβλητότητας που μεταδίδονταν με 4-8mm/s σε γειτονικό φύλλο, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό την καθαρή πρόληψη CO<sub>2</sub> (Gamalei et al. 1994). Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν το ρόλο των ηλεκτρικών σημάτων στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης επειδή η υψηλή ταχύτητα διάδοσης τους αποκλείει τη συμμετοχή ενός αργού χημικού σήματος.

Επιπρόσθετα, βρέθηκαν στοιχεία για τη σχέση μεταξύ των ηλεκτρικών σημάτων και της φωτοσυνθετικής αντίδρασης, σε πειράματα που έγιναν στο φυτό *Mimosa*. (Koziolok et al. 2004).

Ειδικότερα σε πειραματική έρευνα με το φυτό *Elodea canadensis*, υπήρξε μετακίνηση των χλωροπλαστών η οποία συμπίπτει με τις αλλαγές στο δυναμικό των μεμβρανών, που καταγράφηκε από μικροηλεκτρόδια που τοποθετήθηκαν στο φύλλο του φυτού. (Gamalei et al. 1994). Η εφαρμογή άμεσου ρεύματος, δηλαδή ηλεκτρική διέγερση, διεγείρει παράγοντα πρωτεΐνωσης σχετιζόμενο με τη λειτουργία της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας στα φύλλα. (Herde et al. 1995). Σε φυτά σόγιας παρατηρήθηκε παραγωγή ηλεκτροχημικών αντιδράσεων που προκλήθηκαν από μπλε και κόκκινα συστήματα φωτοεκπομπής (σχ1.22). Μια φωτοαντίδραση αποτελεί μια ακολουθία των τεσσάρων ακόλουθων διαδικασιών:

1. υποδοχή του κατευθυντικού φωτεινού σήματος,
2. μεταγωγή σημάτων,
3. μετασχηματισμός του σήματος σε μια φυσιολογική αντίδραση
4. αντίδραση στο ερέθισμα

Τα πειράματα αποκαλύπτουν ότι η ακτινοβολία των φυτών σόγιας σε 450nm, 470nm, 670nm, και 730nm προκαλεί δυναμικά δράσης με χρόνους διάρκειας περίπου 0,3ms και πλάτη περίπου 50mV. (Volkov et al. 2004a,b, 2005).



**Σχήμα 1.22:** Δυναμικά δράσης στη σόγια, που προκαλούνται από την ακτινοβολία σε 450nm (α), 470nm (β), 671nm (γ) και 730nm (δ).



### 1.15 Ο ρόλος των ηλεκτρικών σημάτων στις επιδράσεις των περιβαλλοντικών συνθηκών

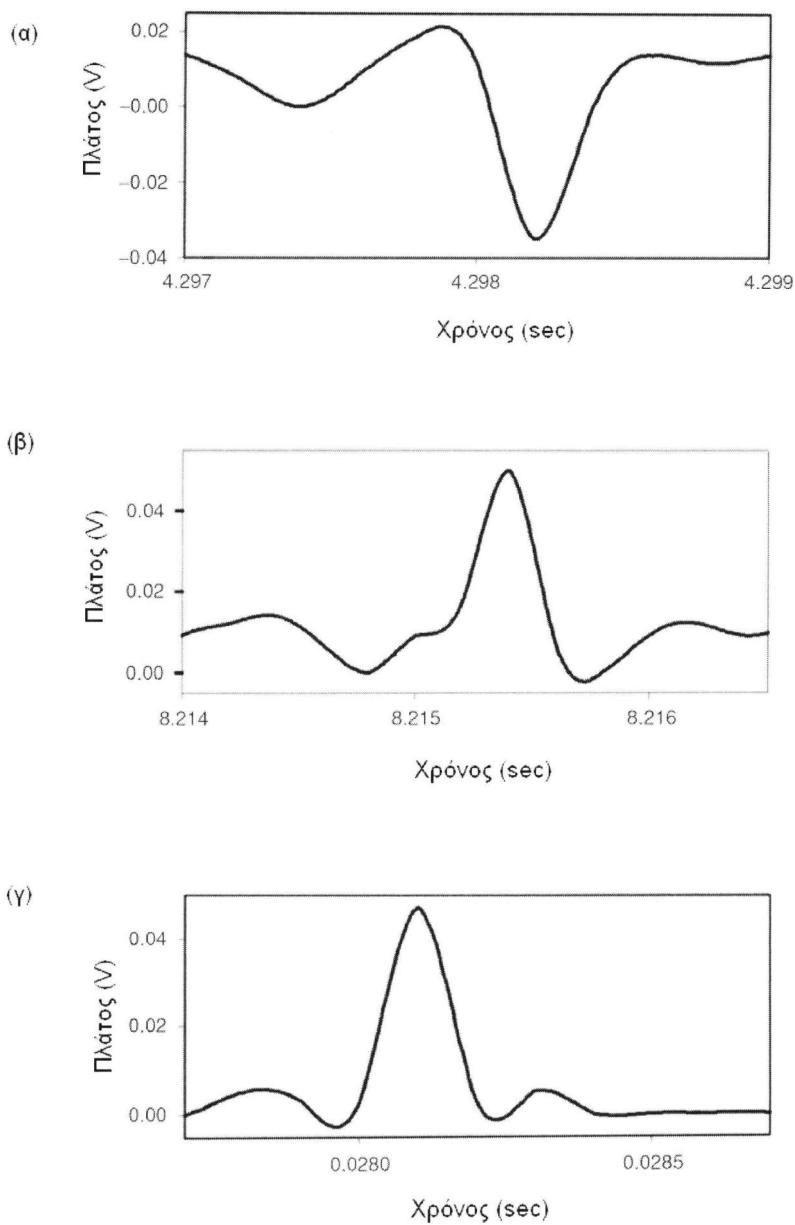
Τα φυτά αντιδρούν συνεχώς στα εξωτερικά ερεθίσματα προκειμένου να διατηρήσουν την ισορροπία τους. Οι εσωτερικές βιολογικές διαδικασίες και οι συνακόλουθες αντιδράσεις τους στο περιβάλλον συνδέονται πολύ με το φαινόμενο της διέγερσης των φυτικών κυττάρων. Η μεγάλη ευαισθησία του πρωτοπλάσματος στις χημικές αντιδράσεις είναι η βάση για τη διέγερση. Τα ευερέθιστα κύτταρα, οι ιστοί και τα όργανα αλλάζουν τις εσωτερικές συνθήκες τους και αντιδρούν στους εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Τα φυτά παράγουν διαφορετικούς τύπους εξωκυτταρικών ηλεκτρικών σημάτων σε συνδυασμό με την περιβαλλοντική πίεση.

Για παράδειγμα η όξινη βροχή έχει pH κάτω από 5,6 και περιλαμβάνει κατά προσέγγιση 70% θειικό οξύ το ενώ κατά 30% νιτρικό οξύ.

Ψεκάζοντας το φυτό σόγια με ένα διάλυμα  $H_2SO_4$ , σε μια περιοχή με pH 5,0-5,6, παρατηρήθηκε ότι δεν προκλήθηκαν δυναμικά δράσης ή αποκλίσεις στο δυναμικό ανάπαυσης. Εντούτοις, ο ψεκασμός των φύλλων του φυτού με 0,1ml όξινου διαλύματος ή με 10ml σταγόνων διαλύματος  $H_2SO_4$  ή  $HNO_3$  σε μία περιοχή του pH από 0 έως 4,9 προκαλεί δυναμικά δράσης στο φυτό της σόγιας (Shvetsova et al. 2001; Volkov and Mwesigwa 2001a,b; Volkov et al. 2001a,b, 2002a,b).

Στο σχήμα 1.23 απεικονίζεται η καταγραμμένη διαφορά δυναμικού μεταξύ δύο ηλεκτροδίων Ag/AgCl στο μίσχο της σόγιας α) μία, β) δεκαπέντε, και γ) σαρανταοκτώ ώρες μετά από τον ψεκασμό με 1ml 0,1N  $H_2SO_4$  επάνω στα φυτά. Η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων Ag/AgCl ήταν 5cm και η συχνότητα ανίχνευσης ήταν 10.000 δείγματα ανά δευτερόλεπτο. Η θερμοκρασία δωματίου ήταν 22 °C και η υγρασία 45-50%

Καταγράφηκε επίσης η επίδραση των φυτοφαρμάκων, και των ρύπων στα ηλεκτρικά σήματα που προκλήθηκαν από τα φυτά (Labady et al. 2002).



**Σχήμα 1.23:** Δυναμικά ηλεκτροδίων σε μίσχο σόγιας κατά τον ψεκασμό.

## 1.16 Ο ρόλος των ηλεκτρικών σημάτων στις επιθέσεις των εντομών

Οι Volkon και Haak (1995) ήταν οι πρώτοι που προσπάθησαν να ερευνήσουν όχι μόνο τον ρόλο των ηλεκτρικών σημάτων προκαλούνταν από ερεθίσματα των εντόμων που προσβάλλουν τα φυτά, αλλά επίσης να τεκμηριώσουν τον μηχανισμό με τον οποίο τα ηλεκτρικά σήματα επηρέαζαν τόσο τη βιοφυσική όσο και τη βιοχημική διαδικασία στους μακρινούς ιστούς. Οι αντιδράσεις των φυτών στην επίθεση χορτοφάγων εντόμων είναι σύνθετες και περιλαμβάνουν μια σειρά σημάτων, που οδηγούν στην ενεργοποίηση των μηχανισμών αυτοάμυνας.

Τα δυναμικά δράσης και παραλλαγής μετρήθηκαν στα φυτά της πατάτας παρουσία των προνυμφών του κανθάρου πατατών του Κολοράντο (*Leptinotarsa decemlineata*). Οι προνύμφες του εντόμου προσβάλλουν τα ανώτερα φύλλα των φυτών της πατάτας. Μετά από 6-10 ώρες καταγράφηκαν δυναμικά δράσης με πλάτη  $40 \pm 10 \text{ mV}$  σε διαστήματα  $2 \pm 0,5$  ωρών κατά τη διάρκεια μιας δύο ημερών δοκιμαστικής περιόδου.

Το έντομο προκάλεσε δυναμικά δράσης, τα οποία «ταξίδεψαν» κάτω από το μίσχο με ταχύτητα  $0,05 \text{ cm/s}$ . Το δυναμικό παραλλαγής μειώθηκε από τα  $30 \text{ mV}$  σε ένα επίπεδο σταθερού μεγέθους των  $0 \pm 5 \text{ mV}$ .

## 1.17 Ο ρόλος των ηλεκτρικών σημάτων στις επιδράσεις χαμηλών και υψηλής πεδίων τάσης

Οι πειραματικές μετρήσεις των ηλεκτρικών πεδίων στα φυτά μετράει ήδη πολλούς αιώνες, ο πρώτος που έκανε μια σειρά από πολλά πειράματα ήταν ο καθηγητής Φυσικής στο Ελσίνκι Karl Lemström. Είχε επισκεφτεί πολλές φορές την Αρκτική και ήταν έκπληκτος για το πόσο πράσινη και υγιής ήταν η βλάστηση, παρόλο το ελάχιστο ηλιακό φως και τη χαμηλή θερμοκρασία, και αναρωτήθηκε εάν αυτό συνέβαινε λόγω των αδύνατων ηλεκτρικών ρευμάτων μέσω της ατμόσφαιρας από ιόντα του αέρα.

Οι υποψίες του επιβεβαιώθηκαν όταν παρατήρησε τους ετήσιους δακτύλιους ανάπτυξης των ελάτων της περιοχής κατά τη διάρκεια αιχμών των ηλιακών κύκλων (όταν η αυγή ήταν περισσότερο ενεργή).

Για να εξετάσει τη θεωρία του, εξέθεσε μία σειρά από διαφορετικά δείγματα δέντρων που βρίσκονταν σε ευρωπαϊκές χώρες, τα οποία ήταν τοποθετημένα κάτω από καλώδια υψηλής τάσης. Από τα ηλεκτρικό πεδίο των καλωδίων που ήταν περίπου 10kV/m, διαπίστωσε ότι τα φυτά ήταν πιο πράσινα, πιο εύρωστα και παρουσίαζαν συχνά πολύ μεγάλη ανάπτυξη. Αν και η τεχνική αυτή δεν απέδιδε πάντα, υπήρξε μία ανταπόκριση στη διέγερση του ερεθίσματος κατά 45%.

Αργότερα ο Blackman, ο οποίος συνέχισε τα πειράματα χρησιμοποιώντας μεγαλύτερα ηλεκτρικά πεδία (20-40kV/m), παρατήρησε ότι δεν είχε σημασία αν τα καλώδια ήταν αρνητικά ή θετικά, αλλά αυτό που συντελούσε στην ανάπτυξη ήταν η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος. Ένα ρεύμα της τάξης των  $10^{-11} - 10^{-8}$  Amp ανά φυτό βοήθησε στην ανάπτυξη, αλλά μεγαλύτερης έντασης ρεύμα θα μπορούσε να είναι επιβλαβές (Blackman & Legg 1924). Όμως οι αντιδράσεις των φυτών δεν ήταν συνεχείς. Από τις δεκαοκτώ υπαίθριες δοκιμές που έγιναν στο σιτάρι, στο κριθάρι και τη βρώμη, μόνο οι δεκατέσσερις έδειξαν σημαντική αύξηση ξηρού βάρους.

Εντούτοις, οι έρευνες διακόπηκαν τη δεκαετία του '30, λόγω του μεγάλου κόστους, των ηλεκτρικών κινδύνων και την αβεβαιότητα των ορθών αποτελεσμάτων.

Τα φυτά φαίνονταν να χρησιμοποιούν τα πολύ δυνατά ηλεκτροστατικά πεδία που σχετίζονται με τις καταιγίδες. Αν ένα φυτό που βρίσκεται σε κατάσταση έλλειψης νερού πρόκειται να χρησιμοποιήσει αποτελεσματικά το νερό της βροχής, τότε θα πρέπει να αντιδράσει γρήγορα πριν αυτό απομακρυνθεί στα κατώτερα στρώματα του εδάφους όπου θα αποτελούσε μεγάλο πλεονέκτημα εάν η συλλογή του νερού άρχιζε πριν τη βροχή μέσω του χώματος στις ρίζες του φυτού. Το ηλεκτρικό πεδίο των σύννεφων είναι ένα άριστο σήμα για αυτό. Ο Schonland (1928) μέτρησε ότι ηλεκτρικό πεδίο, ήταν πάνω από 16kV/m κάτω από τα σύννεφα, παρόμοια με τις τιμές των πειραμάτων κατά Blackman. Ο Blackman (1923), διαπίστωσε ότι η έκθεση των σποριόφυτων δημητριακών σε ένα ηλεκτρικό πεδίο για μία και μόνο ώρα ήταν αρκετή ώστε να υποκινήσει την ανάπτυξη.

Αυτό παραπέμπει στο συμπέρασμα ότι το ηλεκτρικό πεδίο ενεργοποιεί τον μηχανισμό ανάπτυξης του φυτού, ο οποίος έπειτα παρέμεινε ενεργός για μερικές ώρες ακόμη. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγήσει την κοινή αντίληψη ότι η βλάστηση φαίνεται συχνά, κατά ασυνήθιστο τρόπο, πράσινη, έπειτα από μία καταιγίδα.

Παρόμοιες καταστάσεις όπως εκείνη του φαινομένου των ισχυρών ηλεκτρικών πεδίων μπορούν να συμβούν όταν ένα ασθενές DC ρεύμα εφαρμοστεί σε καλλιέργεια φυτικών ιστών. Ρεύματα του ενός ή των δύο  $\mu\text{A}$ , που εφαρμόστηκαν μεταξύ δύο ηλεκτροδίων επέφεραν πολλαπλές αυξήσεις πολλαπλασιαστικού υλικού του φυτού (Rathore and Goldsworthy 1985; Rathore et al. 1988) γεγονός που οφείλεται στην είσοδο ασβεστίου μέσα στα κυτταρόπλασμα (cytosol). (Melikov et al. 2001) Αυτό μπορεί να αυξήσει το ποσοστό του μεταβολισμού, επειδή τα ιόντα ασβεστίου αποτελούν συχνά αναπόσπαστο κομμάτι των ενζυμικών εκχύσεων, τα οποία ελέγχουν πολλές κυτταρικές διαδικασίες. Αυτές οι εκχύσεις ενζύμων είναι στην ουσία ενισχυτές, όπου ένα ενζυμικό μόριο ενεργοποιεί ένα μεγάλο αριθμό μορίων ενός άλλου ενζύμου, το οποίο ενεργοποιεί ένα τρίτο ένζυμο και κ.ο.κ. Ο συνδυασμός αυτών των ενζύμων με ιόντα ασβεστίου ρυθμίζει πολλές πτυχές του μεταβολισμού, όπως τη σύνθεση της χλωροφύλλης και την αύξηση και αναγέννηση ολόκληρων καλλιεργειών φυτών και ιστών (Alberts et al 2002).

Τεχνητά εφαρμοσμένα ηλεκτρικά ρεύματα μπορούν να υποκινήσουν την ανάπτυξη της ηλεκτρικής πολικότητας στα μονοκύτταρα, όπως τα ζυγωτικά, και έτσι να επιδράσουν στην ανάπτυξή τους. Αυτό είναι πιθανό, επειδή η ασύμμετρη είσοδος του ασβεστίου στις θετικές και αρνητικές πλευρές των κυττάρων καθορίζει πιο μέρος του κυττάρου θα αναπτυχθεί.

Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι εκείνο του Lund (1923) μεταξύ των τεχνητά εφαρμοσμένων ηλεκτρικών ρευμάτων και της πολικής αύξησης στα ζυγωτικά του φυκιού *Fucus*, το οποίο αποκτά πολικότητα όταν βλασταίνει. Αν και η κατεύθυνση αύξησής τους ελέγχεται κανονικά από τη κατεύθυνση του φωτός, ο Lund διαπίστωσε ότι ένα πολύ μικρής ηλεκτρικής έντασης ρεύμα, που εφαρμόστηκε στο σκοτάδι, έκανε τα ριζοειδή να μεγαλώσουν (το πρώτο ορατό σημάδι βλάστησης).

### **1.18 Ο ρόλος των ηλεκτρικών σημάτων σε φαινόμενα συντονισμού ηλεκτρομαγνητικών πεδίων**

Ο ιοντικός συντονισμός μπορεί εμφανίζεται όταν τα ιόντα κινούνται μέσα σε ένα σταθερό μαγνητικό πεδίο. Όταν τα ιόντα εκτίθενται ταυτόχρονα είτε σε ένα ηλεκτρικό είτε σ' ένα μαγνητικό πεδίο, που ταλαντεύεται σε αυτή τη συχνότητα, απορροφούν την ενέργειά του και αυξάνουν βαθμιαία το μέγεθος των τροχιών τους.

Αυτό αυξάνει την κινητική τους ενέργεια, η οποία αυξάνει την χημική τους δραστηριότητα και τη δυνατότητα να αντιδράσουν. Η συχνότητα συντονισμού για οποιοδήποτε ιόν μπορεί να καθοριστεί από τον τύπο:

$$\text{Συχνότητα (Hz)} = \frac{\text{Φορτισμένο ιόν (Coulombs)} \times \text{Σταθερή ένταση του μαγνητικού πεδίου (Tesla)}}{\text{Μάζα ιόντος (Kg)} \times 2\pi}$$

Οι δύο σημαντικότερες συχνότητες για τα βιολογικά αποτελέσματα είναι εκείνες για το κάλιο και το ασβέστιο. Η συχνότητα συντονισμού για το κάλιο στο γήινο μαγνητικό πεδίο είναι περίπου 16 Hz και αυτή για το ασβέστιο είναι περίπου 32 Hz (οι ακριβείς τιμές εξαρτώνται από την τοπική δύναμη του πεδίου). Οι συχνότητες για αυτά τα ιόντα είναι σημαντικές δεδομένου ότι δίνουν βιολογικά αποτελέσματα. Αφού με την αύξηση της κινητικής τους ενέργειας μπορεί να ενισχυθεί έτσι η χημική τους δραστηριότητα (Smith et al. 1993; Mehedintu and Berg 1997)

Οι ενδείξεις ότι ο συντονισμός μπορεί να αυξήσει τη χημική δραστηριότητα των στοιχείων, ακόμη και στα καθαρά φυσικά συστήματα, προέρχονται από την εργασία του Zhadin (1998), ο οποίος έδειξε ότι η ηλεκτρόλυση της γλουταμίνης ενισχύθηκε από ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο στη συχνότητα συντονισμού της.

Ο Smith (1993) διαπίστωσε ότι η συχνότητα καλίου υποκίνησε τη βλάστηση των σπόρων ραδικιών αλλά η συχνότητα ασβεστίου την εμπόδισε. Αυτό ήταν αναμενόμενο, δεδομένου ότι η συχνότητα καλίου θα ενίσχυε την περιβαλλοντική δραστηριότητα καλίου, θα την βοηθούσε να αντικαταστήσει το δεσμευμένο στην μεμβράνη ασβέστιο και έτσι θα αύξανε τη διαπερατότητα. Η συχνότητα ασβεστίου θα αύξανε τη δραστηριότητα των περιβαλλοντικών ιόντων ασβεστίου έτσι ώστε να ανταγωνιστούν αποτελεσματικότερα το κάλιο και να μειώσουν τη διαπερατότητα. Οι δύο συχνότητες πρέπει επομένως να έχουν επιπτώσεις στην αποστολή σήματος των κυττάρων και τις μεταβολικές συνέπειές τους σε αντίθετες κατευθύνσεις

Αυτό μπορεί να εξηγηθεί δεδομένου ότι η αναλογία φόρτισης/ μάζας για το ιόν ασβεστίου είναι σχεδόν διπλάσια από εκείνη για το κάλιο. Αυτό σημαίνει ότι η θεμελιώδης συχνότητα για το ασβέστιο αντιστοιχεί στην πρώτη αρμονική του καλίου και από κει και πέρα κάθε περαιτέρω αρμονική του καλίου αντιστοιχεί σε μια αρμονική του ασβεστίου.

Τα χρονικώς μεταβαλλόμενα ηλεκτρομαγνητικά πεδία προκαλούν δινορρεύματα μέσα και γύρω από τα ζωντανά κύτταρα, τα οποία αφαιρούν μερικά από τα ιόντα ασβεστίου που βοηθούν να σταθεροποιήσουν τις μεμβράνες τους. Αυτά τα ιόντα ασβεστίου αντικαθίστανται από ιόντα με μια χαμηλότερη αναλογία φόρτισης/μάζας, κυρίως καλίου, λιγότερο ικανά να σταθεροποιήσουν τη μεμβράνη. Έτσι αυξάνεται ο σχηματισμός των παροδικών πόρων στις μεμβράνες με αποτέλεσμα την επίπτωση στο μεταβολισμό.

Η έκθεση στη συχνότητα καλίου (16 Hz) αυξάνει την κινητική ενέργεια των ιόντων καλίου, η οποία τα κάνει ικανά να αντικαταστήσουν τα ιόντα ασβεστίου ευκολότερα. Η έκθεση σε 32 Hz (συχνότητα ασβεστίου) αυξάνει τη δραστηριότητα του ασβεστίου και την κάνει να ανταγωνιστεί αποτελεσματικότερα το κάλιο, και να μειώσει τη διαπερατότητα των μεμβρανών. Επομένως, δίνουν αντίθετα από τα βιολογικά αποτελέσματα.

Τα ραδιοκύματα μπορούν επίσης να δώσουν βιολογικά αποτελέσματα, αλλά μόνο εάν πάλλονται ή έχουν διαμορφωμένο πλάτος στις βιολογικά ενεργές χαμηλές συχνότητες

### 1.19 Σύνοψη της ηλεκτροφυσιολογίας στα φυτά

1. Όλες οι διαδικασίες των ζωντανών οργανισμών, που εξετάζονται με τις κατάλληλες και αρκετά ευαίσθητες τεχνικές μέτρησης, παράγουν ηλεκτρικά πεδία (Volkov 2000). Η διεξαγωγή της ηλεκτροχημικής διέγερσης πρέπει να θεωρηθεί ως μια από τις πιο καθολικές ιδιότητες των ζωντανών οργανισμών (Bertholon 1783; Bois-Reymond 1848; Burdon-Sanderson 1873, 1888; Burdon-Sanderson and Page 1876; Bose 1914, 1925, 1926, 1927)
2. Τα ηλεκτρικά δυναμικά έχουν μετρηθεί στον ιστό και σε όλο το επίπεδο του φυτού. Στο κυτταρικό επίπεδο, τα ηλεκτρικά δυναμικά υπάρχουν στις μεμβράνες. Οι ηλεκτρολύτες όπως το  $K^+$ , το  $Ca^{2+}$ , το  $H^+$  και το  $Cl^-$  δρουν ενεργά στη διαμόρφωση των ηλεκτρικών δυναμικών.

3. Τα δυναμικά δράσης έχουν ερευνηθεί με λεπτομέρεια σε πολλά είδη ανώτερων φυτών και έχουν βρεθεί ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες (Ksenzhek and Volkov 1998; Volkov et al. 2002c).
4. Τα δυναμικά δράσης είναι σήματα που προκαλούνται από την αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης (Volkov και Jovanov 2002, Lautner 2005). Η πλασματική μεμβράνη επιτρέπει στα κύτταρα, τους ιστούς και τα όργανα να διαβιβάσουν τα ηλεκτροχημικά σήματα απότομα και σε μεγάλες αποστάσεις.
5. Σύμφωνα με του Gunar και Sinyukhin (1963), τα κύματα διέγερσης ή τα δυναμικά δράσης στα ανώτερα φυτά είναι πιθανοί μηχανισμοί για την μεσοκυττάρια και ενδοκυττάρια επικοινωνία παρουσία περιβαλλοντικών αλλαγών.
6. Τα φυτά αποκρίνονται στα κατά τόπους ερεθίσματα που εφαρμόζονται, αλλά η διέγερση μπορεί να διασκορπιστεί σε όλο το φυτό. (Sinyukhon and Britikov 1967; Pickard 1973; Volkov 2000)
7. Τα κύματα της διέγερσης ταξιδεύουν από την κορυφή του μίσχου στη ρίζα και από τη ρίζα στην κορυφή του μίσχου, αλλά όχι με το ίδιο μέγεθος (Zavadzki 1980; Zavadzki et al. 1991)
8. Η ταχύτητα της διάδοσης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως τη χημική επεξεργασία, την ένταση του ερεθίσματος, τη μηχανική καταπόνηση και τη θερμοκρασία. (Volkov and Mwesigwa 2001a).
9. Οι ηθμοσωλήνες των φυτικών οργανισμών υποστηρίζουν τη μετακίνηση του υλικού και προκαλούν τη μεταφορά των βιοηλεκτρικών ωθήσεων (Sinyukhin and Gorchakov 1966, 1968, 1996).
10. Οι φυσικοί παράγοντες όπως τα ηλεκτρομαγνητικά ή τα βαρυτικά πεδία, η μηχανική καταπόνηση και οι επιδράσεις της θερμοκρασίας προκαλούν επίσης



- ηλεκτρικές δυναμικά. (Sibaoka 1962; Abe 1981; Eschrich et al. 1988; Eschrich and Fromm 1989, 1994; Fromm and Eschrich 1989; Pyatygin and Oprítov 1990; Fromm 1991; Fromm and Spanswick 1993; Fromm and Bauer 1994).
11. Τα βιοχημικά σήματα αποτελούν τη γρηγορότερη τεχνική μετάδοσης σημάτων σε απόσταση μεταξύ των ιστών και των οργάνων των φυτών. Τα φυτά ανταποκρίνονται γρήγορα στις αλλαγές της φωτεινής έντασης, της οσμωτικής πίεσης, της θερμοκρασίας, στην κοπή, στην μηχανική διέγερση και στη διαθεσιμότητα νερού (Davies and Schuster 1981; Davies 1983; Davies et al. 1991). Αυτές οι αντιδράσεις μπορούν να εμφανιστούν στα απόμακρα μέρη των φυτών αμέσως μετά την εμφάνιση του ερεθίσματος. (Stankovich and Davies 1996).
  12. Τα δυναμικά δράσης ενεργοποιούν τα ενζυματικά συστήματα των μεμβρανών.
  13. Η ταχύτητα της διάδοσης των δυναμικών δράσης εξαρτάται από τους ποικίλους τύπους που προκλήθηκε το στρεσάρισμα στα φυτά (Volkov et al. 2000). Η ταχύτητα της διάδοσης των βιοηλεκτρικών σημάτων κυμαίνεται από 0.05 cm/s ως 40 m/s.
  14. Τα δυναμικά δράσης στα ανώτερα φυτά μπορούν να είναι οι μεταφορείς πληροφοριών στη μεσοκυττάρια και ενδοκυτταρική επικοινωνία ως αντίδραση στις περιβαλλοντικές αλλαγές.
  15. Η επικοινωνία μπορεί να ολοκληρωθεί μέσω της διαμόρφωσης του πλάτους, της διάρκειας, της αλλαγής της κατεύθυνσης, της πολικότητας και του ποσοστού διάδοσης του ηλεκτρικού σήματος.
  16. Η μετάδοση σημάτων μέσα στα φυτά εξαρτάται από την ηλεκτρική αγωγιμότητα των πλασμοδεσμών σε κατεύθυνση κάθετη προς αυτές καθώς

επίσης και από τον υψηλό βαθμό ηλεκτρικής σύζευξης μέσω των πόρων των ηθμοσωληνών στη διαμήκη κατεύθυνση.

17. Στα ανώτερα φυτά τα ηλεκτρικά σήματα διαβιβάζονται από κύτταρο σε κύτταρο μέσω των πλασμοδεσμών, ενώ η διάδοση σε μεγάλες αποστάσεις κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης των ηθμοσωληνών (sieve tubes) γίνεται μέσω των ιοντικών καναλιών.

# 2

## Απόκτησης και επεξεργασία βιοηλεκτρικών σημάτων

---

### 2.1 Εισαγωγή

Η μέτρηση βιοηλεκτρικών σημάτων στηρίζεται στην αρχή της μεθόδου ποτενσιομετρίας για τη μέτρηση της ηλεκτρεγερτικής δύναμης ενός ηλεκτροχημικού συστήματος  $E_{\sigma}$  (κύτταρο). Με την κατασκευή εκλεκτικών ηλεκτροδίων και βάση αρχής της μεθόδου ποτενσιομετρίας μετράμε την ενεργότητα ενός ιόντος, η οποία σχετίζεται με την συγκέντρωσή του στο διάλυμα (σύμφωνα με την εξίσωση Nernst).

Κατά την διαδικασία της ποτενσιομετρίας η μέτρηση της ηλεκτρεγερτικής δύναμης ενός ηλεκτροχημικού συστήματος  $E_{\sigma}$  επιτυγχάνεται με χρήση ενός ηλεκτροδίου εργασίας  $E_{\text{εργ}}$  και ενός ηλεκτροδίου αναφοράς  $E_{\text{αν}}$ .

$$E_{\sigma} = E_{\text{ενδ}} - E_{\text{αν}}$$

Σε περίπτωση μέτρηση με συνδυασμό δύο διαλυμάτων με διαφορετική ιοντική σύνθεση εμφανίζεται το δυναμικό συνδέσμου (junction potential) των ηλεκτροδίων

$E_{\text{συνδ}}$ . Το δυναμικό αυτό έχει μικρό πλάτος με τυπική τιμή 1-2 mV και θα πρέπει να αφαιρείται από το αποτέλεσμα της μέτρησης. Η τελική σχέση ακολουθεί την εξίσωση:

$$E_{\sigma} = E_{\text{ενδ}} - (E_{\text{αν}} + E_{\text{συνδ}})$$

Για τη μέτρηση της διαφοράς δυναμικού  $E_{\sigma}$  θα πρέπει το όργανο που συνδέεται στα ηλεκτρόδια για την απόκτηση του σήματος να παρουσιάζει άπειρη αντίσταση λόγω της πολύ χαμηλής ροής ηλεκτρικού ρεύματος.

Για τον προσδιορισμό ενός ιόντος με μέτρηση της ηλεκτρεγερτικής δύναμης καταφεύγουμε στην μέθοδο της άμεσης ποτενσιομετρίας η οποία στηρίζεται στην γραμμική σχέση μεταξύ του δυναμικού του μετρητικού ηλεκτροδίου  $E_{\text{εν}}$  και του λογαρίθμου της ενεργότητας του προς μέτρηση ιόντος. Η μέτρηση της ηλεκτρεγερτικής δύναμης  $E$  δίνεται από την εξίσωση Nernst:

$$E = E_o - \left( \frac{RT}{nF} \right) \ln \left( \frac{\alpha_{\text{red}}}{\alpha_{\text{ox}}} \right)$$

όπου,

$E_o$ : δυναμικό του ηλεκτροδίου (volt),

$R$ : 8.31 volt coulomb  $^{\circ}\text{K}^{-1}$  mole $^{-1}$ ,

$T$ : η απόλυτη θερμοκρασία ( $^{\circ}\text{K}$ ),

$F$ : η σταθερά Faraday (96486.7 coulomb eq $^{-1}$ ),

$n$ : ο αριθμός των ηλεκτρονίων στην αντίδραση (eq mole $^{-1}$ ),

$a_{\text{αν}}$ : η ενεργότητα της αναγωγικής μορφής του οξειδωτικού/αναγωγικού στοιχείου (**reductant**).

$a_{\text{οξ}}$ : η ενεργότητα της οξειδωτικής μορφής του οξειδωτικού/αναγωγικού στοιχείου (**oxidant**).

Για εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων ισχύει η τροποποιημένη εξίσωση Nernst

$$E = E_{\text{σταθ}} + \left( 2,303 \frac{RT}{z_a F} \right) \log [a_A + K_{A,B}(a_B) + K_{A,C}(a_C)]$$

όπου,

- $a_A$  : η ενεργότητα του μετρήσιμου ιόντος,  
 $a_B, a_C$  : οι ενεργότητες των μη μετρήσιμων ιόντων ,  
 $K_{A,B} , K_{A,C}$  : οι ποτενσιομετρικοί συντελεστές εκλεκτικότητας,  
 $z_A, z_B, z_C$  : ακέραιος αριθμός φορτίο των ιόντων  
 $E_{σταθ}$  : σταθερός όρος για  $E_{σινδ}$ ,  $E_{αν}$  και  $E_{σινδ}$ .

Η κυτταρική μεμβράνη όταν βρίσκεται σε ισορροπία έχει δυναμικό ίσο με το δυναμικό Nernst. Σε κάθε μεταβολή της ισορροπίας της λόγω συγκεντρώσεις ιόντων που εμφανίζουν στο εσωτερικό και το εξωτερικό του κυττάρου ή της μετακίνησης των μέσω της ημιπερατής ιδιότητας της προκαλείται μεταβολή του δυναμικού Nernst τα οποία μέσω της άμεσης ποτενσιομετρίας μπορεί να ανιχνευθεί.

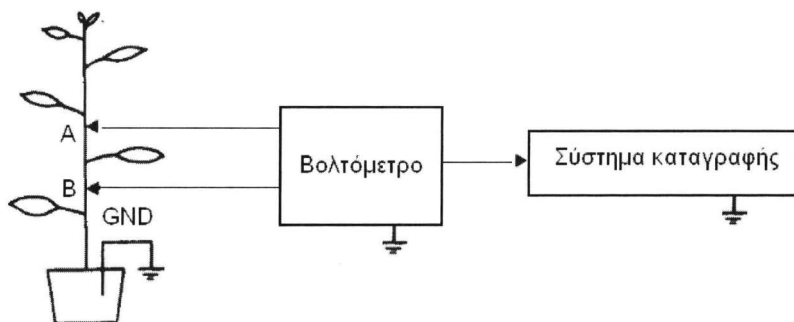
## 2.2 Δημιουργώντας επαφή με το φυτό

Η μέτρηση μιας τάσης απαιτεί ένα πλήρες ηλεκτρικό κύκλωμα ή ένα σύστημα που περιλαμβάνει τη συσκευή μέτρησης και ένα βολτόμετρο ή ένα ηλεκτρόμετρο. Η ηλεκτρική επαφή στο βιολογικό υλικό παρέχεται από ένα ηλεκτρόδιο. Αυτή η διεπαφή μεταξύ του βιολογικού δείγματος και του ηλεκτρομέτρου είναι πολύ σημαντική, δεδομένου ότι πρέπει να έχει μια χαμηλή ηλεκτρική αντίσταση που δεν παρεμποδίζει τα κύτταρα ή τους ιστούς που μετριοούνται. Υπάρχουν διάφορα είδη ενδεικτικών ηλεκτροδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μετρήσεις στα φυτά.

Προτού εξετάσουμε του τύπους των ηλεκτροδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την λήψη βιοσημάτων από φυτικούς οργανισμούς ορίζουμε τα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να εξετάζουμε για την επιλογή του κατάλληλου ηλεκτροδίου.

Στο σχήμα 2.1 φαίνεται ένα απλό πειραματικό σύστημα μέτρησης βιοσημάτων στα φυτά. Το κέντρο του συστήματος αποτελεί το βολτόμετρο (V) το οποίο μέσω μιας ψηφιακής οθόνης απεικονίζει το ηλεκτρικό δυναμικό μεταξύ των σημείων A και B πάνω στο φυτό μέσω αισθητήρων Ag/AgCl. Το βολτόμετρο, μπορεί επίσης να παρέχει και μία έξοδο για να οδηγήσει μία συσκευή απεικόνισης δεδομένων, έναν καταγραφέα γραφημάτων, αν απαιτείται διαρκής καταγραφή της μεταβολής του βιοσήματος με το χρόνο, ή ένα σύστημα διαχείρισης δεδομένων που βασίζεται στη χρήση ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή. Το βολτόμετρο (V) και οι συσκευές

απεικόνισης (D) που χρησιμοποιούνται στις μετρήσεις πάνω σε φυτά έχουν αυστηρά τεχνικά χαρακτηριστικά από αυτά που χρησιμοποιούνται σε συστήματα ζωικών μετρήσεων. Οι ηλεκτρικές επαφές (A, B) μεταξύ του φυτού και των μεταλλικών οδηγιών προς το βολτόμετρο είναι κρίσιμης σημασίας και συνήθως απαιτείται να κατασκευάζονται στο εργαστήριο προκειμένου να ικανοποιούν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.



Σχήμα2.1: Απλοποιημένο σύστημα μέτρησης βιοσημάτων στα φυτά.

### 2.3 Χαρακτηριστικά ηλεκτροδίων

Τα χαρακτηριστικά που εξετάζουμε για την επιλογή ή την κατασκευή ενός ηλεκτροδίου επαφής για την μέτρηση βιοηλεκτρικών σημάτων στους φυτικούς οργανισμούς είναι:

1. Καμπύλη αναφοράς
2. Ακρίβεια ανίχνευσης
3. Απόκριση κατά Nernst
4. Ποτενσιομετρικός συντελεστής επιλεκτικότητας
5. Χρόνος απόκρισης
6. Διακριτική ικανότητα (resolution)
7. Σφάλμα επαναληψιμότητας
8. Αξιοπιστία (Reliability)
9. Ολίσθηση (drift)
10. Χρόνος ζωής

### 2.3.1 Καμπύλη αναφοράς

Για τα εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων ισχύει η τροποποιημένη εξίσωση Nernst η οποία είναι γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου της ενεργότητας των ιόντων, στα οποία το ηλεκτρόδιο μετρά.

$$E = E_{\sigma\sigma\alpha\theta} + \left( 2,303 \frac{RT}{z_o F} \right) \log [ a_A + K_{A,B} (a_B) + K_{A,C} (a_C) ]$$

### 2.3.2 Ακρίβεια ανίχνευσης

Ως ακρίβεια ανίχνευσης ορίζεται το ποσοστό απόκλισης της μετρήσιμης τιμής του εκλεκτικού ηλεκτροδίου από την πραγματική τιμή του μεγέθους. Ο συντελεστής ακρίβεια ανίχνευσης, επηρεάζεται από την ηλικία, την φύση της κυτταρικής μεμβράνης και της συνθήκες του περιβάλλοντος. Ειδικά για του δεύτερου τύπου ηλεκτροδίων επαφής Ag/AgCl , απαιτείται διαρκής αντικατάσταση τους λόγω οξείδωση τους.

### 2.3.3 Απόκριση κατά Nernst

Κάθε εκλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντων μετρά δυναμικό σύμφωνα με την εξίσωση κατά Nernst σε μία δεδομένη περιοχή ενεργοτήτων ιόντων.

### 2.3.4 Ποτενσιομετρικός συντελεστής επιλεκτικότητας

Η ικανότητα ενός εκλεκτικού ηλεκτροδίου να παρουσιάζει απόκριση για ένα και μόνο ιόν καθορίζει τον βαθμός επιλεκτικότητας του ηλεκτροδίου γνωστό ως ποτενσιομετρικό συντελεστή επιλεκτικότητας  $K_{A,B}$ . Ο συντελεστής επιλεκτικότητας ενός εκλεκτικού ηλεκτροδίου μεταξύ ενός ιόντος A και B αυξάνεται όταν αυξάνεται ο συντελεστής  $K_{A,B}$  και ο λόγος  $a_B/a_A$ .

### 2.3.5 Χρόνος απόκρισης

Ως χρόνος απόκρισης ορίζεται ο χρόνος που απαιτείται από τη στιγμή της επαφής ενός ζεύγους ηλεκτροδίων (μετρητικού και αναφοράς) μέχρι την λήψη σταθερού

δυναμικού σε κατάσταση ανάπαυσης της κυτταρικής μεμβράνης. Ο χρόνος αυτός κυμαίνεται από μερικά ms μέχρι μερικά λεπτά, και εξαρτάται από το υλικό κατασκευή των ηλεκτροδίων.

### 2.3.6 Διακριτική ικανότητα (resolution)

Η διακριτική ικανότητα ενός αισθητήρα αφορά τη μικρότερη αύξηση διέγερσης την οποία μπορεί να ανιχνεύσει.

### 2.3.7 Σφάλμα επαναληψιμότητας

Σφάλμα επαναληψιμότητας (δυνατότητας αναπαραγωγής) καλείται η αδυναμία ενός αισθητήρα να αποδόσει την ίδια τιμή μέτρησης κάτω από ίδιες συνθήκες. Συγκεκριμένα εκφράζεται ως η μέγιστη διαφορά μεταξύ επαναλαμβανόμενων μετρήσεων και εκφράζεται ως:

$$\delta = \frac{\Delta}{FS} 100\%$$

όπου,

FS: εύρος εισόδου μέτρησης

$\Delta$ : απόκλιση από την πραγματική τιμή του μεγέθους

Το σφάλμα της επαναληψιμότητας οφείλεται σε διάφορους φυσικούς παράγοντες των υλικών κατασκευή του αισθητήρα.

### 2.3.8 Αξιοπιστία (Reliability)

Αξιοπιστία καλείται η ικανότητα που έχει ένα ηλεκτρόδιο να εργάζεται χωρίς σφάλματα για μεγάλο χρονικό διάστημα.

### 2.3.9 Ολίσθηση (drift)

Η ολίσθηση είναι ένα σύνθετο φαινόμενο του οποίου τα αποτελέσματα είναι η αλλαγή στην τιμή της ευαισθησίας του ηλεκτροδίου. Σε ολίσθηση οδηγούν οι μεταβολές των περιβαλλοντικών παραμέτρων όπως η θερμοκρασία, η υγρασία που επιδρούν στον



αισθητήρα. Η έκφραση μηδενική ολίσθηση (zero drift) περιγράφει το φαινόμενο όταν η μηδενική ένδειξη ενός αισθητήρα μεταβάλλεται εξαιτίας μίας αλλαγής που συμβαίνει στις συνθήκες περιβάλλοντος κατάστασης ηρεμίας. Η μονάδα μέτρησης αυτού του είδους της ολίσθησης είναι τα Volt/ $^{\circ}$ C. Συχνά αναφέρεται ως συντελεστής μηδενικής ολίσθησης εξαρτώμενος από τη θερμοκρασία. Αν ένα ηλεκτρόδιο είναι ευαίσθητο σε περισσότερες από μία περιβαλλοντικές παραμέτρους, τότε θα εμφανίζει συντελεστή μηδενικής ολίσθησης για κάθε μία από αυτές. Η ολίσθηση της ευαισθησίας (sensitivity drift) προσδιορίζει το ποσό της μεταβολής της ευαισθησίας ενός ηλεκτροδίου καθώς οι περιβαλλοντικές συνθήκες αλλάζουν.

### 2.3.10 Χρόνος ζωής

Ως χρόνος ζωής των ηλεκτροδίων στερεής κατάστασης και των ηλεκτροδίων υάλου είναι 2-3 χρόνια, ενώ των ηλεκτροδίων υγρού ιονανταλλάκτη 1-2 μήνες.

## 2.4 Τύποι ηλεκτροδίων

Οι τύποι των ηλεκτροδίων που χρησιμοποιούνται ως για την δημιουργία επαφής και την μέτρησης βιοηλεκτρικών σημάτων στους φυτικούς οργανισμούς είναι τα:

1. Ηλεκτρόδια πρώτου τύπου
2. Ηλεκτρόδια δευτέρου τύπου
3. Ηλεκτρόδια μεμβράνης
4. Ηλεκτρόδια αναφοράς

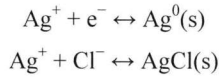
### 2.4.1 Ηλεκτρόδια πρώτου τύπου

Ένα μέταλλο M σε επαφή με διάλυμα  $Mn^{+}$  αποτελεί ένα ηλεκτρόδιο πρώτου είδους. Τα ηλεκτρόδια που στοιχεία που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία ηλεκτροδίων πρώτου τύπου είναι: Ag, Cu, Hg, Pb, και Cd.

### 2.4.2 Ηλεκτρόδια δευτέρου τύπου

Τα ηλεκτρόδια δευτέρου τύπου ακολουθούν την μορφή  $M/M_mX_x, X^{b-}$ , όπου  $M_mX_x$  είναι ένα δυσδιάλυτο άλας. Το ποίο συνήθης ηλεκτρόδιο δευτέρου τύπου είναι το

ηλεκτρόδιο αργύρου - χλωριούχου αργύρου (Ag/AgCl) και το οποίο χρησιμοποιείται για την μέτρηση της ενεργότητας των ιόντων  $\text{Cl}^-$  και  $\text{Ag}^+$ . Το Ag/AgCl λειτουργεί ως ένα οξειδοαναγωγικό ηλεκτρόδιο σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις:



Η εξίσωση του Nernst που ακολουθεί περιγράφει την εξάρτηση του δυναμικού που παρατηρείται ανάμεσα στο ηλεκτρόδιο Ag/AgCl και τη συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου:

$$E = E_o - \left( \frac{RT}{nF} \right) \ln a_{\text{Cl}^-}$$

Οι Ksenzhek και Volkov (1998) περιέγραψαν την κατασκευή ηλεκτροδίων Ag/AgCl από ασημένια καλώδια καλυμένα με τεφλόν. Τα ηλεκτρόδια Ag/AgCl είναι ευαίσθητα στις αλλαγές της θερμοκρασίας επομένως η θερμοκρασία πρέπει να παραμείνει σταθερή. Και τα δύο ηλεκτρόδια Ag/AgCl είναι ίδια και αναφέρονται ως ηλεκτρόδιο αναφοράς και ηλεκτρόδιο μέτρησης.

Το ηλεκτρόδιο αναφοράς (-) παρεμβάλλεται γενικά στον μίσχο ή στη ρίζα. Το άλλο ηλεκτρόδιο (+) εισέρχεται στο μίσχο ή ένα φύλλο. Μετά από την εισαγωγή των ηλεκτροδίων τα φυτά πρέπει να ηρεμήσουν έως ότου ληφθεί ένα σταθερό δυναμικό μεταξύ των ηλεκτροδίων λειτουργίας και αναφοράς.

Η εισαγωγή των ηλεκτροδίων στα φυτά προκαλεί δυναμικά δράσης σε όλο το μίσχο και αργές διακυμάνσεις του δυναμικού παραλλαγής. Μετά από περίπου 1-2 ώρες το δυναμικό παραλλαγής σταθεροποιείται.

Οι αυτόματες μετρήσεις του εξοκυτταρικού και ενδοκυτταρικού ηλεκτρικού δυναμικού μέσω ηλεκτρόδιο αργύρου - χλωριούχου αργύρου μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά στην ηλεκτροφυσιολογία των φυτών για να μελετηθούν οι μοριακοί ενδιάμεσοι μηχανισμοί της ιοντικής μεταφοράς, η επιρροή των εξωτερικών ερεθισμάτων στα φυτά και για την έρευνα των βιοηλεκτροχημικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των εντόμων και των φυτών (Volkov 2001).

### 2.4.2.1 Κατασκευή ηλεκτροδίων Ag/AgCl

Αν ένας αγωγός από ασήμι επενδυθεί με χλωρίδιο του ασημιού βυθίζοντάς τον μέσα σε ένα διάλυμα που περιέχει ιόντα χλωριδίου, ανταλλάσσει ηλεκτρικές φορτίσεις κατά μήκος της διεπαφής μετάλλου/ διαλύματος. Αυτό παρέχει μία σταθερή και αξιόπιστη ηλεκτρική επαφή μεταξύ του ασημένιου αγωγού και του διαλύματος. Το ηλεκτρικό δυναμικό που μετριέται με ένα ηλεκτρόδιο τέτοιου τύπου θα εξαρτηθεί από την συγκέντρωση των Cl<sup>-</sup> ιόντων μέσα στο διάλυμα. Επομένως είναι σημαντικό πως αυτή η συγκέντρωση πρέπει να παραμένει σταθερή κατά την διάρκεια ενός πειράματος. Τα ηλεκτρόδια αυτά μπορούν να ετοιμαστούν εύκολα στο εργαστήριο σε διάφορα σχήματα και μεγέθη (Purves, 1981, p. 51; Geddes, 1972, p. 32).

Για ηλεκτρόδια αγωγών, δύο αγωγοί από ασήμι (διαμέτρου 0.1-0.5mm), καθαρίζονται τρίβοντάς τους με γυαλόχαρτο και πλένοντάς τους με αλκοόλ. Οι δύο αγωγοί ενώνονται έτσι ώστε το περισσότερο από το μήκος τους να είναι βυθισμένο, χωρίς να εφάπτονται μεταξύ τους, μέσα σε μία λεκάνη από 0.1 M HCl. Ο ένας αγωγός συνδέεται στον θετικό ακροδέκτη μίας μπαταρίας 1.5V και ο άλλος αγωγός στον αρνητικό ακροδέκτη. Για μερικά λεπτά επιτρέπεται η διέλευση ρεύματος από τον αγωγό και μέσα σε αυτό το χρόνο ο αγωγός που συνδέεται στον θετικό ακροδέκτη της μπαταρίας επενδύεται με ένα στρώμα από χλωρίδιο του ασημιού με αποτέλεσμα να παράγονται φυσαλίδες αερίου H<sub>2</sub> στον άλλον αγωγό. Οι συνδέσεις των αγωγών με την μπαταρία σε αυτό το σημείο αναστρέφονται έτσι ώστε να μπορέσει να χλωριοποιηθεί και ο άλλος αγωγός.

Τα ηλεκτρόδια αυτά μπορούν να ετοιμαστούν με αυτό τον τρόπο από ασημένιο φύλλο αλουμινίου και από ασημένιο πλέγμα αγωγών. Τα ηλεκτρόδια αυτά μπορούν επίσης να προετοιμαστούν βυθίζοντας τον ασημένιο αγωγό σε λιωμένο χλωρίδιο του ασημιού. Αυτό παράγει μία μηχανικά δυνατότερη επένδυση. Εκτός των καλών ηλεκτροχημικών τους ιδιοτήτων, τα ηλεκτρόδια αυτά είναι διάσημα λόγω του ότι μπορούν να φτιαχτούν σε διαφορετικά σχήματα και μεγέθη προκειμένου να ταιριάζουν σε διαφορετικές πειραματικές καταστάσεις. Είναι επίσης πολύ κατάλληλα για την διέλευση ηλεκτρικών ρευμάτων

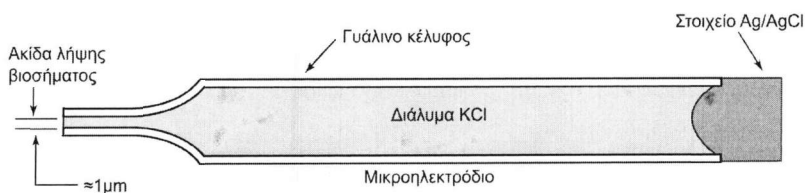
### 2.4.3 Ηλεκτρόδια μεμβράνης

Στην κατηγορία αυτή υπάγονται τα ηλεκτρόδια υάλου, και τα εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων, τα οποία αποκρίνονται επιλεκτικά σε ένα ή περισσότερα είδη ιόντων.

Τα εκλεκτικά μικροηλεκτρόδια εμπλουτισμένου υγρού συλλογής ιόντων χρησιμοποιούνται για να μετρούν τις ιοντικές μεταβολές στις μεμβράνες. Αυτές οι μετρήσεις μπορούν να γίνουν επίσης τόσο εξωτερικά όσο και εσωτερικά του κυττάρου. Για παράδειγμα, μια ροή ιόντων στην επιφάνεια της ρίζας μπορεί να μετρηθεί άμεσα χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδια συλλογής ιόντων. Από τις ενδοκυτταρικές μετρήσεις αντλούνται σημαντικές πληροφορίες για τη διάσπαση των θρεπτικών ουσιών, τη δυναμική των κυψελοειδών ιοντικών κινήσεων και τους μηχανισμούς μεταφοράς, ιδιαίτερα για τις ενεργειακές μεταβολές των ιόντων. Τα κύρια πλεονεκτήματα της χρήσης μικροηλεκτροδίων συλλογής ιόντων είναι:

1. προσφέρουν μια μη καταστρεπτική μέθοδο μέτρησης ιόντων.
2. δεν αλλάζουν τη δραστηριότητα του ιόντος που μετριέται.
3. είναι σχετικά φτηνή μέθοδος σε σύγκριση με άλλες μεθόδους μέτρησης ενδοκυτταρικών ιόντων και ο ίδιος ο εξοπλισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση μίας σειράς διαφορετικών ιόντων.

Κατασκευαστικά στο γυάλινο σωλήνα του μικροηλεκτροδίου εισάγεται διάλυμα χλωριδίου του καλίου ( $KCl$ ). Η δεξιά άκρη του καλύπτεται από υλικό  $Ag-AgCl$  για την λήψη του βιοσήματος ενώ η αριστερή άκρη του λόγω της πολύ μικρής διαμέτρου ( $1\mu m$ ) της παραμένει ανοιχτή.



**Σχήμα2.2:** Μικροηλεκτρόδιο εμπλουτισμένου υγρού

Όταν ένα μικροηλεκτρόδιο εισέρχεται μέσα σ' ένα κύτταρο, η τάση που μετριέται δίνει μία άμεση ένδειξη της ενδοκυτταρικής ιοντικής δραστηριότητας. Αυτή η κατάσταση περιπλέκεται από την τάση στην κυτταρική μεμβράνη, επειδή το ηλεκτρόδιο θα «διεγερθεί» από την επιπρόσθετη τάση λόγω της δραστηριότητας των ιόντων. Για να υπολογιστεί μόνο η διέγερση λόγω παρουσίας ιόντος η έξοδος η τάση της κυτταρικής μεμβράνης πρέπει να αφαιρεθεί. Η διαφορά των σημάτων μπορεί να επιτευχθεί με χρήση ηλεκτρονικών κυκλωμάτων.

Τα μικροηλεκτρόδια συλλογής ιόντων βαθμονομούνται βάση της συγκέντρωσης ή της δραστηριότητας των ανιχνευόμενων ιόντων. Για την βαθμονόμηση των μικροηλεκτροδίων χρησιμοποιούνται διαλύματα που μοιάζουν με το ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Η έξοδος του μικροηλεκτροδίου μετά την βαθμονόμηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα χωρίς οποιαδήποτε συνεκτίμηση του ενδοκυτταρικού συντελεστή δραστηριότητας.

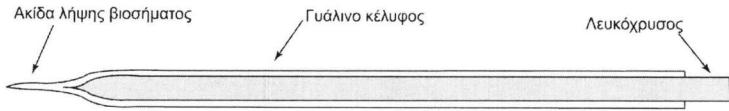
Η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία και συνεπώς τόσο η βαθμονόμηση όσο και οι ενδοκυτταρικές μετρήσεις πρέπει να γίνουν στην ίδια θερμοκρασία. Στη πράξη αυτό δεν είναι τόσο εύκολο, επειδή η γνώση του ιοντικού περιβάλλοντος είναι περιορισμένη, αν και υπάρχουν κάποιες πληροφορίες για τα γιγαντιαία φυκώδη κύτταρα (e.g. Okihara and Kiyosawa 1988).

Το όριο ανίχνευσης ορισμένων μικροηλεκτροδίων είναι πολύ μικρό, με τιμές μόλις  $10^{-9}$  M για ορισμένους τύπους ιόντων (Bakker and Pretsch 2005). Αυτό σημαίνει ότι το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης είναι πιθανό να υπάρχει μόνο για τις εξωκυτταρικές μετρήσεις, όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεγαλύτεροι διάμετροι άκρων.

Για τη διατήρησή τους, τα μικροηλεκτρόδια συλλογής ιόντων θα πρέπει να αποθηκεύονται, σε σφραγισμένο δοχείο διοξειδίου του πυριτίου στο σκοτάδι. Ο χρόνος απόκρισης του δυναμικού ηλεκτροδίου μεμβράνης είναι σχεδόν στιγμιαία, ενώ εκείνη του ηλεκτροδίου συλλογής ιόντων είναι συνήθως της τάξης των 5 – 20s, ανάλογα με τη μετρούμενη δραστηριότητα (Fluka 1996).

Το ηλεκτρόδιο υάλου αποτελείται από ένα γυάλινο σωληνάριο το οποίο παρουσιάζει επιλεκτικότητα στα ιόντα  $H^+$  και ορισμένα άλλα μονοσθενή κατιόντα ανάλογα με την σύσταση της μεμβράνης Η άκρη χαράσσεται και διαμορφώνεται

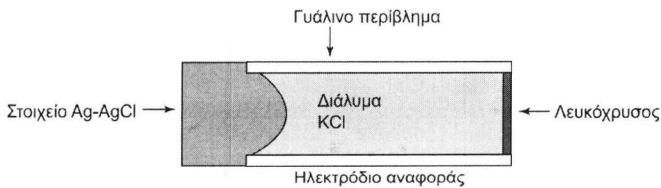
μέσω θερμότητας σε λεπτή ακμή. Αυτή η μεταλλική επίστρωση που δημιουργείται στην άκρη του σωλήνα είναι τόσο λεπτή ώστε να γίνεται απαραίτητη η μέτρηση σε μονάδες Ανγκστρον.



Σχήμα2.3: Μικροηλεκτρόδιο υάλου.

#### 2.4.4 Ηλεκτρόδια αναφοράς

Ως ηλεκτρόδια αναφοράς χρησιμοποιούνται συνήθως ηλεκτρόδια δευτέρου. Το ηλεκτρόδιο αναφοράς όπως και το μικροηλεκτρόδιο εμπλουτισμένου υγρού περιέχει διάλυμα χλωριδίου του καλίου (KCl) φέροντας την μια άκρη του περίβλημα από Ag/AgCl ενώ η άλλη άκρη του φέρει επαφή από έχει έναν διακόπτη από λευκόχρυσο για την μετάδοση του βιοδυναμικού. Το μέγεθός του είναι μεγαλύτερο από το μικροηλεκτρόδιο.



Σχήμα2.4: Μικροηλεκτρόδιο αναφοράς.

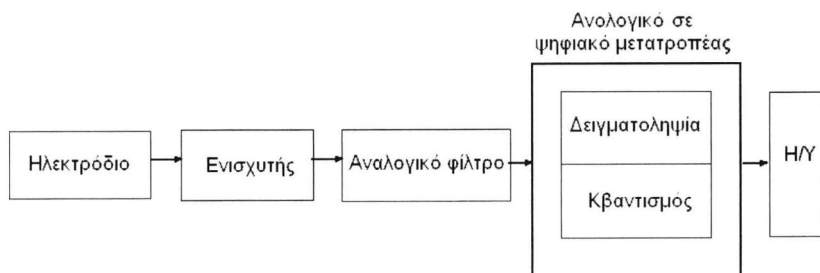
#### 2.4.5 Ηλεκτρόδια Καλομελά

Σε ένα ηλεκτρόδιο τέτοιου τύπου υγρός υδράργυρος βρίσκεται σε επαφή με μια πάστα από calomel (χλωρίδιο υδραργύρου,  $Hg_2Cl_2$ ) που βρίσκεται σε επαφή με υδατικό διάλυμα που περιέχει ιόντα  $Cl^-$ , συνήθως ένα κορεσμένο διάλυμα KCl. Και στο ηλεκτρόδιο αυτό, η διαφοράς δυναμικού που λαμβάνονται από αυτό το ηλεκτρόδιο εξαρτώνται από την συγκέντρωση  $Cl^-$  του διαλύματος. Τα ηλεκτρόδια αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως ως ηλεκτρόδια αναφοράς και είναι εύκολο να τα

προμηθευτεί κανείς από τους περισσότερους προμηθευτές εργαστηριακών εξοπλισμών. Είναι περισσότερο σταθερά από τα ηλεκτρόδια Ag/AgCl, αλλά λιγότερο κατάλληλα αν απαιτείται η διέλευση ρεύματος μέσα από αυτά. Είναι επίσης περισσότερο ογκώδης από τα ηλεκτρόδια Ag/AgCl και επομένως, μερικές φορές, περισσότερο δύσχερα.

## 2.5 Συστήματα απόκτησης βιοσημάτων

Η σχηματική απεικόνιση ενός γενικού συστήματος απόκτησης και επεξεργασίας βιοηλεκτρικών σημάτων απεικονίζεται στο σχήμα 2.5.



**Σχήμα 2.5:** Γενικό διάγραμμα συστήματος απόκτησης βιοηλεκτρικών δεδομένων

Τα τμήματα από τα οποία αποτελείται ένα σύστημα απόκτησης και επεξεργασίας βιοηλεκτρικών σημάτων είναι:

1. Ο ενισχυτής
2. Το αναλογικό φίλτρο
3. Ο αναλογικός σε ψηφιακό μετατροπέας
4. Το λογισμικό επεξεργασίας βιοσημάτων

### 2.5.1 Ο Ενισχυτής

Η πρώτη βαθμίδα ενός συστήματος απόκτησης βιοσημάτων είναι ο ενισχυτής που έχει ως σκοπός την ενίσχυση των χαμηλών δυναμικών των ηλεκτροδίων Ag/AgCl της τάξεως των  $\mu\text{V}$  και  $\text{mV}$  καθώς και την προσαρμογή της αντίστασης τους στο

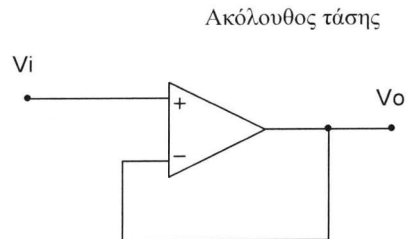
σύστημα απόκτηση δεδομένων. Τα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχει ο ενισχυτής βιοσημάτων είναι:

1. Υψηλό κέρδος (της τάξεως των 100db).
2. Γραμμική ενίσχυση όλων των συχνοτήτων του βιοσήματος
3. Κατάλληλο εύρος ζώνης (BandWidth, BW) σύμφωνα με την μέγιστη συχνότητα δειγματοληψίας του αναλογικού σε ψηφιακό μετατροπέα για την ενίσχυση όλων των συχνοτήτων του βιοσήματος
4. Μεγάλο λόγο απορρίψης κοινής λειτουργίας (CMRR) για την απορρίψη σημάτων κοινής λειτουργίας (π.χ. παροχής ηλεκτρικού ρεύματος)
5. Μικρό θερμικό θόρυβος και η ολίσθηση
6. Μεγάλη αντίσταση εισόδου με τυπική τιμή μεγαλύτερη της τάξης των  $10^{12} \Omega$ . Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται κυκλώματα τελεστικών στην είσοδο του ενισχυτή σε συνδεσμολογία ακολούθου τάσης. Η ενίσχυση ενός τελεστικού σε συνδεσμολογία ακολούθου τάσης ισούται με την μονάδα

$$A_0 = \frac{A_0}{1 + A_0} \rightarrow \square 1$$

Στη συνδεσμολογία ακολούθου τάσης εκμεταλλευόμαστε την ιδιότητα της απόκτησης πολύ μικρών ρευμάτων που απαιτούν την προσαρμογή τους σε ενισχυτές με πολύ υψηλή αντίσταση εισόδου ( $>10^{12} \Omega$ ). Η τιμή της αντίστασης του δίνεται από τη σχέση:

$$R_{in} = (1 + A_0) R_{iop} \rightarrow \square A_0 R_{iop}$$



## 2.5.2 Αναλογικό φίλτρο

Για την απόρριψη ανεπιθύμητων σημάτων σε έναν σύστημα μέτρησης βιοηλεκτρικών δεδομένων και φαινομένων αναδίπλωσης συχνοτήτων (anti-aliasing) κατά τη

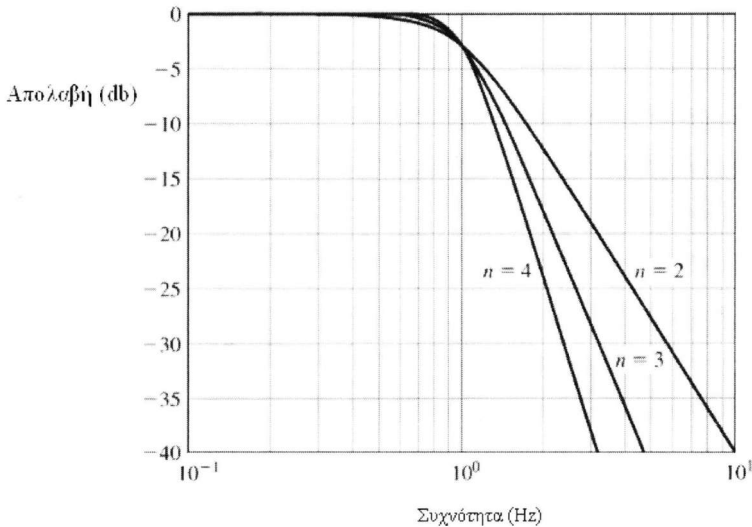


δειγματοληψία χρησιμοποιούμε διατάξεις αναλογικών φίλτρων. Ο πιο κοινός τύπος αναλογικού φίλτρου είναι το φίλτρο Butterworth. Η συνάρτηση μεταφορά ενός φίλτρου Butterworth είναι:

$$H(j\omega) = \frac{1}{1 + \left(\frac{\omega}{\omega_0}\right)^{2n}}$$

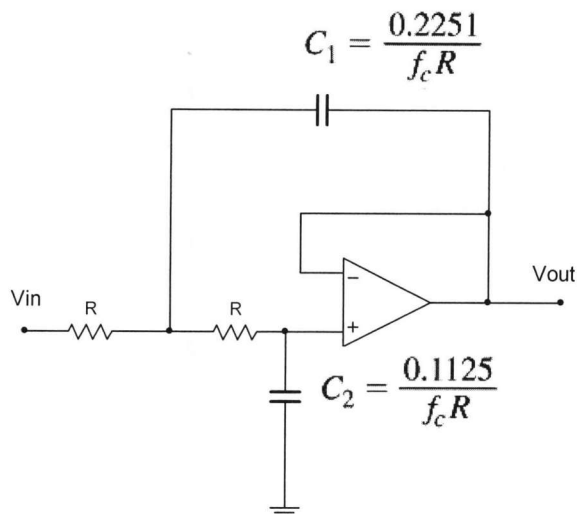
όπου  $n$ , η τάξη του φίλτρου (1,2,3 ...) και  $\omega_0$  η συχνότητα αποκοπής, -3db.

Στο παρακάτω γράφημα (σχ2.6) παρατηρούμε την απόκριση πλάτους ενός φίλτρου Butterworth 2ης, 3ης και 4ης τάξης.



**Σχήμα 2.6:** Καμπύλη απόκρισης φίλτρου Butterworth 2ης, 3ης και 4ης τάξης.

Ένα τυπικό κύκλωμα φίλτρου Butterworth 2<sup>ης</sup> τάξης με τελεστικό ενισχυτή παρουσιάζεται στη παρακάτω σχεδίαση (σχ2.7).



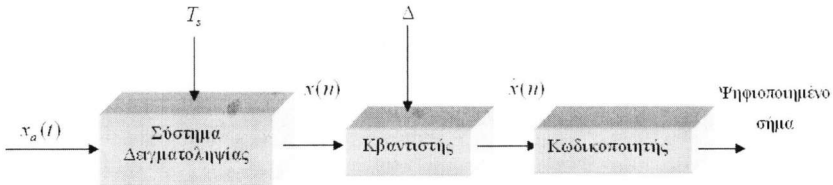
Σχήμα 2.7: Κύκλωμα φίλτρου Butterworth 2<sup>ης</sup> τάξης με Τελεστικό ενισχυτή.

### 2.5.3 Αναλογικός σε ψηφιακό μετατροπέας

Η συλλογή των δεδομένων γίνεται με τον A/D (αναλογικό/ ψηφιακό μετατροπέα) ο οποίος αποτελεί την τρίτη βαθμίδα του συστήματος βιοηλεκτρικών σημάτων. Ο A/D μετατροπέας μετασχηματίζει ένα αναλογικό σήμα σε μια ψηφιακή ακολουθία(σχ2.8). Η ψηφιακή επεξεργασία αποτελείται από τα παρακάτω στάδια:

1. Το σύστημα δειγματοληψίας, το οποίο μετατρέπει το σήμα συνεχούς χρόνου  $x_a(t)$  σε μια ακολουθία διακριτού χρόνου  $x(n)$  εξάγοντας και συγκρατώντας τις τιμές της  $x_a(t)$  σε ακέραια πολλαπλάσια ενός χρονικού διαστήματος που ονομάζεται περίοδος δειγματοληψίας και συμβολίζεται  $T_s$ .
2. Τον κβαντιστή, ο οποίος αντιστοιχίζει το συνεχές πλάτος των δειγμάτων σε ένα διακριτό σύνολο τιμών πλάτους. Για ομοιόμορφους κβαντιστές, η διαδικασία του κβαντισμού ορίζεται από έναν αριθμό δυαδικών ψηφίων (*bits*) και το διάστημα κβαντισμού  $\Delta$ .

3. Ο κωδικοποιητής, ο οποίος λαμβάνει το ψηφιακό σήμα  $x(n)$  και παράγει μια ακολουθία δυαδικών κωδικών λέξεων.



**Σχήμα 2.8:** Διαγραμματικό μπλοκ αναλογικού σε ψηφιακό μετατροπέας.

Τα συστήματα διακριτού χρόνου σχηματίζονται με την περιοδική δειγματοληψία ενός σήματος συνεχούς χρόνου όπως περιγράφονται στη παρακάτω σχέση:

$$x(n) = x_a(nT_s)$$

Η χρονική απόσταση μεταξύ των διαδοχικών μετρήσεων  $T_s$  είναι η περίοδος δειγματοληψίας και  $f_s = 1/T_s$  είναι η συχνότητα δειγματοληψίας, σε δείγματα ανά δευτερόλεπτο.

### 2.5.3.1 Κβαντισμός και κωδικοποίηση

Ο κβαντιστής είναι ένα μη-γραμμικό και μη αναστρέψιμο σύστημα το οποίο μετασχηματίζει μια ακολουθία εισόδου  $x(n)$  συνεχούς πλάτους, σε μια ακολουθία διακριτού πλάτους αντιστοιχίζοντας στα δείγματα της  $x(n)$  μια τιμή από ένα σύνολο πιθανών παλμών πεπερασμένου πλήθους. Η πράξη αυτή δίνεται από την σχέση:

$$\hat{x}(n) = Q[x(n)]$$

Ο κβαντιστής διαθέτει  $L+1$  επίπεδα απόφασης (decision levels)  $x_1, x_2, \dots, x_{L+1}$  τα οποία διαιρούν τη περιοχή τιμών πλάτους της  $x(n)$  σε  $L$  διαστήματα

$$I_k = [x_k, x_{k+1}] \quad k = 1, 2, \dots, L$$

Για μια είσοδο  $x(n)$  η οποία βρίσκεται μέσα σ' ένα διάστημα  $I_k$ , ο κβαντιστής εκχωρεί μια τιμή που ανήκει στο διάστημα αυτό,  $\hat{x}$ , στη  $x(n)$  (σχ2.9).



**Σχήμα 2.9:** Επίπεδα κβαντοποίησης.

Οι κβαντιστές μπορούν να έχουν στάθμες κβαντισμού που να απέχουν μεταξύ τους ίσες ή άνισες αποστάσεις. Για ίσες αποστάσεις οι στάθμες δίνονται από την σχέση:

$$\Delta = x_{k+1} - x_k$$

Η παράμετρος  $\Delta$  καλείται μήκος βήματος ή βαθμός διακριτικής ικανότητας του κβαντιστή και ο κβαντιστής λέγεται ομοιόμορφος ή γραμμικός. Η περιοχή εισόδου του σήματος είναι φραγμένη, η διαφορά δυναμικού δηλαδή του σήματος κινείται μεταξύ μιας ελάχιστης και μέγιστης διαφοράς δυναμικού  $\pm V$ . Η περιοχή πιθανών τιμών εισόδου αποδικοποιείται με ένα βήμα πλάτους:

$$\Delta = \frac{2V}{2^n}$$

όπου,

$n$  : ο αριθμός των bits της κάρτας δειγματοληψίας.

### 2.5.3.2 Θεωρία δειγματοληψίας

Όπως αναφέραμε στόχος μας είναι να μπορέσουμε να ψηφιοποιήσουμε ένα αναλογικό βιοσήμα. Η μετατροπή αυτή εμπεριέχει σφάλματα που εξαρτώνται από τις παρακάτω μεταβλητές:

- Το πλάτος της μέγιστης συχνότητας

- Την συχνότητα δειγματοληψίας ( $\Delta t$ )
- Την συνολική διάρκεια που πραγματοποιούμε την δειγματοληψία (T)

Ο προσδιορισμός των παραπάνω μεταβλητών γίνεται με κατάλληλη επεξεργασία σήματος και τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τον μετασχηματισμό Fourier.

Υπάρχουν άπειροι συνδυασμοί με τους οποίους μπορούμε να πραγματοποιήσουμε την δειγματοληψία μας, στόχος μας όμως είναι να πραγματοποιήσουμε μια δειγματοληψία που εμπεριέχει μέσα της όλες τις απαραίτητες πληροφορίες που εμπεριέχονται στο αναλογικό σήμα μας. Ο ρυθμός δειγματοληψίας ορίζεται σύμφωνα με την σχέση:

$$f_s = 1/\Delta t$$

Το θεώρημα δειγματοληψίας του Nyquist ορίζει ότι ο ρυθμός δειγματοληψίας πρέπει να είναι μεγαλύτερος από το διπλάσιο της μέγιστης συχνότητα του αναλογικού σήματος.

$$f_s > 2f_m$$

όπου,

$f_m$  : η μέγιστη συχνότητα του αναλογικού σήματος.

$$\text{ή} \quad \Delta t < \frac{1}{2f_m}$$

Στην περίπτωση όμως που δεν ικανοποιείται το κριτήριο του Nyquist και το αναλογικό μας σήμα λαμβάνεται μ' ένα ρυθμό μικρότερο του  $2f_m$ , η μέγιστη συχνότητα που περιέχεται στο αναλογικό σήμα θα περιληφθεί σαν σφάλμα σε κάποια χαμηλότερη συχνότητα του ψηφιακού σήματος. Αυτό το σφάλμα ονομάζεται σφάλμα αναδίπλωσης (alias frequency). Το φαινόμενο της αναδίπλωσης είναι συνηθισμένο κατά την ψηφιοποίηση αναλογικών σημάτων. Έστω ότι έχουμε ένα περιοδικό σήμα που περιγράφεται με τις σειρές Fourier σύμφωνα με τον τύπο:

$$x(t) = C \sin[2\pi ft + \varphi(f)]$$

Θεωρώντας ότι το  $x(t)$  λαμβάνεται με διάστημα  $\Delta t$ , έτσι ώστε η ψηφιοποιημένη μορφή του να παρουσιάζεται σύμφωνα με την σχέση:

$$x(n\Delta t) = C \sin[2\pi f n \Delta t + \varphi(f)] \quad \text{για } n = 0, 1, \dots, N-1$$

θέτοντας  $\sin x = \sin(x + 2\pi q)$ , όπου  $q$  είναι ένας τυχαίος ακέραιος αριθμός, ξαναυπολογίζουμε το  $x(n\Delta t)$  σύμφωνα με την σχέση:

$$C \sin[2\pi f n \Delta t + \varphi(f)] = C \sin[2\pi \eta f n \Delta t + 2\pi q + \varphi(f)] =$$

$$C \sin\left[2\pi \left(f + \frac{m}{\Delta t}\right) n \Delta t + \varphi(f)\right]$$

όπου,

$$m = 0, 1, 2, \dots$$

Η σχέση μας δείχνει ότι για οποιαδήποτε τιμή του  $\Delta t$ , οι συχνότητες του  $f$  και του  $f+m/\delta t$  δεν είναι ευδιάκριτες. Συνεπώς όλες οι συχνότητες του  $f+m/\delta t$  είναι οι αναδιπλωμένες συχνότητες του  $f$ . Σύμφωνα με τα κριτήρια του θεωρήματος δειγματοληψίας, όλες οι τιμές για  $m \geq 1$  θα απαλειφθούν από το ψηφιοποιημένο σήμα, μειώνοντας τις ασάφειες μεταξύ των συχνοτήτων.

Οι θεωρήσεις που κάναμε ισχύουν όμως και για σύνθετες μορφές σημάτων όπως απεριοδικά και τυχαία σήματα. Έτσι για γενικευμένες σειρές Fourier έχουμε:

$$y(n\Delta t) = \sum_{n=1}^{\infty} C_n \sin[2\pi n \Delta t + \phi_n(f)]$$

Για  $n = 0, 1, 2, \dots, N-1$  εκφράζουμε την σχέση ως εξής:

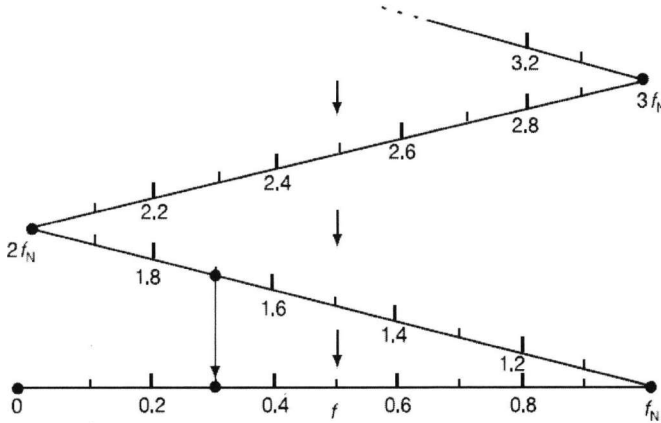
$$y(n\Delta t) = \sum_{n=1}^{\infty} C_l \sin\left[2\pi \left(lf + \frac{nl}{\Delta t}\right) n \Delta t + \phi_l(f)\right]$$

η σχέση αυτή παρουσιάζει το ίδιο φαινόμενο (alias) με την περίπτωση του περιοδικού σήματος. Η γενικευμένη σχέση του Nyquist εκφράζεται από την σχέση

$$f_N = \frac{f_s}{2} = \frac{1}{2\delta t} \quad \text{και απεικονίζει το αναδιπλωμένο σημείο του φαινομένου}$$

αναδίπλωσης. Η πραγματική συχνότητα που εμπεριέχεται στο αναλογικό σήμα και

έχει τιμή πάνω από  $f_N$  θα απεικονιστεί σαν αναδιπλωμένη συχνότητα μικρότερη του  $f_N$ . Μια αναδιπλωμένη συχνότητα  $f_a$  μπορεί να υπολογιστεί από το σχήμα 2.10 όπου ο άξονας της πραγματικής συχνότητας αναδιπλώνεται γύρω από τον εαυτό του στο σημείο  $f_N$  και στις αρμονικές του  $mf_N$  με  $m=1,2,\dots$



Σχήμα 2.10: Αναδίπλωση συχνοτήτων.

## 2.5.4 Λογισμικό επεξεργασίας βιοσημάτων

Για την ανάλυση, καταγραφή και αποθήκευση των βιοσημάτων απαιτείται ανάπτυξη κατάλληλου λογισμικού σύμφωνα με τις απαιτήσεις κάθε πειραματικής διάταξης για την οποία πέρα των μετρήσιμων βιοσημάτων μπορούν να απαιτούνται και μετρήσεις κλιματικών παραμέτρων.

## 2.6 Τεχνικές μετρήσεων βιοσημάτων

### 2.6.1 Τεχνική μέτρηση σε επίπεδο δυναμικού μεμβράνης (MP)

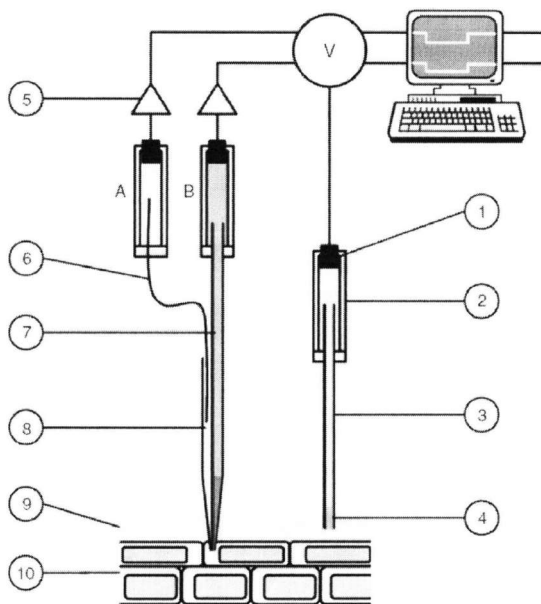
Για να γίνουν ενδοκυτταρικές μετρήσεις είναι απαραίτητο να μετρηθεί ταυτόχρονα το δυναμικό μεμβράνης είτε με διείσδυση ενός δεύτερου ηλεκτροδίου είτε, για μικρά κύτταρα, με τον συνδυασμό της συλλογής ιόντων και του ηλεκτροδίου μέτρησης τάσης μέσα σε ένα διπλό μικροηλεκτρόδιο. Η λέξη μικροηλεκτρόδιο χρησιμοποιείται συνήθως για να περιγράψει ένα μικροσιφώνιο γυαλιού που φέρει μία λεπτή άκρη και

το οποίο περιέχει αλατούχο διάλυμα 0,1M χλωριούχο κάλιο (KCl). Το μικροσιφόνιο μετρώντας το δυναμικό μεμβράνης MP παρέχει μία γέφυρα άλατος μεταξύ του εσωτερικού του ζωντανού κυττάρου και του μεταλλικού στοιχείου του μικροηλεκτροδίου. Η μετάδοση του σήματος μεταξύ του αλατούχου διαλύματος μέσα στο μικροηλεκτρόδιο στον ενισχυτή πραγματοποιείται συνήθως μέσω μιας μεταλλικής επαφή Ag/AgCl. Ένα μικροηλεκτρόδιο που συλλέγει ιόντα περιέχει μία μεμβράνη συλλογής ιόντων στην άκρη του γυάλινου μικροσιφωνίου και αποκρίνεται τόσο στο δυναμικό μεμβράνης όσο και στη δραστηριότητα των ιόντων που συλλέγει.

Προκειμένου να μετρηθούν πολλά διαφορετικά ιόντα, είναι απαραίτητο να συνδυαστούν διαφορετικά ηλεκτρόδια και να δημιουργηθεί ένα πολυ-μικροηλεκτρόδιο. Η χρήση ειδικής βιντεοκάμερας κρίνεται απαραίτητη προκειμένου το ηλεκτρόδιο να οδηγηθεί ακριβώς στο επιθυμητό σημείο επάνω στον ιστό των φύλλων. Στην εικόνα 2.11 δίνεται η σχηματική αναπαράσταση ενός διπλού μικροηλεκτροδίου συλλογής ιόντων. Η πειραματική διάταξη για λήψη ενδοκυτταρικών μετρήσεων περιλαμβάνει:

1. στοιχείο Ag / AgCl,
2. θάλαμο συγκέντρωσης,
3. γέφυρα άλατος,
4. πορώδες τριμμένο γυαλί,
5. ενισχυτή σημάτων,
6. ηλεκτρόδιο Ag / AgCl,
7. ηλεκτρόδιο συλλογής ιόντων με αισθητήρα,
8. κύτταρο δυναμικού μεμβράνης γεμάτο με 0,1M KCl,
9. θρεπτικό διάλυμα φυτού,
10. φυτικό ιστό με την άκρη του μικροηλεκτροδίου μέσα σ' ένα κύτταρο.





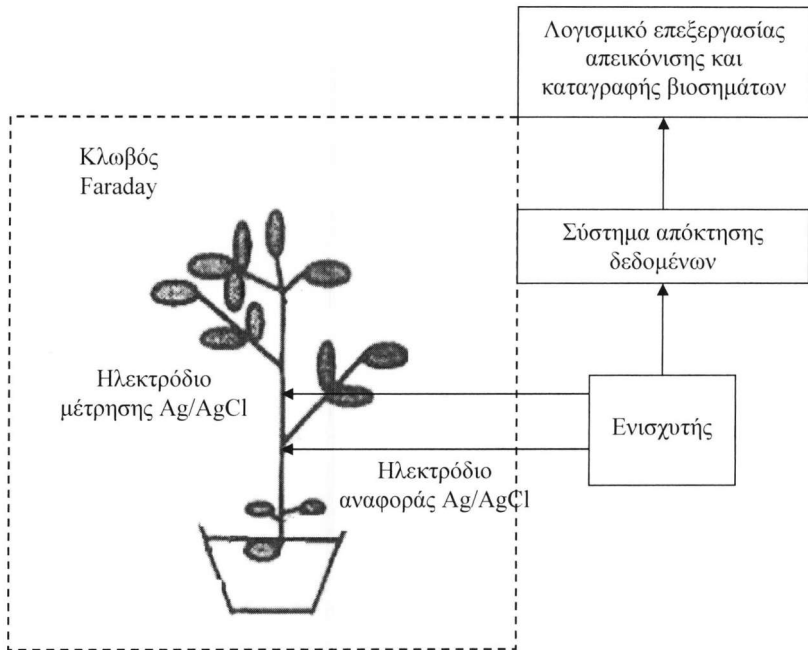
**Σχήμα 2.11:** Διάταξη μέτρησης σε επίπεδο δυναμικού μεμβράνης

## 2.6.2 Τεχνική μέτρησης των δυναμικών δράσης και ανάπαυσης

Τα κύτταρα όπως εξετάσαμε στο κεφάλαιο 1 παράγουν ηλεκτρικό δυναμικό, το οποίο μπορεί να επηρεάσει ηλεκτρικά κυκλώματα. Οι ηλεκτρικοί παλμοί, που μπορεί να προκύψουν ή να δημιουργηθούν από τη διέγερση, μπορούν να διαδοθούν σε γειτονικά κύτταρα. Η αλλαγή του διαμεμβρανικού δυναμικού δημιουργεί ένα κύμα διπόλωσης ή δυναμικού δράσης, το οποίο επηρεάζει την παρακείμενη, μεμβράνη ανάπαυσης. Άρα, όταν το φλοιώμα διεγείρεται με οποιοδήποτε τρόπο το δυναμικό δράσης αναπαράγεται σε όλο το μήκος της κυτταρικής μεμβράνης και του φλοιώματος με μία σταθερή τάση.

Για να γίνουν εξωκυτταρικές μετρήσεις των δυναμικών δράσης και ανάπαυσης με χρήση επιφανειακών ηλεκτροδίων Ag/AgCl ή καλομέλανος όλες οι ηλεκτροχημικές μετρήσεις πρέπει να διεξαχθούν σε σταθερό περιβάλλον μέσα σ' έναν κλωβό Faraday. Όλα τα καλώδια, όταν δεν προστατεύονται κατάλληλα, είναι τυλιγμένα με

φύλλο αλουμνίου προκειμένου να μειωθεί ο θόρυβος. Τα αναστρέψιμα ηλεκτρόδια, συνδέονται σε έναν ενισχυτή υψηλού κέρδους με υψηλή εμπέδηση εισόδου. Στη συνέχεια με χρήση συστημάτων απόκτησης δεδομένων που φέρουν αναλογικά φίλτρα αντιαναδίπλωσης (Butterworth) γίνεται καταγραφή των βιοσημάτων. Οι Volkon και Haack (1995) μέτρησαν το δυναμικό δράσης, που προκαλείται από μηχανική καταπόνηση στους φυτικούς ιστούς χρησιμοποιώντας μερικά ηλεκτρόδια  $Ag/AgCl$  και ένα σύστημα ενίσχυσης καταγραφής ακολουθώντας την διάταξη του σχήματος 2.12.



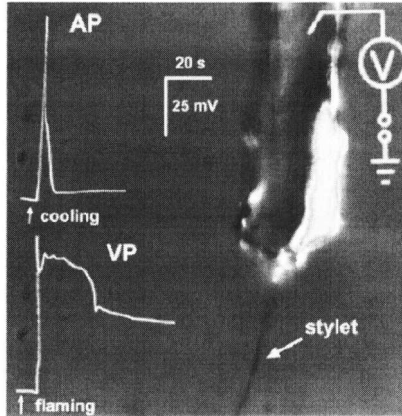
Σχήμα 2.12: Διάταξη μέτρησης δυναμικών δράσης και ανάπαυσης.

### 2.6.3 Τεχνική των ηλεκτρικών σημάτων μέσα στο φλοιώμα

Δεδομένου ότι το φλοιώμα βρίσκεται μέσα στο σώμα των φυτών (πολλά στρώματα κυττάρων μακριά από την επιφάνεια τους), τα πειράματα καταγραφής των ηλεκτρικών σημάτων μέσω του φλοιώματος είναι δύσκολο να εκτελεστούν. Οι μετρήσεις με χρήση μικροηλεκτροδίου σε συνδυασμό με διαλύματα χρωστικών

ουσιών που εγχέονται στο κύτταρο που μετρείται (αφού απέκτησαν ηλεκτροφυσιολογικές επιδράσεις), είναι μία χρονοβόρα τεχνική, επειδή η άκρη του μικροηλεκτροδίου δεν εισέρχεται σωστά στο φλοιώμα.

Μικροηλεκτρόδια έρχονται σ' επαφή με τα εκκρίματα που επιτρέπουν τον έλεγχο του δυναμικού μεμβρανών των ηθμοσωληνών και των αλλαγών τους μετά από διέγερση του φυτού (Wright and Fisher 1981; Fromm and Eschrich 1988b). Στο σχήμα 2.13 με την εισαγωγή μικροηλεκτροδίου καταγράφεται το δυναμικό δράσης (AP) και το δυναμικό μεταβλητότητας (VP) στους ηθμοσωλήνες (sieve tubes) του φυτού *Mimosa*. (Fromm και Eschrich 1989).



**Σχήμα 2.13:** Μετάδοση των δυναμικών δράσης (AP) και των δυναμικών παραλλαγής (VP) στους ηθμοσωλήνες του φυτού *Mimosa*.

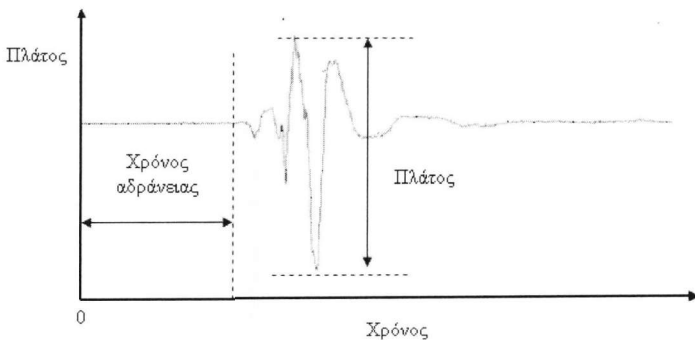
## 2.7 Τεχνικές επεξεργασίας βιολογικών σημάτων

Για την μελέτη των ηλεκτροφυσιολογικών φαινομένων μπορούμε να κατηγοριοποιήσουμε της μεθόδους επεξεργασίας στα παρακάτω τέσσερα πεδία που δημιουργούνται από στοιχεία που εξάγονται ή στηρίζονται σε μετρήσεις των βιοσημάτων:

- I. Πεδίο επεξεργασίας των σημάτων στο χρόνο (Time base analysis). Το πεδίο αυτό παρέχει στοιχεία που αφορούν στο πλάτος, τη μέση τιμή του σήματος, την πολικότητα του βιοσήματος και τον χρόνο αδράνειας της μέτρησης.
- II. Πεδίο επεξεργασίας στατιστικής σημαντικότητας (statistic probability analysis). Το πεδίο αυτό παρέχει στοιχεία για συσχέτιση συγκεκριμένων δεδομένων όταν αυτά συγκριθούν με αντίστοιχα δεδομένα ομάδας ελέγχου.
- III. Πεδίο επεξεργασίας συχνοτήτων (power spectrum analysis). Το πεδίο αυτό παρέχει στοιχεία που αφορούν φασματική ανάλυση ισχύος (power spectral analysis) και την ισχύ κάθε συχνότητα του σήματος.
- IV. Πεδίο επεξεργασίας στο επίπεδο παραμέτρου / χρόνου (cofience – time analysis). Το πεδίο αυτό παρέχει στοιχεία που αφορούν ανάλυση ισχύος και παραμέτρου κλίμακας στην εξέλιξη του χρόνου.

### 2.7.1 Πεδίο επεξεργασίας των σημάτων στο χρόνο

Ως πλάτος ενός βιοσήματος υπολογίζεται ως η διαφορά της μέγιστης και ελάχιστης τιμής του σήματος. Ως χρόνος αδράνειας της μέτρησης καλούμε την χρονική καθυστέρηση έπειτα από κάποιο εξωτερικό ερέθισμα μέχρι την απόκτηση και καταγραφή του βιοσήματος (σχ2.14).



**Σχήμα 2.14:** Πλάτος σήματος και χρόνος αδράνειας σε βίόσημα.

## 2.7.2 Πεδίο επεξεργασίας στατιστικής σημαντικότητας

Για την ανάλυση των αποκτημένων βιοσημάτων θα πρέπει πάντοτε να λαμβάνεται υπόψη η φυσιολογία του φαινομένου από το οποίο προέρχονται τα δεδομένα. Αν οι κύριοι παράγοντες που δημιουργούν το φαινόμενο δεν μεταβάλλονται χρονικά, τότε μπορούμε γενικά να δεχτούμε τη στασιμότητα των δεδομένων. Για το λόγο αυτό θα πρέπει όλοι οι παράμετροι του κλίματος κάτω από το οποίο πραγματοποιείται η μέτρηση όπως η φωτεινή ακτινοβολία, η θεοκρασία, η υγρασία κ.α. να παραμένουν σταθερές, με μόνη παράμετρο μεταβολής τον έλεγχο του ερεθίσματος που θέλουμε να διερευνήσουμε.

### 2.7.2.1 Διαδικασίες για την επεξεργασία μίας ομάδας τυχαίων τιμών

#### Μέση τιμή και τυπική απόκλιση

Το πρώτο βήμα που συνήθως πραγματοποιείται είναι η εύρεση της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται σχεδόν πάντα για πολλούς λόγους. Πρώτον, η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση είναι τα βασικά μέτρα που δείχνουν την τάση της μετρούμενης μεταβλητής καθώς και τη διασπορά της. Δεύτερον, ο υπολογισμός για ένα μικρό χρονικό διάστημα της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης δίνουν τη βάση για την εκτίμηση της στασιμότητας των δεδομένων. Τέλος, η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση μπορούν να εξαχθούν από άλλες περιγραφικές ιδιότητες (διαγράμματα πυκνότητας πιθανότητας κ.α.) που μπορούν να μετρηθούν αργότερα.

#### Ανάλυση αυτοσυσχέτισης

Το επόμενο βήμα είναι η ανάλυση αυτοσυσχέτισης. Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης στάσιμων δεδομένων είναι ο αντίστροφος μετασχηματισμός Fourier της συνάρτησης φασματικής ισχύος. Για αυτό το λόγο ο καθορισμός της

συνάρτησης αυτοσυσχέτισης δεν δίνει άμεσα νέες πληροφορίες από αυτές του φάσματος ισχύος. Παρόλα αυτά, μπορεί να υπάρξουν εφαρμογές όπου το διάγραμμα της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης θα παρουσίαζε τις επιθυμητές πληροφορίες σε καλύτερη μορφή. Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης μπορεί να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο περιοδικότητας σε κατά τα άλλα τυχαία δεδομένα.

### **Φασματική ανάλυση τυχαίων σημάτων**

Ίσως το πιο σημαντικό περιγραφικό χαρακτηριστικό για μία μόνο ομάδα μετρήσεων στάσιμων τυχαίων δεδομένων είναι η φασματική ανάλυση τυχαίων σημάτων, η οποία ορίζει τις συχνότητες που συνθέτουν τα δεδομένα. Για ένα γραμμικό φυσικό σύστημα σταθερών παραμέτρων, το φάσμα ισχύος εξόδου είναι ίσο με το φάσμα ισχύος εισόδου πολλαπλασιασμένο με την τετραγωνική ρίζα του συντελεστή ενίσχυσης του συστήματος. Για αυτό το λόγο, οι μετρήσεις του φάσματος ισχύος μπορούν να δώσουν πληροφορίες που αφορούν τα δυναμικά χαρακτηριστικά του συστήματος. Το συνολικό εμβαδόν κάτω από την καμπύλη του φάσματος ισχύος είναι ίσο με τη μέση τετραγωνική τιμή του δείγματος προς επεξεργασία. Είναι εμφανές ότι οι μετρήσεις των τιμών του φάσματος ισχύος είναι πολύτιμες για πολλούς σκοπούς ανάλυσης όπως για παράδειγμα η εύρεση του επιπέδου του θορύβου στο σήμα. Δευτερεύουσα εφαρμογή αποτελεί η ανίχνευση περιοδικότητας.

### **Ανάλυση πυκνότητας πιθανότητας**

Η τελευταία βασική ερμηνεία των δεδομένων στη διαδικασία επεξεργασίας μιας μόνο ομάδας τυχαίων τιμών είναι μέσω της ανάλυσης πυκνότητας πιθανότητας. Η ανάλυση αυτή συχνά

παραλείπεται από την ανάλυση των δεδομένων επειδή υπάρχει η τάση να υποτίθεται ότι όλα τα τυχαία φαινόμενα είναι κανονικά κατανεμημένα. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως, τα τυχαία δεδομένα μπορεί να αποκλίνουν σημαντικά από την κανονική κατανομή. Αν ανιχνεύονται τέτοιες αποκλίσεις από τον έλεγχο κανονικότητας, τότε πρέπει να μετρηθεί η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας για να γίνουν εμφανή τα στοχαστικά χαρακτηριστικά των δεδομένων.

### 2.7.3 Πεδίο επεξεργασίας συχνοτήτων

Ένα αναλογικό σήμα  $x(t)$  πεπερασμένου μήκους με συχνότητα  $\omega$  μπορεί να απεικονιστεί με συνημίτονα και ημίτονα σύμφωνα με τις σειρές Fourier. Οι συντεταγμένες του σήματος είναι περιοδικές συναρτήσεις σε σχέση με το χρόνο και υπολογίζονται με τις συναρτήσεις του συνημίτονου και το ημίτονου. Ένα αναλογικό περιοδικό σήμα περιγράφεται με τις σειρές Fourier σύμφωνα με την σχέση:

$$x(t) = A_0 + \sum_{n=1}^{\infty} A_n \cos n\omega t + B_n \sin n\omega t$$

όπου,

$$A_0 = \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} x(t) dt$$

$$A_n = \frac{2}{T} \int_{-T/2}^{T/2} x(t) \cos n\omega t dt$$

$$B_n = \frac{2}{T} \int_{-T/2}^{T/2} x(t) \sin n\omega t dt$$

Στην σχέση αυτή του  $x(t)$ , για  $n=1$  ο όρος που αντιστοιχεί στις σειρές Fourier ονομάζεται θεμελιώδης (fundamental), και έχει την μικρότερη συχνότητα της σειράς (θεωρούμε ότι είναι μηδέν). Η θεμελιώδης συχνότητα αυτής της σειράς Fourier είναι:

$$\omega = \frac{2\pi}{T}.$$

Οι συχνότητες που ανταποκρίνονται στα  $n=2,3,\dots$  ονομάζονται αρμονικές. Για παράδειγμα το  $n=2$  αντιστοιχεί στην αρμονική δευτέρας τάξης. Οι συντελεστές της σειράς Fourier προσδιορίζουν το πλάτος των ημίτονων και των συνημίτονων, για μια συγκεκριμένη συχνότητα. Στην πραγματικότητα όμως δεν γνωρίζουμε την συνάρτηση του σήματος εισόδου. Εάν θεωρήσουμε ότι η περίοδος της συνάρτησης είναι άπειρη, εξαλείφουμε τον περιορισμό ότι η συνάρτηση μας πρέπει να είναι περιοδική για να εφαρμόσουμε την ανάλυση Fourier. Με την προϋπόθεση ότι η περίοδος τείνει στο άπειρο, οι σειρές Fourier παίρνουν την μορφή ολοκληρώματος. Αυτό σημαίνει ότι οι σταθερές  $A_n$  και  $B_n$  μετασχηματίζονται σε σταθερές συναρτήσεις τις συχνότητας και εκφράζονται σαν  $A(\omega)$  και  $B(\omega)$  :

$$A(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t) \cos \omega t dt$$

$$B(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t) \sin \omega t dt$$

Οι σταθερές του Fourier  $A(\omega)$  και  $B(\omega)$  είναι γνωστές και σαν τον μετασχηματισμό *Fourier* του  $x(t)$ . Για να αναπτύξουμε τον μετασχηματισμό Fourier, ορίζουμε τον μιγαδικό αριθμό ως εξής:

$$Y(\omega) \equiv A(\omega) - iB(\omega)$$

όπου  $i = \sqrt{-1}$ . Από τις εξισώσεις:

$$A(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t) \cos \omega t dt$$

και

$$B(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t) \sin \omega t dt \quad \text{υπολογίζουμε κατευθείαν το}$$

$$X(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t)(\cos \omega t - i \sin \omega t) dt$$

όπου σύμφωνα με την σχέση:

$$e^{-i\theta} = \cos \theta - i \sin \theta$$

μετασχηματίζεται σε:



$$X(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t)e^{-i\omega t} dt$$

γνωρίζοντας ότι η συχνότητα ισούται με:

$$f = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{1}{T}$$

η σχέση μετασχηματίζεται σε:

$$X(f) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t)e^{-i2\pi ft} dt$$

Η παραπάνω σχέση ορίζεται σαν ο μετασχηματισμός Fourier του  $x(t)$ . Εάν ορίσουμε τον μετασχηματισμό Fourier για μια πεπερασμένη εγγραφή του  $x(t)$  στο διάστημα  $(0, T)$  η σχέση παίρνει την μορφή:

$$X(f, T) = \int_0^T x(t)e^{-i2\pi ft} dt$$

Ο μετασχηματισμός Fourier αποτελεί το πιο σημαντικό περιγραφικό χαρακτηριστικό των μετρήσεων μας ,διότι ορίζει την σύνθεση συχνοτήτων των δεδομένων μας. Η παράσταση των μετρήσεων μας κατά Fourier ορίζει τον μετασχηματισμό των σημάτων από το πεδίο του χρόνου στο πεδίο της συχνότητας. Έτσι εάν μετρήσουμε την τιμή του  $y(t)$  τότε με τον μετασχηματισμό Fourier μπορούμε να μελετήσουμε τις ιδιότητες του πλάτους-συχνότητας. Επίσης μπορούμε να πραγματοποιήσουμε τον αντίστροφο μετασχηματισμό. Εάν γνωρίζουμε το  $X(f)$  είμαστε σε θέση να ξανά-ανακτήσουμε το σήμα  $x(t)$  από τον τύπο:

$$x(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} X(f)e^{i2\pi ft} dt$$

η σχέση αυτή καλείται αντίστροφος μετασχηματισμός Fourier

Ο μετασχηματισμός Fourier είναι ένας μιγαδικός αριθμός, ο οποίος εμπεριέχει πλάτος (magnitude) και φάσμα (phase).

$$X(f) = |X(f)|e^{i\phi(f)} = A(f) - iB(f)$$

όπου το πλάτος δίνεται από τον τύπο:

$$|X(f)| = \sqrt{\operatorname{Re}(X(f))^2 + \operatorname{Im}(X(f))^2}$$

και η φάση από την σχέση:

$$\phi(f) = \tan^{-1} \frac{\operatorname{Im}(X(f))}{\operatorname{Re}(X(f))}$$

### 2.7.3.1 Ταχύς μετασχηματισμός Fourier

Στην πράξη όμως δεν πραγματοποιούμε τους μετασχηματισμούς Fourier σ' ένα αναλογικό σήμα, αλλά σ' ένα ψηφιοποιημένο σήμα. Αν υποθέσουμε ότι το σήμα  $x(t)$  λαμβάνονται σε  $N$  σημεία που απέχουν μεταξύ τους διάστημα  $\Delta t$ , τότε το συνεχές σήμα  $x(t)$  απεικονίζεται από ένα διακριτό σήμα  $x_n = x(n\Delta t)$  για  $n=1,2,\dots,N-1$ . Η σχέση που μας δίνει την απεικόνιση του συνεχούς σήματος σε διακριτό είναι:

$$X(f, T) = \Delta t \sum_0^{N-1} x_n e^{-j2\pi f n \Delta t} dt$$

ο συνήθης υπολογισμός των διακριτών τιμών συχνότητας δίνεται για τον υπολογισμό του  $X(f, T)$  για:

$$f_k = \frac{k}{T} = \frac{k}{N\Delta t}, k = 0, 1, 2, \dots, N-1$$

Μια προσέγγιση του μετασχηματισμού Fourier για σημεία διακριτού χρόνου (DFT) δίνεται από την σχέση:

$$X_k = \frac{X(f_k)}{\Delta t} = \sum_{n=0}^{N-1} x_n e^{-j2\pi k n / N} \quad \text{με } k = 1, 2, \dots, N-1$$

Τα αποτελέσματα είναι μοναδικά μέχρι το  $k = N/2$ , όπου σ' αυτό το σημείο εμφανίζεται η συχνότητα του Nyquist. Αυτός ο μετασχηματισμός ονομάζεται μετασχηματισμός μιας πλευράς (one-sided) αφού θεωρεί ότι τα δεδομένα βρίσκονται

σε μια πλευρά, δηλαδή από  $t = 0$  μέχρι  $t_f$  και οι συχνότητες παρουσιάζουν μόνο θετικές τιμές. Για να απλοποιήσουμε τους παραπάνω υπολογισμούς γράφουμε:

$$W(u) = e^{-j\frac{2\pi u}{N}}$$

$$\text{και } X(k) = X_k, x(n) = x_n$$

Συνεπώς η εξίσωση μας περιγράφεται με την σχέση:

$$X(k) = \sum_{n=0}^{N-1} x(n)W(kn)$$

Ο  $x(n)$  μπορεί να είναι τόσο πραγματικός όσο και μιγαδικός, γι' αυτό ο υπολογισμός του  $X(f_k)$  απαιτεί ένα πλήθος μιγαδικών πολλαπλασιασμών της τάξης  $N$  και ένα πλήθος μιγαδικών προσθέσεων, επίσης της τάξης των του  $N$ , για κάθε σημείο του  $k$ . Έτσι για τον συνολικό DFT υπολογισμό  $N$  σημείων του  $X(f_k)$  απαιτούνται  $N^2$  μιγαδικοί πολλαπλασιασμοί και προσθέσεις.

Όταν ο αριθμός των σημείων μας είναι υψωμένος στην δύναμη του 2 τότε είμαστε σε θέση να εξοικονομήσουμε χρόνο πραγματοποιώντας γρήγορους αλγόριθμους υπολογισμού του DFT που καλούνται ταχύτατοι μετασχηματισμοί Fourier (FFT).

Έτσι όταν  $N = 2^m$  για  $m=1,2,3\dots$  τότε οι πράξεις μειώνονται με τους μετασχηματισμούς FFT σε περίπου  $N \log_2(N)$  πράξεις. Η λειτουργία των FFT είναι ο μετασχηματισμός των DFT  $N$ -σημείων σε διαδοχικούς μικρότερους μετασχηματισμούς DFT.

### 2.7.3.2 Αυτοσυσχέτιση

Η συνάρτηση αυτό-συσχέτισης είναι ένα εργαλείο για τον έλεγχο περιοδικότητας σε τυχαία δεδομένα. Η συνάρτηση αυτό-συσχέτισης τυχαίων δεδομένων περιγράφει την άλλο-εξάρτηση μιας τιμής δεδομένων σε μια χρονική στιγμή με αυτή μιας άλλης

τιμής σε διαφορετική χρονική τιμή. Μια εκτίμηση της συνάρτησης αυτό-συσχέτισης που συνδέει την καταγραφή της δειγματικής τιμής  $x(t)$  την χρονική στιγμή  $t$  με αυτή της χρονικής στιγμής  $t+\tau$ . Η σχέση που ορίζει την αυτοσυσχέτιση είναι:

$$\hat{R}_{xx}(\tau) = \frac{1}{T-\tau} \int_0^{T-\tau} x(t)x(t+\tau)dt, \quad 0 \leq \tau \leq T$$

Υπάρχουν δυο διαφορετικοί τρόποι υπολογισμού της συνάρτησης αυτό-συσχέτισης για μια ψηφιακή έγγραφη:

- Με απευθείας υπολογισμό των μέσων όρων των γινόμενων των λαμβανομένων τιμών.
- Με αντίστροφο μετασχηματισμό Fourier του φάσματος ισχύος.

#### Απευθείας υπολογισμός των μέσων όρων

Έστω ότι έχουμε  $N$  τιμές της εγγραφής  $\{x_n\}, n=1,2,\dots,N$ , που έχουν δειγματοληφθεί με σταθερά διαστήματα  $\Delta t$  και έχει μετατραπεί σε  $x(t)=x_n(t)$ . Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης του  $x(t)$  υπολογίζεται από τις μέσες τιμές του δείγματος σύμφωνα με τον τύπο:

$$\hat{R}_{xx}(r\Delta t) = \frac{1}{N-r} \sum_{n=1}^{N-r} x_n x_{n+r}, \quad r = 0,1,2,\dots,m$$

όπου,

$r$  ονομάζεται ο αριθμός συγκέντρωσης, και  $m$  ο μέγιστος αριθμός συγκέντρωσης ( $m < N$ ).

#### Αυτοσυσχέτιση μέσω FFT

Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης υπολογίζεται από τον αντίστροφο υπολογισμό Fourier του φάσματος ισχύος. Θεωρούμε τον μετασχηματισμό Fourier μιας δειγματικής εγγραφής  $x(t)$  με  $0 \leq t \leq T$

$$X^*(f) = \int x(a)e^{j2\pi fa} da \text{ και } X(f) = \int x(\beta)e^{-j2\pi f\beta} d\beta$$

προκύπτει ότι:

$$|X(f)|^2 = \int_0^T \int_0^T x(a)x(\beta) [e^{-j2\pi f(\beta-a)}] d\beta da$$

Αντικαθιστώντας της μεταβλητές  $\tau = \beta - a, d\tau = d\beta, \beta = a + \tau$  η συνάρτηση γίνεται:

$$|X(f)|^2 = \int_0^{T-a} \int_{-a}^{T-a} x(a)x(a+\tau) [e^{-j2\pi f\tau}] d\tau da$$

από την σχέση του δυο-πλευρών φάσματος ισχύος του  $x(t)$  υπολογίζουμε την σχέση:

$$\hat{S}_{xx}(f) = \frac{1}{T} E[|X(f)|^2] = \frac{1}{T} \int_0^{T-a} \int_{-a}^{T-a} \hat{R}_{xx}(\tau) [e^{-j2\pi f\tau}] d\tau da$$

μεταβάλλοντας τα όρια της ολοκλήρωσης μπορούμε να δημιουργήσουμε το ολοκλήρωμα:

$$\begin{aligned} \hat{S}_{xx}(f) &= \frac{1}{T} \int_{-T}^0 \int_0^T \hat{R}_{xx}(\tau) [e^{-j2\pi f\tau}] da d\tau + \frac{1}{T} \int_0^{T-\tau} \int_0^{\tau} \hat{R}_{xx}(\tau) [e^{-j2\pi f\tau}] da d\tau = \\ &= \frac{1}{T} \int_{-T}^0 (T+\tau) \hat{R}_{xx}(\tau) [e^{-j2\pi f\tau}] d\tau + \frac{1}{T} \int_0^T (T-\tau) \hat{R}_{xx}(\tau) [e^{-j2\pi f\tau}] d\tau \end{aligned}$$

στο πρώτο μέρος της εξίσωσης θέτουμε όπου  $u = -\tau$  και  $du = -d\tau$  και μετατρέπουμε την εξίσωση σε:

$$\int_{-T}^0 (T+\tau) \hat{R}_{xx}(\tau) [e^{-j2\pi f\tau}] d\tau = \int_0^T (T-u) \hat{R}_{xx}(u) [e^{j2\pi fu}] du$$

όπου το  $\hat{R}_{xx}(-u)$  αντικαθιστάτε με το  $\hat{R}_{xx}(u)$ . Τέλος πραγματοποιούμε μια τελευταία αλλαγή μεταβλητών θέτοντας  $\tau = T - u, d\tau = -du$  και προκύπτει η εξίσωση:

$$\int_0^T (T-u) \hat{R}_{xx}(u) [e^{j2\pi fu}] du = \int_0^T \hat{R}_{xx}(T-\tau) [e^{-j2\pi f\tau}] d\tau$$

εδώ χρησιμοποιώντας ότι  $e^{j2\pi T} = 1$  για κάθε  $f = f_k = k\Delta f = (k/T)$  όπου  $k$  είναι ένας ακέραιος. Γι' αυτό η εξίσωση που προκύπτει είναι:

$$\hat{S}_{xx}(f) = \frac{1}{T} \int_0^T \tau \hat{R}_{xx}(T-\tau) [e^{-j2\pi f\tau}] d\tau + \frac{1}{T} \int_0^T (T-\tau) \hat{R}_{xx}(\tau) [e^{-j2\pi f\tau}] d\tau = \int_0^T \hat{R}_{xx}^c(\tau) [e^{-j2\pi f\tau}] d\tau$$

όπου,

$$\hat{R}_{xx}^c(\tau) = \frac{T-\tau}{T} \hat{R}_{xx}(\tau) + \frac{\tau}{T} \hat{R}_{xx}(T-\tau)$$

ο αντίστροφος μετασχηματισμός Fourier της  $\hat{S}_{xx}(f)$  δημιουργεί το  $\hat{R}_{xx}^c(\tau)$ .

Η φυσική σημασία της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης είναι ότι παρέχει ένα μέτρο της ομοιότητας μεταξύ ενός σήματος και ενός αντιγράφου του σήματος μετατοπισμένο κατά  $\Delta t = \tau$ .

### 2.7.3.3 Μη παραμετρικές τεχνικές

Οι τεχνικές με τις οποίες υπολογίζουμε το φάσμα ισχύος και δεν κάνουν παραδοχές για το πώς δημιουργήθηκαν τα δεδομένα (δεν δημιουργούν παραμετρικά μοντέλα) ονομάζονται μη παραμετρικές τεχνικές. Η φασματική ανάλυση τυχαίων σημάτων αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά του σήματος μας. Ο υπολογισμός του φάσματος για ψηφιακές εγγραφές γίνεται με δυο μεθόδους.

- Μέθοδος 'Blackman- Tukey'.

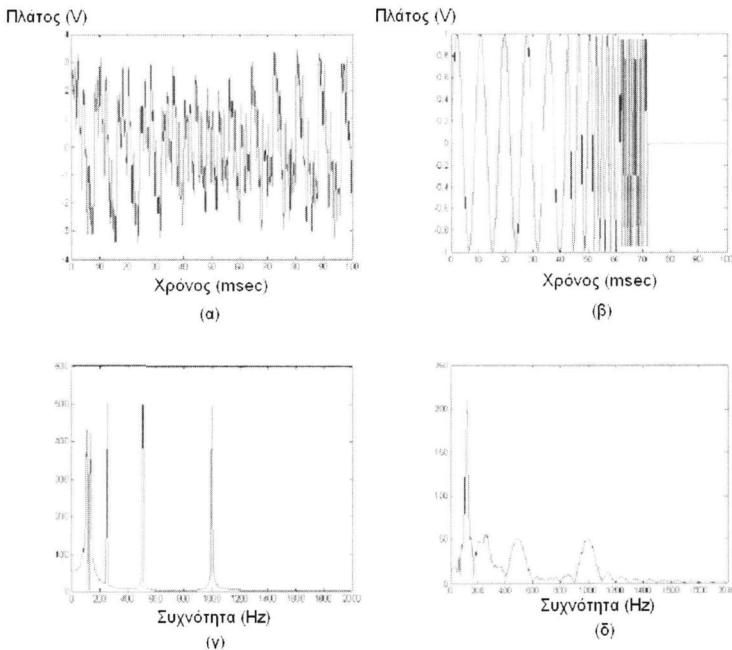
Βασίζεται στον μετασχηματισμό Fourier της συνάρτησης αυτόσυσχέτισης.

- Στη μέθοδο "Cooley-Tukey".

Βασίζεται στον υπολογισμό της πυκνότητας φάσματος ισχύος μέσω πεπερασμένου εύρους FFT μετασχηματισμών στα αρχικά δεδομένα.

### 2.7.4 Πεδίο επεξεργασίας στο επίπεδο παραμέτρου – χρόνου

Το κύριο μειονέκτημα στην ανάλυση του της συχνοτήτων έγκειται στο γεγονός στο δεν παρουσιάζει πληροφορίες οι οποίες συμβαίνουν στο πεδίο του χρόνου γιατί σύμφωνα με τον μετασχηματισμό Fourier όλες οι συχνότητες του σήματος αποτελούν ταυτόχρονη δομή του σήματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα όταν κάποιες συχνότητες είναι παρούσες σε συγκεκριμένες χρονικές η ανάλυση του σήματος στο πεδίο των συχνοτήτων να παρουσιάζει διαφοροποιήσεις. Στο σχήμα (2.15α) που ακολουθεί παρουσιάζεται το παράδειγμα κυματομορφής ενός σύνθετου σήματος αποτελούμενο από τις συχνότητες 115, 125, 250, 500 και 1000 Hz, ενώ στην στο σχήμα (2.15β) για την ίδια χρονική περίοδο οι ίδιες συχνότητες με εμφάνιση σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Στο σχήμα (2.15γ) κι (2.15δ) μπορούμε να παρατηρήσουμε την διαφοροποίηση της ανάλυσης του φάσματος κατά Fourier σύμφωνα με την παραπάνω επισήμανση μας. Για την σωστή ανάλυση του σήματος απαιτείται η ανάλυσης χρόνου-συχνότητας μέσω Fourier Βραχέως Χρόνου (φασματογράμμα).



**Σχήμα 2.15:** Απεικόνιση φάσματος για αθροιστικό και μεταβαλλόμενο συχνότητας σήμα.

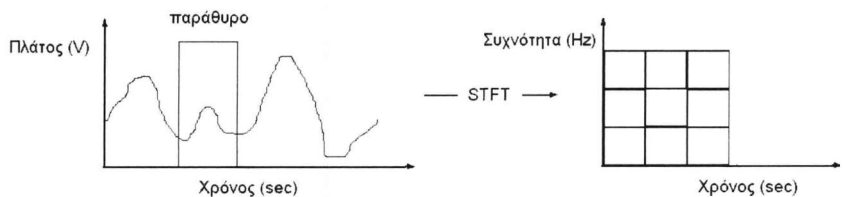
### 2.7.4.1 Μετασχηματισμός Fourier Βραχέως Χρόνου

Σύμφωνα με τον μετασχηματισμό Fourier Βραχέως Χρόνου (Short Time Fourier Transform(STFT)) για την ανάλυση στο πεδίο χρόνου συχνοτήτων το προς επεξεργασία βιόσημα χωρίζεται για την θεώρηση της στατικότητας των δεδομένων σε πολύ μικρά τμήματα χρόνου μέσω κατάλληλου παραθύρου (σχ2.16). Τυπικές συναρτήσεις παραθύρων που χρησιμοποιούνται είναι οι: rectangular, Hanning, Hamming and Blackman. Ο μετασχηματισμός STFT περιγράφεται από την σχέση:

$$F_x(t, f; w) = \int_{-\infty}^{\infty} x(u)w^*(u-t)e^{-j2\pi fu} du$$

όπου,

w(t): η συνάρτηση του παραθύρου.



**Σχήμα 2.16:** Παράθυρο χρόνου STFT

Η παραγωγή του φασματογράμματος  $S_x(t, f)$  (spectrogram), επιτυγχάνεται με την μετατόπιση του παραθύρου στο χρόνο  $w^*(u-t)$  και εκφράζει την πυκνότητα της φασματικής ενέργειας του σήματος στο χρόνο εφαρμογής του παραθύρου η οποία είναι:

$$S_x(t, f) = \left| \int_{-\infty}^{\infty} x(u)w^*(u-t)e^{-j2\pi fu} du \right|^2$$

ενώ για σήματα  $s(t)$  δίνεται:

$$STFT(t, \omega) \Big|_{t=nM, \omega=\frac{2k\pi}{NM}} = STFT(n, k) = \sum_{l=0}^{N-1} s(i)w(i-n)e^{\frac{j2k\pi}{N}}$$



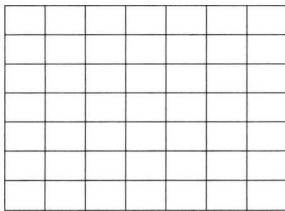
όπου,

$w(n)$ : η συνάρτηση παραθύρου,

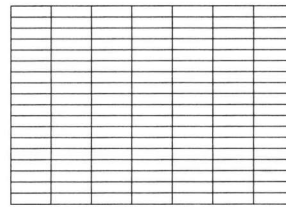
$\Delta t$ : το διάστημα δειγματοληψίας

$N$ : το μήκος του παραθύρου.

Από το μέγεθος του παραθύρου εξαρτάται η ακρίβεια της στατικότητας των δεδομένων (σχ2.17). Το φαινόμενο είναι αντιστρόφως ανάλογο για την ανάλυση του σήματος στο πεδίο των συχνοτήτων με αποτέλεσμα όσο μικρότερο είναι το παράθυρο που εφαρμόζεται κατά την ανάλυση STFT βελτιώνεται μεν η χρονική ανάλυση του σήματος αλλά , ελαττώνεται η συχνοτική του ανάλυση. Συνεπώς ανάλογα του προς μελέτη ηλεκτροφυσιολογικού φαινομένου θα πρέπει να δοθεί έμφαση είτε στην χρονική ανάλυση, είτε στην η ανάλυση συχνοτήτων σε βάρος της χρονικής.



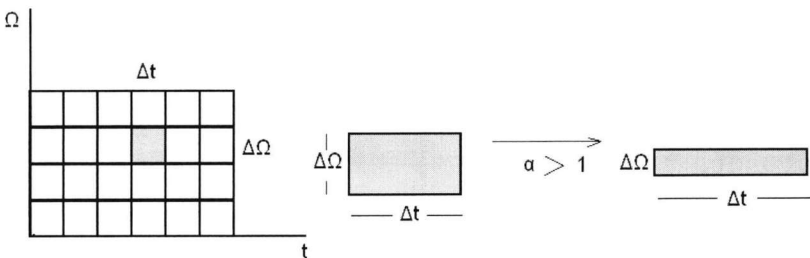
Ευρύ επίπεδο χρόνου



Βραχύ επίπεδο χρόνου

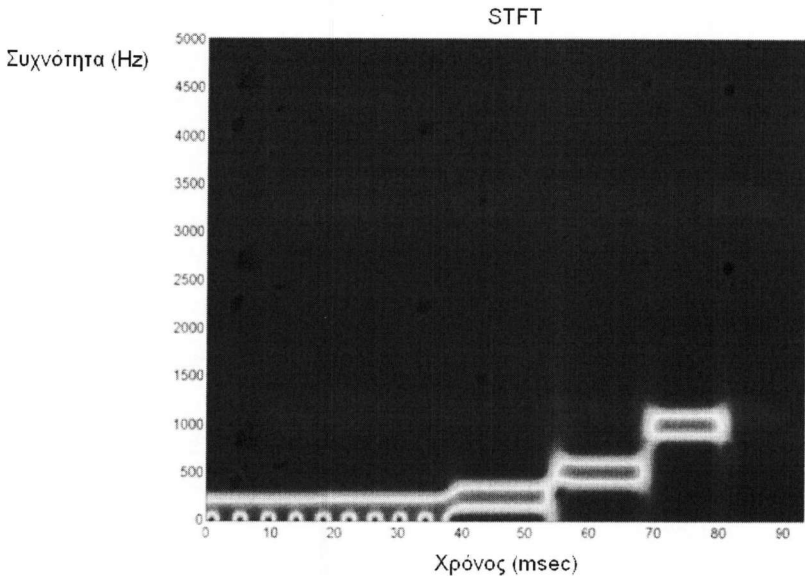
**Σχήμα2.17:** Επίπεδο χρόνου / συχνότητας για βραχύ κα ευρύ παράθυρο κατά STFT

Μια τεχνική για την βελτίωση της ανάλυσης λόγω των παραπάνω περιορισμών είναι η χρήση μεταβλητού μεγέθους παραθύρων ώστε να προσδιορίζεται με μεγαλύτερη ακρίβεια είτε ο χρόνος είτε η συχνότητα.(σχ2.18).



**Σχήμα2.18::** Σχέση διαστάσεων παραθύρου συχνότητας χρόνου

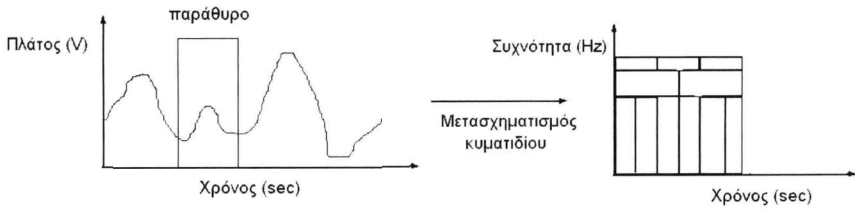
Στο σχήμα 2.19 παρουσιάζεται ένα τυπικό παράδειγμα ανάλυσης STFT με χρήση παραθύρου Hamming, και μήκος παραθύρου  $N=70$  σε εφαρμογή των σημάτων της παραγράφου 2.7.4



**Σχήμα 2.19:** Φασματόγραμμα χρόνου συχνότητας.

### 2.7.5 Κυματοειδή (wavelets)

Στην ανάλυση σήματος με κυματοειδή (wavelet) δεν χρησιμοποιείται περιοχή χρόνου – συχνότητας αλλά χρόνου- κλίμακας. Η τεχνική αυτή εμφανίστηκε από τον Joseph Fourier το 19ο αιώνα. Το πλεονέκτημα που εμφανίζει η ανάλυση σήματος με κυματοειδή είναι ο εντοπισμός ταχύτερων σημάτων στον χρόνο όπως αυτών των δυναμικών δράσης. Σύμφωνα με την αρχή της ανάλυσης κυματοειδών το σήμα διασπάται σε μία σειρά από κλίμακες με κάθε κλίμακα να αναπαριστά μία διαφορετική τραχύτητα του υπό εξέταση σήματος. Πρακτικά με την ανάλυση κυματοειδούς επιτυγχάνουμε την διάσπαση ενός σήματος σε μετατοπισμένες και βαθμωτές παραλλαγές ενός μητρικού κυματιδίου μέσω διαδικασίας μετατόπισης (στον άξονα του χρόνου) και πλάτυνσης (σχ2.20). Δηλαδή, ο μετασχηματισμός κυματιδίου είναι η συνέλιξη της συνάρτησης κυματιδίου με το σήμα.



**Σχήμα 2.20:** Παράθυρο μετασχηματισμού συχνότητας / κλίμακας

Τα κυματίδια είναι μια συνάρτηση  $\psi(t)$  η οποία ικανοποιεί συγκεκριμένα κριτήρια και έχουν ως χαρακτηριστικά:

- Τη μικρή χρονική διάρκεια.
- Μέση τιμή πλάτους ίση με μηδέν.
- Ασύμμετρη μορφή.

Ως συνεχής μετασχηματισμός wavelet (CWT) ορίζεται ως το άθροισμα στο χρόνο του σήματος πολλαπλασιασμένου με μετατοπισμένες και βαθμωμένες παραλλαγές της συνάρτησης του κυματοειδούς  $\psi$  :

$$C = (a, b) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)\psi(a, b, t)dt$$

Για την παραγωγή των βαθμωτών παραλλαγών ενός κυματοειδούς χρησιμοποιούμε το κυματίδιο γεννήτορας (mother wavelet ή analyzing wavelet)  $\psi(t)$  , στο οποίο εισάγουμε μεταβολές στην μορφή του:

$$\psi_{a,b}(t) = \frac{1}{\sqrt{a}}\psi\left(\frac{t-b}{a}\right)$$

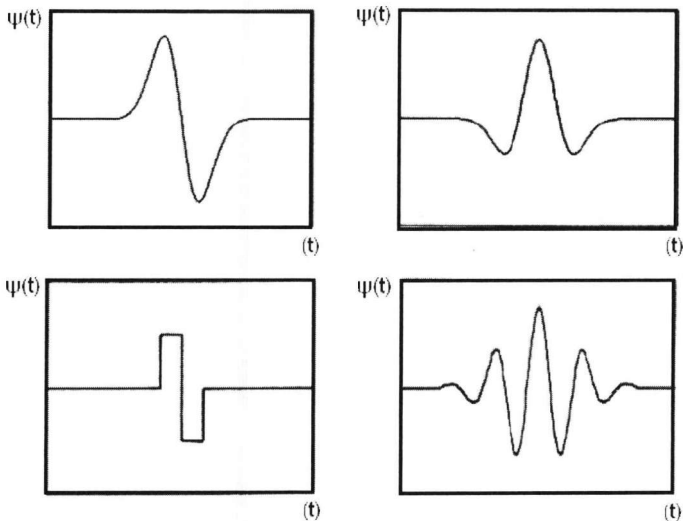
όπου  $a$  και  $b$  οι παράμετροι αλλαγής κλίμακας και μετατόπισης. Όσο μικρότερος είναι ο συντελεστής κλίμακας τόσο συμπιέζεται το κυματίδιο.

Γενικά έχουμε ότι:

*Μικρής κλίμακας  $a$  → Συμπιεσμένο κυματίδιο → ανίχνευση ταχύτατων μεταβολών του σήματος*

*Μεγάλης κλίμακας  $a$  → Τανυσμένο wavelet → ανίχνευση αργών μεταβολών του σήματος*

Στο σχήμα 2.21 απεικονίζονται κυματίδια που χρησιμοποιούνται στην πράξη στην επεξεργασία βιοσημάτων.

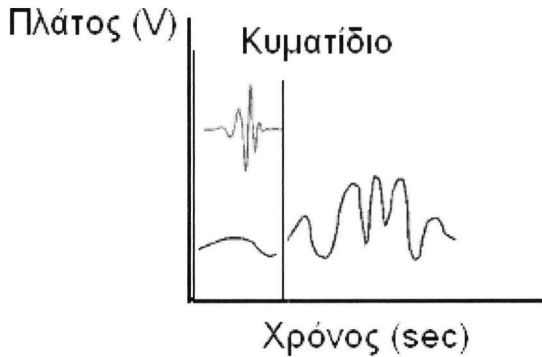


**Σχήμα 2.21:** Τύποι κυματοειδών

### 2.7.5.1 Σχηματική απεικόνιση ανάλυσης κυματιδίου

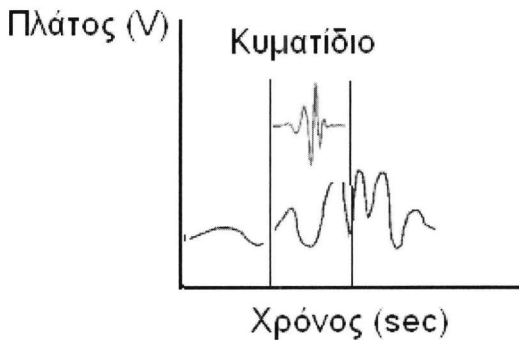
Για την επεξεργασία βιοσήματος με ανάλυση κυματιδίου υπολογίζουμε ένα σύνολο συντελεστών από διαφορετικά τμήματα του σήματος σε διαφορετικές κλίμακες σύμφωνα τα παρακάτω βήματα:

1. Συγκρίνουμε το επιλεγμένο κυματίδιο που α χρησιμοποιήσουμε με τμήμα του σήματος το οποίο έχει ίδιο μέγεθος με το κυματίδιο.
2. Υπολογίζουμε έναν αριθμό ομοιότητας (π.χ  $C=0,0102$ ) του κυματιδίου με τμήμα του σήματος (σχ.2.22).



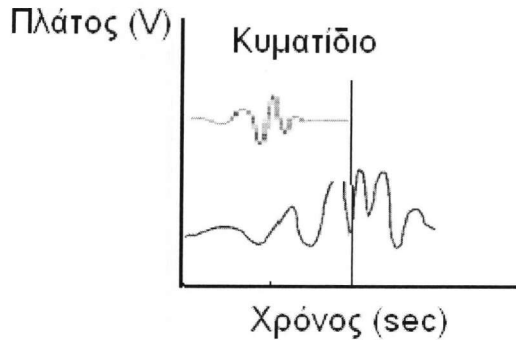
**Σχήμα 2.22:** Επιλεγμένο κυματίδιο που εφαρμόζεται σε τμήμα του σήματος

Μετατοπίζουμε το κυματίδιο προς τα δεξιά και επαναλαμβάνουμε τα βήματα 1 και 2 (σχ.2.23).



**Σχήμα 2.23:** Μετατόπιση του κυματιδίου στο χρόνο

Αυξομειώνουμε την κλίμακα του κυματιδίου (δηλαδή το τεντώνουμε ή το) και επαναλαμβάνουμε τα βήματα 1 έως 3 οπότε έχουμε νέο αριθμό ομοιότητας (π.χ  $C=0,0102$ ) (σχ.2.24).



Σχήμα 2.24: Διαπλάτωση κυματιδίου.

5. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 1 έως 4 για όλες τις κλίμακες.

# 3

## Πρωτόκολλο ZigBEE για ασύρματους αισθητήρες

---

### 3.1 Εισαγωγή

Σήμερα υπάρχει ένα πλήθος προτύπων ασύρματης μετάδοσης δεδομένων (Bluetooth , WiFi) που απευθύνονται σε μεγάλης κλίμακας μετάδοσης πληροφοριών όπως φωνής, για PC LAN's, για μετάδοση βίντεο, κ.τ.λ. Εντούτοις, μέχρι τώρα δεν υπήρξαν ασύρματα πρότυπα δικτύων που να ικανοποιούν ανάγκες μετάδοσης σήματος αισθητήρων και συσκευών ελέγχου. Οι αισθητήρες και οι συσκευές ελέγχου δεν χρειάζονται υψηλό εύρος ζώνης αλλά απεναντίας χρειάζονται μικρό ποσοστό σφάλματος και πολύ μικρή κατανάλωση ενέργειας.

Για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, το πρωτόκολλο ZigBEE παρέχει ένα τυποποιημένο σύνολο λειτουργιών για συστήματα αισθητήρων και ελέγχου χρησιμοποιώντας το πρότυπο IEEE 802.15.4, επιτρέποντας έτσι την δημιουργία ασύρματων δικτύων μεταξύ των συστημάτων. Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι το πρότυπο IEEE 802.15.4 δεν σχεδιάστηκε για να ανταγωνιστεί τα πρότυπα των Bluetooth και WiFi αλλά για να καλύψει τις ανάγκες αισθητήρων.

Για τους λόγους όπου οι αισθητήρες απαιτούν ζώνες πληροφοριών μικρού εύρους, με μικρό ποσοστό σφάλματος και πολύ μικρή κατανάλωση ισχύος η ανάπτυξη ασύρματων αισθητήρων μέσω ενσωματωμένου υπολογιστικού συστήματος πρωτοκόλλου IEEE 802.15.4 έρχεται να λύσει προβλήματα σε ζητήματα μετρήσεων και ανίχνευσης φυσικών μεγεθών κυρίως σε εφαρμογές όπου απαιτείται διαρκής μετακίνηση των αισθητήρων, όπως για παράδειγμα στο εσωτερικό ενός θερμοκηπίου (Fourlas G, Kalonrektis, Fountas E, 2009). Λόγω της υψηλής συχνότητας εκπομπής των δεδομένων, η μετάδοση των μετρήσεων είναι ασφαλής από επιδράσεις ηλεκτρομαγνητικών θορύβων του περιβάλλοντος. Το πρότυπο IEEE 802.15.4 σχεδιάστηκε για να προσφέρει στις εφαρμογές ZigBEE χαμηλό κόστος, χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, μεγάλο αριθμό συσκευών με εύκολη εγκατάσταση και κυρίως ασφάλεια και αξιοπιστία στην μεταφορά πληροφοριών. Το πρωτόκολλο επικοινωνίας που χρησιμοποιεί η τεχνολογία ZigBEE ονομάζεται ZigBEE Protocol και είναι υπεύθυνο για την επικοινωνία των ZigBEE οντοτήτων, θέτοντας κανόνες επικοινωνίας μεταξύ τους. Το ασύρματο πρωτόκολλο ZigBEE βρίσκει εφαρμογές σε τοπολογίες αστέρα και διομότιμων συστημάτων (peer-to-peer, p2p).

### **3.2 Ασύρματα προσωπικά δίκτυα χαμηλού ρυθμού LR-WPAN**

Ένα ασύρματο προσωπικό δίκτυο χαμηλού ρυθμού (LR-WPAN) είναι ένα απλό, χαμηλού κόστους δίκτυο επικοινωνίας που επιτρέπει την ασύρματη σύνδεση σε εφαρμογές με περιορισμένη ισχύ και χαμηλό ρυθμό μετάδοσης δεδομένων. Οι κύριοι στόχοι ενός LR-WPAN είναι, η ευκολία της εγκατάστασης του, η αξιόπιστη μεταφορά δεδομένων, οι λειτουργίες περιορισμένου σφάλματος, το εξαιρετικά χαμηλό κόστος και η μακροχρόνια ζωή των μπαταριών. Μερικά από τα τεχνικά χαρακτηριστικά ενός LR- WPAN παρουσιάζονται παρακάτω:

- Ρυθμός μεταφοράς δεδομένων στον αέρα, 250 kb/s, 40 kb/s, και 20 kb/s.
- Λειτουργία σε τοπολογία αστέρα (star) ή p2p.
- 16-bit ή 64-bit διατιθέμενες διευθύνσεις επέκτασης.
- Κατανομή εγγυημένων χρονικών θυρίδων (GTS – Guaranteed Time Slots).



- Πρόσβαση στο κανάλι με πολλαπλή προσπέλαση με ακρόαση φέροντος και αποφυγή συγκρούσεων (CSMA-CA).
- Πλήρως αναγνωρισμένο πρωτόκολλο για την αξιοπιστία μεταφοράς.
- Μικρή κατανάλωση ισχύος.
- Ενεργειακή ανίχνευση (ED – Energy Detection).
- Ποιοτική ένδειξη σύνδεσης (LQI – Link Quality Indication).
- 16 κανάλια στη ζώνη 2.450 MHz, 10 κανάλια στους 915 MHz, και 1 κανάλι στη ζώνη 868 MHz.

Σε ένα ασύρματο δίκτυο χαμηλού ρυθμού(LR-WPAN) μπορούν να συμμετέχουν δύο διαφορετικοί τύποι συσκευών:

- μία συσκευή πλήρους λειτουργίας (Full Function Device- FFD) και
- μία συσκευή μειωμένης λειτουργίας (Reduced Function Device – RFD).

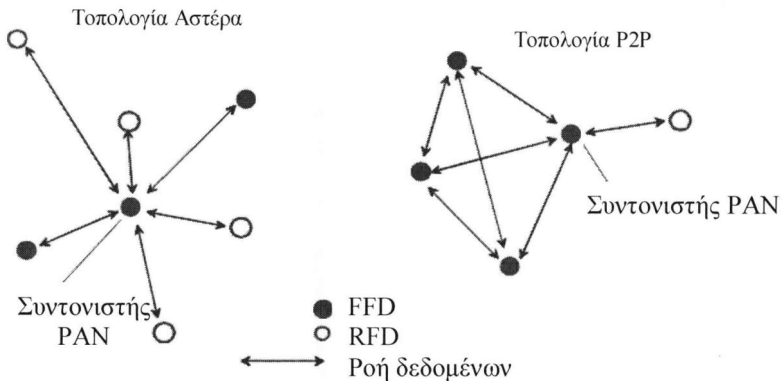
Μία FFD μπορεί να λειτουργήσει με τρεις από τους παρακάτω τρόπους:

- ως συντονιστής του προσωπικού δικτύου (PAN Coordinator).
- ως απλός συντονιστής (Coordinator).
- ως απλή συσκευή.

Μία συσκευή πλήρους λειτουργίας (FFD) μπορεί να επικοινωνήσει με συσκευές μειωμένης λειτουργίας (RFD) καθώς και με άλλες FFD, ενώ μία RFD συσκευή μπορεί να επικοινωνήσει μόνο με μία FFD συσκευή (σχ3.1).

Μία συσκευή RFD προορίζεται για αισθητήρες μεταφοράς σημάτων χαμηλού ρυθμού. Τέτοιοι αισθητήρες δεν έχουν την ανάγκη να στείλουν μεγάλο όγκο δεδομένων και μπορούν να συνδεθούν μόνο με μία FFD την φορά. Συνεπώς, μία RFD χρησιμοποιεί ελάχιστους πόρους και χωρητικότητα μνήμης στην διάταξη της.

Ανάλογα με τις απαιτήσεις της εφαρμογής, το ασύρματο δίκτυο χαμηλού ρυθμού (LR-WPAN) μπορεί να λειτουργήσει με καθεμία από τις δύο τοπολογίες: την τοπολογία αστέρα ή την p2p τοπολογία. Και οι δύο παρουσιάζονται στο σχήμα 3.1 .



**Σχήμα 3.1:** Συσκευές FFD και PAN σε δίκτυο τοπολογίας αστέρα και p2p.

Στην τοπολογία αστέρα η επικοινωνία καθιερώνεται μεταξύ των συσκευών και ενός ενιαίου κεντρικού ελεγκτή, που καλείται συντονιστής του προσωπικού δικτύου (PAN coordinator). Ο συντονιστής (PAN Coordinator) είναι ο αρχικός ελεγκτής του προσωπικού δικτύου. Ένας συντονιστής προσωπικού δικτύου (PAN Coordinator) μπορεί επίσης να έχει μια συγκεκριμένη εφαρμογή, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αρχίσει, να ολοκληρώσει, ή να δρομολογήσει την επικοινωνία γύρω από το δίκτυο. Όλες οι συσκευές που λειτουργούν σε ένα δίκτυο με οποιαδήποτε από τις δύο τοπολογίες έχουν μοναδικές διευθύνσεις επέκτασης με μέγεθος 64-bit. Αυτές οι διευθύνσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την άμεση επικοινωνία μέσα στο δίκτυο του προσωπικού συντονιστή PAN. Ο συντονιστής του δικτύου (PAN Coordinator) πρέπει να τροφοδοτείται από σταθερή πηγή, ενώ οι συσκευές μπορούν να τροφοδοτούνται από μπαταρίες.

Η p2p τοπολογία διαθέτει επίσης έναν συντονιστή (PAN Coordinator), εντούτοις, διαφέρει από την τοπολογία αστέρα δεδομένου ότι οποιαδήποτε συσκευή μπορεί να επικοινωνήσει με οποιαδήποτε άλλη εφ' όσον είναι σε κατάλληλη απόσταση.

Σε περιπτώσεις ανεξάρτητων προσωπικών δικτύων (PAN) ο συντονιστής PAN θα επιλέγει μια μοναδική προσδιοριστική (identifier) ταυτότητα αναγνώρισης. Αυτή η ταυτότητα (PAN identifier) επιτρέπει μεταδόσεις μεταξύ των συσκευών ανεξάρτητων δικτύων.

### 3.2.1 Σχηματισμός δικτύων αστέρα

Όταν ενεργοποιηθεί για πρώτη φορά μία συσκευή FFD, καθιερώνει το δίκτυο της και γίνεται ο συντονιστής (PAN Coordinator) του δικτύου. Όλα τα δίκτυα αστέρα λειτουργούν ανεξάρτητα από παρόμοια δίκτυα κατά την περίοδο λειτουργίας τους.

Στις περιπτώσεις ανεξάρτητων προσωπικών δικτύων (PAN) ο συντονιστής PAN επιλέγει μια μοναδική προσδιοριστική (identifier) ταυτότητα αναγνώρισης. Την χρονική στιγμή που επιλέγεται η ταυτότητα, κλειδώνεται για τον συγκεκριμένο συντονιστή και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από κάποιον άλλον συντονιστή δικτύου μέσα στην περιοχή των ράδιομεταδόσεων επιτυγχάνοντας έτσι μεταδόσεις μεταξύ των συσκευών ανεξάρτητων δικτύων. Μόλις επιλεγθεί η προσδιοριστική ταυτότητα, ο συντονιστής μπορεί να επιτρέψει σε άλλες συσκευές να συνδεθούν στο δίκτυό του.

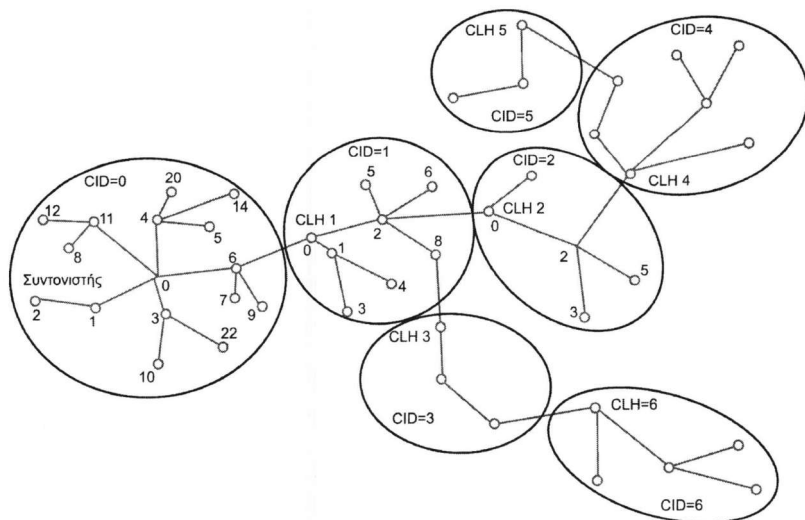
### 3.2.2 Σχηματισμός δικτύων p2p

Σε μια p2p τοπολογία, κάθε συσκευή είναι σε θέση να επικοινωνήσει με οποιαδήποτε άλλη συσκευή μέσα στην περιοχή που καλύπτει το ράδιο-σήμα της ενώ μια συσκευή θα οριστεί ως συντονιστής του δικτύου (PAN Coordinator). Περαιτέρω δομές του δικτύου μπορούν να δημιουργηθούν έξω από την p2p τοπολογία. Ένα παράδειγμα χρήσης της p2p τοπολογίας με επιπρόσθετες δομές είναι το δέντρο συστάδων (cluster-tree). Το δίκτυο τοπολογίας δέντρο συστάδων είναι μια ειδική περίπτωση ενός p2p δικτύου στο οποίο οι περισσότερες συσκευές είναι FFD.

Μία RFD μπορεί να συνδεθεί με ένα δίκτυο δέντρο συστάδων ως αποσπώμενος κόμβος στο τέλος ενός κλάδου, επειδή μπορεί να συνδεθεί μόνο με μία FFD τη φορά. Οποιαδήποτε από τις FFD μπορεί να ενεργήσει ως συντονιστής (Coordinator) και να παρέχει τις υπηρεσίες συγχρονισμού σε άλλες συσκευές ή σε άλλους συντονιστές. Μόνο ένας από τους συντονιστές μπορεί να είναι ο γενικός συντονιστής (PAN

Coordinator), ο οποίος μπορεί να έχει τους περισσότερους υπολογιστικούς πόρους από οποιαδήποτε άλλη συσκευή στο δίκτυο. Ο συντονιστής (PAN Coordinator) διαμορφώνει την πρώτη συστάδα με την καθιέρωσή του ως επικεφαλίδα συστάδων (CLH-Cluster Head) μέσω μιας προσδιοριστική ταυτότητας συστάδων (CID-Cluster Identifier)

Μια συσκευή που θέλει να συνδεθεί στο δίκτυο, λαμβάνει ένα αναγνωριστικό πλαίσιο σημάτων μέσω του οποίου μπορεί να κάνει αίτηση σύνδεσης στο δίκτυο του συντονιστή. Εάν ο συντονιστής επιτρέψει στη συσκευή να συνδεθεί, θα προσθέσει τη νέα συσκευή ως υπο-συσκευή στον πίνακα συνδέσεων που διαθέτει. Κατόπιν η πρόσφατα συνδεδεμένη συσκευή θα προστέθει στην επικεφαλίδα συστάδων (CLH) ως ‘γονέα της’ στον πίνακα συνδέσεών της και θα αρχίσει την εκπομπή των αναγνωριστικών σημάτων. Τώρα μπορούν να συνδεθούν και άλλες συσκευές σε αυτή την συσκευή. Εάν η αρχική συσκευή που κάνει αίτηση για σύνδεση στην επικεφαλίδα συστάδων (CLH) δεν είναι ικανή να συνδεθεί στο δίκτυο, θα ανιχνεύσει για άλλη συσκευή. Η μορφή ενός δικτύου δένδρου συστάδων (cluster-tree) μπορεί να αποτελείται από ένα δίκτυο μίας συστάδας έως μεγαλύτερα δίκτυα με τη διαμόρφωση ενός πλέγματος πολλαπλών γειτονικών συστάδων (σχ3.2).

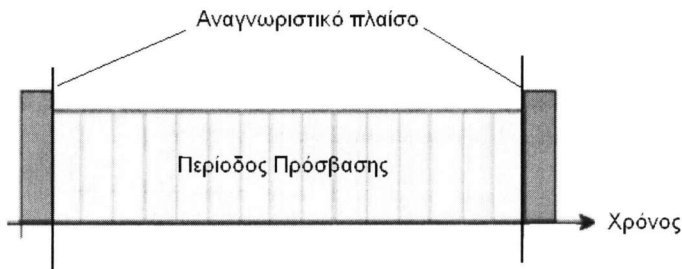


**Σχήμα 3.2:** Δομή δένδρου συστάδας.

Μόλις καλυφθούν οι προκαθορισμένες απαιτήσεις εφαρμογής ή δικτύων, ο συντονιστής μπορεί να καθοδηγήσει μια συσκευή έτσι ώστε να γίνει η επικεφαλίδα μιας νέας συστάδας. Ο συντονιστής αποτελεί για τη συσκευή αυτή το τελικό σημείο της αρχικής συστάδας του συντονιστή (PAN Coordinator). Άλλες συσκευές μπορούν να συνδεθούν βαθμιαία και να διαμορφώσουν μια πολυσυστάδα (multicluster) δομή δικτύου όπως φαίνεται στο σχήμα 3.2. Το πλεονέκτημα μιας δομής πολυσυστάδας είναι η αυξανόμενη περιοχή κάλυψης, ενώ το μειονέκτημα είναι μια αύξηση στη λανθάνουσα κατάσταση μηνυμάτων.

### 3.3 Δομή υπερπλαισίου

Τα LR- WPAN πρότυπα επιτρέπουν την προαιρετική χρήση μιας δομής υπερπλαισίου (superframe). Η διαμόρφωση του υπερπλαισίου καθορίζεται από τον συντονιστή. Το υπερπλαίσιο οριοθετείται από αναγνωριστικά σήματα (beacons) του δικτύου, τα οποία αποστέλνονται από το συντονιστή σε διάταξη 16 ίσων ταξινομημένων θυρίδων (Slots) (σχ3.3).



Σχήμα 3.3: Δομή υπερπλαισίου.

Το αναγνωριστικό πλαίσιο (beacon frame) διαβιβάζεται στην πρώτη θυρίδα του κάθε υπερπλαισίου. Εάν ένας συντονιστής δεν επιθυμεί να χρησιμοποιήσει μια δομή υπερπλαισίου, μπορεί να απενεργοποιήσει την μετάδοση των αναγνωριστικών. Τα αναγνωριστικά σήματα χρησιμοποιούνται για να συγχρονίσουν τις συνημμένες συσκευές, για να προσδιορίσουν το δίκτυο (PAN) και για να περιγράψουν τη δομή των υπερπλαισίων. Οποιαδήποτε συσκευή που επιθυμεί να επικοινωνήσει κατά τη

διάρκεια της περιόδου πρόσβασης σύνδεσης (CAP-Connection Access Period) μεταξύ δύο αναγνωριστικών σημάτων, θα ανταγωνιστεί με άλλες συσκευές χρησιμοποιώντας έναν μηχανισμό θυρίδων που καλείται Πολλαπλή Πρόσβαση με Ανίχνευση φέροντος και Αποφυγή Συγκρούσεων (CSMA-CA – Carrier Sense Multiple Access with Collision Avoidance).

### 3.4 Πρότυπο μεταφοράς δεδομένων

Υπάρχουν τρεις τύποι συναλλαγής μεταφοράς δεδομένων μεταξύ συσκευών FFD και RFD:

1. Ο πρώτος τύπος αφορά τη μεταφορά στοιχείων από μια συσκευή RFD προς έναν συντονιστή FFD.
2. Ο δεύτερος τύπος αφορά μεταφορά στοιχείων από έναν συντονιστή FFD προς μια συσκευή RFD.
3. Ο τρίτος τύπος αφορά τη μεταφορά δεδομένων μεταξύ δύο όμοιων συσκευών (FDD, RFD).

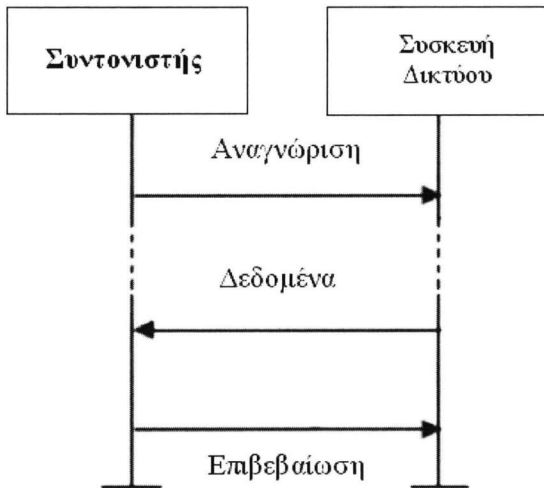
Στην τοπολογία αστέρα μόνο ο πρώτος και δεύτερος τύπος μεταφοράς δεδομένων χρησιμοποιούνται, επειδή τα δεδομένα μπορούν να ανταλλαχθούν μόνο μεταξύ του συντονιστή και μίας συσκευής. Σε μια p2p τοπολογία τα δεδομένα μπορούν να ανταλλαχθούν μεταξύ οποιονδήποτε δύο συσκευών στο δίκτυο. Συνεπώς, σε αυτήν τη τοπολογία μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι τρεις συναλλαγές. Οι μηχανισμοί για κάθε τύπο μεταφοράς εξαρτώνται από το αν το δίκτυο υποστηρίζει τη μετάδοση αναγνωριστικών σημάτων (beacon-enable). Ένα LR- WPAN καθορίζει τέσσερις δομές πλαισίων:

1. Ένα πλαίσιο αναγνωριστικών σημάτων, που χρησιμοποιείται από έναν συντονιστή για να διαβιβάσει τα αναγνωριστικά σήματα.
2. Ένα πλαίσιο δεδομένων, που χρησιμοποιείται για όλες τις μεταφορές των δεδομένων.
3. Ένα πλαίσιο αναγνώρισης, που χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της επιτυχούς λήψης των πλαισίων.

4. Ένα πλαίσιο εντολής MAC, που χρησιμοποιείται για το χειρισμό της μεταφοράς όλων των όμοιων οντοτήτων ελέγχου MAC.

### 3.4.1 Μεταφορά δεδομένων από συσκευή RFD προς συντονιστή FFD

Όταν μια συσκευή RFD επιθυμεί να μεταφέρει δεδομένα σε έναν συντονιστή FFD του δικτύου που χρησιμοποιεί αναγνωριστικά (beacon enabled Network), αρχικά περιμένει το αναγνωριστικό σήμα του δικτύου. Όταν λάβει το αναγνωριστικό σήμα, η συσκευή συγχρονίζεται στη δομή του υπερπλαισίου. Κατόπιν, η συσκευή διαβιβάζει στον συντονιστή το πλαίσιο δεδομένων της, χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό CSMA-CA με θυρίδες (slotted CSMA-CA). Ο συντονιστής αναγνωρίζει την επιτυχή λήψη των δεδομένων με τη εκπομπή ενός προαιρετικού πλαισίου αναγνώρισης. Η συναλλαγή έχει τώρα ολοκληρωθεί. Αυτή η ακολουθία φαίνεται στο σχήμα 3.5.



**Σχήμα 3.5:** Επικοινωνία με συντονιστή σε δίκτυο που δεν χρησιμοποιεί αναγνωριστικά σήματα.

Όταν μια συσκευή RFD επιθυμεί να μεταφέρει τα δεδομένα της σε ένα δίκτυο που δεν χρησιμοποιεί αναγνωριστικά (nonbeacon-enabled network), διαβιβάζει απλά το

πλαίσιο δεδομένων της στον συντονιστή, χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό CSMA-CA χωρίς θυρίδες (unslotted CSMA-CA). Ο συντονιστής αναγνωρίζει την επιτυχή λήψη των δεδομένων με τη διαβίβαση ενός προαιρετικού αναγνωριστικού πλαισίου.

### 3.4.2 Μεταφορά δεδομένων από συντονιστή FFD προς συσκευή RFD

Όταν ο συντονιστής FFD επιθυμεί να μεταφέρει τα δεδομένα σε μια συσκευή RFD του δικτύου με αναγνωριστικά σήματα, καθορίζει στο αναγνωριστικό σήμα εκπομπής της ότι ένα μήνυμα δεδομένων εκκρεμεί.

Η συσκευή FFD λαμβάνει περιοδικά το αναγνωριστικό σήμα της συσκευής RFD. Όταν ένα μήνυμα μετάδοσης εκκρεμεί, ο συντονιστής διαβιβάζει μια εντολή MAC ζητώντας τα δεδομένα, χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό CSMA-CA (slotted). Ο συντονιστής αναγνωρίζει την επιτυχή λήψη του αιτήματος δεδομένων με τη εκπομπή ενός προαιρετικού πλαισίου αναγνώρισης. Το πλαίσιο δεδομένων που εκκρεμεί στέλνεται έπειτα χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό CSMA-CA (slotted). Η συσκευή αναγνωρίζει την επιτυχή λήψη των δεδομένων με τη εκπομπή ενός πλαισίου αναγνώρισης. Η συναλλαγή έχει τώρα ολοκληρωθεί.

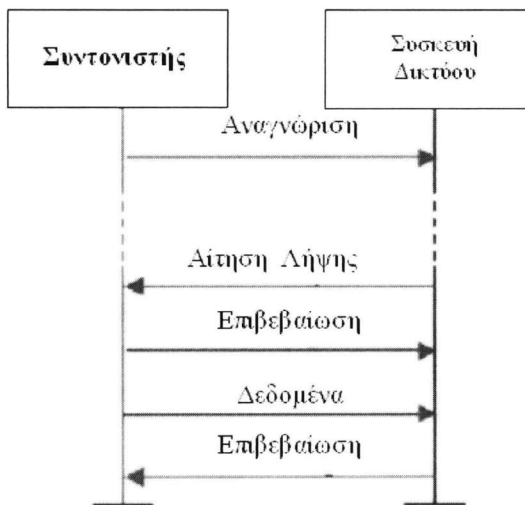
Όταν ένας συντονιστής FFD επιθυμεί να μεταφέρει δεδομένα σε μια συσκευή που δεν υποστηρίζει σήματα αναγνώρισης (non-beacon), αποθηκεύει τα δεδομένα που προορίζονται για την κατάλληλη συσκευή ώστε να κάνει πρώτα την επαφή μαζί της.

Μια συσκευή μπορεί να έρθει σε επαφή με τον συντονιστή FFD μέσω της εκπομπής εντολής MAC ζητώντας δεδομένα, χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό CSMA-CA (unslotted). Ο συντονιστής αναγνωρίζει την επιτυχή λήψη του αιτήματος δεδομένων με την εκπομπή ενός πλαισίου αναγνώρισης.

Εάν τα δεδομένα εκκρεμούν, ο συντονιστής εκπέμπει το πλαίσιο δεδομένων με την χρήση του μηχανισμού CSMA-CA (unslotted), στη συσκευή. Εάν τα δεδομένα δεν εκκρεμούν, ο συντονιστής εκπέμπει ένα μηδενικό πλαίσιο δεδομένων, χωρίς δηλαδή ωφέλιμο φορτίο, για να δείξει ότι κανένα δεδομένο δεν εκκρεμεί.

Η συσκευή αναγνωρίζει την επιτυχή λήψη των δεδομένων με τη εκπομπή ενός πλαισίου αναγνώρισης. Αυτή η ακολουθία φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 3.6 .





Σχήμα 3.6: Επικοινωνία με συντονιστή σε δίκτυο που χρησιμοποιεί αναγνωριστικά σήματα

### 3.4.3 Διομότιμη μεταφορά δεδομένων

Σε ένα p2p δίκτυο, κάθε συσκευή μπορεί να επικοινωνήσει με κάθε άλλη συσκευή που βρίσκεται στο πεδίο επιρροής της. Προκειμένου να γίνει αυτό αποτελεσματικά, οι συσκευές που επιθυμούν να επικοινωνήσουν χρειάζεται είτε να λαμβάνουν συνεχώς δεδομένα είτε να συγχρονίζονται μεταξύ τους για την λήψη των δεδομένων.

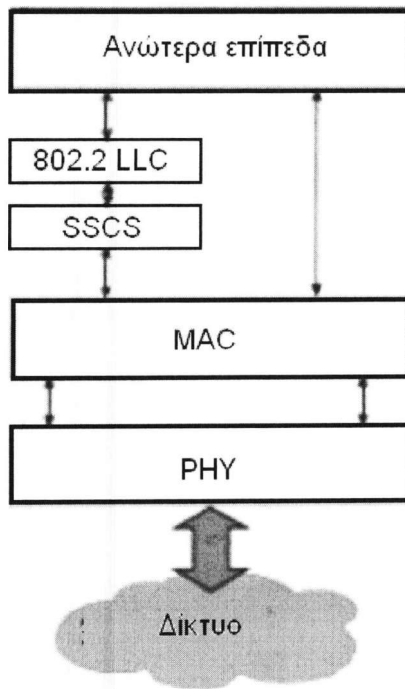
Στην πρώτη περίπτωση, η συσκευή μπορεί απλά να διαβιβάσει τα δεδομένα της χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό CSMA-CA (unslotted). Στην δεύτερη περίπτωση, πρέπει να ληφθούν μέτρα προκειμένου να επιτευχθεί ο συγχρονισμός μεταξύ των συσκευών.

Δεν υπάρχει μια καθορισμένη με σαφήνεια περιοχή κάλυψης για τα ασύρματα μέσα επειδή τα χαρακτηριστικά διάδοσης είναι δυναμικά και αβέβια. Οι μικρές αλλαγές στη θέση ή την κατεύθυνση μπορούν να οδηγήσουν σε δραστικές διαφορές στην δύναμη του σήματος ή στην ποιότητα της σύνδεσης επικοινωνίας. Αυτά τα συμπτώματα εμφανίζονται εάν μια συσκευή είναι στάσιμη ή κινητή δεδομένου ότι η κίνηση των αντικειμένων μπορεί να προσκρούσει στη διάδοση από σταθμό σε σταθμό.

### 3.5 Αρχιτεκτονική του LR-WPAN IEEE 802.15.4

Το πρότυπο IEEE 802.15.4 είναι βασισμένο στο μοντέλο OSI και την στρωματοποιημένη αρχιτεκτονική δικτύων. Κάθε στρώμα είναι αρμόδιο για ένα μέρος του προτύπου και προσφέρει τις υπηρεσίες του στα υψηλότερα στρώματα. Οι διεπαφές μεταξύ των στρωμάτων χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν τις λογικές συνδέσεις που περιγράφονται σε αυτό το πρότυπο.

Μια συσκευή σε ένα ασύρματο προσωπικό δίκτυο χαμηλού ρυθμού (LR-WPAN) περιλαμβάνει ένα φυσικό στρώμα (PHY), το οποίο περιέχει τον πομποδέκτη ραδιοσυχνότητας (RF) μαζί με τον χαμηλού επιπέδου μηχανισμό ελέγχου καθώς και ένα υπόστρωμα ελέγχου πρόσβασης στο μέσο (MAC) που παρέχει την πρόσβαση στο φυσικό κανάλι για όλους τους τύπους μεταφοράς. Στο παρακάτω σχήμα 3.7 φαίνονται οι διεπαφές μεταξύ των στρωμάτων.



Σχήμα 3.7: Αρχιτεκτονική LR-WPAN

Τα ανώτερα στρώματα, που φαίνονται στο σχήμα 3.7, είναι ένα στρώμα δικτύου (Network Layer), που παρέχει τη διαμόρφωση δικτύων, τον χειρισμό, και την δρομολόγηση μηνυμάτων, και ένα στρώμα εφαρμογής (Application Layer), το οποίο παρέχει την προοριζόμενη λειτουργία της συσκευής. Τέλος ένας IEEE 802.2™ έλεγχος λογικής σύνδεσης (LLC) μπορεί να έχει πρόσβαση στο υπό-επίπεδο MAC μέσω του υπό-επιπέδου υπηρεσίας ειδικής κλίσης (SSCS-Service Specific Convergence Sub-layer).

### 3.5.1 Το φυσικό επίπεδο (PHY)

Το φυσικό επίπεδο (PHY) παρέχει διεπαφή μεταξύ του φυσικού καναλιού και του υπό-επιπέδου MAC.

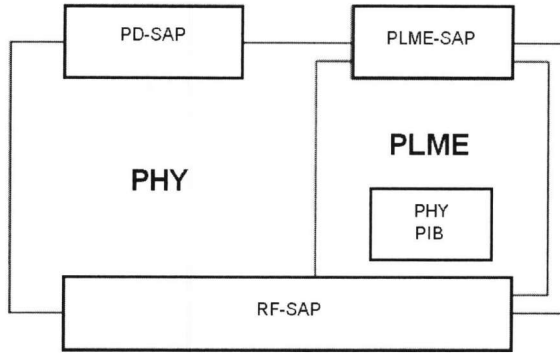
Το φυσικό επίπεδο περιέχει μία οντότητα διαχείρισης η οποία καλείται οντότητα διαχείρισης του φυσικού επιπέδου (PLME-Physical Layer Management Entity). Αυτή η οντότητα παρέχει τις υπηρεσίες διαχείρισης των διεπαφών του επιπέδου μέσω των οποίων επικαλούνται οι λειτουργίες διαχείρισης του επιπέδου. Η οντότητα PLME είναι επίσης υπεύθυνη για την διατήρηση μίας βάσης δεδομένων των διαχειριζόμενων αντικειμένων που ανήκουν στο φυσικό επίπεδο. Αυτή η βάση δεδομένων καλείται PIB (Physical PAN Information Base).

Το φυσικό επίπεδο (PHY) παρέχει δύο υπηρεσίες που είναι προσβάσιμες μέσω δύο σημείων πρόσβασης για εξυπηρέτηση (SAPs-Service Access Points):

1. την υπηρεσία φυσικών δεδομένων που είναι προσβάσιμη μέσω του σημείου πρόσβασης για εξυπηρέτηση φυσικών δεδομένων (PD-SAP/Physical Data-Service Access Point) και
2. την υπηρεσία φυσικής διαχείρισης που είναι προσβάσιμη μέσω του σημείου πρόσβασης για εξυπηρέτηση της οντότητας διαχείρισης του φυσικού επιπέδου (PLME-SAP/Physical Layer Management Entity-Service Access Point).

Η υπηρεσία φυσικών δεδομένων επιτρέπει τη μετάδοση και τη λήψη πακέτων δεδομένων (data units) του φυσικού πρωτοκόλλου (PPDUs-Physical Protocol Data Units) μέσω του φυσικού ράδιο-καναλιού. Η υπηρεσία φυσικής διαχείρισης επιτρέπει την μεταφορά εντολών διαχείρισης μεταξύ της οντότητας διαχείρισης του υπό-

επιπέδου MAC (MLME) και της οντότητας διαχείρισης του φυσικού επιπέδου (PLME). Στο παρακάτω σχήμα 3.8 παρουσιάζεται το μοντέλο αναφοράς του φυσικού επιπέδου.



**Σχήμα 3.8:** Μοντέλο αναφοράς του φυσικού επιπέδου (PHY)

Το σημείο πρόσβασης για εξυπηρέτηση των φυσικών δεδομένων (PD-SAP) υποστηρίζει την μεταφορά πακέτων δεδομένων του πρωτοκόλλου MAC. Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του φυσικού επιπέδου είναι η ενεργοποίηση και η απενεργοποίηση του ράδιο-πομποδέκτη, η ενεργειακή ανίχνευσης (ED), η ποιοτική ένδειξη συνδέσεων (LQI), η επιλογή καναλιών και ο καθορισμός ελεύθερου καναλιού (CCA) όσο γίνεται η λήψη πακέτων από το φυσικό μέσο. Οι λειτουργίες αυτές γίνονται μέσω αρχών που έχουν οριστεί από το πρότυπο IEEE 802.15.4 για τον έλεγχο των φυσικών οντοτήτων. Οι αρχές αυτές διακρίνονται ανάλογα με την λειτουργία τους και υποστηρίζονται από τα σημεία πρόσβασης για εξυπηρέτηση (SAPs). Το σημείο πρόσβασης για εξυπηρέτηση των φυσικών δεδομένων PD\_SAP υποστηρίζει τις παρακάτω λειτουργίες του πίνακα 3.1.

**Πίνακας 3.1:** Λειτουργίες σημείου πρόσβασης εξυπηρέτησης φυσικών δεδομένων (PD-SAP Primitives)

Ρουτίνα	Περιγραφή
PD-DATA.Request	Κάνει αίτηση μεταφοράς δεδομένων

PD-DATA.Confirm	Επιβεβαιώνει το τέλος της εκπομπής των δεδομένων
PD-DATA.Indication	Παρέχει ένδειξη μεταφοράς των δεδομένων

Το σημείο πρόσβασης για εξυπηρέτηση της οντότητας διαχείρισης του φυσικού επιπέδου PLME-SAP υποστηρίζει τις παρακάτω λειτουργίες του πίνακα 3.2.

**Πίνακας 3.2:** Λειτουργίες της οντότητας διαχείρισης φυσικού επιπέδου (PLME-SAP Primitives)

Ρουτίνα	Κατάσταση	Περιγραφή
PLME-CCA	Request	Αίτηση για εκτέλεση μίας λειτουργίας CCA
	Confirm	Αναφέρει τα αποτελέσματα της λειτουργίας CCA.
PLME-ED	Request	Κάνει αίτηση για μέτρηση ED
	Confirm	Αναφέρει τα αποτελέσματα της ED μέτρησης.
PLME-GET	Request	Αίτηση πληροφοριών για μία δοσμένη ιδιότητα της βάσης δεδομένων PIB.
	Confirm	Αναφέρει τα αποτελέσματα της πληροφορίας που ζητήθηκαν από την βάση δεδομένων PIB.
PLME-SET_RX_STATE	Request	Αίτηση για αλλαγή της λειτουργίας του πομποδέκτη. Λειτουργίες: -πομποδέκτης απενεργοποιημένος (TRX_OFF)

		-πομπός ενεργοποιημένος (TX_ON) -δέκτης ενεργοποιημένος (RX_ON)
	Confirm	Αναφέρει τα αποτελέσματα της αίτησης για την εσωτερική κατάσταση λειτουργίας του πομποδέκτη.
PLME-SET	Request	Αίτηση για τοποθέτηση ιδιότητας της βάσης δεδομένων PIB.
	Confirm	Επιβεβαίωση αλλαγής της ιδιότητας της βάσης δεδομένων PIB.

**Πίνακας 3.3:** Περιγραφή καταστάσεων του φυσικού επιπέδου (PHY) για τον πομποδέκτη

Κατάσταση	Τιμή	Περιγραφή
BUSY	0x00	Η προσπάθεια CCA ανίχνευσε ένα απασχολημένο κανάλι
BUSY_RX	0x01	Ο πομποδέκτης ζήτησε την αλλαγή της κατάστασής του κατά την διάρκεια λήψης
BUSY_TX	0x02	Ο πομποδέκτης ζήτησε την αλλαγή της κατάστασής του κατά την διάρκεια εκπομπής
FORCE_TRX_OFF	0x03	Ο πομποδέκτης πρόκειται να απενεργοποιηθεί
IDLE	0x04	Η προσπάθεια CCA ανίχνευσε ένα ελεύθερο κανάλι
INVALID_PARAMETER	0x05	Οι αρχές αίτησης SET/GET ενημερώθηκαν με μία παράμετρο η οποία δεν είναι μέσα στα επιτρεπτά όρια
RX_ON	0x06	Ο πομποδέκτης είναι ή πρόκειται να ρυθμιστεί έτσι ώστε να βρίσκεται στην ενεργή κατάσταση δέκτη

SUCCESS	0x07	Οι SET/GET, μία λειτουργία ED ή μία αλλαγή κατάστασης του πομποδέκτη έγινε επιτυχώς
TRX_OFF	0x08	Ο πομποδέκτης είναι ή πρόκειται να ρυθμιστεί έτσι ώστε να βρίσκεται στην ανενεργή κατάσταση
TX_ON	0x09	Ο πομποδέκτης είναι ή πρόκειται να ρυθμιστεί έτσι ώστε να βρίσκεται στην ενεργή κατάσταση πομπού
UNSUPPORTED_ATTRIBUTE	0x0a	Οι αρχές αίτησης SET/GET ενημερώθηκαν από ένα προσδιοριστικό μίας ιδιότητας που δεν υποστηρίζεται

### 3.5.1.1 Διαμόρφωση των πακέτων

Η επικοινωνία μεταξύ οντοτήτων σε ένα ασύρματο δίκτυο γίνεται με την χρήση πακέτων δεδομένων. Τα πακέτα αυτά εκτός από το ωφέλιμο φορτίο (δεδομένα), περιέχουν πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση των οντοτήτων, τον συγχρονισμό, την ασφάλεια κλπ.

#### Διαμόρφωση της μονάδας δεδομένων του φυσικού πρωτοκόλλου (PPDU)

Ένα πακέτο PPDU (σχ3).αποτελείται από τα παρακάτω στοιχεία :

1. μία επικεφαλίδα συγχρονισμού (SHR-Synchronization Header) που επιτρέπει σε μία συσκευή λήψης να συγχρονίζεται και να κλειδώνεται στον ρυθμό αποστολής δεδομένων (bits).
2. μία φυσική επικεφαλίδα (PHR-Physical Header), που περιέχει τις πληροφορίες για το μήκος του πλαισίου.
3. ένα μεταβλητού μήκους πεδίο (payload), το οποίο μεταφέρει το πλαίσιο του υποεπίπεδο MAC.

Octets:4	1	1		variable
Preamble	SFD	Frame length (7 bit)	Reserved (1 bit)	PSDU
SHR		PHR		PHY payload

**Σχήμα 3.9:** Διαμόρφωση πακέτου PPDU

***Το εισαγωγικό πεδίο (Preamble Field)***

Το εισαγωγικό πεδίο χρησιμοποιείται από τον πομποδέκτη για την απόκτηση συγχρονισμού με ένα εισερχόμενο μήνυμα.

***Πεδίο οριοθέτησης της αρχής του πλαισίου (SFD Field)***

Το πεδίο αυτό έχει μήκος 8-bit και υποδεικνύει το τέλος του πεδίου συγχρονισμού (Preamble) και την αρχή των πακέτων δεδομένων.

***Πεδίο μήκους του πλαισίου (Frame Length Field)***

Το πεδίο αυτό έχει μήκος 7-bit και καθορίζει τον αριθμό των οκτάδων (bytes) που περιέχονται στην μονάδα δεδομένων του φυσικού επιπέδου PSDU (δηλαδή, το φυσικό ωφέλιμο φορτίο).

***Πεδίο της μονάδας δεδομένων της φυσικής υπηρεσίας (PSDU Field)***

Το πεδίο αυτό έχει μεταβλητό μήκος και μεταφέρει μεταφέρει το πλαίσιο του υπό-επιπέδου MAC (δηλαδή, την μονάδα δεδομένων του πρωτοκόλλου MAC (MPDU)).

***Χαρακτηριστικά Εκπομπής του Φυσικού επιπέδου***

Το φυσικό επίπεδο του IEEE 80215.4 εκπέμπει σε μια από τις ακόλουθες ελεύθερες ζώνες συχνότητας (ISM Bands):

- 868–868,6 MHz (π.χ., Ευρώπη),
- 902–928 MHz (π.χ., Βόρεια Αμερική) ή
- 2400–2483.5 MHz (παγκοσμίως).

Στον πίνακα 3.5 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά εκπομπής του φυσικού επιπέδου IEEE 802.15.4.



**Πίνακας 3.5:** Χαρακτηριστικά εκπομπής του PHY

PHY (MHz)	Frequency band (MHz)	Spreading parameters		Data parameters		
		Chip rate (Kchip/s)	Modulation	Bit rate (kb/s)	Symbol rate (ksymbol/s)	Symbols
868/915	868 – 868.6	300	BPSK	20	20	Binary
	902 - 928	600	BPSK	40	40	Binary
2450	2400 – 2483.5	2000	O-QPSK	250	62.5	16-ary Orthogonal

Σε αυτές τις τρεις ζώνες συχνοτήτων αριθμούνται συνολικά 27 κανάλια, 0 έως 26. Από αυτά, τα 16 κανάλια είναι διαθέσιμα στην ζώνη 2450MHz, τα 10 στη ζώνη 915 MHz, και 1 στη ζώνη 868 MHz.

Η κεντρική συχνότητα αυτών των καναλιών καθορίζεται ως εξής:

$$F_c = 868.3 \text{ MHz, για } k = 0$$

$$F_c = 906 + 2 (k - 1) \text{ MHz, για } k = 1, 2, \dots, 10.$$

$$\text{και } F_c = 2405 + 5 (k - 11) \text{ MHz, για } k = 11, 12, \dots, 26.$$

Όπου,

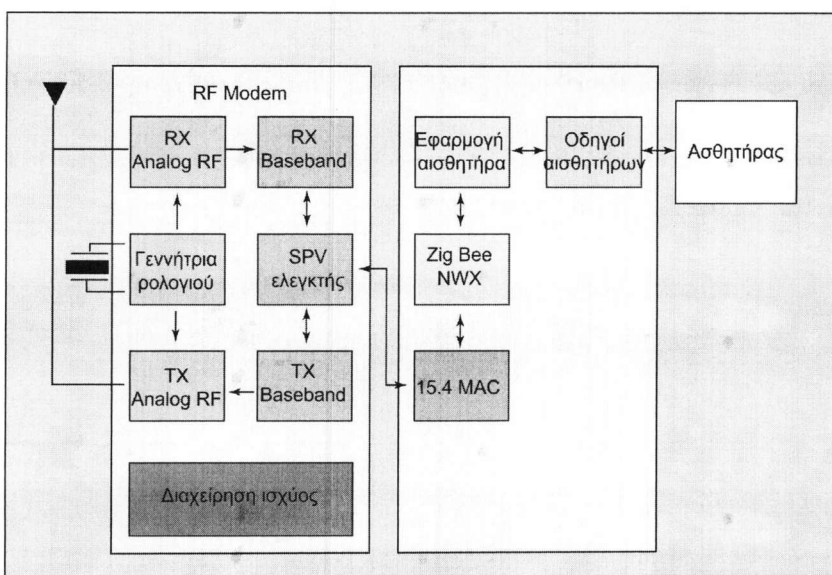
k: είναι ο αριθμός των καναλιών.

Όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα 3.5 ο ρυθμός δεδομένων (bit rate) εξαρτάται από την επιλογή συχνότητας λειτουργίας. Η ζώνη 2,4 GHz παρέχει 250 kbps, η 915 MHz παρέχει 40 kbps και η 868 MHz παρέχει ένα ποσοστό 20 kbps. Η πραγματική ρυθμό-απόδοση στοιχείων θα είναι μικρότερη από το διευκρινισμένο ρυθμός δεδομένων λόγω της πληθώρας των πακέτων και των καθυστερήσεων επεξεργασίας.

### 3.6 Υλικό συστήματος ασύρματου αισθητήρα ZigBEE

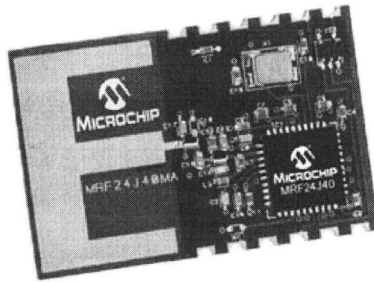
Ένα ολοκληρωμένο σύστημα ασύρματου αισθητήρα ZigBEE (σχ3.9) περιλαμβάνει:

- Τον αισθητήρα,
- Τον μικροελεγκτή του συστήματος,
- Τον πομποδέκτης ραδιοσυχνοτήτων,
- Την κεραία εκπομπής και λήψης του σήματος.



**Σχήμα 3.9:** Υλικό ασύρματου αισθητήρα ZigBEE

Ο μικροελεγκτής εκτελεί αλγόριθμο που η λειτουργία του έχει προσδιοριστεί από τον χρήστη συμπεριλαμβάνοντας τους αλγόριθμους των επιπέδων: MAC, του στρώματος δικτύου (Network Layer), που παρέχει τη διαμόρφωση δικτύων, τον χειρισμό, και την δρομολόγηση μηνυμάτων, και ένα στρώμα εφαρμογής (Application Layer), το οποίο παρέχει την προοριζόμενη λειτουργία της συσκευής. Ο μικροελεγκτής αποτελεί τα πακέτα δεδομένων στον πομποδέκτης ραδιοσυχνοτήτων για τη μετάδοση τους μέσω της κεραίας (σχ3.10).



**Σχήμα 3.10:** Πομποδέκτης RF της Microchip

### 3.7 Δίκτυα ZigBEE

Τα δίκτυα ZigBEE μπορούν να είναι ad-hoc, που σημαίνει ότι ένα νέο δίκτυο διαμορφώνεται και αποδιαμορφώνεται όπως απαιτείται. Σε ένα δίκτυο αστέρα, οι τελικές συσκευές αναζητούν πάντα ένα δίκτυο προτού να μπορέσουν να εκτελέσουν οποιαδήποτε μεταφορά δεδομένων. Ένα νέο δίκτυο καθιερώνεται αρχικά από έναν συντονιστή (coordinator). Στην εκκίνηση του δικτύου, ένας συντονιστής (coordinator) ανιχνεύει για άλλους συντονιστές κοντά σε αυτόν. Όταν δεν βρίσκεται κανένας κοντά του, καθιερώνει το δίκτυό του και επιλέγει μια μοναδική 16-bit PAN ID (Personal Area Network ID) ταυτότητα. Μόλις καθιερωθεί ένα νέο δίκτυο, μία ή περισσότερες τελικές συσκευές επιτρέπεται να συνδεθούν στο δίκτυο. Η απόφαση να επιτραπούν ή να απαγορευθούν οι νέες ενώσεις εξαρτάται από το συντονιστή.

Μόλις διαμορφωθεί ένα δίκτυο, είναι δυνατό λόγω των φυσικών αλλαγών, περισσότερα από ένα δίκτυα να συμπίπτουν χρονικά και μια ταυτότητα PAN ID να αντιστοιχεί σε περισσότερα από ένα δίκτυα. Σε αυτή την περίπτωση, ο συντονιστής μπορεί να αρχίσει μια διαδικασία επίλυσης του προβλήματος των PAN ID συγκρούσεων και ένας από τους συντονιστές θα αλλάξει την ταυτότητα PAN ID ή/και το κανάλι του. Ο συντονιστής που επηρεάστηκε θα καθοδηγήσει όλες τις τελικές συσκευές του για να κάνει τις απαραίτητες αλλαγές.

Ανάλογα με τις απαιτήσεις του συστήματος, ένας συντονιστής μπορεί να αποθηκεύει όλες τις ενώσεις δικτύων σε αμετάβλητη μνήμη που καλείται πίνακας γειτνίασης (neighbor table). Προκειμένου να συνδεθεί με ένα δίκτυο, μια τελική συσκευή εκτελείται διαδικασία που καλείται orphan notification procedure για να

εντοπίσει το τελευταίο δίκτυο με το οποίο είχε συνδεθεί ή για να εκτελέσει την διαδικασία ένωσης (association procedure) με το νέο δίκτυο. Στην περίπτωση εκτέλεσης της πρώτης διαδικασίας (orphan notification procedure), ο συντονιστής θα αναγνωρίσει μία πρόσφατα συνδεδεμένη τελική συσκευή ψάχνοντας την αμετάβλητη μνήμη του πίνακα γειτνίασης.

Όταν γίνει η ένωση σε ένα δίκτυο, μια τελική συσκευή μπορεί να επιλέξει να διαχωριστεί από το δίκτυο με την εκτέλεση μίας διαδικασίας αποσύνδεσης (disassociation procedure). Αν είναι απαραίτητο, ένας συντονιστής μπορεί και ο ίδιος να αρχίσει τη διαδικασία αποσύνδεσης για να αναγκάσει ένα κόμβο να αφήσει το δίκτυο.

Ένας κόμβος ZigBEE υποστηρίζει 31 τελικά σημεία (0-31) και 8 διεπαφές (0-7). Το τελικό σημείο 0 είναι καθορισμένο για τη ρύθμιση των συσκευών και το τελικό σημείο 31 έχει καθοριστεί για τις ράδιο-μεταδόσεις μόνο. Αυτό αφήνει συνολικά 30 τελικά σημεία για χρήση σε εφαρμογές. Για κάθε τελικό σημείο, μπορούν να υπάρξουν συνολικά 8 διεπαφές. Κατά συνέπεια, στην πραγματικότητα, η εφαρμογή μπορεί να έχει μέχρι 240 εικονικά κανάλια σε ένα φυσικό κανάλι.

Το πρωτόκολλο ZigBEE καθορίζει επίσης έναν όρο που αποκαλείται προφίλ (profile). Ο όρος προφίλ είναι συνώνυμος της περιγραφής μίας διανεμημένης εφαρμογής. Περιγράφει μια διανεμημένη εφαρμογή σε επίπεδο πακέτων που πρέπει να χειριστεί και ενεργειών που πρέπει να εκτελέσει. Το προφίλ είναι αυτό που καθιστά τις συσκευές ZigBEE διαλειτουργικές.

### 3.7.1 Σύνδεση τελικών σημείων

Όπως αναφέραμε, οι τελικές συσκευές σε ένα δίκτυο αστέρα επικοινωνούν πάντα με το συντονιστή. Ο συντονιστής είναι αρμόδιος για την προώθηση του πακέτου δεδομένων που στέλνεται από ένα τελικό σημείο από έναν κόμβο στο κατάλληλο τελικό σημείο (ή σημεία) και στην τελική συσκευή λήψης. Όταν καθιερώνεται ένα νέο δίκτυο, ο συντονιστής πρέπει να ενημερωθεί πώς να δημιουργήσει την πηγή και τις συνδέσεις των τελικών σημείων προορισμού.

Το πρωτόκολλο ZigBEE καθορίζει μια ειδική διαδικασία που ονομάζεται σύνδεση τελικού σημείου (endpoint biding). Σαν μέρος της συνδετικής διαδικασίας,

ένα απομακρυσμένο δίκτυο ή συσκευή διαχείρισης (device manager) μπορεί να ζητήσει από τον συντονιστή να τροποποιήσει τον πίνακα συνδέσεων του. Ο κόμβος του συντονιστή διατηρεί έναν πίνακα συνδέσεων που περιέχει ουσιαστικά μία λογική σύνδεση μεταξύ δύο ή περισσότερων τελικών σημείων. Κάθε σύνδεση είναι καθορισμένη από την ταυτότητα της συστάδας της (cluster ID) και από την πηγή του τελικού της σημείου (source endpoint).

Για παράδειγμα, εάν τα δεδομένα από την ψηφιακή είσοδο Digital input #1 του κόμβου εισόδου/εξόδου πρέπει να σταλούν στο κανάλι ελέγχου Channel Control #1 του κόμβου ελέγχου, πρέπει να ζητήσουμε από τον συντονιστή να δημιουργήσει μία εισαγωγή στον πίνακα συνδέσεων (binding table entry) που αποτελείται από το τελικό σημείο της ψηφιακής εισόδου Digital input #1 του κόμβου εισόδου/εξόδου ως πηγή και του καναλιού ελέγχου Channel Control #1 του κόμβου ελέγχου ως προορισμό. Αφού έχει δημιουργηθεί μια εισαγωγή στον πίνακα συνδέσεων, οποιαδήποτε στιγμή ο κόμβος εισόδου/εξόδου στέλνει δεδομένα από το τελικό σημείο της ψηφιακής εισόδου Digital input #1, στο τελικό σημείο του Channel Control #1 του κόμβου ελέγχου. Η ψηφιακή είσοδος Data input #1 καθώς και το κανάλι ελέγχου Channel Control #1 θα μοιραστούν μία κοινή ταυτότητα συστάδων (cluster ID). Ανάλογα με το πώς έχει δημιουργηθεί ο πίνακας συνδέσεων, είναι δυνατό να γίνει πολύ-διανομή των δεδομένων (multicast data) από ένα τελικό σημείο σε πολλαπλά τελικά σημεία στους πολλαπλούς κόμβους.

Το πρωτόκολλο ZigBEE καθορίζει ένα ειδικό αντικείμενο λογισμικού, που ονομάζεται ZigBEE Device Object (ZDO), το οποίο παρέχει υπηρεσίες συνδέσεων μεταξύ άλλων υπηρεσιών.

### 3.7.2 Μηχανισμός μεταφοράς δεδομένων

Ανάλογα με τον τύπο δικτύου, διαφέρουν και οι μηχανισμοί για την μεταφορά δεδομένων από και προς στην τελική συσκευή. Σε ένα δίκτυο αστέρα χωρίς αναγνωριστικά (non-beacon), όταν μια τελική συσκευή θέλει να στείλει ένα πλαίσιο δεδομένων, περιμένει απλά να ελευθερωθεί το κανάλι. Όταν ανιχνευθεί ένα ελεύθερο κανάλι, διαβιβάζει το πλαίσιό του στο συντονιστή. Εάν ένας συντονιστής θέλει να στείλει τα στοιχεία σε μια τελική συσκευή, φυλάσσει το πλαίσιο δεδομένων στην μνήμη μετάδοσης του (transmit buffer) μέχρι η προοριζόμενη τελική συσκευή να

κάνει αίτηση για την αποδοχή των δεδομένων. Αυτή η μέθοδος εξασφαλίζει ότι ο δέκτης της τελικής συσκευής είναι ενεργός και είναι ικανός να λάβει τα δεδομένα από το συντονιστή.

Σε ένα p2p δίκτυο, κάθε κόμβος πρέπει να κρατήσει τον δέκτη του ενεργό όλη την ώρα ή να συμφωνήσουν όλοι οι κόμβοι να ενεργοποιήσουν τους δέκτες τους ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα. Αυτό θα επιτρέψει σε έναν κόμβο να διαβιβάσει ένα πλαίσιο δεδομένων και να εξασφαλίσει ότι το πλαίσιο θα παραληφθεί από τον άλλο κόμβο. Το γεγονός ότι η τελική συσκευή πρέπει να ειδοποιήσει το συντονιστή για τα δεδομένα της, παρά να κρατήσει τον δέκτη της ενεργό, επιτρέπει στις τελικές συσκευές να μειώσουν την κατανάλωση ενέργειας θέτοντας τις σε κατάσταση αδράνειας (sleep mode) με περιοδική ενεργοποίηση.

Μειονέκτημα της τεχνικής αδράνειας είναι ότι ο συντονιστής πρέπει να κρατήσει όλα τα πλαίσια δεδομένων στην εσωτερική μνήμη του (internal buffer) μέχρι η προοριζόμενη τελική συσκευή να ενεργοποιηθεί και να κάνει αίτηση για την λήψη των δεδομένων. Εάν ένα δίκτυο περιέχει πολλές τελικές συσκευές που βρίσκονται σε αδράνεια για μεγάλο χρονικό διάστημα, ο συντονιστής πρέπει να κρατήσει τα πλαίσια δεδομένων για εκείνο το χρονικό διάστημα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ανάλογα με τον αριθμό των κόμβων και το ποσοστό ανταλλαγής των πλαισίων, να αυξηθούν και οι απαιτήσεις της μνήμης RAM του συντονιστή. Ένας συντονιστής μπορεί επιλεκτικά να αποφασίσει να κρατήσει ένα συγκεκριμένο πλαίσιο για μεγάλο χρονικό διάστημα, ή για ένα σύντομο χρονικό διάστημα, βασισμένος στον περιγραφέα συσκευών για την τελική συσκευή.

### 3.8 Σωρός ZigBEE (ZigBEE Stack)

Το επίπεδο πρόσβασης στο μέσο μετάδοσης MAC, το επίπεδο δικτύου και ασφαλείας (Network & Security) καθώς και το επίπεδο εφαρμογής με τα προφίλ (application layer with application profiles) καθορίζονται από ειδικό λογισμικό πρόγραμμα που εκτελείται στην μνήμη ενός μικροελεγκτή που υποστηρίζει την τεχνολογία ZigBEE. Το λογισμικό αυτό πρόγραμμα καλείται σωρός ZigBEE (ZigBEE Stack). Ο σωρός ZigBEE καθορίζει την δημιουργία των στρωμάτων (layers), το πρωτόκολλο επικοινωνίας μεταξύ τους, την δημιουργία των πακέτων δεδομένων, την διαχείριση αυτών και όλες τις απαραίτητες λειτουργίες για την δημιουργία δικτύων μεταξύ των

διαφόρων συσκευών. Ο σωρός ZigBEE διαφέρει ανάλογα με την εφαρμογή και τον τύπο του μικροελεγκτή και του φυσικού επιπέδου που θα χρησιμοποιηθεί.

Εφαρμογή	ZDO (ZDO.*)
APL (zAPL.*)	APS (zAPS.*)
NWK (zNWK.*)	
MAC (zMAC.*)	
PHY (zPHY.h)	

**Σχήμα 3.12:** Αρχιτεκτονική ZigBEE Stack της Microchip

Ο σωρός ZigBEE σε γλώσσα προγραμματισμού C υποστηρίζεται από τους MPLAB C18 και Hi-Tech PICC-18 μεταγλωττιστές (compilers). Ανάλογα με το ποιος μεταγλωττιστής χρησιμοποιείται, τα αρχεία αυτόματα κάνουν τις απαραίτητες αλλαγές. Ο σωρός ZigBEE σχεδιάστηκε αρχικά για να τρέχει μόνο στους μικροελεγκτές της οικογένειας PIC18F. Ο σωρός χρησιμοποιεί την εσωτερική μνήμη για να αποθηκεύει την ρυθμιζόμενη διεύθυνση MAC, τον πίνακα δικτύου και τον πίνακα συνδέσεων.

Ο σωρός ZigBEE της Microchip διαιρεί τη λογική του σε πολλαπλά στρώματα όπως καθορίζεται από τις προδιαγραφές ZigBEE. Σύμφωνα με τις προδιαγραφές του σωρού μια εφαρμογή διασυνδέεται πάντα με το στρώμα εφαρμογής (APL) και το υπόστρωμα υποστήριξης εφαρμογής (APS).

Ο κώδικας που εφαρμόζεται σε κάθε στρώμα περιέχεται σε ένα ξεχωριστό αρχείο, ενώ οι υπηρεσίες και οι διεπαφές προγραμματισμού της εφαρμογής (APIs) περιέχονται σε ειδικό αρχείο που ονομάζεται ενσωματωμένο αρχείο (include file).

### 3.8.1 Στρώμα εφαρμογής (APL)

Η ενότητα APL παρέχει τις υψηλού επιπέδου λειτουργίες διαχείρισης του σωρού. Μια εφαρμογή χρήστη θα χρησιμοποιήσει αυτή την ενότητα για να διαχειριστεί τη λειτουργία του σωρού. Το αρχείο zAPL.c εφαρμόζει τη λογική του επιπέδου εφαρμογής APL και το αρχείο zAPL.h καθορίζει τις APIs που υποστηρίζονται από την ενότητα APL. Μία εφαρμογή χρήστη θα περιλάβει το αρχείο zAPL.h για να έχει πρόσβαση στις APIs του. Στον πίνακα 3.6 συνοψίζονται οι μακροεντολές του στρώματος εφαρμογής του Microchip ZigBEE Stack

**Πίνακας 3.6:** Λειτουργίες του στρώματος εφαρμογής

λειτουργία	Περιγραφή
APLInit	Η λειτουργία ρυθμίζει όλες τις ενότητες του σωρού. Επίσης ρυθμίζει την μηχανή καταστάσεων του στρώματος (APL state machine)
APLIsIdle	Η λειτουργία χρησιμοποιείται για ανιχνεύσει σφαλμάτων ώστε να γίνει απενεργοποίηση του στρώματος εφαρμογής και των άλλων ενοτήτων.
APLEnable	Η λειτουργία χρησιμοποιείται για την ενεργοποίηση των ενοτήτων του σωρού και του πομποδέκτη ραδιοσυχνότητας
APLDisable	Η λειτουργία χρησιμοποιείται για να απενεργοποιήσει τον πομποδέκτη ραδιοσυχνότητας και των άλλων ενοτήτων του σωρού.
APLTask	Η λειτουργία καλεί διαδοχικά κάθε ενότητα του σωρού. Οι κλήσεις σε αυτήν την λειτουργία επιτρέπουν στο σωρό να επεξεργάζεται τα εισερχόμενα πακέτα δεδομένων.
APLNetworkInit	Η λειτουργία εκκινεί τη ρύθμιση ενός νέου δικτύου.
APLIsNetworkInitComplete	Η λειτουργία ελέγχει την μηχανής κατάστασης του δικτύου. Πρέπει να καλείται επανειλημμένως μέχρι να επιστρέψει TRUE.
APLNetworkForm	Η λειτουργία δίνει εντολή στο επίπεδο δικτύου να σχηματίσει ένα νέο δίκτυο στο συγκεκριμένο κανάλι.
APLPermitAssociation	Η λειτουργία επιτρέπει στις τελικές συσκευές να συνεργαστούν με το δίκτυο.
APLDisableAccociation	Η λειτουργία δεν επιτρέπει στις νέες συσκευές να ενωθούν με το δίκτυο. Είναι συμπληρωματική της εντολής



APLPermitAssociation	
APLCommitTableChanges	Η λειτουργία αποθηκεύει όλες τις αιτήσεις για σύνδεση και συναλλαγή που έχουν ληφθεί.
APLJoin	Η λειτουργία χρησιμοποιείται από μια τελική συσκευή για να συνδεθεί με ένα από τα πολλά πιθανά διαθέσιμα δίκτυα.
APLIsJoinComplete	Η λειτουργία χρησιμοποιείται από την τελική συσκευή για να καθορίσει αν μια πρόσφατη διαδικασία έναρξης σύνδεσης έχει ολοκληρωθεί.
APLRejoin	Η λειτουργία χρησιμοποιείται από την τελική συσκευή για να αρχίσει την διαδικασία επανασύνδεσης. Όταν εκτελείται σε κανονική λειτουργία, μια τελική συσκευή πρέπει να επανασυνδεθεί σε ένα δίκτυο που έχει συνδεθεί πρόσφατα εκτός αν η εφαρμογή απαιτεί να βρει και να συνδεθεί με νέο δίκτυο σε κάθε εκκίνηση.
APLRejoinComplete	Η λειτουργία χρησιμοποιείται από την τελική συσκευή για να καθορίσει αν μια πρόσφατη διαδικασία έναρξης επανασύνδεσης ολοκληρώθηκε.
APLLeave	Η λειτουργία χρησιμοποιείται από την τελική συσκευή για να αρχίσει την ακολουθία εγκατάλειψης από ένα υπάρχον δίκτυο.
APLIsLeaveComplete	Η λειτουργία χρησιμοποιείται από την τελική συσκευή για να καθορίσει αν μια πρόσφατη διαδικασία αποχώρησης έχει ολοκληρωθεί ή όχι.

### 3.8.2 Το υποεπίπεδο υποστήριξης της εφαρμογής (APS)

Το υπό-επίπεδο υποστήριξης της εφαρμογής (APS) παρέχει τις διεπαφές των τελικών σημείων του ZigBEE. Μία εφαρμογή θα χρησιμοποιήσει αυτό το επίπεδο για να ανοίξει ή να κλείσει ένα ή περισσότερα τελικά σημεία και να ανακτήσει ή να στείλει τα δεδομένα.

Επίσης, το υποεπίπεδο αυτό διατηρεί τον πίνακα συνδέσεων. Ο πίνακας συνδέσεων παρέχει μία λογική σύνδεση μεταξύ του τελικού σημείου και του ζεύγους ταυτοτήτων των συστάδων μεταξύ δύο κόμβων σε ένα δίκτυο. Όταν ένας συντονιστής προγραμματίζεται για πρώτη φορά, ο πίνακας συνδέσεων του είναι κενός. Η εφαρμογή πρέπει να καλέσει τις απαραίτητες συναρτήσεις σύνδεσης API για να κάνει νέες εισαγωγές συνδέσεων. Το υποεπίπεδο APS της Microchip αποθηκεύει

τους πίνακες συνδέσεων στη μνήμη. Η ρουτίνες προγραμματισμού για την μνήμη βρίσκονται στο αρχείο zNVM.c του σωρού της Microchip.

Το υποεπίπεδο αυτό επίσης παρέχει και μια μνήμη για να αποθηκεύει πλαίσια που εκκρεμούν μέχρι να ζητηθούν από τους προοριζόμενους δέκτες. Βασιζόμενοι στις προδιαγραφές ZigBEE, σε ένα δίκτυο τοπολογίας αστέρα, μία συσκευή RFD θα δρομολογεί πάντα τα δεδομένα της στον συντονιστή. Η συσκευή RFD μπορεί να μην γνωρίζει για τον προοριζόμενο δέκτη του πλαισίου δεδομένων που έστειλε. Ο ακριβής προορισμός αυτού του πλαισίου δεδομένων καθορίζεται από την εισαγωγή του πίνακα συνδέσεων. Όταν ο συντονιστής λάβει αυτό το πλαίσιο δεδομένων, ελέγχει τον πίνακα συνδέσεων του για να καθορίσει ποιος είναι ο προορισμός του. Αν υπάρχει ο δέκτης για αυτό το πακέτο δεδομένων, θα αποθηκεύσει αυτό το πλαίσιο δεδομένων στην μνήμη του μέχρι ο δέκτης να κάνει αίτηση για λήψη του πλαισίου αυτού. Συνεπώς ένας μεγάλος αριθμός αιτήσεων για δεδομένα θα χρειάζεται και μεγαλύτερο χώρο στην μνήμη. Το μέγεθος της μνήμης καθορίζεται από την επιλογή MAX\_HEAP\_SIZE που βρίσκεται στο αρχείο ZigBEE.def.

Στον πίνακα 3.7 συνοψίζονται οι συναρτήσεις που χρησιμοποιούνται από το υποεπίπεδο υποστήριξης της εφαρμογής

**Πίνακας 3.7:** Λειτουργίες του στρώματος APS

Ρουτίνα	Περιγραφή
APSInit	Η λειτουργία προετοιμάζει το υποεπίπεδο APS μηδενίζοντας τις μεταβλητές δεδομένων.
APSDisable	Η λειτουργία μηδενίζει οποιεσδήποτε σημαίες (flags) τελικών σημείων και προετοιμάζει την ενότητα APS για την αλλαγή του επεξεργαστή σε κατάσταση αδράνειας
APSOOpenEP	Η λειτουργία επιτρέπει στην εφαρμογή να ανοίξει ένα τελικό σημείο.
APSSetEP	Η λειτουργία θέτει το δοσμένο τελικό σημείο σαν ένα ενεργό τελικό σημείο.
APSCloseEP	Η λειτουργία επιτρέπει στην εφαρμογή να κλείσει ένα ήδη ανοιχτό τελικό σημείο που είναι ενεργό.
APSPut	Η λειτουργία φορτώνει δεδομένα στην μνήμη εκπομπής
APSPutArray	Η λειτουργία φορτώνει έναν πίνακα δεδομένων στην μνήμη εκπομπής

APSSend	Η λειτουργία εκπέμπει τα δεδομένα της μνήμη εκπομπής
APSIConfirmed	Η λειτουργία ελέγχει αν το ενεργό πλαίσιο είναι αναγνωρισμένο από τον απομακρυσμένο κόμβο
APSIstimedOut	Η λειτουργία ελέγχει αν διαπιστώθηκε μία αναγνώριση εκτός χρόνου
APSRemoveFrame	Η λειτουργία διαγράφει την αναγνώριση από τη σειρά αναμονής
APSIstGetReady	Η λειτουργία ελέγχει αν το ενεργό τελικό σημείο έχει λάβει δεδομένα που εκκρεμούν
APSGet	Η λειτουργία ανακτά δεδομένων από τη μνήμη λήψης.
APSGetArray	Η λειτουργία ανακτά πίνακα δεδομένων από τη μνήμη λήψης.
APSDiscardRx	Η λειτουργία διαγράφει το συγκεκριμένο πλαίσιο που έχει ληφθεί από τη μνήμη λήψης.
APSGetClusterID	Η λειτουργία ανακτά μία ταυτότητα συστάδων (cluster ID)

Το τελικό σημείο είναι συνώνυμο με ένα τέλος ενός εικονικού καναλιού. Για να ολοκληρωθεί το εικονικό κανάλι, πρέπει να υπάρχουν δύο τελικά σημεία, η πηγή και ο προορισμός (δηλαδή σύνδεση ένα προς ένα). Σε προηγμένες εφαρμογές, μπορεί να υπάρχουν περισσότερα από ένα τελικά σημεία (δηλαδή, μία προς πολλές συνδέσεις), όπου σε αυτήν την περίπτωση, ένα πακέτο δεδομένων μπορεί να λαμβάνεται από πολλούς δέκτες. Στην ορολογία ZigBEE, μία σύνδεση καθορίζεται από ένα τελικό σημείο πηγή και από μία ταυτότητα συστάδας (cluster ID). Η ταυτότητα συστάδας είναι απλά ένας αριθμός που καθορίζει την συλλογή των μεταβλητών για δεδομένα που θα ανταλλαχθούν πάνω σε ένα εικονικό κανάλι. Μπορούμε επίσης να φανταστούμε μία ταυτότητα συστάδας σαν ένα πρόσθετο εικονικό κανάλι μέσα στο αυθεντικό εικονικό κανάλι. Σαν αποτέλεσμα, τώρα μπορούμε να έχουμε πολλαπλές ταυτότητες συστάδων για ένα δοσμένο σύνολο από τελικά σημεία πηγών και προορισμών, έτσι δημιουργώντας πολλαπλά εικονικά υπό-κανάλια μέσα σε ένα εικονικό κανάλι.

### **3.8.3 Το επίπεδο δικτύου**

Το επίπεδο δικτύου είναι υπεύθυνο για την εγκατάσταση και τη διατήρηση των συνδέσεων του δικτύου. Το επίπεδο δικτύου χειρίζεται τις εισερχόμενες αιτήσεις για δεδομένα, τη σύνδεση και την αποσύνδεση καθώς και τις αιτήσεις για σύνδεση από καινούργιους κόμβους (Orphan Notification Requests).

### **3.8.4 Το επίπεδο ZDO**

Το επίπεδο ZigBEE DEVICE OBJECT (ZDO) είναι υπεύθυνο για την λήψη και την επεξεργασία διάφορων αιτήσεων από μία απομακρυσμένη συσκευή. Το επίπεδο ZDO επιτρέπει τις υπηρεσίες διαχείρισης απομακρυσμένων συσκευών. Μία απομακρυσμένη συσκευή διαχείρισης θα κάνει αιτήσεις στο τελικό σημείο και το ZDO θα επεξεργάζεται αυτές τις αιτήσεις.

### **3.8.5 Το επίπεδο ZigBEE Device Profile Layer**

Το επίπεδο αυτό παρέχει τυποποιημένες υπηρεσίες προφίλ. Μία απομακρυσμένη συσκευή μπορεί να ζητήσει οποιαδήποτε από τις πρότυπες πληροφορίες περιγραφής μέσω της διεπαφής. Κατά την λήψη τέτοιων αιτήσεων, το επίπεδο καλεί ένα αντικείμενο προφίλ για να ανακτήσει την αντίστοιχη τιμή περιγραφής.

### **3.8.6 Το επίπεδο ελέγχου πρόσβασης στο μέσο μετάδοσης MAC**

Το επίπεδο αυτό περιέχει τις συναρτήσεις που χρειάζονται από τις προδιαγραφές του προτύπου IEEE 802.15.4. Είναι υπεύθυνο για την ένωση με το φυσικό επίπεδο. Για να υποστηρίξει διαφορετικούς τύπους πομποδεκτών, ο σωρός ZigBEE της Microchip χωρίζει την κάθε φυσική αλληλεπίδραση σε ξεχωριστό αρχείο την κάθε μία. Υπάρχει δηλαδή ένα ξεχωριστό αρχείο για κάθε υποστηριζόμενο πομποδέκτη. Ας σημειωθεί ότι αυτό οφείλεται στις διαφορετικές ιδιότητες μεταξύ των διάφορων πομποδεκτών, τα επίπεδα MAC και PHY δεν είναι τελείως ανεξάρτητα. Το αρχείο MAC ρυθμίζει ένα μέρος της λογικής του βασισμένο στον συγκεκριμένο πομποδέκτη. Όλα τα

αρχεία που αντιπροσωπεύουν τους πομποδέκτες χρησιμοποιούν το αρχείο zPHY.h σαν την κύρια διεπαφή με το επίπεδο ελέγχου πρόσβασης στο μέσο μετάδοσης MAC.

### 3.9 Αρχεία του ZigBEE Stack

#### 3.9.1 Αρχεία διαχείρισης συσκευών FFD και RFD

Στον πίνακα 3.6 συνοψίζονται τα αρχεία του σωρού της Microchip για εφαρμογές με συσκευές μειωμένης λειτουργίας (RFD) και πλήρους λειτουργίας (FFD). Τα αρχεία του πίνακα, περιέχουν τα απαραίτητα στοιχεία για την δημιουργία μίας πλήρους εφαρμογής και τα οποία ο χρήστης πρέπει να συμπεριλαμβάνει στην εφαρμογή του.

**Πίνακας 3.6:** Αρχεία διαχειρίσεις σωρού ZigBEE

Αρχεία FFD	Σκοπός
ZigBEE.def	Περιέχει ρουτίνες ρύθμισης της εφαρμογής.
Console.c	Περιέχει ρουτίνες του RS-232 τερματικού.
MSPI.c	Περιέχει ρουτίνες για την διεπαφή SPI για σύνδεση με πομποδέκτες ραδιοσυχνότητας.
Tick.c	Περιέχει ρουτίνες χρονισμού της εφαρμογής
zAPL.c	Περιέχει ρουτίνες για το επίπεδο εφαρμογής
zAPS.c	Περιέχει ρουτίνες για το υποεπίπεδο υποστήριξης της εφαρμογής
ZDO.c	Περιέχει ρουτίνες διαχείριση απομακρυσμένων συσκευών.
zMAC.c	Περιέχει ρουτίνες για το επίπεδο ελέγχου πρόσβασης στο μέσο μετάδοσης του IEEE 802.15.4
zNWK.c	Περιέχει ρουτίνες για το επίπεδο δικτύου
zPHY???.c	Περιέχει ρουτίνες ρουτίνες για τον προσδιορισμό και τις λειτουργίες των πομποδεκτών (Φυσικό Επίπεδο)
zProfile.c	Περιέχει ρουτίνες για τα προφίλ εφαρμογών.

18f????.lkr	Αρχείο linker που χρησιμοποιείται από το MPLAB κατά την διαδικασία μεταγλώττισης.
-------------	---

<b>Αρχεία RFD</b>	<b>Σκοπός</b>
ZigBEE.def	Περιέχει ρουτίνες ρύθμισης της εφαρμογής.
Console.c	Περιέχει ρουτίνες του RS-232 τερματικού.
Neighbor Table.c	Περιέχει ρουτίνες του πίνακα συνδέσεων και συναλλαγών
SRAlloc.c	Περιέχει ρουτίνες μνήμη για την αποθήκευση των πακέτων που εκκρεμούν
Tick.c	Περιέχει ρουτίνες χρονισμού της εφαρμογής
zAPL.c	Περιέχει ρουτίνες για το επίπεδο εφαρμογής
zAPS.c	Περιέχει ρουτίνες για το υποεπίπεδο υποστήριξης της εφαρμογής
ZDO.c	Περιέχει ρουτίνες για τη διαχείριση απομακρυσμένων συσκευών.
zMAC.c	Περιέχει ρουτίνες για το επίπεδο ελέγχου πρόσβασης στο μέσο μετάδοσης του IEEE 802.15.4
zNMV.c	Περιέχει ρουτίνες αποθήκευσης της μνήμης δεδομένων
zNWK.c	Περιέχει ρουτίνες για το επίπεδο δικτύου
zPHY???.c	Περιέχει ρουτίνες για τον προσδιορισμό και τις λειτουργίες των πομποδεκτών (Φυσικό Επίπεδο)
zProfile.c	Περιέχει ρουτίνες για τα προφίλ εφαρμογών.
18f????.lkr	Αρχείο linker που χρησιμοποιείται από το MPLAB κατά την διαδικασία μεταγλώττισης.

### 3.9.2 Ρουτίνες διαχείρισης σωρού ZigBEE

Ο σωρός της Microchip χρησιμοποιεί πολλές επιλογές κατά την μεταγλώττιση για να ενεργοποιήσει ή να απενεργοποιήσει πολλές από τις μεταβλητές του πυρήνα λογικής και της μνήμης. Η ακριβής σύνθεση των μεταβλητών αυτών εξαρτάται από τον τύπο της εφαρμογής ZigBEE. Για να απλοποιηθούν οι ρυθμίσεις κατά την μεταγλώττιση όλες οι επιλογές βρίσκονται στο αρχείο ZigBEE.def. Στον πίνακα 3.7 συνοψίζονται όλες οι επιλογές που μπορεί να κάνει ο χρήστης κατά την μεταγλώττιση.

**Πίνακας 3.7:** Λειτουργίες διαχείρισης σωρού ZigBEE

Σύνταξη	Λειτουργία
CLOCK_FREQ	Καθορίζει την συχνότητα ρολογιού του επεξεργαστή.
BAUD_RATE	Καθορίζει το ρυθμό μετάδοσης των δεδομένων του USART
ENABLE_DEBUG	Ενεργοποιεί την λειτουργία εξασφαλμάτωσης
USE_CC24240	Χρησιμοποιείται για να καθορίσει ότι γίνεται χρήση του πομποδέκτη CC2420 της Chipcon
USE_ZMD44101	Χρησιμοποιείται για να καθορίσει ότι γίνεται χρήση του πομποδέκτη ZMD 44101
I_AM_COORDINATOR	Καθορίζει ότι αυτός ο κόμβος είναι ένας Coordinator
I_AM_ROUTER	Καθορίζει ότι αυτός ο κόμβος είναι ένας δρομολογητής
I_AM_END_DEVICE	Καθορίζει ότι αυτός ο κόμβος είναι μια τελική συσκευή
MY_FREQ_BAND_IS_868_MHZ	Καθορίζει την ραδιοεκπομπή στα 868MHz
MY_FREQ_BAND_IS_900_MHZ	Καθορίζει την ραδιοεκπομπή στα 900MHz
MY_FREQ_BAND_IS_2400_MHZ	Καθορίζει την ραδιοεκπομπή στα 2.4 GHz
I_AM_ALT_PAN_COORD	Δηλώνει ότι ο συγκεκριμένος κόμβος είναι ένας PAN Coordinator
I_AM_MAINS_POWERED	Δηλώνει ότι ο συγκεκριμένος κόμβος τροφοδοτείται με AC τροφοδοσία.

I_AM_RECHARGEABLE_BATTERY_POWERED	Δηλώνει ότι ο συγκεκριμένος κόμβος τροφοδοτείται με μπαταρίες
I_AM_DISPOSABLE_BATTERY_POWERED	Δηλώνει ότι ο συγκεκριμένος κόμβος τροφοδοτείται από μπαταρίες μιας χρήσης
I_AM_SECURITY_CAPABLE	Δηλώνει ότι ο κόμβος χρησιμοποιεί κρυπτογράφηση/ αποκρυπτογράφηση για να λάβει και να στείλει πακέτα
MY_RX_IS_ALWAYS_ON_OR_SYNCED_WITH_BEACON	Δηλώνει ότι ο κόμβος διατηρεί τον δέκτη του συνεχώς ενεργό ή ανιχνεύει περιοδικά τα αναγνωριστικά σήματα
MY_RX_IS_PERIODICALLY_ON	Δηλώνει ότι ο κόμβος ενεργοποιεί τον δέκτη περιοδικά
MY_RX_IS_ON_WHEN_STIMULATED	Δηλώνει ότι ο κόμβος ενεργοποιεί τον δέκτη του μόνο όταν ζητηθεί
MAC_LONG_ADDR_BYTEn	Καθορίζει την 64-bit διεύθυνση MAC για τον κόμβο
MAX_EP_COUNT	Καθορίζει το μέγιστο αριθμό τελικών σημείων που υποστηρίζονται από αυτήν την συσκευή
MAC_USE_RF_TEST_CODE	Ενεργοποιεί τις λειτουργίες για τεστ του πομποδέκτη
MAC_USE_SHORT_ADDR	Χρησιμοποιείται από τελική συσκευή για αίτηση νέας διεύθυνσης
MAC_CHANNEL_ENERGY_THRESHOLD	Καθορίζει το κατώτατο όριο στο οποίο ένα κανάλι θεωρείται ότι είναι απασχολημένο
MAC_MAX_FRAME_RETRIES	Θέτει το μέγιστο αριθμό επαναλήψεων εκπομπής του πλαισίου αν δεν ληφθεί αναγνώριση
MAC_ACK_WAIT_DURATION	Θέτει το μέγιστο αριθμό χρόνου που θα περιμένει ο κόμβος για ανταπόκριση από έναν άλλον κόμβο.
MAC_RESPONSE_WAIT_TIME	Θέτει την περίοδο του ED. Κατά την περίοδο αυτή ο δέκτης μένει ενεργός για να μετρήσει την ενέργεια RF.
MAC_ED_SCAN_PERIOD	Θέτει την περίοδο ενεργής ανίχνευσης. Κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου, ένας κόμβος ζητά αναγνωριστικό σήμα από έναν γειτονικό συντονιστή και περιμένει την ανταπόκριση του μέσα σε αυτήν την περίοδο
MAC_MAX_DATA_REQ_PERIOD	Θέτει την περίοδο κατά την οποία οι τελικές συσκευές ζητούν τα πακέτα δεδομένων τους από τον συντονιστή. Χρησιμοποιείται μόνο από τον συντονιστή



MAX_HEAP_SIZE	Καθορίζει το μέγιστο μέγεθος του έμμεσου απομονωτή εκπομπής
MAX_NEIGHBORS	Καθορίζει το μέγιστο αριθμό των κόμβων που υποστηρίζονται από τον συντονιστή
MAX_BINDINGS	Καθορίζει το μέγιστο αριθμό των αιτήσεων σύνδεσης που υποστηρίζονται από τον συντονιστή

### 3.9.3 Ρουτίνες Callback (Callback Functions)

Ο σωρός καλεί τις συναρτήσεις Callback για επικοινωνία με την εφαρμογή. Στον πίνακα 3.8 συνοψίζονται οι συναρτήσεις αυτές.

**Πίνακας 3.8:** Λειτουργίες Callback

Συνάρτηση	Λειτουργία
AppOkayToUseChannel	Καλεί την εφαρμογή αν θα χρησιμοποιήσει το υπάρχον κανάλι
AppMACFrameReceived	Ειδοποιεί την εφαρμογή ότι ένα έγκυρο πακέτο δεδομένων έχει ληφθεί
AppMACFrameTransmitted	Ειδοποιεί την εφαρμογή ότι ένα πακέτο δεδομένων μόλις έχει εκπεμφθεί.
AppMACFrameTimeOutOccurred	Ειδοποιεί την εφαρμογή ότι ένας απομακρυσμένος κόμβος δεν έστειλε μήνυμα αναγνώρισης μέσα στο όριο που έχει οριστεί από την λειτουργία MAC_ACK_WAIT_DURATION
AppOkayToAcceptThisNode	Καλεί την εφαρμογή για αποδοχή σύνδεσης με έναν κόμβο στο δίκτυό της.
AppNewNodeJoined	Ειδοποιεί την εφαρμογή ότι ο νέος κόμβος μόλις συνδέθηκε με το δίκτυο
AppNodeLeft	Ειδοποιεί την εφαρμογή ότι ένας γνωστός

	κόμβος μόλις άφησε το δίκτυο
AppOkayToAssociate	Όταν μία τελική συσκευή προσπαθεί να συνδεθεί με ένα διαθέσιμο δίκτυο, ο σωρός καλεί την ρουτίνα όταν ανιχνεύσει έναν συντονιστή μέσα στην ζώνη εκπομπής του.

# 4

## Υλικά και μέθοδοι

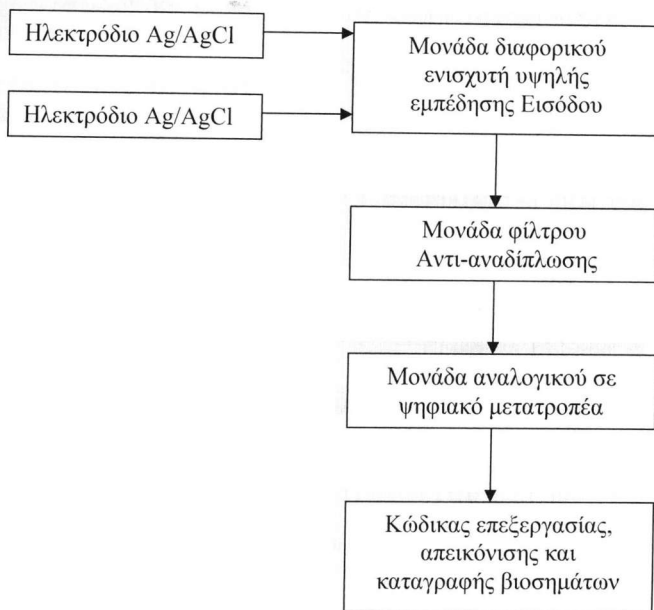
---

### 4.1 Υλικά

Το ολοκληρωμένο σύστηματος απόκτησης, καταγραφής και επεξεργασίας βιοσημάτων των φυτικών οργανισμών που αναπτύχθηκε αποτελούνταν από τις παρακάτω μονάδες:

1. Ζεύγος Αισθητήρα Ag/AgCl
2. Μονάδα ενισχυτή υψηλής εμπέδησης αισθητήρα Ag/AgCl
3. Μονάδα φίλτρου αντιαναδίπλωσης (anti-alias filter)
4. Μονάδα απόκτησης δεδομένων (DAQ)
5. Κώδικας επεξεργασίας απεικόνισης και καταγραφής βιοσημάτων

Στο σχήμα 4.1 απεικονίζεται το διαγραμμικό μπλοκ της ολοκληρωμένης πειραματικής διάταξης.



**Σχήμα 4.1:** Διαγραμμικό μπλοκ του συστήματος απόκτησης, συλλογής και επεξεργασίας βιοσημάτων.

Για τη μελέτη των ηλεκτροφυσιολογικών φαινομένων σε εγκατεστημένα θερμοκήπια ή σε ανοιχτή καλλιέργεια, σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε: **Ασύρματο Ενσωματωμένο Σύστημα Μέτρησης Βιοσημάτων** (Kalonrektis K, et all 2010). Η χρήση του ενσωματωμένου συστήματος μέτρησης βιοσημάτων εφαρμόστηκε και για φαινόμενα EMC και ECG (Kalonrektis K, et all, 2008, 2009). Η σχεδίαση του ασύρματου ενσωματωμένου συστήματος μέτρησης βιοσημάτων κρίνεται αναγκαία γιατί η μετάδοση ενός σήματος μέσα σε ένα εγκατεστημένο θερμοκήπιο ή σε μια ανοιχτή καλλιέργεια μπορεί να επηρεαστεί από:

- Ηλεκτρομαγνητικές παρεμβολές (EMI)
- Παρεμβολές γραμμών ισχύος
- Ηλεκτροστατική εκφόρτιση (ESD)

Ως EMI (Electromagnetic interference (EMI)) ορίζεται κάθε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, ή εκπεμπόμενο φαινόμενο που μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργία

στα στοιχεία μιας μετρητικής μονάδας και στην απόκλιση των τεχνικών χαρακτηριστικών τους οδηγώντας σε μετρητικά σφάλματα. Λόγω των χαμηλής τάξης σημάτων σε ένα σύστημα μέτρησης βιοηλεκτρικών σημάτων οι επιπτώσεις ενός φαινομένου EMI παρουσιάζονται σε μεγαλύτερη κλίμακα. Ωστόσο, αν και οι περισσότερες ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων επιτυγχάνονται υπό ελεγχόμενες συνθήκες, η μεταδιδόμενη ηλεκτρομαγνητική ενέργεια πολλές φορές οδηγεί σε φαινόμενα παραγωγής παρεμβολών που είναι σε θέση να επηρεάσουν το μετρητικό μας σύστημα.

Επίσης φαινόμενα εκπομπής ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας από ρευματοφόρους αγωγούς υψηλής τάσης, όπως στις περιπτώσεις ρευματοφόρων στηλών κοντά σε θερμοκήπια συμβάλλουν στην επίδραση της απόκρισης των ευαίσθητων μονάδων μέτρησης βιοηλεκτρικών σημάτων.

Ως Ηλεκτροστατική εκφόρτιση ορίζεται η εκφόρτιση ενός φορτισμένου σώματος σε ένα αφόρτιστο. Κατά την διάρκεια του μεταβατικού φαινομένου της ηλεκτροστατικής εκφόρτισης παράγεται παλμική ενέργεια με χρόνο ανόδου του ρεύματος μικρότερο του 1 ns και με διάρκεια μικρότερη των 100 ns (Jesus L et all. 2000). Μέσω αυτής της πολύ μικρή χρονικά έντασης του ηλεκτρικού πεδίου κατά την εκφόρτιση μπορεί να προκληθεί μεγάλη ένταση καταπόνησης στην αντοχή των ηλεκτρονικών στοιχείων του μετρητικού συστήματος οδηγώντας σε βλάβη ή σε λανθασμένες μετρήσεις (Theodore Dangelmayer 1990). Τρία μοντέλα δημιουργίας του φαινομένου της ηλεκτροστατική εκφόρτιση έχουν επικρατήσει:

1. Το μοντέλο του ανθρώπινου σώματος (Human Body Model – HBM).
2. Το μοντέλο της μηχανής (Machine Model – MM).
3. Το μοντέλο της φορτισμένης συσκευής (Charged Device Model – CDM).

## 4.2 Αισθητήρας Ag/AgCl

Ο αισθητήρας-ηλεκτρόδιο Ag/AgCl λειτουργεί ως ένα οξειδοαναγωγικό μέσο λήψης βιοσήματος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση της ενεργότητας των ιόντων  $\text{Cl}^-$  και  $\text{Ag}^+$ . Οι Ksenzhek και Volkov (1998) περιέγραψαν την επιδερμική

χρήση των Ag/AgCl ηλεκτροδίων σε μέτρησες ηλεκτρικών δυναμικών δράσης και μεταβλητότητας. Ο αισθητήρας επαφής Ag/AgCl που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί το εμπορικό ηλεκτρόδιο της εταιρείας SKINTACT μοντέλο FF-55 όποιος φέρει άκρο νικελίου για την σύνδεση του με αγωγό. Η τοποθέτηση του αισθητήρα γίνονταν με συνδέσμους απομόνωσης ηλεκτροστατικής φόρτισης με τους οποίους ερχόταν σε επαφή το ηλεκτρόδιο με το βιολογικό υλικό (φύλλο-βλαστός). Η επιφάνεια του αισθητήρα καλύπτονταν από επίστρωμα τζελ για βελτίωση αγωγήμια επαφή του αισθητήρα με το φύλλο ή το βλαστό του φυτού. Για την σύνδεση του αισθητήρα στο σύστημα μέτρηση χρησιμοποιήθηκε θωρακισμένο καλώδιο διαμέτρου  $\varphi=0,25mm$  που στο άκρο του έφερε σύνδεσμο νικελίου για την συγκράτηση του ηλεκτροδίου. Ανά χρονικά διαστήματα 2 ωρών γινόταν αλλαγή του αισθητήρα-ηλεκτροδίου λόγω φαινομένων οξειδωσής προκαλώντας αλλαγής της ιοντικής κατάσταση της περιοχής με την οποία ήταν σε επαφή ο αισθητήρας (Ksenzhek and Volkov(1998); Volkov (2001); Purves (1981); Geddes(1972)).

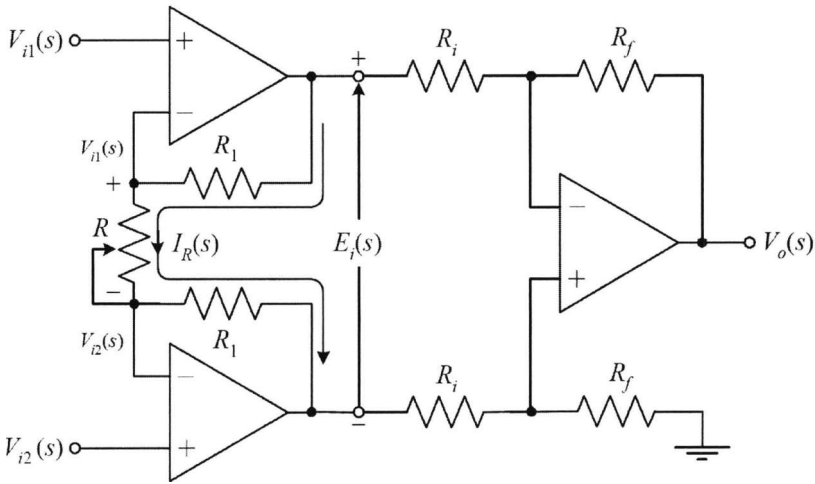
#### 4.3 Μονάδα ενισχυτή υψηλής εμπέδησης αισθητήρα Ag/AgCl

Η μονάδα ενισχυτή σήματος υψηλής εμπέδησης εισόδου είχε ως σκοπό την ενίσχυση των ασθενών βιοσημάτων από τον αισθητήρια Ag/AgCl. Για το λόγο αυτό απαιτείται σχεδίαση κυκλώματος που θα φέρει μεγάλη ενίσχυση για σήματα πολύ μικρού πλάτους (της τάξης των  $\mu V$ ) από τους αισθητήρες Ag/AgCl.

Η επιλογή των στοιχείων των κυκλωμάτων για τη σχεδίαση της μονάδας έγινε με κριτήριο την υψηλή απόδοση λόγου σήματος προς θόρυβο. Τα χαρακτηριστικά που φέρει η σχεδίαση:

- Η ενίσχυση του σήματος με υψηλό κέρδος.
- Η υψηλή αντίσταση εισόδου (μεγαλύτερη από  $10^{10}$  Ohm).
- Ο υψηλός λόγος απόρριψης κοινού ρυθμού (Common Mode Rejection Ratio - CMRR). Μεγάλος CMRR υποδηλώνει σημαντική απόρριψη του “κοινού” θορύβου και αύξηση της δυνατότητας μέτρησης εξαιρετικά ασθενών σημάτων.

- Η ρύθμιση του κέρδους στον ενισχυτή υψηλής εμπέδησης εισόδου με χρήση μόνο μίας  $R$ , (σχ4.2)



**Σχήμα 4.2:** Κυκλωματική σχεδίαση, ενισχυτή σήματος υψηλής εμπέδησης εισόδου αισθητήρα Ag/AgCl.

Η τάση εξόδου του ενισχυτή, υπολογίζεται από την σχέση:

$$V_o(s) = -\frac{R_f}{R_i} E_i(s) \quad (4.1)$$

Η διαφορική τιμή της τάσης  $E_i$ , υπολογίζεται μέσω του ρεύματος  $I_R$  διαρρέει την αντίσταση  $R$ . Για το λόγο ότι,

$$V_{i1} = V_1 \quad \text{και} \quad V_{i2} = V_2,$$

το ρεύμα που διαρρέει την αντίσταση  $R$  δίνεται από την σχέση:

$$I_R(s) = \frac{V_{i1}(s) - V_{i2}(s)}{R}$$

και επειδή το ρεύμα  $I_R$  τελικά διαρρέει μέσα από τις αντιστάσεις  $R_1$  τότε η τάση  $E_i$  υπολογίζεται από την σχέση:

$$E_i(s) = I_R(s)(R + 2R_1) = [V_{i1}(s) - V_{i2}(s)] \left( 1 + \frac{2R_1}{R} \right)$$

όπου σε αντικατάσταση του όρου στην σχέση 4.1 η τάση εξόδου του ενισχυτή, υπολογίζεται τελικά από την σχέση:

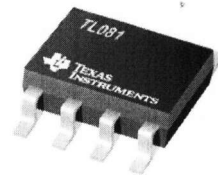
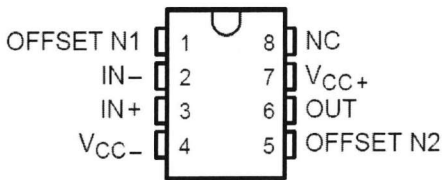
$$V_o(s) = - \left( 1 + \frac{2R_1}{R} \right) \frac{R_f}{R_1} [V_{i1}(s) - V_{i2}(s)] = \left( 1 + \frac{2R_1}{R} \right) \left\{ \frac{R_f}{R_1} [V_{i2}(s) - V_{i1}(s)] \right\}$$

όπου συνεπώς το κέρδος του βελτιωμένου διαφορικού ενισχυτή θα είναι:

$$\frac{V_{out}}{V_{in}} = - \left( 1 + \frac{2 \cdot R_1}{R} \right) \cdot \left( \frac{R_f}{R_1} \right)$$

Για αύξηση του λόγου απόρριψη του κοινού σήματος CMRR μεταβάλλουμε την τιμή της αντίστασης  $R_f$  ως προς την γη. Όλες οι αντιστάσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη του ενισχυτή είχαν ακρίβεια 0,1%. Το κέρδος της ενίσχυσης του σχεδιασμένου κυκλώματος είναι 40db. Για την υλοποίηση του κυκλώματος ενίσχυσης του βιοσήματος χρησιμοποιήθηκε το ολοκληρωμένο TL081 της Texas Instruments (σχ4.3). Το ολοκληρωμένο επιλέχτηκε βάση των παρακάτω χαρακτηριστικών του:

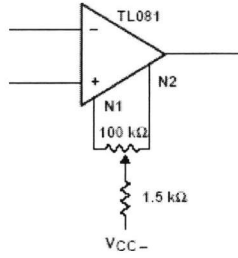
- Χαμηλής κατανάλωση ισχύος.
- Χαμηλό ρέμα εισόδου.
- Ηλεκτροστατική προστασία.
- Αρμονική παραμόρφωση < 0.003%.
- Υψηλή αντίσταση εισόδου JFET.
- Υψηλό βαθμό απόκρισης (13 V/μs).



**Σχήμα 4.3 :** Ολοκληρωμένο TL081 του ενισχυτή για αισθητήρα Ag/AgCl.

Η ρύθμιση της τάση εξόδου offset γίνεται με την τοποθέτηση ποτενσιόμετρου  $R=100K\Omega$  στους ακροδέκτες 1 και 5 του ολοκληρωμένου όπως φαίνεται στο σχήμα 4.4.

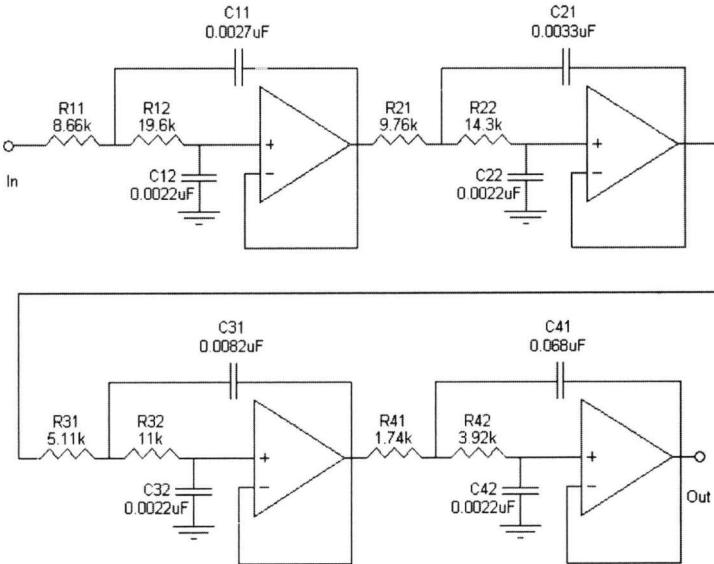




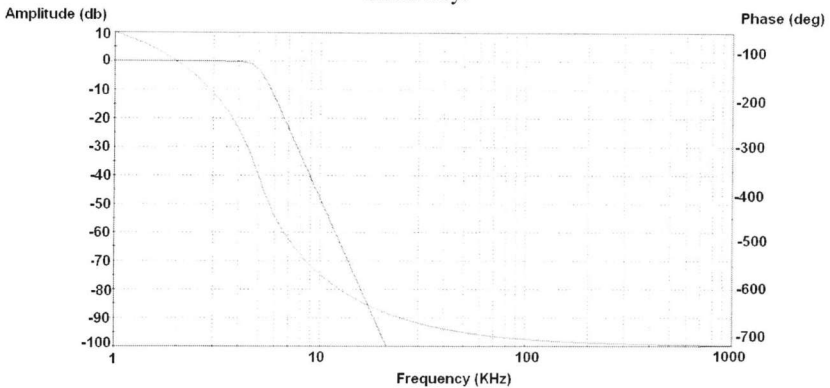
Σχήμα 4.4 : Ρύθμιση τάσης εξόδου offset.

#### 4.4 Μονάδα φίλτρου αντι-αναδίπλωσης (anti-alias filter)

Για την αποφυγή φαινομένου αναδίπλωσης (alias) κατά την μετατροπή του σήματος από αναλογικό σε ψηφιακό αναπτύχθηκε το παρακάτω φίλτρο Butterworth 8<sup>ης</sup> τάξης με τοπολογία Sallen Key όπως φαίνεται στο σχήμα 4.5 (Kalonrektis 2010). Η συχνότητα απόκριση του φίλτρου αναδίπλωσης είναι 5 kHz  $-3\text{db}$  (λόγω της συχνότητας δειγματοληψίας των μετρήσεων (10KHz) με λόγο απόρριψης θορύβου και 72db. Στο σχήμα 4.6 απεικονίζεται η απόκριση συχνότητας και φάσης του σχεδιασμένου φίλτρου.



**Σχήμα 4.5:** Κυκλωματική σχεδίαση διάγραμμα φίλτρου Butterworth 8<sup>ης</sup> τάξης με τοπολογία Sallen Key.



**Σχήμα 4.6:** Απόκριση συχνότητας / φάσης

#### 4.5 Μονάδα απόκτησης δεδομένων (DAQ)

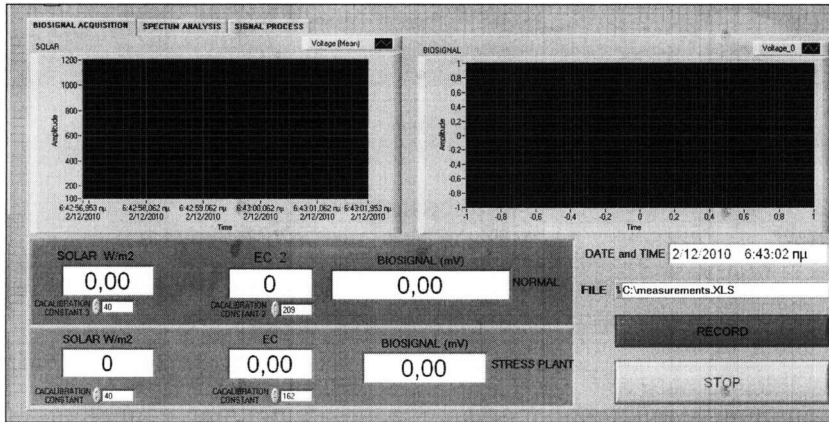
Για την απόκτηση του βιοσήματος στον ηλεκτρονικό υπολογιστή χρησιμοποιήθηκε η κάρτα PCI-6221 της National instruments. Η κάρτα διαθέτει 16 αναλογικά κανάλια διαφορικής σύνδεσης με ανάλυση 16-Bit και μέγιστο ρυθμό δειγματοληψίας 250 kS/s.

#### 4.6 Κώδικας επεξεργασίας, απεικόνισης και καταγραφής βιοσημάτων

Ο κώδικας επεξεργασίας, απεικόνισης και καταγραφής βιοσημάτων δημιουργήθηκε με την αντικειμενοστραφή γλώσσα LabVIEW έκδοση 8.6 ώστε να είναι δυνατή:

1. Η επεξεργασία του σήματος σε πραγματικό χρόνο παρέχοντας στοιχειά μετρήσεων που αφορούν το πλάτος του βιοσήματος, τη μέση τιμή του σήματος, και τη μέτρηση παραμέτρων κλίματος (ένταση ηλιακής ακτινοβολίας, PAR, EC).
2. Η άμεση στατιστική επεξεργασία των καταγεγραμμένων δεδομένων .
3. Η φασματική ανάλυση ισχύος (power spectral analysis) του σήματος (ανάλυση του πεδίου συχνότητων).
4. Η καταγραφή όλων των δεδομένων.

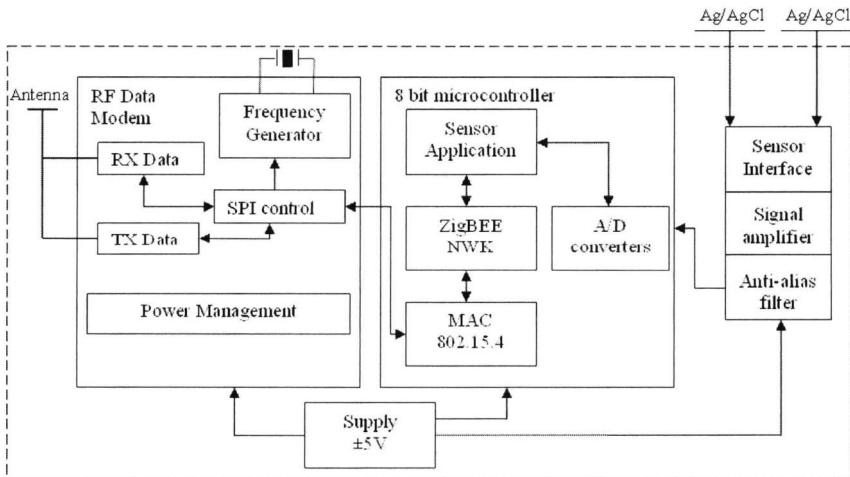
Στην εικόνα 4.7 παρουσιάζεται το περιβάλλον του κώδικα επεξεργασίας, απεικόνισης και καταγραφής βιοσημάτων.



Σχήμα 4.7: Front panel κώδικα επεξεργασίας, απεικόνισης και καταγραφής βιοσημάτων

### 4.7 Ασύρματο ενσωματωμένο σύστημα μέτρησης βιοηλεκτρικών

Το διαγραμμικό μπλοκ του ασύρματου ενσωματωμένου συστήματος μέτρησης βιοσημάτων που αναπτύχθηκε παρουσιάζεται στο σχήμα 4.8. Στο σχήμα 4.9 παρουσιάζεται το διαγραμμικό μπλοκ του μικροελεκτή PIC18LF4620 της εταιρείας MicroChip που φέρει το σύστημα.



Σχήμα 4.8: Διαγραμμικό μπλοκ του ασύρματου ενσωματωμένου συστήματος μέτρησης βιοσημάτων.



Το ασύρματο ενσωματωμένο σύστημα μέτρησης βιοσημάτων περιλαμβάνει τις παρακάτω τέσσερις μονάδες:

- Μονάδα ενισχυτής σήματος υψηλής εμπέδησης εισόδου.
- Μονάδα φίλτρου αντι-αναδίπλωσης σήματος.
- Μικροελεγκτή.
- RF modem ZigBEE/IEEE 802.15.4.

### 1.Μονάδα ενισχυτής σήματος υψηλής εμπέδησης εισόδου

Η σχεδίαση της μονάδας του ενισχυτή σήματος υψηλής εμπέδησης είναι αντίστοιχη με τη μονάδα του εργαστηριακού συστήματος απόκτησης δεδομένων.

### 2.Μονάδα φίλτρου αντι-αναδίπλωσης σήματος:

Η μονάδα ενισχυτής σήματος υψηλής εμπέδησης είναι αντίστοιχη με την μονάδα του εργαστηριακού συστήματος απόκτησης δεδομένων.

### 3.Μικροελεγκτής

Ο μικροελεγκτής που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του ασύρματου ενσωματωμένου συστήματος βιοσημάτων ήταν ο PIC18LF4620 της εταιρείας Microchip. Ο μικροελεγκτής PIC18LF4620 επιλέχθηκε για τους παρακάτω λόγους:

- Έχει μικρή κατανάλωση ισχύος (nanowatt τεχνολογία),
- Παρέχει υποστήριξη σύγχρονων και ασύγχρονων πωλών επικοινωνίας με τους αισθητήρες και τους ενσωματωμένους ραδιοπομποδέκτες ZigBEE.

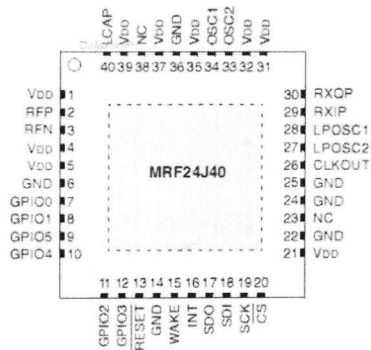
Το σχέδιο του ενσωματωμένου συστήματος επιτρέπει τη σύνδεση ενός μέγιστου αριθμού (N) ηλεκτροδίων Ag/AgCl σε μία μονάδα RFD. Ο αριθμός αυτός εξαρτάται από την μέγιστη χωρητικότητα της μνήμης δεδομένων ( $M_c$ ) του μικροελεγκτή, τον χρόνο μέτρησης ( $T_m$ ) και από τον ρυθμό δειγματοληψείας ( $T_s$ ) και υπολογίζεται από την σχέση:

$$N = \frac{M_c}{a} * \frac{T_m}{T_s} \quad , \quad a: \text{η μέγιστη χωρητικότητα μνήμης του συστήματος (256 Kb).}$$

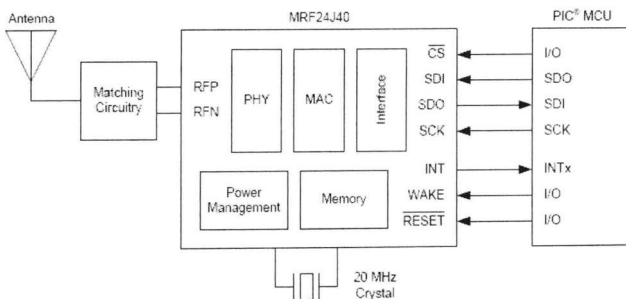
Η διασύνδεση του συστήματος πραγματοποιείται μέσω RS232 ή USB θύρας ανάλογα του τύπου μικροελεγκτή. Τα δεδομένα αποστέλλονται σε μορφή ASCII.

#### 4. Ραδιοπομποδέκτης ZigBEE

Το ολοκληρωμένο κύκλωμα ραδιοπομποδέκτη MRF24J της Microchip (σχ4.9) ή το CC2420 της ChipCon είναι βασισμένο στην τεχνολογία SmartRF®03 μέσα σε ένα CMOS 0.18μm. Σχεδιάστηκε για εφαρμογές ZigBEE και προσφέρει χαμηλό κόστος, αξιοπιστία, χαμηλό ρυθμό δεδομένων, λύσεις σχεδιασμού δικτύων και ασφάλεια. Επίσης υποστηρίζει υπηρεσίες υλικού για πρόσβαση στο μέσον MAC καθώς και λειτουργίες όπως χειρισμό των πακέτων δεδομένων, απομόνωση των δεδομένων, αναγνώριση διευθύνσεων, ένδειξη ποιότητας σύνδεσης, έλεγχο ελεύθερου καναλιού. Όλες αυτές οι λειτουργίες μειώνουν το φορτίο του κύριου επεξεργαστή και δίνουν την δυνατότητα στο ολοκληρωμένο κύκλωμα MRF24J να συνδέεται με μικροελεγκτές χαμηλού κόστους. Η επικοινωνία γίνεται μέσω διασύνδεσης SPI (σχ4.9). Λόγω της υψηλής κλίμακας ολοκλήρωσης δεν απαιτούνται πολλά εξωτερικά στοιχεία.



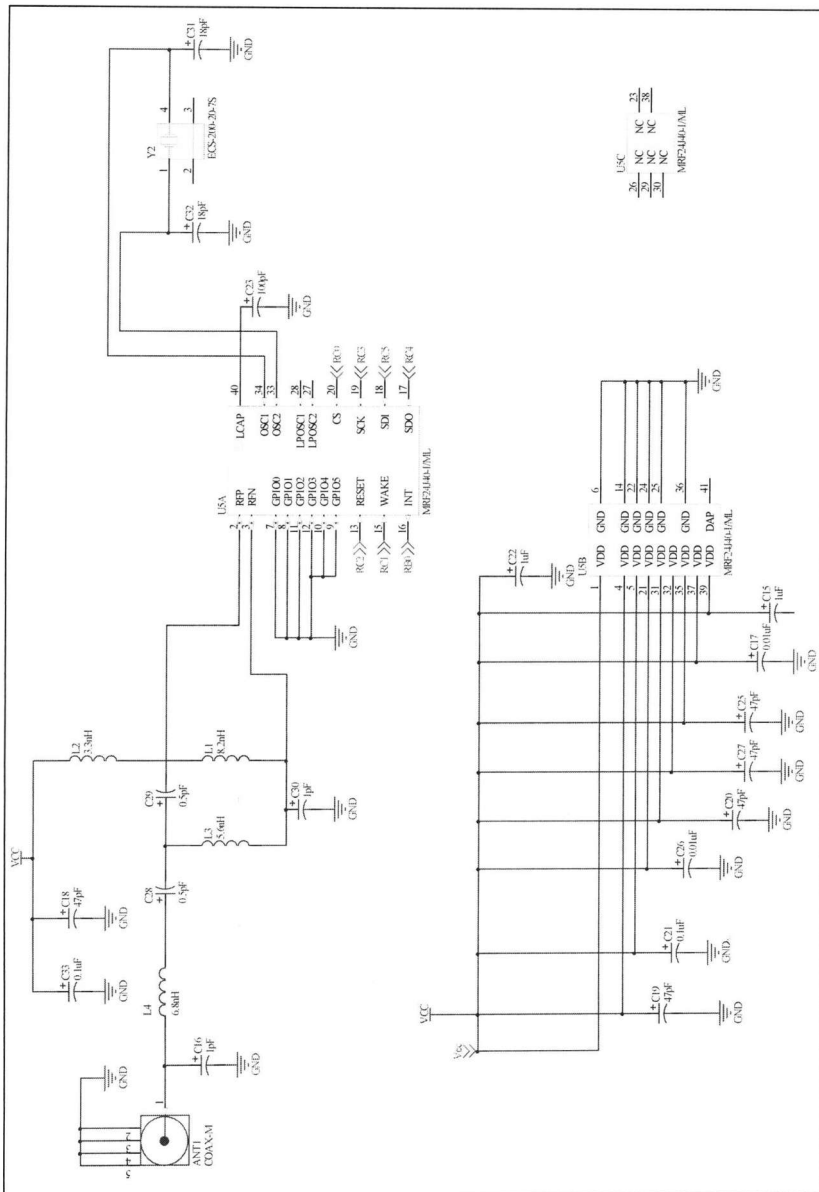
Σχήμα4.9 Το ολοκληρωμένο κύκλωμα MRF24J της Microchip



Σχήμα4.10: Μέθοδος διασύνδεσης μικροελεγκτή και RF modem ZigBEE.



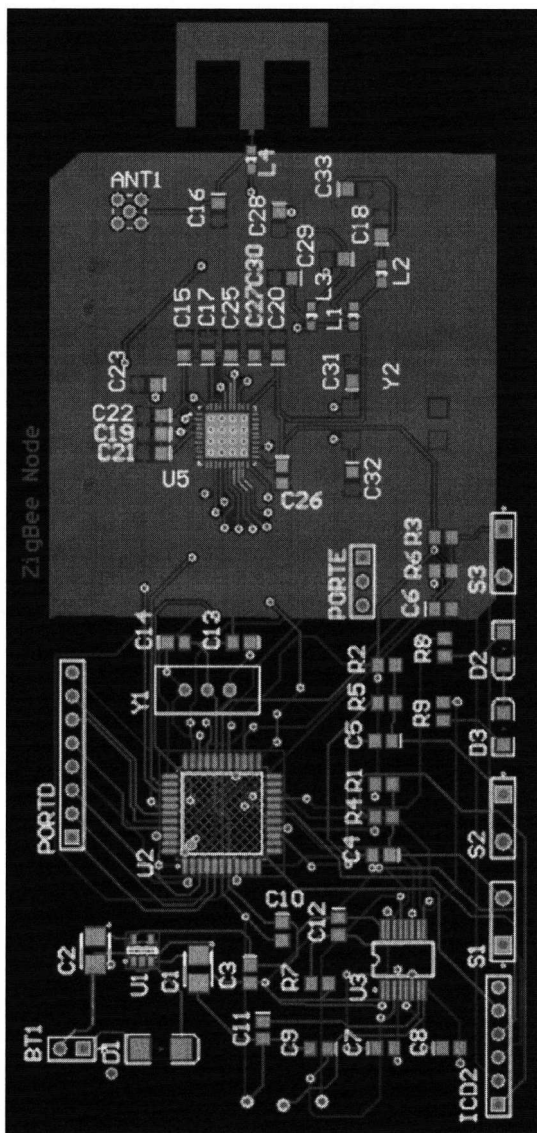
Στο σχήμα 4.12 παρουσιάζεται η κυκλωματική σχεδίαση που αναπτύχθηκε για το τμήμα του ραδιοπομποδέκτη του ασύρματου ενσωματωμένου συστήματος.



**Σχήμα 4.12:** Κυκλωματική σχεδίαση του τμήματος ραδιοπομποδέκτη του ασύρματου ενσωματωμένου συστήματος μέτρησης βιοσημάτων.

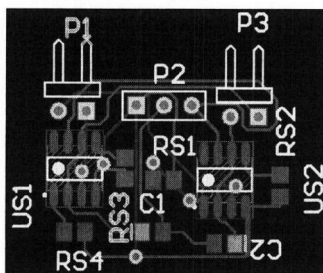


Στο σχήμα 4.13 παρουσιάζεται η πλακέτα που αναπτύχθηκε για το ολοκληρωμένο ασύρματο ενσωματωμένο σύστημα μέτρησης βιοσημάτων.



Σχήμα 4.13: Πλακέτα PCB ασύρματος ενσωματωμένου συστήματος βιοσημάτων.

Στο σχήμα 4.14 παρουσιάζεται η πλακέτα στην οποία συνδέονται τα ηλεκτρόδια Ag/AgCl ηλεκτροδίων στο ενσωματωμένο συστήματος και η οποία τοποθετείται ως δεύτερο επίπεδο στην κύρια πλακέτα του συστήματος. Στον ακροδέκτη P1 και P2 συνδέονται οι δύο αισθητήρες Ag/AgCl (ηλεκτρόδιο μέτρησης και ηλεκτρόδιο αναφοράς).



Σχήμα 4.14 Πλακέτα σύνδεσης αισθητήρων Ag/AgCl

## 4.8 Πειραματικές διατάξεις

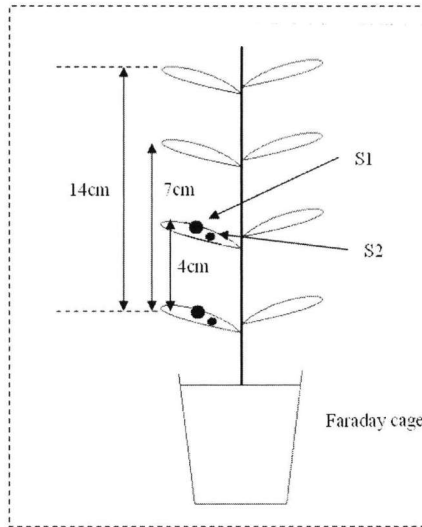
### 4.8.1 Μεθοδολογία αξιολόγησης του αισθητήρα επαφής Ag/AgCl

Για την αξιολόγηση του μεγέθους του αισθητήρα και της θέσης τοποθέτησης του στο φυτό έγινε καταγραφή και ανάλυση του βιοσήματος με αισθητήρες Ag/AgCl:

1. με διαφορετικό μέγεθος διαμέτρων αισθητήρων,
2. τοποθετημένους σε διαφορετική απόσταση πάνω στο φυτό,
3. τοποθετημένους σε φύλλα με διαφορετικό μέγεθος.

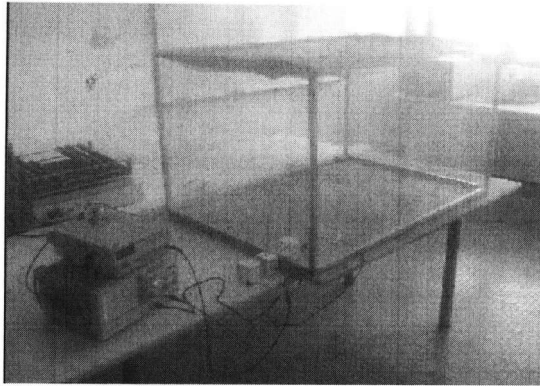
#### 4.8.1.1 Πειραματική διάταξη για τη μελέτη επίδρασης του μεγέθους και της θέσης του αισθητήρα επάνω στο φυτό

Για την μελέτη της επίδρασης της απόκρισης του αισθητήρα συναρτήσει του μεγέθους του και της θέσης του επάνω στο φυτό έγιναν ταυτόχρονες λήψεις βιοσήματος από αισθητήρες Ag/AgCl με διάμετρο 10 mm<sup>2</sup> (Big Sensor-BS) και 5mm<sup>2</sup> (small sensor- SS) οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε αποστάσεις 4, 7 και 14cm, σε φυτό χρυσάνθεμου και σε φύλλα που είχαν την ίδια φυλλική επιφάνεια.



**Σχήμα 4.16:** Τοποθέτηση αισθητήρων BS και SS σε διαφορετικές αποστάσεις και μεγέθη φύλλων.

Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων φυτό ήταν τοποθετημένο μέσα σε κλωβό Faraday με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. Για την αποφυγή αλλοίωσης του αποκτημένου βιοσήματος λόγω ηλεκτρομαγνητικών παρεμβολών από το περιβάλλον όλες οι πειραματικές μετρήσεις πραγματοποιούνταν σε κλωβό Faraday. Ο κλωβός Faraday που κατασκευάστηκε είχε διαστάσεις 66 cm ύψος, 120 cm μήκος και 86 cm πλάτος και χωρίστηκε σε δύο θαλάμους με διαστάσεις 66 cm ύψος, 60 cm μήκος και 86 cm πλάτος (σχ4.15). Ο κλωβός Faraday ελέγχθηκε για να διαπιστωθεί η αποκοπή των συχνοτήτων από 0Hz μέχρι 5MHz. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ελεγχόμενη RF γεννήτρια η οποία τοποθετήθηκε σε απόσταση 11 cm έξω από το κλωβό Faraday ενώ η λήψη του σήματος γίνονταν από κεραία λήψης που τοποθετήθηκε μέσα στον κλωβό Faraday. Για τον έλεγχο του καταγράφονταν σήματα εκπομπής από την ελεγχόμενη RF γεννήτρια τοποθετημένη έξω από τον κλωβό σε απόσταση 11cm. Οι μετρήσεις κατά τη σάρωση στο πεδίο συχνοτήτων από 100Hz έως 5Mhz έδειξαν μηδενική ηλεκτρομαγνητική καταγραφή ( $f(\text{db}) > -180\text{db}$ ). Ο κλωβός τοποθετήθηκε σε θάλαμο με σταθερή ακτινοβολία, υγρασία και θερμοκρασία (εξαρτημένες τιμές συστήματος).



Σχήμα4.15: Κλωβός Faraday.

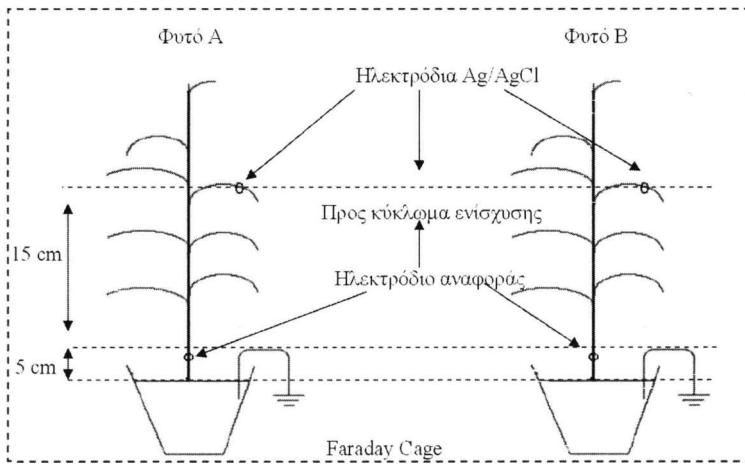
#### 4.8.1.2 Πειραματική διάταξη για τη μελέτη επίδρασης του μεγέθους του φύλλου στο πλάτος του σήματος

Για την μελέτη της επίδρασης της απόκρισης του αισθητήρα συναρτήσει του μεγέθους του φύλλου έγινε καταγραφή και επεξεργασία βιοσήματος με τη χρήση μεζεύγους αισθητήρων επαφής Ag/AgCl διαμέτρου 10mm (Big Sensor-BS) και διαμέτρου 5mm (small sensor- SS) σε φύλλα διαφορετικής φυλλικής επιφάνειας. Η απόσταση των αισθητήρων εργασίας και αναφοράς ήταν 14cm. Κατά την διάρκεια των μετρήσεων φυτό ήταν τοποθετημένο μέσα σε κλωβό Faraday με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. Για την επαλήθευση τις απόκρισης του μεγέθους του αισθητήρα και της τοποθέτησης του στο φυτό έγινε καταγραφή και επεξεργασία βιοσήματος με τη χρήση ίδιων αισθητήρων επαφής οι οποίοι είχαν τοποθετηθεί στην επιφάνεια δύο φύλλων γαριφαλιάς.

#### 4.8.2 Πειραματική διάταξη για τη μελέτη της επίδρασης της EC στο πλάτος του σήματος

Καταγράφηκε με τη χρήση αισθητήρων Ag/AgCl, σε πραγματικό χρόνο το ηλεκτρικό φορτίο στα φύλλα δύο μονοστέλεχων φυτών χρυσάνθεμου που αναπτύχθηκαν σε φυτοδοχείο με υπόστρωμα μίγμα τύρφη-περλίτη σε αναλογία 2:1. Το ένα από τα δύο φυτά ποτίστηκε με νερό με ηλεκτρική αγωγιμότητα  $0,7 \text{ dS cm}^{-1}$  (το οποίο καλείται κανονικό φυτό- Normal Plant /NP) ενώ το δεύτερο φυτό ποτίστηκε μία φορά με διάλυμα με υψηλή τιμή ηλεκτρικής αγωγιμότητας ( $18 \text{ dS m}^{-1}$ )

(το οποίο καλείται στρεσαρισμένο φυτό- Stressed Plant /SP) και στη συνέχεια με καθαρό νερό. Στο παρακάτω σχήμα 4.17 απεικονίζεται σχηματικά η πειραματική διάταξη για συσχέτιση πλάτους του βιοσήματος και διαταραχής ηλεκτρικής αγωγιμότητας (EC) σε χρυσάνθεμο. Κατά τη διάρκεια του πειράματος μετρήθηκε επίσης η τιμή της EC των διαλυμάτων που απέρρεαν από τα φυτοδοχεία μετά από κάθε άρδευση και οι παράμετροι του κλίματος (θερμοκρασία, υγρασία και ένταση φωτεινής ακτινοβολίας) στο οποίο αναπτύχθηκαν τα φυτά. Τα φυτά ποτιζόταν με νερό μία φορά την ημέρα (ώρα 11:30). Το απορρέων νερό συλλεγόταν και καταγραφόταν το επίπεδο της EC και από τα δύο φυτά SP και NP. Η μέση τιμή  $\bar{V}$  των αποκτημένων βιοσημάτων μετριοταν κάθε 1 δευτερόλεπτο για περίοδο χρόνου 60 λεπτών από τις 10:00 έως 11:00 για τέσσερις (4)συνεχόμενες ημέρες.



**Σχήμα 4.17:** Τοποθέτηση αισθητήρων S1 και S2 σε διαφορετικές αποστάσεις και μεγέθη φύλλων.

### 4.8.3 Μεθοδολογία διερεύνησης της επίδρασης διαφορετικών ερεθισμάτων στο εύρος και την τιμή του βιοσήματος

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δύο παρόμοια φυτά χρυσάνθεμο με 3 ανθοφόρους μη ξυλοποιημένους βλαστούς τα οποία είχαν παραχθεί από μόσχευμα τα οποία μεταφυτεύτηκαν 2 εβδομάδες μετά τη ριζοβολία τους σε

φυτοδοχεία 4 λίτρων με υπόστρωμα χόμα : τύρφη σε αναλογία 2:1. Τα φυτά παρέμειναν στις ίδιες συνθήκες ανάπτυξης για χρονικό διάστημα 14 εβδομάδων και κατά τη διάρκεια αυτή δέχτηκαν τις ίδιες καλλιεργητικές φροντίδες ενώ ακολουθήθηκε η συνήθης καλλιεργητική πρακτική για τη διαμόρφωση ανθοφόρων οφθαλμών. Το ύψος των βλαστών στα δύο φυτά μετά την διαφοροποίηση των ανθοφόρων οφθαλμών κυμαίνονταν από 20-23 cm ενώ η φυλλική επιφάνεια τους κυμαίνονταν από 2210 μέχρι 2314 cm<sup>2</sup>. Η διεξαγωγή του πειράματος έγινε 16 εβδομάδες μετά την μεταφύτευση των φυτών στα φυτοδοχεία και ενώ αυτά βρίσκονταν στο στάδιο της ανθοφορίας. Πριν από την έναρξη του πειράματος και τα δύο φυτά ποτίστηκαν μέχρι απορροής με νερό αγωγιμότητας 0,7 dS cm<sup>-1</sup>. Το ύψος και η φυλλική επιφάνεια των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν στις μετρήσεις παρέμεινε σταθερό αφού τα φυτά είχαν διαμορφώσει ανθοφόρους οφθαλμούς.

Κατά την διάρκεια του πειράματος καταγράφονταν σε πραγματικό χρόνο με ρυθμό δειγματοληψίας 10 KS/sec (Volkon) μέσω φίλτρο Butterworth η διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού (EP) στο 2<sup>ο</sup> και 5<sup>ο</sup> φύλλο από τη βάση του κάθε φυτού. Παράλληλα μετρήθηκαν οι τιμές της θερμοκρασίας και της σχετικής υγρασίας του αέρα και της ηλιακής ακτινοβολίας στο περιβάλλον όπου παρέμειναν τα φυτά καθώς της ηλεκτρικής αγωγιμότητας (EC), του pH, της θερμοκρασίας και της υγρασίας στο υποστρώματος ανάπτυξης των φυτών.

Για την αποφυγή αλλοίωσης του μεταγραφόμενου βιοσήματος λόγω ηλεκτρομαγνητικών παρεμβολών από το περιβάλλον τα δύο φυτά χρυσάνθεμου τοποθετήθηκαν σε κλωβό Faraday όση ώρα διαρκούσε η καταγραφή των σημάτων. Ο ένας από τους δύο αυτούς χώρους ήταν καλυμμένος με αδιαφανή υλικό ώστε να μην εισέρχεται εντός του η ηλιακή ακτινοβολία. Βιοσήματα καταγράφηκαν στα φύλλα των φυτών όταν αυτά παρέμειναν σε καθεστώς φωτισμού και σκότους καθώς και όταν αυτά ποτίστηκαν με νερό χαμηλής και υψηλής EC. Το πείραμα ολοκληρώθηκε σε τρεις διαδοχικές φάσεις:

### **Φάση 1<sup>η</sup>:**

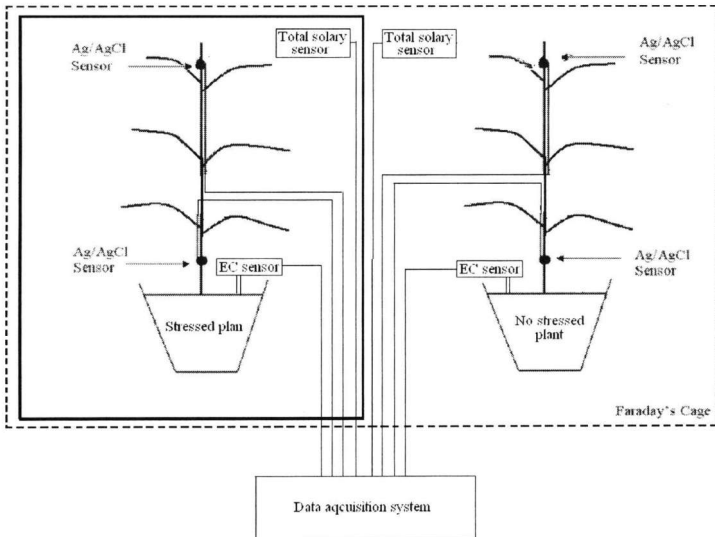
Κατά την 1<sup>η</sup> φάση τα δύο φυτά παρέμειναν σε ίδιο εναέριο και υπόγειο περιβάλλον (θερμοκρασία, υγρασία και ένταση φωτεινής ακτινοβολίας, EC και pH).

**Φάση 2<sup>η</sup>:**

Κατά την 2<sup>η</sup> φάση το ένα φυτό (Normal Plant /NP) παρέμενε σε καθεστώς με φωτισμό υψηλής έντασης ενώ το δεύτερο (Stressed Plant /SP) σε συνθήκες σκότους. Οι λοιποί παράγοντες του αέριου (θερμοκρασία και σχετική υγρασία) και του ριζικού περιβάλλοντος (ηλεκτρική αγωγιμότητα, pH, επίπεδο υγρασίας και θερμοκρασίας του υποστρώματος) ήταν ίδιοι και για τα δύο φυτά.

**Φάση 3<sup>η</sup>:**

Κατά την 3<sup>η</sup> φάση το NP φυτό συνέχισε να παραμένει σε καθεστώς με φωτισμό υψηλής έντασης ενώ στο υπόστρωμα ανάπτυξης του SP φυτού που συνέχισε να παραμένει σε συνθήκες σκότους αυξάνονταν η τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας με χορήγηση υδατικού διαλύματος NaCl του οποίου η τιμή ηλεκτρικής αγωγιμότητας ήταν  $8 \text{ dS cm}^{-1}$ . Οι λοιποί παράγοντες του αέριου (θερμοκρασία και σχετική υγρασία) και του ριζικού περιβάλλοντος (pH και επίπεδο υγρασίας και θερμοκρασίας του υποστρώματος) ήταν ίδιοι και για τα δύο φυτά. Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την ολοκλήρωση του πειράματος φαίνεται στο σχήμα 4.18.



**Σχήμα 4.18:** Πειραματική διάταξη για την μέτρηση του βιοσήματος που προκλήθηκε από τη μεταβολή διαφορετικών παραμέτρων του περιβάλλοντος.

#### 4.8.4 Μεθοδολογία διερεύνησης επίδρασης της μεταβολής της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας (PAR) στη μορφολογία του βιοσήματος

Όλη η ενέργεια που χρειάζονται οι φυτικοί οργανισμοί για να βιοσυνθέσουν τα κυτταρικά τους συστατικά, προέρχεται άμεσα ή έμμεσα από την ηλιακή ακτινοβολία η οποία δεσμεύεται από την χλωροφύλλη με το μηχανισμό της φωτοσύνθεσης που είναι κατά κάποιον τρόπο η αντίστροφη διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής.

Τα φυτά έχουν διαφορετική απόκριση ευαισθησίας από τους ανθρώπους στο φως διαφόρων μηκών κύματος. Μόνο ένα τμήμα του ορατού στο ανθρώπινο μάτι φωτός βοηθά στην ανάπτυξη (φωτοσύνθεση) των φυτών, δηλαδή το φως με μήκη κύματος μεταξύ 400 και 700 nm. Αυτή η περιοχή καλείται PAR (PAR = Photosynthetic Active Radiation ή Φωτοσυνθετική Ενεργή Ακτινοβολία και εκφράζει την ενέργεια ανά δευτερόλεπτο μεταξύ 400 και 700 nm ανά μονάδα εμβαδού, (W/m<sup>2</sup>). Περίπου 45% της παγκόσμιας ακτινοβολίας του ημερήσιου φωτός είναι μεταξύ 400 και 700 nm.

Τα φυτά μπορεί να καταπονηθούν από χαμηλές ή υψηλές εντάσεις ορατής ακτινοβολίας. Οι χαμηλές εντάσεις ορατής, φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας (PAR), προκαλούν καταπόνηση λόγω ανεπάρκειας της ενέργειας για την επιτέλεση της φωτοσύνθεσης.

Αντίθετα οι υψηλές εντάσεις PAR προκαλούν καταπόνηση λόγω υπερσυσσώρευσης ενέργειας στα φωτοσυστήματα αναφορικά με την ικανότητα φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας στον κύκλο Calvin-Benson.

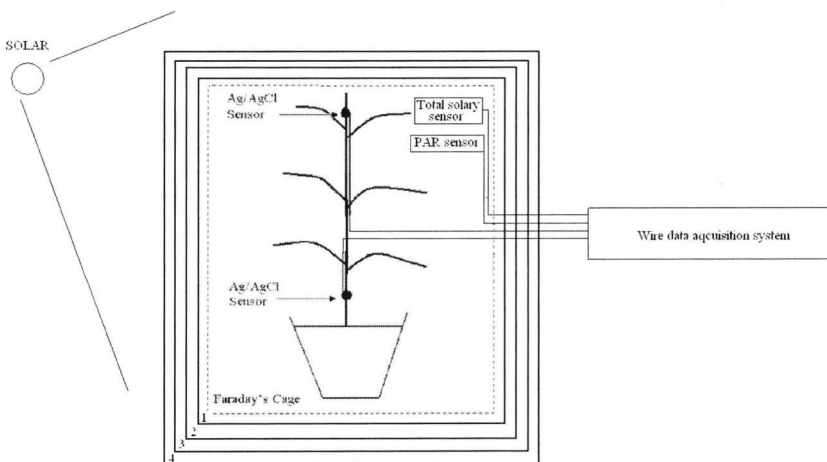
Συνεπώς η γνώση του επιπέδου της απορροφημένης ακτινοβολίας PAR από το ίδιο το φυτό προσδιορίζει με ακρίβεια το επίπεδο της φωτοσύνθεσης τους και μπορεί ταυτόχρονα να αποτελέσει συντελεστή για τον έλεγχο των περιβαλλοντικών παραγόντων στα θερμοκήπια (ακτινοβολία, θερμοκρασία, υγρασία, κ.λ.π.), ανάλογα με τις επικρατούσες κλιματολογικές συνθήκες, την εφαρμογή και τις τεχνικές λεπτομέρειες κατασκευής τους.

Σκοπός της πειραματικής διάταξης είναι η διερεύνηση της συσχέτισης του βιοσήματος που καταγράφηκε σε χρυσάνθεμα (*Chrysanthemum morifolium*) με τη μεταβολή της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας (PAR) σε τέσσερα επίπεδα. Για το σκοπό αυτό καταγράφηκε με τη χρήση αισθητήρων Ag/AgCl, σε πραγματικό



χρόνο το δυναμικό φορτίο σε φύλλο μονοστέλεχων φυτών χρυσάνθεμου το οποίο βρισκόταν στο εσωτερικό του κλωβού faraday. Οι παράμετροι του κλίματος θερμοκρασία, υγρασία και ένταση φωτεινής ακτινοβολίας παρέμεινα σταθερή σε όλη την διάρκεια των μετρήσεων. Για την μεταβολή της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκε εμπορικό δίχτυ σκίασης με ποσοστό σκίασης 30%. Η πειραματική διαδικασία υλοποιήθηκε σε πέντε (5) φάσεις:

1. Στη πρώτη φάση καταγράφηκε η ένταση της ολικής ακτινοβολίας, η ένταση της φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας (400 και 700 nm) και το δυναμικό του φυτού δίχως κάλυψη του κλωβού με το δίχτυ σκίασης.
2. Από την δεύτερη έως την πέμπτη φάση των πειραματικών μετρήσεων καταγράφηκε η ένταση της ολικής ακτινοβολίας, η ένταση της φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας καλύπτοντας τον κλωβό με το δίχτυ σκίασης σε 4 διαδοχικές στρώσεις. Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στη φάση αυτή φαίνεται στο σχήμα 4.19.



**Σχήμα 4.19:** Πειραματική διάταξη για διερεύνηση επίδρασης της μεταβολής της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας (PAR) στη μορφολογία του βιοσήματος.

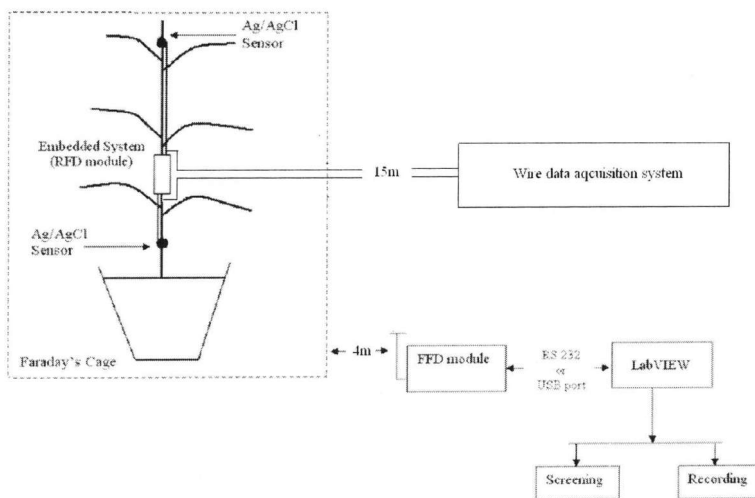
#### 4.8.5 Πειραματική διάταξη για τη συγκριτική μελέτη βιοσημάτων ληφθέντων με ενσύρματο και ασύρματο σύστημα απόκτησης δεδομένων

Η συγκριτική μελέτη λήψης βιοσημάτων με ενσύρματο και ασύρματο σύστημα απόκτησης δεδομένων έγινε σε 2 φάσεις:

##### Φάσης 1<sup>η</sup>

Κατά τη διάρκεια της 1<sup>ης</sup> φάσης μετρήθηκε το ηλεκτρικό δυναμικό σε φύλλα φυτών χρυσάνθεμων καθώς και στην περιοχή του μίσχου. Χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό τα ηλεκτρόδια Ag/AgCl. Το φυτό ήταν τοποθετημένο μέσα στο κλωβό Faraday. Ο ρυθμός δειγματοληψίας των μετρήσεων ήταν 10 kS/s. Η τιμή των αποκτημένων βιοσημάτων τόσο από το ενσύρματο σύστημα απόκτηση βιοσημάτων όσο και από το αναπτυγμένο ενσωματωμένο σύστημα καταγράφηκε:

1. μέσα στο κλωβό Faraday,
2. σε απόσταση 15 μέτρων μακριά από τον κλωβό Faraday μέσω του ενσύρματου συστήματος,
3. σε απόσταση 4 μέτρων μακριά από τον κλωβό Faraday μέσω του ασύρματου ενσωματωμένου συστήματος. Η πειραματική διάταξη που ακολουθήθηκε φαίνεται στο σχήμα 4.20.

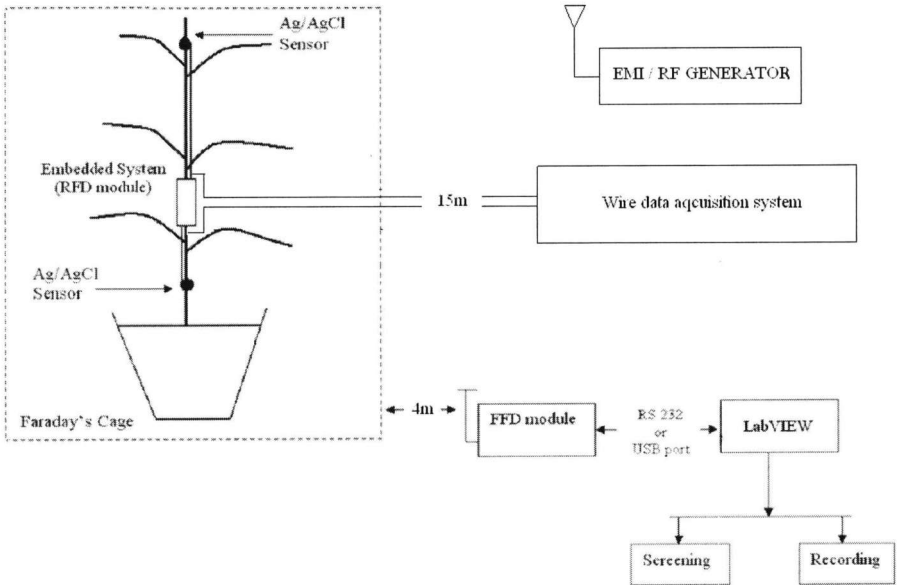


Σχήμα 4.20:: Πειραματική διάταξη μελέτης ενσωματωμένου συστήματος .

**Φάσης 2<sup>η</sup>**

Κατά την διάρκεια της 2<sup>ης</sup> φάσης του πειράματος ηλεκτρομαγνητικής παρεμβολής (EMI) μέσω γεννήτριας EMI RF εκπέμφθηκαν για διάρκεια 40ms δύο σήματα ισχύος A και B ( $p=100\text{mW}$ ) σε απόσταση 30 εκατ. μακριά από το κλωβό Faraday στις συχνότητες: 0,5, 1,3, 2,3 και 3,3 MHz. Το φυτό ήταν τοποθετημένο μέσα στο κλωβό Faraday. Ο ρυθμός δειγματοληψίας των μετρήσεων ήταν 10 kS/s. Η τιμή των αποκτημένων βιοσημάτων τόσο από το ενσύρματο σύστημα απόκτηση βιοσημάτων όσο και από το αναπτυγμένο ενσωματωμένο σύστημα καταγράφηκε:

1. μέσα στο κλωβό Faraday,
2. σε απόσταση 15 μέτρου μακριά από τον κλωβό Faraday μέσω του ενσύρματου συστήματος,
3. σε απόσταση 4 μέτρων μακριά από τον κλωβό Faraday μέσω του ασύρματου ενσωματωμένου συστήματος. Η πειραματική διάταξη που ακολουθήθηκε φαίνεται στο σχήμα 4.21.



**Σχήμα 4.21:** Πειραματική διάταξη μελέτης ενσωματωμένου συστήματος .



# 5

## Αποτελέσματα / Συζήτηση

---

### 5.1 Αξιολόγηση του αισθητήρα επαφής Ag/AgCl

#### 5.1.1 Αποτελέσματα επίδρασης του μεγέθους και της τοποθέτησης των αισθητήρων επάνω στο φυτό

Στο σχήμα 5.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων που έγιναν με ζεύγη αισθητήρων Ag/AgCl (μέτρησης και αναφοράς) διαφορετικών διαμέτρων. Η διάμετρος του πρώτου ζεύγους αισθητήρων ήταν 10mm (Big Sensor-BS), ενώ του δεύτερου 5 mm (Small Sensor-SS).

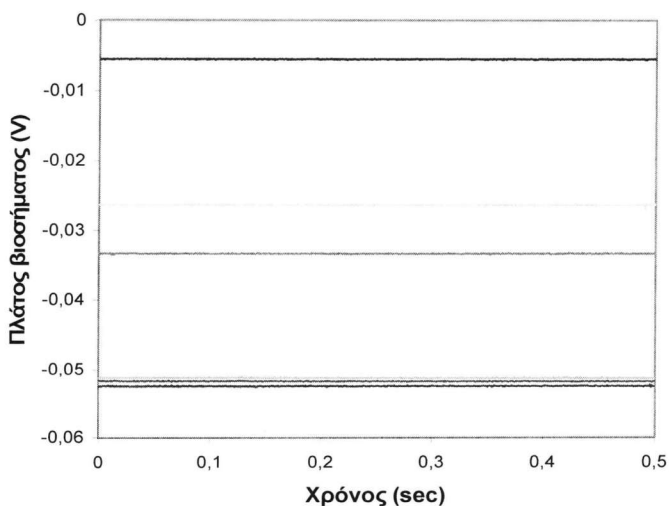
$$BS = 2 \cdot SS$$

Οι αισθητήρες (μέτρησης και αναφοράς) ήταν τοποθετημένοι σε αποστάσεις 4, 7 και 14cm στο φυτό χρυσάνθεμου. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία το δυναμικό ανάπαυσης σε φυτό το οποίο δεν έχει υποστεί καταπόνηση παραμένει σταθερό με το πλάτος του να ποικίλει ανάλογα της φυσιολογικής κατάστασης του (Gradmann et al. 1978, Fromm et al. 1995; Volkov et al. 2001).

Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι ο αισθητήρας Ag/AgCl θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από σταθερή απόκριση κάτω από σταθερές συνθήκες κλίματος και

υποστρώματος. Ο αισθητήρας SS παρουσιάζουν σταθερή απόκριση σε σχέση με τον αισθητήρα BS ανεξάρτητα από την απόσταση τοποθέτησης μεταξύ του αισθητήρα-ηλεκτροδίου μέτρησης και αναφοράς. Η τυπική απόκλιση των μετρήσιμων βιοσημάτων για τον αισθητήρα SS ήταν  $Sd_{(SS)}=0,6mV$ , ενώ για τον αισθητήρα BS ήταν  $Sd_{(BS)}=13,6mV$ .

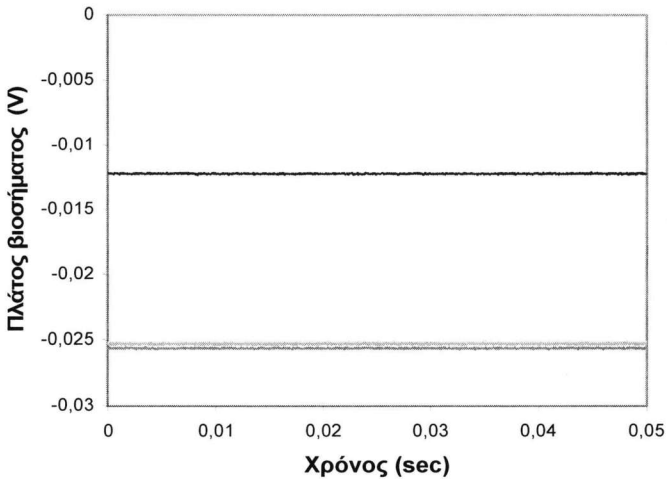
Σε αντίθεση με το αισθητήρα SS η μεγάλη τυπική απόκλιση που παρουσιάζει ο BS οφείλεται στο στοιχείο του χλωριούχου καλίου (KCl), που περιέχουν τα ηλεκτρόδια επαφής Ag/AgCl, το οποίο μετά από σύντομο χρόνο οξειδώνεται, με αποτέλεσμα ν' αλλάζει η ιοντική κατάσταση της περιοχής που μετρείται (Ksenzhek and Volkov 1998; Volkov 2001; Purves 1981; Geddes1972). Για το λόγο αυτό ο αισθητήρας BS λόγω της μεγαλύτερης επιφάνειας και της περιεκτικότητας του KCl σε σχέση με τον αισθητήρα SS παρουσιάζει εντονότερο το φαινόμενο της μεταβολής του πλάτους του βιοσήματος.



**Σχήμα 5.1:** Μεταβολή του πλάτους του βιοσήματος που καταγράφηκε από τον αισθητήρα BS σε απόσταση 4cm (—), 7cm (—) και 14cm ( ) και αντίστοιχα από τον αισθητήρα SS σε απόσταση 4cm (—), 7cm (—) και 14cm (—).

Στο σχήμα 5.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων που έγιναν με ζεύγη αισθητήρων Ag/AgCl (μέτρησης και αναφοράς) διαφορετικών διαμέτρων. Η διάμετρος του πρώτου ζεύγους αισθητήρων ήταν 10mm (Big Sensor - BS) ενώ του δεύτερου 5mm (small sensor- SS). Οι αισθητήρες (μέτρησης και αναφοράς) ήταν

τοποθετημένοι σε αποστάσεις 2, και 20cm μεταξύ τους στο φυτό γαριφαλιάς. Από το διάγραμμα φαίνεται ότι και στην περίπτωση του φυτού της γαριφαλιάς η απόκριση του αισθητήρα SS είναι σταθερότερη σε σχέση με τον αισθητήρα BS ανεξάρτητα από την απόσταση τοποθέτησης τους παρουσιάζοντας μικρότερη τυπική απόκλιση των μετρήσιμων βιοσημάτων η οποία ήταν  $Sd_{(SS)}=0,2mV$ , σε αντίθεση με αυτή του αισθητήρα BS που βρέθηκε  $Sd_{(BS)}=9mV$ .



**Σχήμα 5.2:** Μεταβολή του πλάτους του βιοσήματος που καταγράφηκε από τον αισθητήρα BS σε απόσταση 2cm (---) και 20cm (—) και αντίστοιχα από τον αισθητήρα SS σε απόσταση 4cm (---), 7cm (---) και 14cm (---).

Τα αποτελέσματα και των δύο πειραμάτων έρχονται σε συμφωνία με το γεγονός ότι το δυναμικό ηρεμίας όταν δεν μεταβάλλεται από την ύπαρξη ενός δυναμικού δράσης ή ενός δυναμικού μεταβλητότητας παρουσιάζει σταθερότητα (Volkov et al. 2001). Από την σύγκριση των αποτελεσμάτων των μετρήσιμων τυπικών αποκλίσεων στο φυτό χρυσάνθεμο και γαριφαλιά προκύπτει ότι:

$$\frac{Sd_{(BS)}\chi\rho\nu\sigma}{Sd_{(BS)}\gamma\alpha\rho} \square 2 * \frac{Sd_{(SS)}\chi\rho\nu\sigma}{Sd_{(SS)}\gamma\alpha\rho}$$

Το γεγονός αυτό δείχνει ότι:

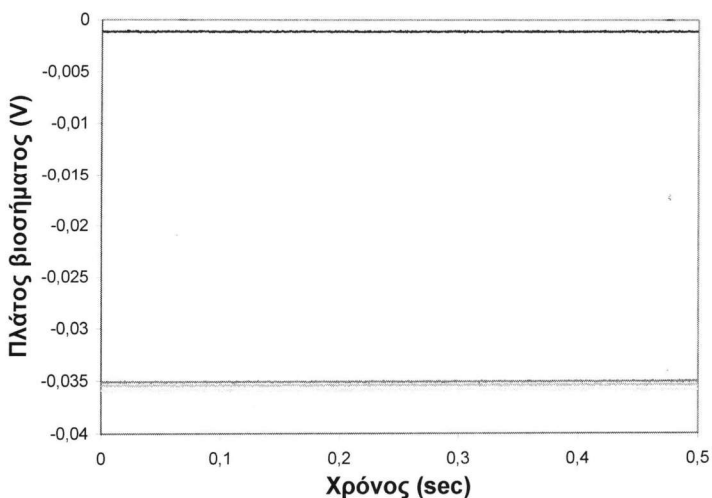
1. η διαφορά των τυπικών αποκλίσεων για τον αισθητήρα SS οφείλεται στην φυσιολογική κατάσταση του φυτού υπό του δυναμικού ανάπαυσης.

2. η διπλάσια διαφορά των λόγων των τυπικών αποκλίσεων μεταξύ του αισθητήρα SS και BS οφείλεται στην διπλάσια διαφορά των διαμέτρων των αισθητήρων.

Συνεπώς η διαφοροποίηση του μεγέθους της απόκλισης του αισθητήρα BS από τον αισθητήρα SS μεταξύ των δύο διαφορετικών φυτών οφείλεται καθαρά στο μέγεθος του αισθητήρα όταν το φυτό βρίσκεται σε κατάσταση ανάπαυσης κάτω από σταθερές συνθήκες κλίματος και υποστρώματος ανεξάρτητα του είδους του και της απόστασης τοποθέτησης των ηλεκτροδίων.

### 5.1.2 Αποτελέσματα επίδρασης της απόκρισης του αισθητήρα συναρτήσει μεγέθους του φύλλου

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στο σχήμα 5.3. Στο γράφημα απεικονίζεται το πλάτος του βιοσήματος σε φύλλα διαφορετικής φυλλικής επιφάνειας με ζεύγη αισθητήρων Ag/AgCl (μέτρησης και αναφοράς) διαφορετικών διαμέτρων. Η διάμετρος του πρώτου ζεύγους αισθητήρων ήταν 10mm (Big Sensor - BS) ενώ του δεύτερου 5mm (small sensor- SS). Η απόσταση των αισθητήρων μέτρησης και αναφοράς ήταν 14cm.



**Σχήμα 5.3:** Μεταβολή του πλάτους του βιοσήματος που καταγράφηκε από τον αισθητήρα BS (—) και ( ), και αντίστοιχα από τον αισθητήρα SS σε φύλλο (—) και ( ) σε απόσταση 20 cm



Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι η απόκριση του αισθητήρα SS κατά τη λήψη του βιοσήματος δεν επηρεάζεται από το μέγεθος του φύλλου λόγω της μικρής τυπικής απόκλισης των μετρήσιμων τιμών το σήματος ( $Sd_{SS}=0,2mV$ ) χαρακτηρίζοντας την απόκριση του σταθερή. Αντίθετα ο αισθητήρας BS λόγω του λόγω της μεγαλύτερης επιφάνειας με κάλυψη από KCl προκαλεί μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις στο σήμα του παρουσιάζοντας τυπική απόκλιση ίση με  $Sd_{BS}=14,4mV$ . Συνεπώς το μέγεθος του φύλλου δεν επηρεάζει την απόκριση του φύλλου.

## 5.2 Επίδρασης της μεταβολής της EC του νερού άρδευσης στο πλάτος του βιοσήματος

Στον πίνακα 5.1 παρουσιάζονται οι μετρούμενες τιμές θερμοκρασίας αέρα, υγρασίας αέρα και ηλιακής ακτινοβολίας κατά την διάρκεια των τεσσάρων ημερών του πειράματος. Η θερμοκρασία αέρα και η υγρασία κατά την διάρκεια της ημέρας παρουσίαζαν σταθερές τιμές. Παρουσιάστηκαν όμως σημαντικές μεταβολές από την πρώτη έως τη τέταρτη μέρα του πειράματος. Η ηλιακή ακτινοβολία παρουσίασε σταθερή τιμή κατά την διάρκεια των τελευταίων τριών ημερών του πειράματος.

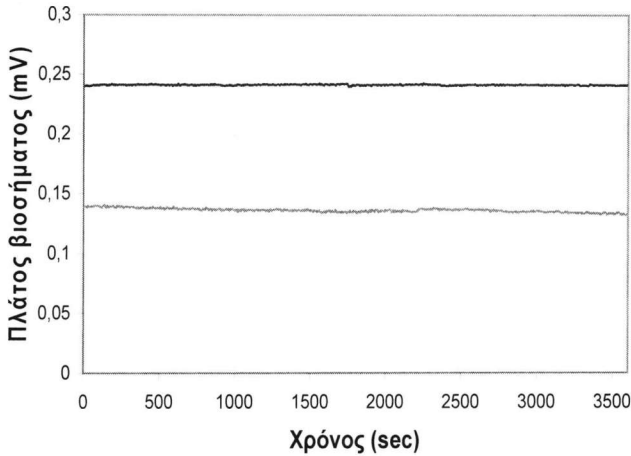
**Πίνακας 5.1.** Μετρούμενες τιμές τη θερμοκρασίας αέρα, υγρασίας αέρα και ηλιακής ακτινοβολίας

Ημέρα πειράματος	Μέση καθημερινή τιμή θερμοκρασίας αέρα ( $\bar{T}$ °C)	SD	Μέση καθημερινή τιμή υγρασίας αέρα (RH %)	SD	Ηλιακή ακτινοβολία ( $MJ m^{-2}$ )
1 <sup>η</sup>	16,8	0,009	23,4	0,024	22,4
2 <sup>η</sup>	14,5	0,24	26,9	2,5	9,7
3 <sup>η</sup>	18,9	0,18	29,4	0,89	10,7
4 <sup>η</sup>	21,0	0,15	30,7	1,08	11,3

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται αν ημέρα καταγραφής:

### 1<sup>η</sup> ημέρα

Κατά τη διάρκεια της πρώτης ημέρας καταγράφηκε όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 5.4 υψηλή τιμή βιοσήματος στο φυτό SP με μέση τιμή πλάτους  $V=0,24\text{mV}$  ( $EC=18\text{ dS m}^{-1}$ ) σε σχέση με πλάτος του βιοσήματος του φυτού NP στο οποίο δεν είχε ποτιστεί με διάλυμα υψηλής αγωγιμότητας ( $EC=0,7\text{dS m}^{-1}$ ) η τιμή του οποίου ήταν  $V=0,14\text{mV}$ . Κατά την διάρκεια των μετρήσεων τα επίπεδα των μετρίσιμων παραμέτρων του κλίματος θερμοκρασίας και υγρασίας παρέμειναν σταθερά



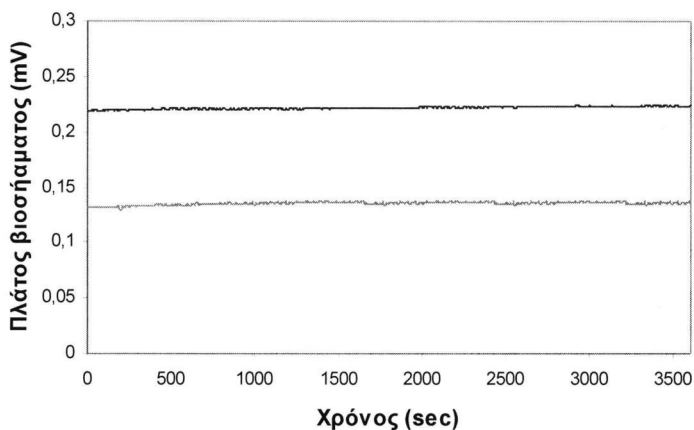
**Σχήμα 5.4:** Πλάτος βιοσήματος α) στο φυτό που έχει ποτιστεί με διάλυμα υψηλής αγωγιμότητας (–) και β) στο φυτό με φυσιολογικό διάλυμα αγωγιμότητας (–)

### 2<sup>η</sup> ημέρα

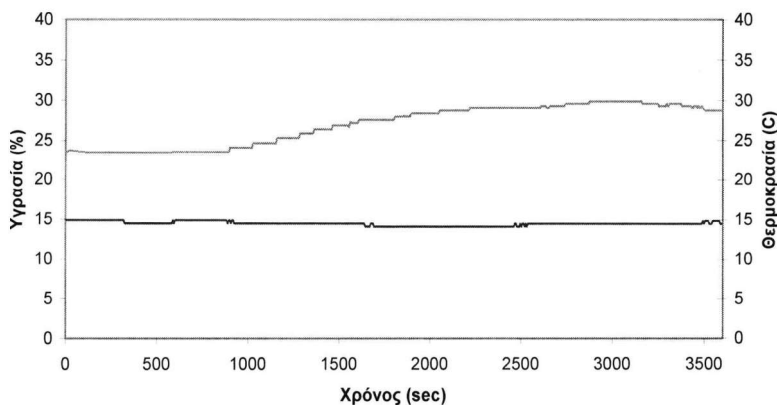
Κατά τη διάρκεια της δεύτερης ημέρας του πειράματος καταγράφηκε όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 5.5 μείωση του βιοσήματος κατά 10% με μέση τιμή πλάτους  $V=0,22\text{mV}$  για το φυτό SP το οποίο είχε ποτιστεί με διάλυμα υψηλής αγωγιμότητας την πρώτη ημέρα του πειράματος ( $EC=18\text{ dS m}^{-1}$ ). Κατά την διάρκεια των μετρήσεων το επίπεδο της θερμοκρασίας παρέμεινε σταθερό ενώ το επίπεδο της υγρασίας παρουσίασε αύξηση 27% από 23,4% σε 29,8% (σχ5.6). Η μεταβολή του επιπέδου της υγρασίας παρουσίασε μεταβολή στο πλάτος του καταγραμμένου σήματος για το φυτό SP και NP με αύξηση του επιπέδου του κατά:

- 2,7% (από 0,218mV σε 0,224mV) στο φυτό SP
- 6,6% (από 0,129 mV σε 0,137 mV) στο φυτό NP

Η αύξηση της υγρασίας δείχνει επίδραση στη μέση τιμή του πλάτους του βιοσήματος. Συνεπώς οι κλιματικοί παράμετροι μπορούν να επηρεάσουν την μεταβολή της μέσης τιμής του πλάτους του βιοσήματος.



**Σχήμα 5.5:** Πλάτος βιοσήματος α) στο φυτό που έχει ποτιστεί με διάλυμα υψηλής αγωγιμότητας (–) και β) στο φυτό με φυσιολογικό διάλυμα αγωγιμότητας (–).



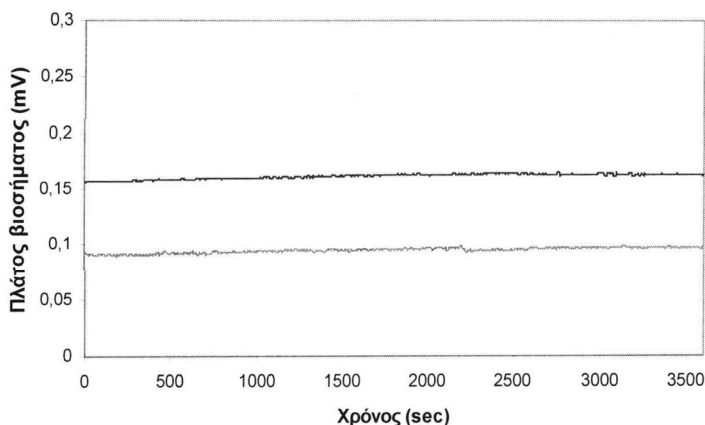
**Σχήμα 5.6:** Επίπεδο θερμοκρασίας (–) και υγρασίας (–) κατά τη πρώτη ημέρα των μετρήσεων.

### 3<sup>η</sup> ημέρα

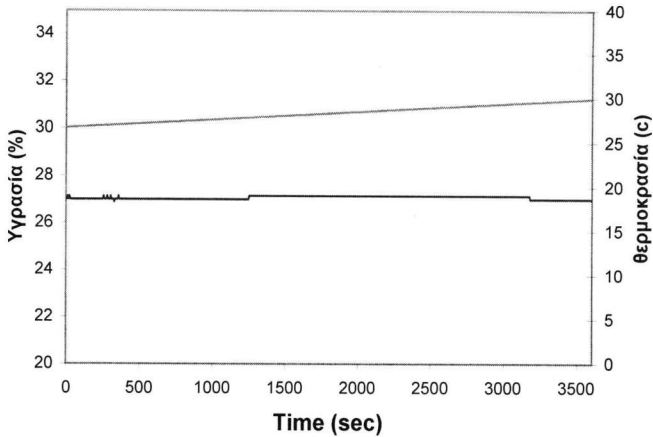
Κατά τη διάρκεια της τρίτης ημέρας του πειράματος καταγράφηκε όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 5.7 περαιτέρω μείωση του ηλεκτρικού δυναμικού βιοσήματος για το φυτό SP το οποίο είχε ποτιστεί με διάλυμα υψηλής αγωγιμότητας την πρώτη ημέρα του πειράματος ( $EC=18 \text{ dS m}^{-1}$ ). Κατά την διάρκεια των μετρήσεων το επίπεδο της θερμοκρασίας παρέμεινε σταθερό ενώ το επίπεδο της υγρασίας παρουσίασε αύξηση κατά 3,8% από 30,0 % σε 31,1% (σχ5.8). Η μεταβολή του επιπέδου της υγρασίας παρουσίασε μεταβολή στο πλάτος του καταγραμμένου σήματος για το φυτό SP και NP με αύξηση του επιπέδου του κατά

- 5,7% (από 0,156mV σε 0,164mV) στο φυτό SP
- 10% (από 0,089 mV σε 0,98 mV) στο φυτό CN

Η αύξηση της υγρασίας δείχνει επίδραση στην μέση τιμή του πλάτος του βιοσήματος. Η αβιοτική καταπόνηση οδηγεί συχνά στις μορφολογικές, φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές αλλαγές που έχουν επιπτώσεις στο βίοςσημα του φυτού καθώς και στην ανάπτυξη του (Wang et al. 2003; Knight & Knight 2001; Zhu 2001, 2002).



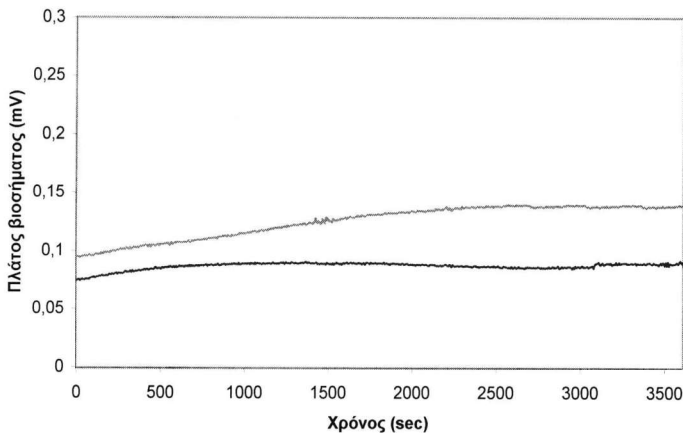
**Σχήμα 5.7:** Δυναμικό βιοσήματος α) στο φυτό που έχει ποτιστεί με διάλυμα υψηλής αγωγιμότητας (—) και β) στο φυτό με φυσιολογικό διάλυμα αγωγιμότητας (---)



**Σχήμα 5.8:** Επίπεδο θερμοκρασίας (—) και υγρασίας (—) κατά τη πρώτη ημέρα των μετρήσεων

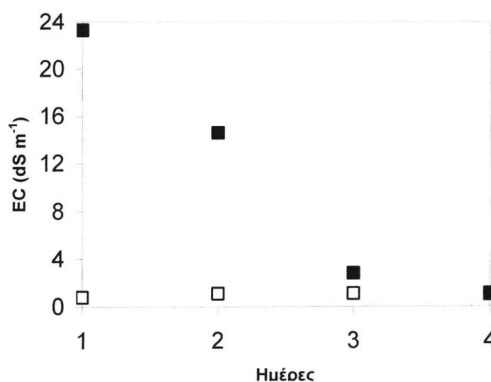
#### 4<sup>η</sup> ημέρα

Κατά την διάρκεια της τέταρτης του πειράματος καταγράφηκε όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 5.9 μείωση του ηλεκτρικού δυναμικού βιοσήματος για το φυτό το οποίο είχε ποτιστεί με διάλυμα υψηλής αγωγιμότητας την πρώτη ημέρα του πειράματος ( $EC=18 \text{ dS m}^{-1}$ ).



**Σχήμα 5.9:** Δυναμικό βιοσήματος α) στο φυτό που έχει ποτιστεί με διάλυμα υψηλής αγωγιμότητας (—) και β) στο φυτό με φυσιολογικό διάλυμα αγωγιμότητας (—)

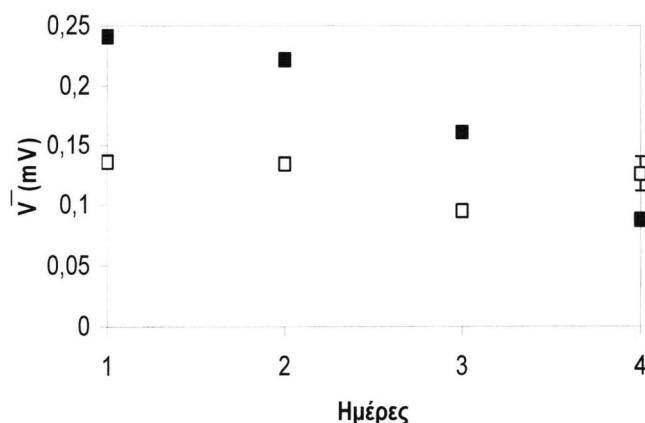
Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων το επίπεδο της θερμοκρασίας παρέμεινε σταθερό ενώ το επίπεδο της υγρασίας παρουσίασε αύξηση κατά 15% από 29,7% σε 32,1%. Επίσης το επίπεδο της αγωγιμότητας από το συλλεγμένο νερό για το φυτό το οποίο δεν είχε ποτιστεί με διάλυμα υψηλής αγωγιμότητας  $1,0\text{dS m}^{-1}$  ενώ για το το οποίο είχε ποτιστεί με διάλυμα υψηλής αγωγιμότητας ήτανε  $1,1\text{dS m}^{-1}$ . Οι μεταβολές στο πλάτος του σήματος κατά  $0,05\text{ mV}$  για το φυτό NP παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μέσης τιμής  $\bar{V}$  και των αποκτημένων σημάτων NP ( $R^2=0,97$ ). Για το φυτό SP το επίπεδο της συσχέτισης έχει τιμή  $R^2=0,8$ . Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στις κλιματικές μεταβολές κατά την διάρκεια των μετρήσεων (Wang et al. 2009). Η μεταβολή που παρουσιάστηκε λόγω των κλιματικών διαφοροποιήσεων δεν παρουσίασε αύξηση του πλάτους του σήματος μεγαλύτερη των  $0,05\text{ mV}$  σε αντίθεση με τη μεγάλη μεταβολή του πλάτους του σήματος που προκάλεσε η αύξηση της αγωγιμότητας ( $0,1\text{ mV}$ ). Στο σχήμα 5.10 παρουσιάζεται το επίπεδο της αγωγιμότητας από την συγκέντρωση του απορρεόμενου νερού. Όπως παρατηρούμε ενώ το επίπεδο της αγωγιμότητας για το φυτό το οποίο δεν είχε ποτιστεί με υψηλής αγωγιμότητας νερό παρουσιάζει ένα σταθερό πεδίο τιμών απο  $1,0$  to  $1,1\text{ dS m}^{-1}$ , σε αντίθεση το πεδίο των μετρήσιμων τιμών για το φυτό που είχε ποτιστεί με υψηλής αγωγιμότητας νερό παρουσιάζει συνεχή μείωση φτάνοντας κατά την διάρκεια της τέταρτης ημέρας το επίπεδο των  $1,1\text{dS m}^{-1}$



**Σχήμα 5.10:** Επίπεδα EC ( $\text{dS m}^{-1}$ ) του απορρεόμενου συλλεγμένου νερού από το NP (□) και SP (■) κατά την διάρκεια των τεσσάρων ημερών.

Η χρονική μεταβολή της μέσης τιμής του αποκτημένου βιοσήματος ( $\bar{V}$  (mV)) από το NP και το SP φυτό παρουσιάζει την ίδια χρονική μεταβολή με τα επίπεδα της συγκέντρωσης του απορροεμένου συλλεγμένου νερού τόσο για το φυτό που είχε ποτιστεί με το διάλυμα υψηλής αγωγιμότητας όσο και για το φυτό που είχε ποτιστεί με το φυσιολογικό διάλυμα. Τα επίπεδα του πλάτους σήματος των δύο φυτών παρουσιάζονται στο σχήμα 5.11. Όπως παρατηρούμε από το σχήμα το επίπεδο της μέσης τιμής της τάσης του σήματος για το φυτό NP ( $\bar{V}_{CP}$ ) παρουσιάζει μία σταθερότητα που κυμαίνεται γύρω από της τιμές 0,1 έως 0,13 mV. Σε αντίθεση το επίπεδο της μέσης τιμής της τάσης του σήματος για το φυτό SP ( $\bar{V}_{SP}$ ) κατά την πρώτη ημέρα των πειραματικών μετρήσεων παρουσιάζει ένα επίπεδο μέσης τιμής σήματος 0,24 mV (εδώ παραθέτουμε το υψηλό επίπεδο αγωγιμότητας που είχε καταγραφή (23,3 dS cm<sup>-1</sup>)), το οποίο μειώνεται συνεχώς κατά το πέρασ των ημερών έχοντας κατά την τέταρτη ημέρα μέση τιμή σήματος 0,09 mV.

Συνεπώς το επίπεδο της αγωγιμότητας επηρέασε σημαντικά το επίπεδο τη μέσης τιμής του πλάτους του βιοσήματος το οποίο όπως μετρήθηκε κατά την τέταρτη ημέρα παρουσίασε μεταβολή 20 φορές μεγαλύτερη της αρχικής τιμής από ότι η μεταβολή που προκάλεσαν οι κλιματικές συνθήκες (Kalovrektis K, Lykas Ch. Fountas E, 2009b; Καλοβρέκτης Κ., Λύκας Χ., Φούντας Ε., Κίττας Κ.,2009α)



**Σχήμα 5.11:** Επίπεδα χρονικής μεταβολή της μέσης τιμής πλάτους ( $\bar{V}$  mV) των NP (□) και SP (■) κατά την διάρκεια των τεσσάρων ημερών.

### 5.3 Μελέτη ηλεκτροφυσιολογικών φαινομένων στην απόκριση διαφορετικών ερεθισμάτων και συσχέτιση φάσματος – φαινομένου

Οι τιμές των κλιματικών παραμέτρων περιβάλλοντος και υποστρώματος κατά τη διάρκεια του πειράματος παρουσιάζονται στον πίνακα 5.2

**Πίνακας 5.2.** Μετρούμενες τιμές τη θερμοκρασίας αέρα, υγρασίας αέρα, ηλιακής ακτινοβολίας, EC και pH

Μέγεθος	Τιμή
Μέση καθημερινή τιμή θερμοκρασίας αέρα ( $\bar{T}$ °C)	18,9
Μέση τιμή υγρασίας αέρα (RH %)	30,7
Ηλιακή ακτινοβολία ( $\text{MJ m}^{-2}$ )	25,8
EC $\text{dS m}^{-1}$	0,75
pH	7,1

Κατά την διάρκεια των τριών φάσεων του πειράματος το επίπεδο της θερμοκρασίας, σχετικής υγρασίας του αέρα και της ηλιακής ακτινοβολίας στο περιβάλλον όπου παρέμεναν τα φυτά καθώς της ηλεκτρικής αγωγιμότητας (EC), του pH, της θερμοκρασίας και της υγρασίας στο υποστρώματος ανάπτυξης των φυτών παρέμειναν σταθερά. Τα ηλεκτρικά δυναμικά των βιοσημάτων που καταγράφηκαν στα δύο φυτά χρυσάνθεμου κατά την διάρκεια του πειράματος σε πραγματικό χρόνο με ρυθμό δειγματοληψίας 10 KS/sec (Volkov 1999) μεταξύ του 2<sup>00</sup> και 5<sup>00</sup> φύλλου από τη βάση του κάθε φυτού παρουσιάζονται στο σχήμα 5.12. Πριν την έναρξη των φάσεων του πειράματος η μέση τιμή και για τα δύο φυτά ήταν:

- -5,9mV για το φυτό SP και
- -7,7mV για το φυτό NP.

#### Φάση 1<sup>η</sup>

Κατά την 1<sup>η</sup> φάση του πειράματος η μέση τιμή του βιοσήματος για το φυτό SP μειώθηκε κατά 87,7% από -5,9mV σε -23,2mV. Ο λόγος της μείωσης



της μέσης τιμής του βιοσήματος οφείλεται στο γεγονός της σχέσης μεταξύ των ηλεκτρικών σημάτων και της φωτοσυνθετικής αντίδρασης, γεγονός που έχει αντίκτυπο στην ισορροπία των ιόντων σε όλη τη πλασματική μεμβράνη, οδηγώντας στην αλλαγή του διαμεμβρανικού δυναμικού (Koziolek et al. 2004; Knight & Knight 2001; Zhu 2001, 2002). Επίσης η ηλιακή ακτινοβολία η οποία προκαλεί δυναμικά δράσης, καθώς μηδενίζεται προκαλεί μεταβολή του πλάτους του βιοσήματος (Volkov et al. 2004a,b, 2005).

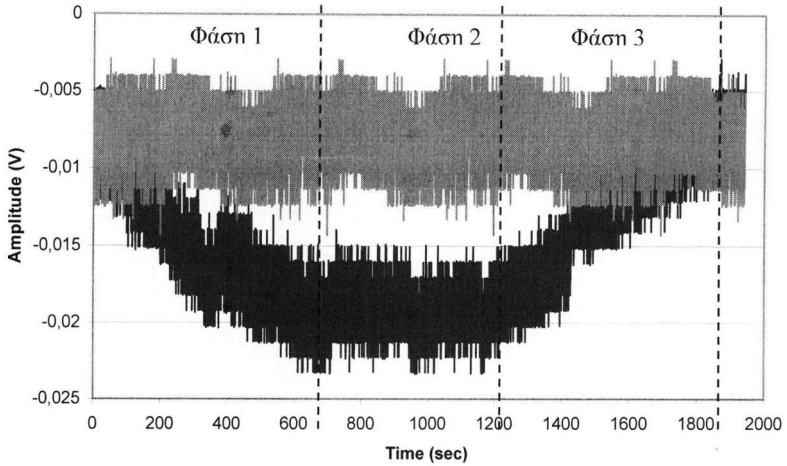
### **Φάση 2<sup>η</sup>**

Κατά την 2<sup>η</sup> φάση του πειράματος το φυτό σε πλήρη σκότος δεν φωτοσυνθέτει και δεν επηρεάζεται από κάποιον βιοτικό ή αβιοτικό παράγοντα. Συνεπώς το φυτό βρίσκεται σε κατάσταση ανάπαυσης κατά την οποία το δυναμικό ανάπαυσης παραμένει σταθερό ( $V=-23,2\text{mV}$ ) η οποία είναι ανάλογη της φυσιολογικής κατάστασης του φυτού (Gradmann et al. 1978, Fromm et al. 1995; Volkov et al. 2001).

### **Φάση 3<sup>η</sup>**

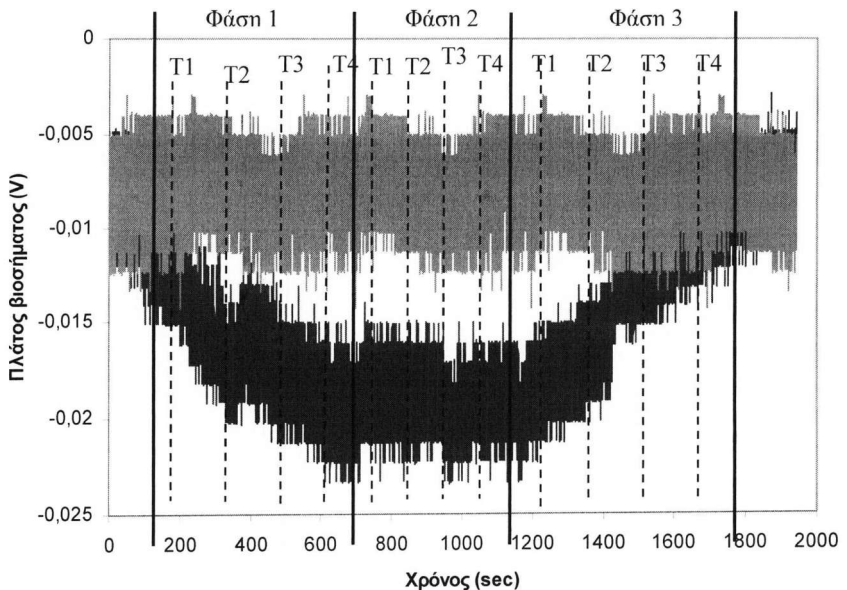
Κατά την 3<sup>η</sup> φάση του πειράματος η εισαγωγή του διαλύματος υψηλής αγωγιμότητας  $8 \text{ dS cm}^{-1}$  στο φυτό SP προκαλεί δυναμικά δράσης τα οποία έχουν αντίκτυπο στην ισορροπία των ιόντων σε όλη τη πλασματική μεμβράνη, και ως εκ τούτου στο διαμεμβρανικό δυναμικό. Δεδομένου ότι οι ιοντικές ροές μέσω των καναλιών επηρεάζουν άμεσα το διαμεμβρανικό δυναμικό η επίδραση της αύξησης της αγωγιμότητας προκαλεί αύξηση της μέσης τιμής του σήματος στο φυτό SP (Wang et al. 2003). Η μέση τιμή του βιοσήματος μέσω ελεγχόμενης εισαγωγής του διαλύματος πλησίασε την αρχική τιμή του βιοσήματος πριν την έναρξη της 1<sup>ης</sup> φάσης.

Από το γράφημα του σχήματος 5.12 συμπεραίνεται ότι η στάθμη του σήματος μεταβάλλεται το ίδιο από τους δυο διαφορετικούς παράγοντες με συνέπεια να μη μπορεί να γίνει διακριτή συσχέτιση του φαινομένου με το αίτιο που το προκαλεί.



**Σχήμα 5.12:** Μεταβολή του EP (V) σε φύλλο του φυτού του NP φυτού (-) και σε φύλλο του SP φυτού (-) κατά τη διάρκεια των τριών φάσεων του πειράματος.

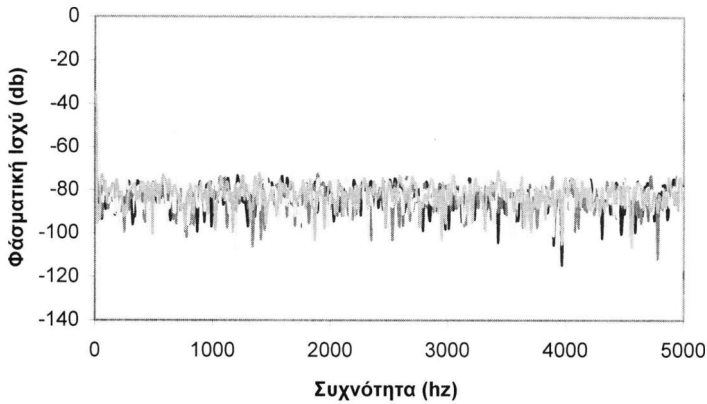
Στο γράφημα το σχήματος 5.13 παρουσιάζονται τα χρονικά παράθυρα T1 έως T4 στα οποία έγινε ανάλυση του φάσματος των αποκτημένων βιοσημάτων και των δύο φυτών (NP και SP) για τις τρεις φάσεις του πειράματος .



**Σχήμα 5.13:** Χρονικά παράθυρα (T1-T4) ανάλυσης του φάσματος για τις τρεις φάσεις του πειράματος .

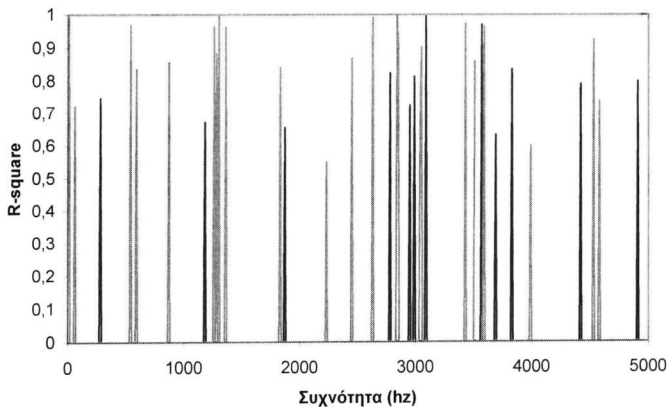
### Ανάλυση φάσματος κατά την 1<sup>η</sup> φάση του πειράματος

Η ανάλυση του φάσματος του βιοσήματος ανά χρονικά παράθυρα T1-T4 κατά την 1<sup>η</sup> του πειράματος παρουσιάζεται στο σχήμα 5.14.



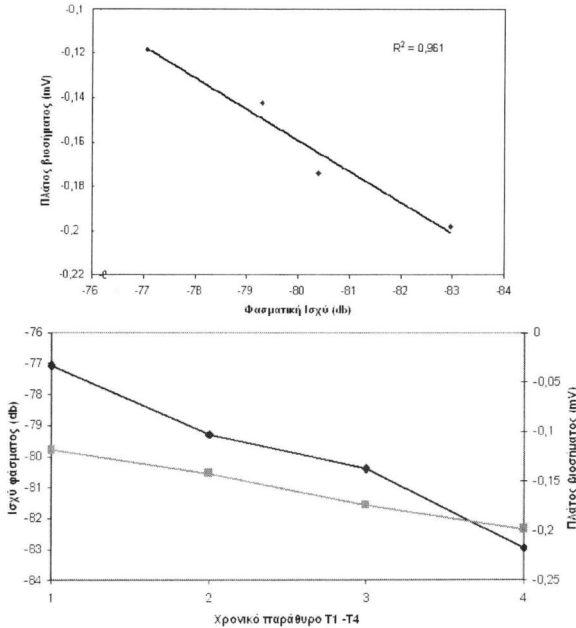
**Σχήμα 5.14:** Καταγραμμένα πεδίων συχνοτήτων κατά την 1<sup>η</sup> φάση του πειράματος για το φυτό SP στο χρονικό παράθυρο T1 (-), T2 (-), T3 ( ) και T4 ( ).

Από το πεδίο συχνοτήτων του φάσματος κατά την 1<sup>η</sup> φάση του πειράματος συσχετίστηκαν με την μέθοδο Least Square όλες οι συχνότητες που παρουσίασαν συμμεταβολές των πλάτους τους (αύξουσα ή φθίνουσα) με το πλάτος του βιοσήματος. Στο σχήμα 5.15 παρουσιάζονται οι συχνότητες που εμφάνισαν συμμεταβολή των πλάτους τους με το πλάτος του βιοσήματος κατά την 1<sup>η</sup> φάση του πειράματος για το φυτό SP.



**Σχήμα 5.15:** Συμμεταβαλλόμενες συχνότητες με αυξανόμενο (-) και με φθίνων (-) πλάτος κατά την 1<sup>η</sup> φάση του πειράματος για το φυτό SP.

Στο σχήμα 5.16 παρουσιάζεται παράδειγμα σε γράφημα η συμμεταβολή του πλάτους του σήματος και της φασματικής ισχύος για την αρμονική συχνότητα των 290 Hz. Μεταξύ των φαινομένων υπάρχει γραμμική συσχέτιση με  $R^2 > 0,9$ .



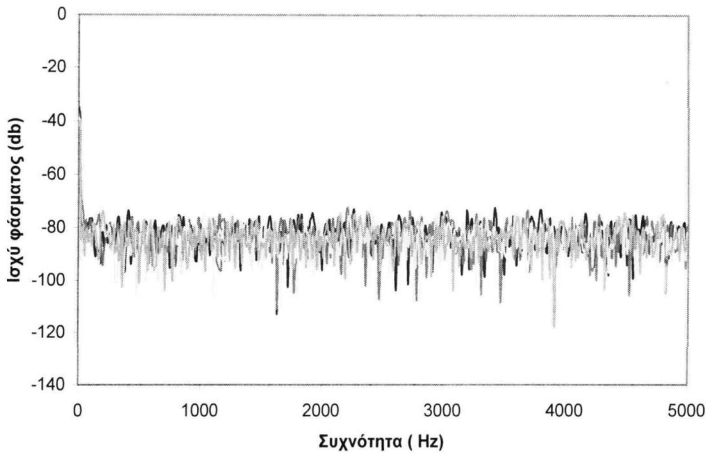
**Σχήμα 5.16:** Συχνότητα 290 Hz με φθίνουσας συμμεταβολή κατά την 1<sup>η</sup> φάση του πειράματος για το φυτό SP.

### Ανάλυση φάσματος κατά την 2<sup>η</sup> φάση του πειράματος

Κατά την 2<sup>η</sup> φάση το πειράματος δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή του πλάτους των συχνοτήτων λόγω ότι το φυτό ήταν σε κατάσταση ανάπαυσης (η μεταβολή των συχνοτήτων ήταν μικρότερη από 0,5db μετά το χρονικό παράθυρο T4 της 1<sup>ης</sup> φάσης).

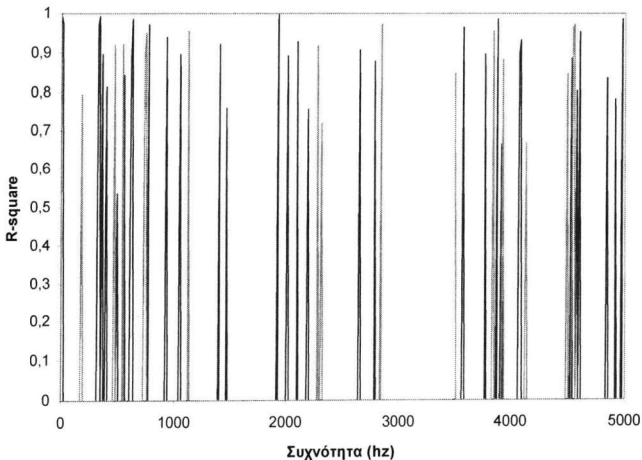
### Ανάλυση φάσματος κατά την 3<sup>η</sup> φάση του πειράματος

Η ανάλυση του φάσματος του βιοσήματος ανά χρονικά παράθυρα T1-T4 για την 3<sup>η</sup> φάση του πειράματος παρουσιάζεται στο σχήμα 5.17.



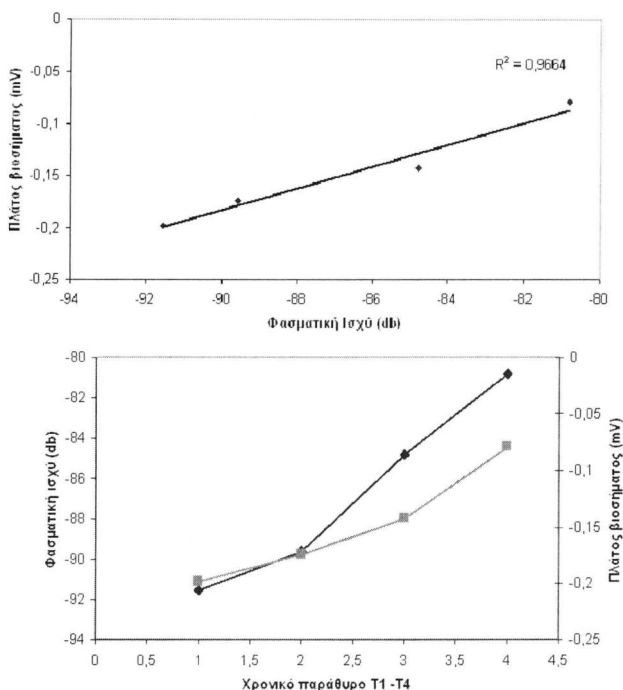
**Σχήμα 5.17:** Καταγραμμένα πεδίων συχνότητων κατά την 3<sup>η</sup> φάση του πειράματος για το φυτό SP στο χρονικό παράθυρο T1 (-), T2 (-), T3 ( ) και T4 (-).

Από το πεδίο συχνότητων του φάσματος κατά την 3<sup>η</sup> φάση του πειράματος συσχετίστηκαν με την μέθοδο Least Square όλες οι συχνότητες που παρουσίασαν συμμεταβολές των πλάτους τους (αύξουσα ή φθίνουσα) με το πλάτος του βιοσήματος. Στο σχήμα 5.18 παρουσιάζονται οι συχνότητες που εμφάνισαν συμμεταβολή των πλάτους τους με το πλάτος του βιοσήματος κατά την 3<sup>η</sup> φάση του πειράματος για το φυτό SP.



**Σχήμα 5.18:** Συμμεταβαλλόμενες συχνότητες με αυξανόμενο (-), και με φθίνων (-) πλάτος κατά την 3<sup>η</sup> φάση του πειράματος για το φυτό SP.

Στο σχήμα 5.19 παρουσιάζεται σε γράφημα παράδειγμα συμμεταβολής του πλάτος του σήματος με την φασματική του ισχύ για την αρμονική συχνότητα τον 480 Hz. Μεταξύ των φαινομένων υπάρχει γραμμική συσχέτιση με  $R^2 > 0,9$ .



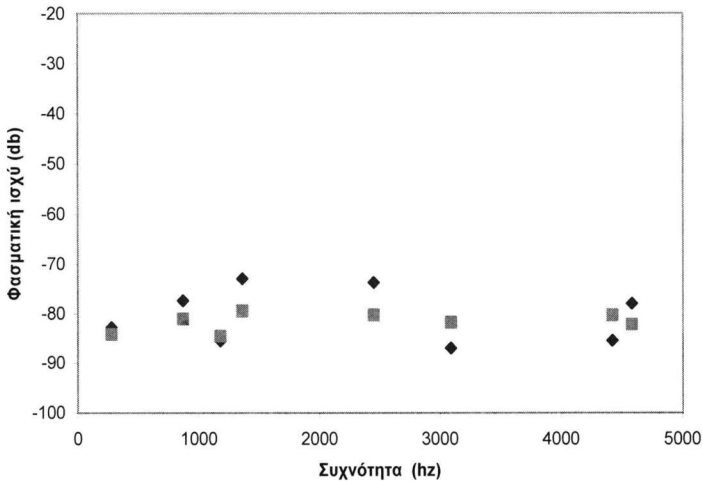
**Σχήμα 5.19:** Συχνότητα 480 Hz με αύξουσα συμμεταβολής κατά την 3<sup>η</sup> φάση του πειράματος για το φυτό SP

Από τη συσχέτιση συμπεραίνεται ότι η επίδραση των δύο διαφορετικών ανεξάρτητων αιτιών, της ηλιακής ακτινοβολίας και της αγωγιμότητας, επιδρούν σε διαφορετικές συχνότητες του φάσματος του σήματος.

Κατά την διάρκεια της 2<sup>ης</sup> φάσης του πειράματος το φυτό SP βρίσκεται σε κατάσταση ανάπαυσης.

Από την καταγραφή των συχνοτήτων κατά την 2<sup>η</sup> φάση του πειράματος καταγράφηκε μια ομάδα συχνοτήτων τα φασματικά πλάτη των οποίων παρέμειναν σταθερά σε όλη τη διάρκεια της 2<sup>ης</sup> φάσης. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι φυσιολογικοί παράμετροι του φυτού που παραμένουν σταθεροί κατά την 2<sup>η</sup> φάση του πειράματος για την οποία το φυτό ήταν σε κατάσταση ανάπαυσης μπορούν να συσχετιστούν με τις συχνότητες που καταγράφηκαν με σταθερά φασματικά πλάτη.

Το φαινόμενο αυτό κατά το οποίο παράμετροι του συστήματος όπως η θερμοκρασία, η ηλιακή ακτινοβολία, η υγρασία του αέρα κ.α που παραμένουν σταθερές στο φυτό SP κατά της φάσεις 2 και 3 του πειράματος δείχνει ότι μπορούν να συσχετισθούν με συχνότητες των οποίων τα φασματικά πλάτη τους παραμένουν σταθερά κατά τις φάσεις αυτές.

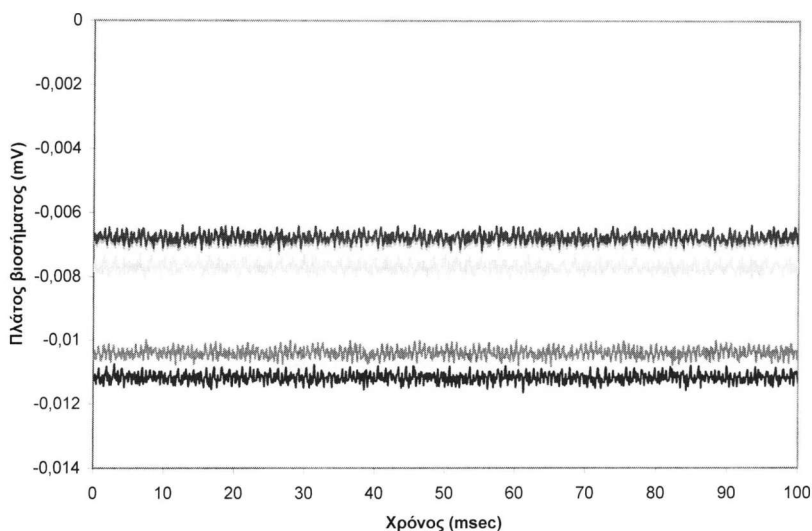


**Σχήμα 5.20:** Συχνότητες των οποίων τα φασματικά πλάτη τους παραμένουν σταθερά από την 2<sup>η</sup> (-) στην 3<sup>η</sup> (-) φάση του πειράματος.

Συνεπώς όπως καταγράφηκε από τις μετρήσεις των τριών φάσεων του πειράματος η επίδραση δύο διαφορετικών ανεξάρτητων παραμέτρων επιδρούν στη στάθμη του λαμβανόμενου βιοσήματος κάνοντας μη εφικτή την συσχέτιση σου με την στάθμη του βιοσήματος. Επίσης διαπιστώνεται μεγάλη συσχέτιση συμμεταβολής πλάτους του σήματος και αρμονικών συχνοτήτων ( $R^2 > 0.9$ ) από τις οποίες διαφορετικές συχνότητες μπορούν συσχετίζονται με διαφορετικές επιδράσεις του συστήματος. Τέλος συχνότητες με σταθερά πλάτη μπορούν να συσχετιστούν με σταθερές παραμέτρους του συστήματος.

## 5.4 Μελέτη επίδρασης του βιοσήματος σε μεταβολή της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας (PAR)

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της επίδρασης του βιοσήματος σε μεταβολή της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας (PAR) παρουσιάζονται στο σχήμα 5.21. Όπως παρατηρούμε το επίπεδο του πλάτους του σήματος μεταβάλλεται σε συνάρτηση με το επίπεδο σκίαση το οποίο προσανξάνεται κατά 30% μέσω του δίχτυ σκίασης σε 4 διαδοχικές στρώσεις.

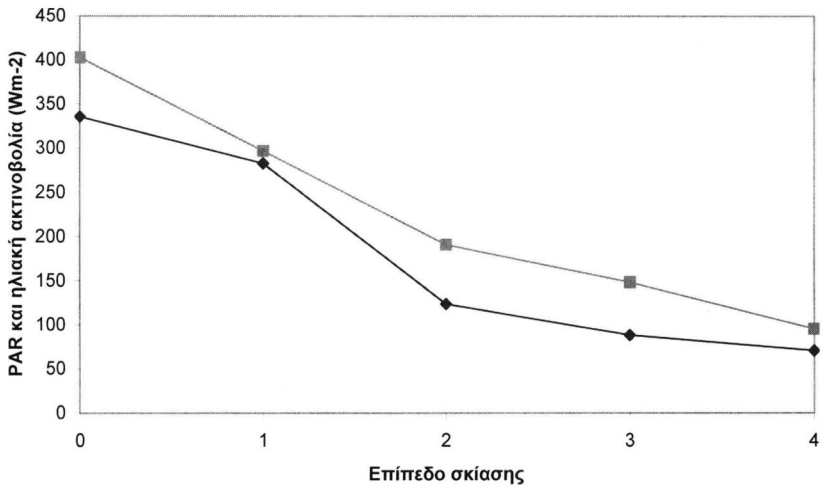


**Σχήμα 5.21:** Μετρήσεις πλάτους βιοσήματος με μηδενικό επίπεδο σκίασης (-), κατά την 1<sup>η</sup> (-), 2<sup>η</sup> ( ), 3<sup>η</sup> (-), και 4<sup>η</sup> (-) στρώση του δίχτυου σκίασης.

Ο λόγος για τον οποίο παρατηρούνται οι μεταβολές του πλάτους του βιοσήματος οφείλεται στο ότι τα φυτά ανταποκρίνονται γρήγορα στις αλλαγές της φωτεινής έντασης, (Davies and Schuster 1981; Davies 1983; Davies et al. 1991). Αυτές οι αντιδράσεις μπορούν να εμφανιστούν στα απόμακρα μέρη των φυτών αμέσως μετά την εμφάνιση του ερεθίσματος, (Stankovich and Davies 1996).

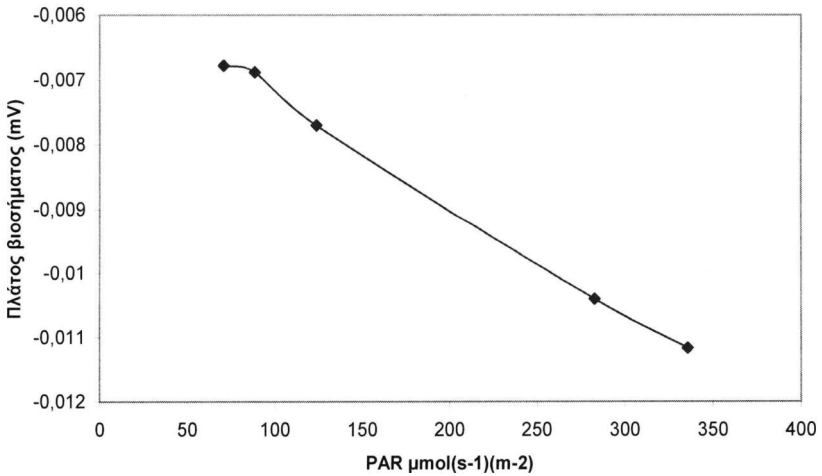
Στο σχήμα 5.22 παρουσιάζεται η μεταβολή της ολική ηλιακής ακτινοβολίας ( $Wm^{-2}$ ) καθώς και η ενεργό φωτοσυνθετική ακτινοβολία (PAR) κατά την μεταβολή της έντασης ηλιακής ακτινοβολίας μέσω του δίχτυ σκίασης σε 4 διαδοχικές στρώσεις.





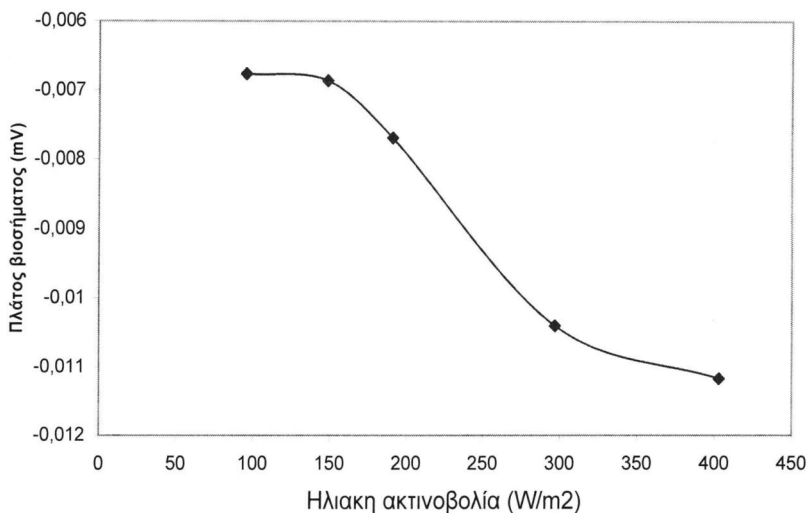
**Σχήμα 5.22:** Επίπεδα μεταβολής ολικής ηλιακής ακτινοβολίας (-) και ενεργούς φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας(-) κατά τη σκίαση του φυτού σε 4 διαδοχικές στρώσεις.

Στο σχήμα 5.23 παρουσιάζεται η συσχέτιση ( $R^2 = 0,997$ ) του πλάτους του βιοσήματος με το επίπεδο της ενεργό φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας.



**Σχήμα5.23:** Συσχέτιση επίπεδου ενεργούς φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας και του πλάτους του βιοσήματος.

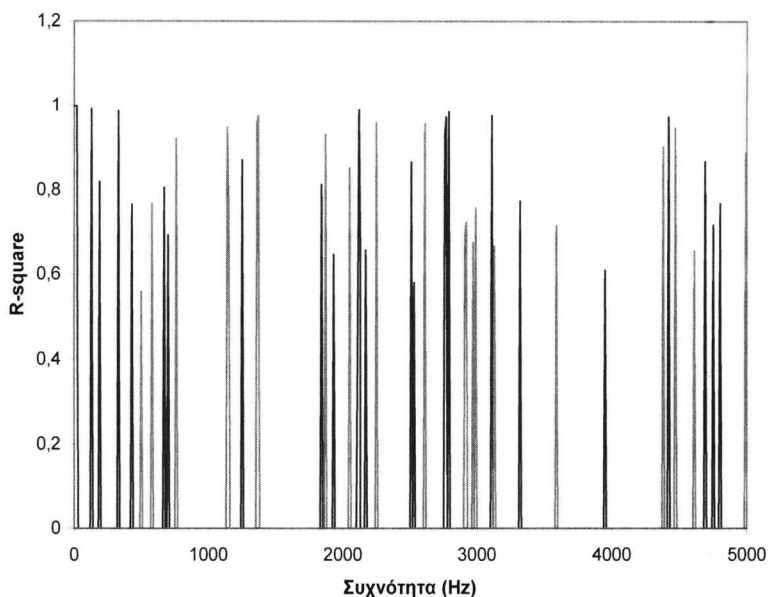
Στο σχήμα 5.24 παρουσιάζεται η συσχέτιση  $R^2 = 0,94$ , του πλάτους του βιοσήματος με το επίπεδο της ολικής ηλιακής ακτινοβολίας.



**Σχήμα 5.24:** Συσχέτιση επίπεδου ολική ακτινοβολίας και ηλεκτρικού δυναμικού βιοσήματος.

Τα αποτελέσματα της συσχέτισης των δύο μετρήσιμων φαινομένων της ολικής και της φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας δείχνουν ότι το βιοσήμα του φυτού μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τη φωτοσυνθετική συμπεριφορά του, γεγονός που έχει αντίκτυπο στην ισορροπία των ιόντων σε όλη τη πλασματική μεμβράνη, οδηγώντας στην αλλαγή του διαμεμβρανικού δυναμικού (Koziolek et al. 2004; Knight & Knight 2001; Zhu 2001, 2002). Από το πεδίο συχνοτήτων του φάσματος των μετρήσιμων ηλεκτρικών δυναμικών των βιοσημάτων συσχετίστηκαν με την μέθοδο Least Square όλες οι συχνότητες που παρουσίασαν συμμεταβολές (αύξουσα ή φθίνουσα μεταβολή) με το πλάτος του σήματος.

Στο σχήμα 5.25 παρουσιάζονται οι συχνότητες που παρουσίασαν συμμεταβολή (αύξουσα και φθίνουσα) με το πλάτος του βιοσήματος.



**Σχήμα 5.25:** Συμμεταβαλόμενες συχνότητες με αυξανόμενο (-), και με φθίνων (-) πλάτος.

Εξετάζοντας την ομάδα των συμμεταβαλόμενων συχνοτήτων που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια των μετρήσεων στην πειραματική διάταξη 5.3 (*Ηλεκτροφυσιολογικών φαινομένων στην απόκριση διαφορετικών ερεθισμάτων και συσχέτιση φάσματος – φαινομένου*) παρατηρούμε την ύπαρξη κοινών συμμεταβαλλόμενων συχνοτήτων και για τις δύο πειραματικές μελέτες. Και στις δύο πειραματικές μελέτες χρησιμοποιήθηκε το φυτό χρυσάνθεμο. Στον πίνακα 5.3 και 5.4 παρουσιάζονται οι κοινές συμμεταβαλόμενες συχνότητες με αύξων και φθίνων πλάτος αντίστοιχα που παρατηρήθηκαν κατά τις δύο πειραματικές μελέτες.

Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι οι κοινές συχνότητες κατά τις δύο πειραματικές μελέτες δείχνουν να συσχετίζονται με το φαινόμενο της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας (PAR). Η ύπαρξη περισσότερων από μία συχνότητα μπορεί να συσχετίζεται με το επίπεδο του φάσματος της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας.

Η συσχέτιση αυτή μπορεί να αποτελέσει παράγοντα ελέγχου του επιπέδου της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας σε μια καλλιέργεια.

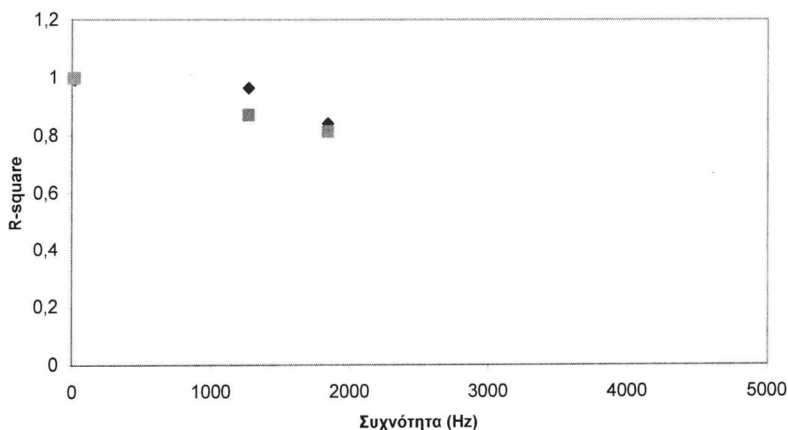
**Πίνακας 5.3:** Κοινές συμμεταβαλόμενες συχνότητες με φθίνων πλάτος κατά την πειραματική μελέτη 5.3 και 5.4.

Συχνότητα (Hz)	R – square (πειραματική μελέτη 5.3)	R – square (πειραματική μελέτη 5.4)
10	0,997	0,998
20	0,993	0,998
1270	0,964	0,871
1840	0,841	0,813

**Πίνακας 5.4:** Κοινές συμμεταβαλόμενες συχνότητες με αυξανόμενο πλάτος κατά την πειραματική μελέτη 5.3 και 5.4.

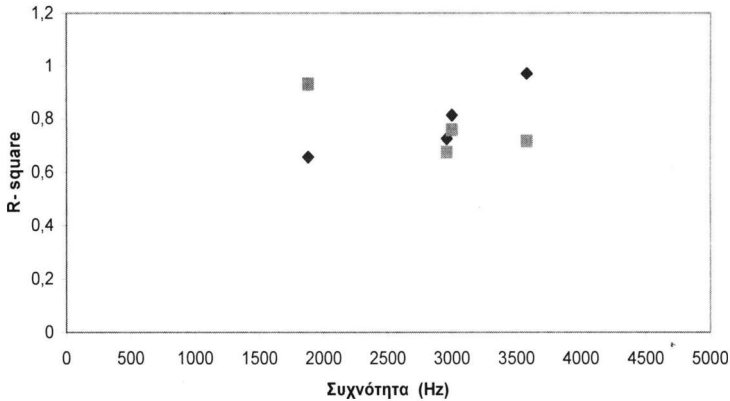
Συχνότητα (Hz)	R – square (πείραμα 2)	R – square (πείραμα 3)
1880	0,656	0,931
2960	0,726	0,675
3000	0,814	0,759
3580	0,971	0,717

Στα σχήμα 5.26 παρουσιάζονται οι συμμεταβαλόμενες συχνότητες με φθίνων πλάτος στο πεδίο συχνοτήτων κατά την πειραματική μελέτη 5.3 και 5.4.



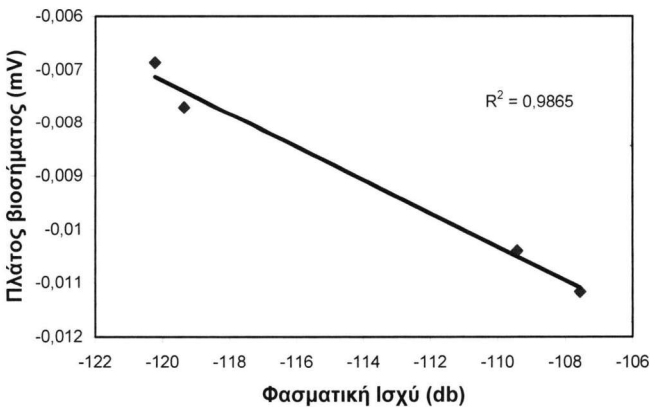
**Σχήμα 5.26 :** Συμμεταβαλόμενες συχνότητες με φθίνων πλάτος κατά την πειραματική μελέτη 5.3 (■) και 5.4(◆).

Στα σχήμα 5.27 παρουσιάζονται οι συμμεταβαλόμενες συχνότητες με αυξανόμενο πλάτος στο πεδίο συχνοτήτων κατά την πειραματική μελέτη 5.3 και 5.4.



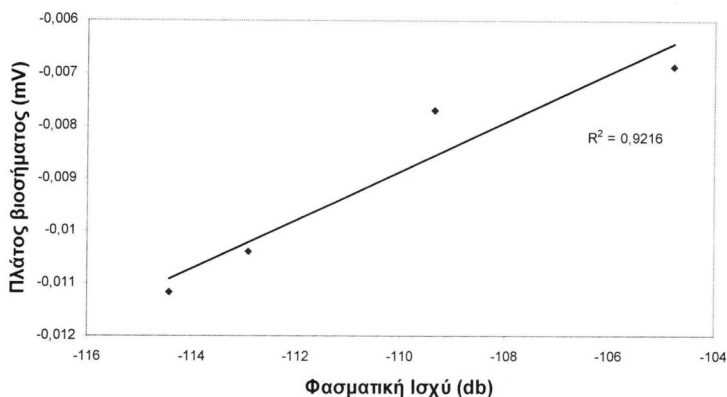
**Σχήμα 5.27:** Συμμεταβαλλόμενες συχνότητες με αυξανόμενο πλάτος κατά την πειραματική μελέτη 5.3 (■) και 5.4 (◆).

Από την καταγραφή των κοινών συμμεταβαλλόμενων συχνοτήτων κατά την πειραματική μελέτη 5.3 και 5.4 παρατηρήθηκε γραμμική συμμεταβολή στο ρυθμό πλάτος του σήματος για τις συγκεκριμένες συχνότητες. Ο ρυθμός μεταβολής του σήματος μπορεί να συσχετιστεί με τον ρυθμό μεταβολής της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας. Η συσχέτιση αυτή μπορεί να αποτελέσει παράγοντα ελέγχου του χρόνου αντίδρασης του φυτού στις μεταβολή του επιπέδου της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας (Ch Lykas, K. Kalonrektis, et al, 2011). Στο σχήμα 5.28 παρουσιάζεται παράδειγμα γραμμικής συμμεταβολής για την αρμονική 330 Hz με φθίνων πλάτος που βρέθηκε κατά την πειραματική μελέτη 5.3(-)και 5.4 (-).



**Σχήμα 5.28:** Αρμονική 330 Hz με φθίνων πλάτος που βρέθηκε κατά την πειραματική μελέτη 5.3 (■)και 5.4 (◆).

Στο σχήμα 5.29 παρουσιάζεται παράδειγμα γραμμικής συμεταβολής για την αρμονική 760 Hz με αυξανόμενο πλάτος που βρέθηκε κατά την πειραματική μελέτη 5.3 και 5.4.

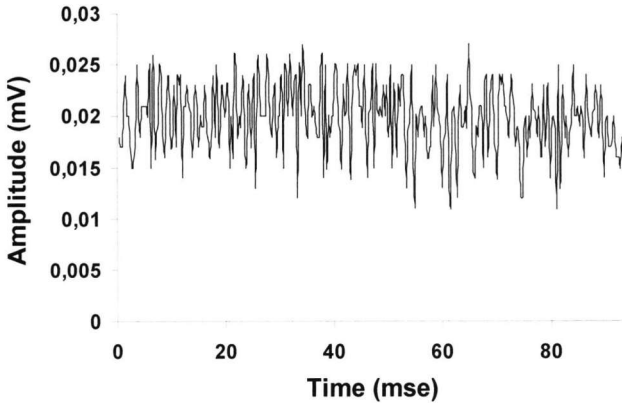


**Σχήμα 5.29:** Αρμονική 760 Hz με αυξανόμενο πλάτος που βρέθηκε κατά την πειραματική μελέτη 5.3 (—) και 5.4 (—).

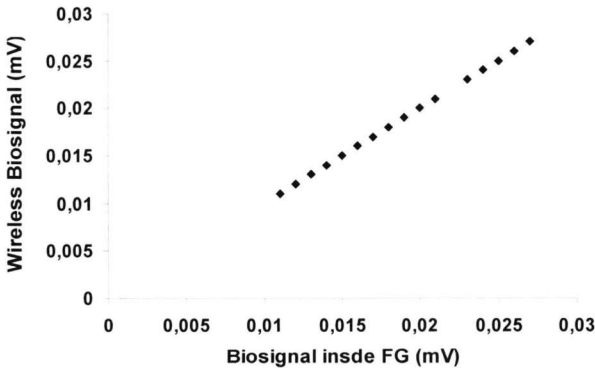
## 5.5 Χρήση σχεδιασμένου ενσωματωμένου συστήματος έναντι ενσύρματου συστήματος απόκτησης βιοσημάτων

### 5.5.1 Ασύρματο και ενσύρματο σύστημα απόκτησης βιοσημάτων

Το ηλεκτρικό δυναμικό των βιοσημάτων που αποκτήθηκε μέσα στο κλωβό faraday από το ενσύρματο σύστημα και από το σχεδιασμένο ασύρματο ενσωματωμένο σύστημα παρουσιάζουν το ακριβώς το ίδιο βιόσημα (σχ5.30). Η συσχέτιση των δύο σημάτων παρουσιάζεται στο σχήμα 5.31 ( $R^2=1$ ). Η γραμμική συσχέτιση που παρουσιάζεται στο σχήμα σημαίνει ότι το μεταδιδόμενο σήμα μέσω του ασύρματου σχεδιασμένου ενσωματωμένου συστήματος δεν επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς θορύβους λόγω της 128-bit κρυπτογράφησης του πρωτοκόλλου ZigBee (Ferens, K. Et all 2009). Συνεπώς το ασύρματο ενσωματωμένο σύστημα είναι κατάλληλο για χρήση σε περιβάλλοντα θορύβου όπως αυτό σε ένα πραγματικό θερμοκήπιο.

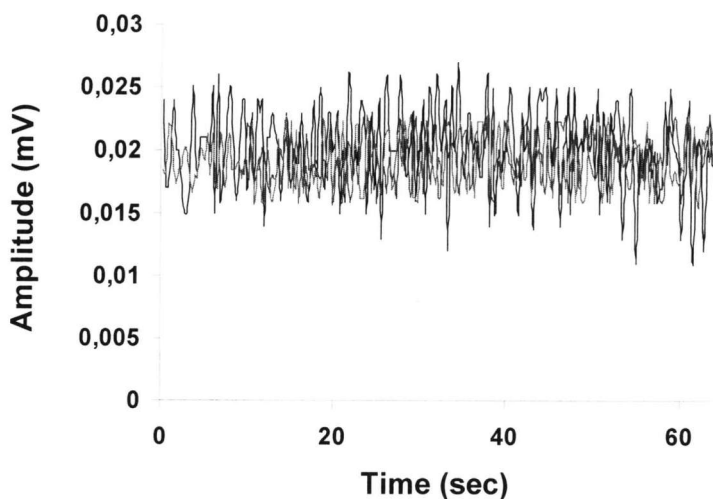


**Σχήμα 5.29 :** Ηλεκτρικό δυναμικό βιοσήματος που αποκτήθηκε μέσα στο κλωβό faraday από το ενσύρματο σύστημα και από το σχεδιασμένο ασύρματο ενσωματωμένο σύστημα.



**Σχήμα 5.30:** Συσχέτιση βιοσημάτων εσωτερικά στον κλωβό και εξωτερικά μέσω του ασύρματου ενσωματωμένου συστήματος ( $R^2=1$ ).

Επίσης η φασματική ανάλυση του σήματος των δύο αποκτημένων βιοσημάτων δεν παρουσίασε διαφοροποιήσεις. Στην περίπτωση απόκτησης ηλεκτρικού δυναμικού των βιοσημάτων μέσω ενσύρματης μετάδοσης εξωτερικά του κλωβού Faraday παρουσιάστηκε διαφορά στο αποκτημένο πλάτος του σήματος.

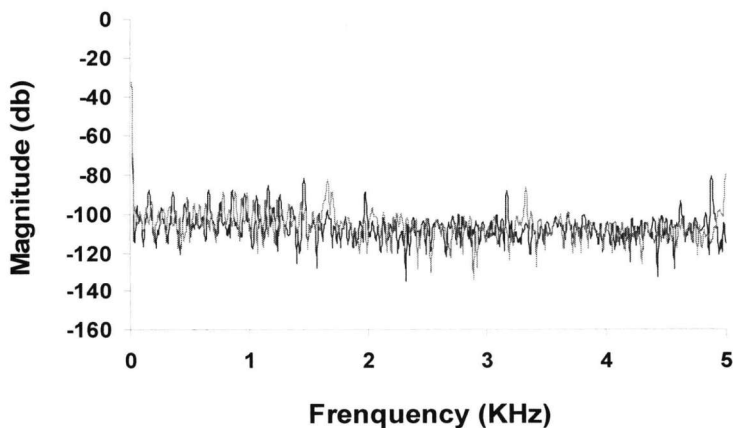


**Σχήμα 5.31:** Βιοσήματα εσωτερικά του κλωβού FC (-), και μέσω ενσύρματης απόκτησης έξω από τον κλωβό FC (-).

Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο μήκος των αγωγών που συνδέουν τα ηλεκτρόδια με το ενσύρματο σύστημα. Η μείωση του πλάτους του σήματος ήτανε -5db για το μήκος των 15m που χρησιμοποιήθηκε (D.W. Pryer, P.F. 2003). Επίσης η χρήση του μεγάλου μήκους αγωγού παρουσιάζει μείωση του πλάτους για διαφορετικές συχνότητες του φάσματος του σήματος (Rowe, Standord H. 2002). Το επίπεδο συσχέτισης του μεταξύ του αποκτημένου βιοσήματος εσωτερικά του κλωβού faraday και εξωτερικά μέσω του ενσύρματου συστήματος απόκτησης ήτανε μηδενικό ( $R^2=0,0063$ ).

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι το αποκτημένο ηλεκτρικό δυναμικό του βιοσήματος μέσω του ενσύρματου συστήματος επηρεάζεται δυναμικά από την επίδραση του λευκού θορύβου του περιβάλλοντος προκαλώντας μείωση πλάτους στο φάσμα του σήματος (Rowe, Standor 2002). Για το λόγο αυτό η ανάλυση φάσματος του σήματος παρουσιάζει διαφορετικές αρμονικές σε σχέση με το αποκτημένο βιόσημα εσωτερικά του κλωβού faraday (σχ5.32).

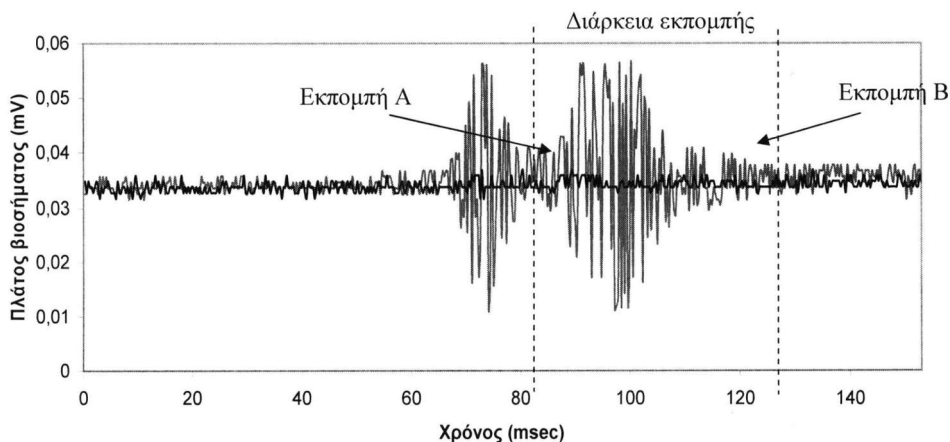




**Σχήμα5.32:** Φασματική ανάλυση εσωτερικά του κλωβού FC (-), και μέσω ενσύρματης απόκτησης έξω από τον κλωβό FC (-).

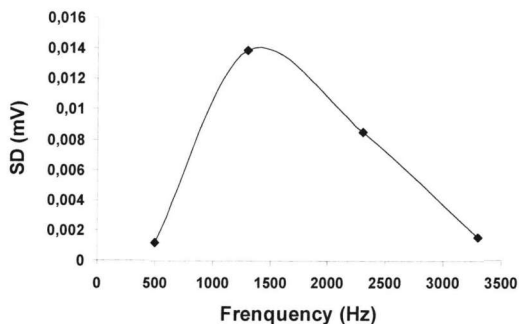
### 5.5.2 Επίδραση σήματος θορύβου στο σχεδιασμένο ασύρματο ενσωματωμένο σύστημα

Κατά την διάρκεια της EMI ακτινοβολίας τα αποκτημένα ηλεκτρικά δυναμικά των βιοσημάτων παρουσιάζονται στο σχήμα 5.33.



**Σχήμα5.33:** Επίδραση της EMI ακτινοβολίας μέσω ενσύρματης (-) και ασύρματης μετάδοσης (-) σήματος.

Η ασύρματη μετάδοση μέσω του σχεδιασμένου συστήματος δεν παρουσίασε επίδραση από την παρεμβολική ακτινοβολία σε αντίθεση με την επίδραση του δέχτηκε η ενσύρματη μεταφορά του βιοσήματος. Το μέγεθος του πλάτους της επίδρασης εξαρτάται από το μήκος του καλωδίου. Μέγιστη επίδραση της EMI ακτινοβολίας παρουσιάστηκε κατά την εκπομπή σήματος με συχνότητα από 1000 έως 2500 Hz (σχ 5.34)



**Σχήμα 5.34:** Τυπική απόκλιση από την επίδραση της EMI ακτινοβολίας.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι το αποκτημένο ηλεκτρικό δυναμικό του βιοσήματος μέσω του ενσύρματου συστήματος επηρεάζεται δυναμικά από την επίδραση EMI ακτινοβολίας προκαλώντας σφάλματα στην απόκτηση του βιοσήματος. Αντίθετα το αναπτυγμένο ενσωματωμένου συστήματος μέτρησης βιοηλεκτρικών σημάτων επηρεάστηκε από την EMI ακτινοβολία χαρακτηρίζοντας το ιδανικό για μετάδοση βιοηλεκτρικών σημάτων σε μεγάλες αποστάσεις με μηδενικά σφάλματα μέτρησης στο αποκτημένο βίσημα (Kalonrektis et all 2010).

# 6

## Συμπεράσματα - προτάσεις

---

### 6.1 Συμπεράσματα

Στη διατριβή αυτή παρουσιάστηκε η ανάπτυξη ενός προηγμένου συστήματος απόκτησης βιοηλεκτρικών σημάτων για τη μελέτη ηλεκτροφυσιολογικών φαινομένων σε φυτικούς οργανισμούς καθώς και οι πειραματικές μέθοδοι και διατάξεις που εφαρμόστηκαν: α) για την αξιολόγηση του συστήματος και β) για την συσχέτιση των ηλεκτροφυσιολογικών φαινομένων με τα αίτια που τα προκάλεσαν.

Τα συμπεράσματα που παράγονται από την διατριβή είναι:

1. Βιοσήματα σε επίπεδο φυτικών οργανισμών μπορούν να ανιχνευθούν, να αποκτηθούν και να επεξεργαστούν μέσω του προηγμένου συστήματος μετρήσεων βιοσημάτων που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της διατριβής. Το μετρητικό σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ηλεκτροφυσιολογικών φαινομένων που προκαλούνται από κλιματικές

- αλλαγές του περιβάλλοντος και του υποστρώματος μέσα στο οποίο αναπτύσσεται το φυτό.
2. Η χρήση αισθητήρα επαφής Ag/AgCl διαμέτρου για την λήψη βιοσημάτων πρέπει να είναι μικρότερη των 5mm ώστε να μην επιφέρει σφάλματα κατά την λήψη των μετρήσεων. Η χρήση μεγαλύτερης διαμέτρου αισθητήρα επιφέρει σφάλματα στο πλάτος του βιοσήματος.
  3. Το μέγεθος του φύλλου τοποθέτησης των αισθητήρων επαφής δεν επιδρά στην εύρος και το πλάτος του βιοσήματος.
  4. Η απόσταση μεταξύ των αισθητήρων επαφής Ag/AgCl (μέχρι 20 cm) δεν επιδρά στο πλάτος του σήματος.
  5. Μεταβολή του πλάτους του βιοσήματος μπορεί να προκληθεί από αβιοτικούς παράγοντες που επηρεάζουν την βιολογική λειτουργία και την ανάπτυξη του φυτού.
  6. Το πλάτος του σήματος μπορεί να μεταβάλλεται δυο ή και περισσότερους διαφορετικούς παράγοντες με συνέπεια να μη μπορεί να γίνει διακριτή συσχέτιση του φαινομένου με το αίτιο που το προκαλεί.
  7. Η ανάλυση του φάσματος του ηλεκτρικού δυναμικού των βιοσημάτων παρέχει πληροφορίες μέσω απομόνωσης συγκεκριμένης συχνότητας ή ομάδας συχνοτήτων και ανάλυσης των χαρακτηριστικών τους για το φαινόμενο που επηρεάζει την βιολογική λειτουργία και την ανάπτυξη του φυτού από συγκεκριμένη διαταραχή που μπορεί να προέρχεται από διαφορετικά αίτια.
  8. Η ανάλυση του φάσματος του ηλεκτρικού δυναμικού των βιοσημάτων έδειξε ότι το επίπεδο της αγωγιμότητας (EC) μπορεί να συσχετιστεί με συγκεκριμένες συχνότητες του φάσματος οι οποίες συσχετίζονται με το φαινόμενο.
  9. Ο ρυθμός μεταβολής του σήματος των συγκεκριμένων συχνοτήτων που συσχετίζονται με το επίπεδο της αγωγιμότητας (EC) μπορεί να αποτελέσει παράγοντα μέτρησης του χρόνου αντίδρασης του φυτού στις μεταβολή της αγωγιμότητας.
  10. Η ανάλυση του φάσματος του ηλεκτρικού δυναμικού των βιοσημάτων έδειξε ότι το επίπεδο της εναργούς φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας (PAR) μπορεί να συσχετιστεί με συγκεκριμένες συχνότητες του φάσματος οι οποίες συσχετίζονται με το φαινόμενο.

11. Ο ρυθμός μεταβολής του σήματος συγκεκριμένων συχνοτήτων που συσχετίζονται με το επίπεδο της ενεργούς φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας PAR μπορεί να αποτελέσει παράγοντα μέτρησης του χρόνου αντίδρασης του φυτού στις μεταβολή του επιπέδου της ενεργού φωτοσυνθετικής ακτινοβολίας.
12. Η απόκτηση ηλεκτρικών δυναμικών των βιοσημάτων μέσω ενσύρματης μετάδοσης σε μεγάλη απόσταση από το φυτό επηρεάζει την μορφή του βιοσήματος ως προς το πλάτος και τη σύνθεση των συχνοτήτων του. Σε απόσταση 15m παρουσιάστηκε παραμόρφωση του πλάτους του σήματος κατά 50%.
13. Για θορυβώδη περιβάλλοντα όπως σε ένα θερμοκήπιο ή σε έναν εξωτερικό χώρο (ανοιχτή καλλιέργεια) το αναπτυγμένο ασύρματο ενσωματωμένο σύστημα μέτρησης βιοσημάτων μπορεί να ανίχνευση, και να μετάδοση χωρίς το βίσημα του φυτού δίχως επίδραση παρεμβολών EMI του περιβάλλοντα χώρου.

Η συνεισφορά του συστήματος που αναπτύχθηκε καθώς και των μεθόδων επεξεργασίας των βιοσημάτων μπορούν να βοηθήσουν στον προσδιορισμού των φυσιολογικών διεργασιών που αποτελούν αντιδράσεις του φυτού σε ένα συγκεκριμένο παράγοντα (προσβολή από εχθρούς ή ασθένειες, έλλειψη νερού ή θρεπτικών στοιχείων κ.α.) και στην γρήγορη διάγνωση και κάλυψη των αναγκών της καλλιέργειας με τη χρήση των βιοσημάτων όταν ακόμα δεν έχουν εμφανιστεί συμπτώματα καταπόνησης από την επίδραση βιοτικών (προσβολή από εχθρούς ή ασθένειες) ή αβιοτικών παραγόντων (έλλειψη νερού ή θρεπτικών στοιχείων, υψηλά ή χαμηλά επίπεδα φωτισμού, θερμοκρασίας, υγρασίας ή αλατότητας), βοηθώντας στην έγκυρη αντιμετώπιση του προβλήματος, στην αύξηση της παραγωγής και στην αναβάθμιση της ποιότητας του παραγόμενου προϊόντος

## 6.2 Προτάσεις

Αρκετοί ερευνητικοί τομείς διερεύνησης ηλεκτροφυσιολογικών φαινομένων παραμένουν στο χώρο των φυτικών οργανισμών. Στις επόμενες παραγράφους

παρουσιάζεται το μελλοντικό ερευνητικό έργο, το οποίο πηγάζει απευθείας από την πρόοδό μας σε αυτή τη διατριβή.

Η δυνατότητα αξιοποίησης του βιοσήματος δεν περιορίζεται μόνο στην καλύτερη κατανόηση της επίδρασης των βιοκλιματικών παραγόντων στα φυτά αλλά στοχεύει κυρίως τον έλεγχο του περιβάλλοντος στον οποίο αυτά αναπτύσσονται, μέσω μιας αυτόματης διαδικασίας δράσης και ανάδρασης του φυτού στον περιοριστικό για την ανάπτυξη του παράγοντα. Για να επιτευχθεί ωστόσο αυτό χρειάζεται επιπλέον στοχευόμενη έρευνα σε θέματα που να αφορούν:

1. Την ανάπτυξη αισθητήρων επαφής που θα μπορούν να παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα πάνω σε φυτά που αναπτύσσονται σε εμπορικό θερμοκήπιο, χωρίς να μεταβάλουν τα χαρακτηριστικά τους.
2. Την ανάπτυξη αισθητήρων δίχως να έρχονται σε επαφή με το φυτικό οργανισμό.
3. Τη συσχέτιση συγκεκριμένων βιοκλιματικών παραμέτρων (βιοτικών και αβιοτικών) με συγκεκριμένες φασματικές συχνότητες του βιοσήματος.
4. Την ανάπτυξη κατάλληλου λογισμικού για την επεξεργασία του βιοσήματος και τη διαχείριση του κλίματος του θερμοκηπίου με χρήση των βιοσημάτων.
5. Την σχεδίαση ενσωματωμένων μονάδων μέτρησης βιοσημάτων σε επίπεδο κυτταρικής μεμβράνης που θα φέρει ο φυτικός οργανισμός στο στέλεχος του.
6. Την ανάπτυξη κώδικα προδιάθεσης ασθενειών μέσω ανάλυσης του βιοσήματος των φυτών για την έγκυρη αντιμετώπιση τους στα αρχικά στάδια.
7. Την βελτίωση της σχεδίαση του ενσωματωμένου συστήματος μέτρησης σε ένα ολοκληρωμένο κύκλωμα πολύ μικρότερης κλίματας (System on Chip) για την εύκολη τοποθέτηση του επάνω στο φυτό.
8. Την ανάπτυξη τεχνική μέτρησης δίχως τη μέχρι τώρα απαραίτητη χρήση του κλωβού Faraday για την αποφυγή παρεμβολών EMI.

Οι εμπορικές εφαρμογές που θα να προκύψουν με την ολοκλήρωση των παραπάνω πεδίων έρευνας θα είναι καινοτόμες ως προς τη διαχείριση των θερμοκηπιακών μονάδων την καταπολέμηση εχθρών και ασθενειών στα φυτά αλλά και τον έλεγχο βρώσιμων προϊόντων φυτικής παραγωγής.

# **Ανάπτυξη Προηγμένων Μετρητικών Συστημάτων & Τεχνικών για Ηλεκτροφυσιολογικά Φαινόμενα**

Εργασίες που προέκυψαν από τη διδακτορική διατριβή και υποβλήθηκαν σε συνέδρια και περιοδικά:

## **1. (J) Περιοδικά**

- J1. George Fourlas, Konstantinos Kalovrektis, and Evangelos Fountas, 'Application of Robot Formation Scheme for Screening Solar Energy in a Greenhouse', International Journal of Applied Science, Engineering and Technology 2009 (Volume 5 Number 2 Spring 2009 page 109-116).
- J2. Kalovrektis K, Ganetsos Th, Shammass N. Y. A., Taylor I., Lykas Ch, Andonopoulos I, Lekakis I, 'Development of an advanced embedded system for description of electrophysiological phenomena in ornamental plants by biosignals processing', WSEAS TRANSACTIONS ON CIRCUITS AND SYSTEMS, Transactions ID Number: 52-710. (Submitted).

## **2. (C) Εθνικά και διεθνή συνέδρια**

- C1. Konstantinos Kalovrektis, Theodore Ganetsos, Evaggelos Fountas, Georgia Tzitzili, 'Development of Wireless Embedded System Using ZigBEE Protocol to Avoid White Gaussian Noise and 50 Hz Power Line Noise in ECG and Pressure Blood Signals', August 2008, PCI '08: Proceedings of the 2008 Panhellenic Conference on Informatics.
- C2. Καλοβρέκτης Κ., Λύκας Χ., Φούντας Ε., Κίττας Κ., 'Ανάλυση του βιοσήματος του χρυσανθέμου και συσχέτιση των βασικών χαρακτηριστικών του με την τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο επίπεδο της ρίζας του φυτού', Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, Βέροια, 20-23 Οκτωβρίου 2009a.
- C3. Identification of high salinity stress in ornamental plant by biosignal process' Kalovrektis K, Lykas Ch. Fountas E, 4th Balkan Conference in Informatics, Thessaloniki, GREECE, September 17th- 19th, 2009b.
- C4. Konstantinos Kalovrektis, Theodore Ganetsos, Evangelos Fountas, N. Y. A. Shammass, I. Taylor, John Andonopoulos, Nikolaos Laskaris, Gkotsinas Antonios, 'Development of a wireless

embedded system to reduce the influence of Gaussian noise and 50 Hz power line noise in electromyography (EMG)', July 2009, ICC'09: 13th WSEAS international conference on Circuits.

C5.Καλοβρέκτης Κ, Σχεδίαση ενσωματωμένου φίλτρου σε σύστημα απόκτησης σημάτων χαμηλού ρυθμού, Ημερίδα με θέμα: Προηγμένα Συστήματα Απόκτησης & Επεξεργασίας Τεχνικών και Βιολογικών Μετρήσεων', Πανεπιστήμιο Στερεάς Ελλάδας Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική, 23 Απριλίου 2010 Λαμία.

C6.Konstantinos Kalovrektis, Theodore Ganetsos, N. Y. A. Shamma, I. Taylor, John Andonopoulos, Lykas Christos, 'An integrated development hardware design for an advanced wireless Ag/AgCl sensor to acquiring biosignals form ornamental plants', January 2010, CISST'10: Proceedings of the 4th WSEAS international conference on Circuits, systems, signal and telecommunications. Harvard University, Cambridge, USA January 27-29, 2010

C7.Ch. Lykas, K. Kalovrektis, V. Pigadas, 'Use the biosignal analysis to indicate the respond of chrysanthemum (Chrysanthemum morifolium) plant to PAR intensity', 'Advanced technologies and management towards sustainable greenhouse ecosystems-GreenSys2011', Halkidiki, Greece, 5 -10 June 2011 (Accepted).

### 3. (B) Υλικό της διατριβής αποτέλεσε κεφαλαία στα παρακάτω βιβλία

B1.Καλοβρέκτης Κ., 'Αισθητήρες Μέτρησης και Ελέγχου' Κωδικός Βιβλίου στον Εύδοξο: 34261, ISBN: 978-960-418-293-0. Κεφάλαιο 14: Αισθητήρες βιοηλεκτρικών σημάτων.

B2.Καλοβρέκτης Κωνσταντίνος, Γκοτσινας Αντόνιο, ' MultiSim για Μηχανικούς', Κωδικός Βιβλίου στον Εύδοξο: 9303, ISBN: 978-960-418-209-1 Κεφάλαιο 5: Αναλογικοί Ψηφιακοί και Ψηφιακοί Αναλογικοί Μετατροπής (Σχεδίαση συστημάτων απόκτηση δεδομένων)

### 4. (Ref) Αναφορές από τρίτους

*Αναφορά στην εργασία C1*

Ref1.Dayu, He. (2010). The ZigBee Wireless Sensor Network in Medical Care Applications, 2010 International Conference on Computer, Mechatronics, Control and Electronic Engineering (CMCE)

*Αναφορά στην εργασία C6*

Ref1.K. Tsiakmakis, N.Charalampidis, N. Mallios, M. Spasos, 'Design and Development of an Optimized Low Power Wireless Sensor Network based on ZigBee for Agricultural Applications, '



COMPUTERS and SIMULATION in MODERN SCIENCE Volume III. Title: Generating Content Recommendation for Adaptive Web-Based Systems. Authors: Bujar Raufi , Juliana Georgieva, Artan Luma, F. Ismaili, Xhemal Zenuni. Publisher: Year: 2010. ISSN: 1792-6882, ISBN: 978-960-474-256-1. pg. 248-257.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbink TEM, Peart JR, Mos TNM, Baulcombe DC, Bol JF, Linthorst HJM (2002) Silencing of a gene encoding a protein component of the oxygen-evolving complex of photosystem II enhances virus replication in plants. *Virology* 295:307–319
- Abe S, Takeda J, Senda M (1980) Resting membrane potential and action potential of *Nitella expansa* protoplasts. *Plant Cell Physiol* 21:537–546
- Abe T (1981) Chloride ion efflux during an action potential in the main pulvinus of *Mimosa pudica*. *Bot Mag* 94:79–383
- Adamec L, Krekule J (1989a) Changes in membrane potential in *Chenopodium rubrum* during the course of photoperiodic flower induction. *Biol Plant* 31:336–343
- Adamec L, Krekule J (1989b) Changes in transorgan electric potential in *Chenopodium rubrum* during the course of photoperiodic flower induction. *Biol Plant* 31:344–353
- Adamec L, Machackova I, Krekule J, Novakova M (1989) Electric current inhibits flowering in the short-day plant *Chenopodium rubrum* L. *J. Plant Physiol* 134:43–46
- Alberts B, Bray D, Lewis J et al. (2002) *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York
- Alexander G, Volkov , Daniel J. Collins , John Mwisigwa, ‘Plant electrophysiology: pentachlorophenol induces fast action’, potentials in soybean, *Plant Science* 153 (2000) 185–190
- Alexander G. Volkov, ‘Green plants: electrochemical interfaces’, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 483 (2000) 150–156
- Alexander G. Volkov, Tanya C. Dunkley, Simone A. Morgan, David Ruff II, Yuel L. Boyce, Anthony J. Labady, ‘Bioelectrochemical signaling in green plants induced by photosensory systems’, *Bioelectrochemistry* 63 (2004) 91–94
- Alexander G. Volkov, Tanya C. Dunkley, Simone A. Morgan, David Ruff II, Yuel L. Boyce, Anthony J. Labady, ‘Bioelectrochemical signaling in green plants induced by photosensory systems’, Department of Chemistry, Oakwood College, Huntsville, AL 35896, USA
- Antkowiak B, Mayer WE, Engelmann W (1991) Oscillations in the membrane potential of pulvinar motor cells in situ in relation to leaflet movements of *Desmodium motorium*. *J Exp Bot* 42:901–910
- Βαλάση, Ε. 2006. Εργασία Msc. Κεφ. 2. ‘Μέθοδοι ανάλυσης των προκλητών δυναμικών.
- Βασιλόπουλος Κ. 2001. Εργασία Bsc. Κεφαλαίο, Επεξεργασία σήματος
- Baluska F, Mancuso S, Volkmann D (2006) *Communications in plants. Neuronal aspects of plant life*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Beilby MJ, Coster HGL (1979) The action potential in *Chara corallina*. II. Two activation-inactivation transients in voltage clamps of plasmalemma. *Aust J Plant Physiol* 6:329–335
- Bendat, A G. Piersol. Random data: Analysis and measurement procedures.
- Bertholon (1783) *De l’electricite des vegetaux*. Paris
- Biskup B, Gradmann D, Thiel G (1999) Calcium release from InsP3-sensitive internal stores initiates action potential in *Chara*. *FEBS Lett* 453:72–76

- Blackman VH (1924) Field experiments in electroculture. *J Agricult Sci* 14:240–267
- Bois-Reymond DE (1848) *Untersuchungen über Thierische Electricität, Erster Band*. Reimer, Berlin, pp 7–10
- Bois-Reymond DE (1848) *Untersuchungen über Thierische Electricität, Erster Band*. Reimer, Berlin, pp 7–10
- Bose JC (1907) *Comparative electro-physiology, a physico-physiological study*. Longmans Green, London
- Bose JC (1914) An automatic method for the investigation of velocity of transmission of excitation in mimosa. *Philos Trans B* 204:63–97
- Bose JC (1925) Physiological and anatomical investigations on *Mimosa pudica*. *Proc R Soc Ser B* 98:280–299
- Bose JC (1925) Transmission of stimuli in plants. *Nature* 115:457–457
- Bose JC (1926) *The nervous mechanism of plants*. Longman Green, London
- Bose JC (1926) *The nervous mechanism of plants*. Longmans Green, New York
- Bose JC (1927) *Plant autographs and their revelations*. Macmillan, New York
- Bose JC, Das GP (1925) Physiological and anatomical investigations on *Mimosa pudica*. *Proc R Soc B* 98:290–312
- Brosche N, Strid A (2003) Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiol Plant* 17:1–10
- Burdon-Sanderson J (1873) Note on the electrical phenomena which accompany stimulation of the leaf of *Dionaea muscipula*. *Proc R Soc Lond* 21:495–496
- Burdon-Sanderson J (1888) On the electromotive properties of *Dionaea* in the excited and unexcited states. *Philos Trans* 179:417–449
- Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R (2005) Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under control of sucrose gradient and pmf. *J Biol Chem* 280:21437–21443
- Castro, I. An introduction to the digital analysis of stationary signal.
- Chemical sensors VI: chemical and biological sensors and analytical methods. Electrochemical Society, Pennington, pp 344–353
- Cole KS, Curtis HJ (1938) Electric impedance of *Nitella* during activity. *J Gen Physiol* 22:37–64
- Cole KS, Curtis HJ (1939) Electric impedance of the squid giant axon during activity. *J GenPhysiol* 22:37–64
- Darwin C (1881) *The power of movements in plants*. Murray, London
- Dat JF, Foyer CH, Scott IM (1998) Changes in salicylic acid and antioxidants during induction of thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol* 118:1455–1461
- Davies E (1983) Action potentials as multifunctional signals in plants: a unifying hypothesis to explain apparently disparate wound responses. *Plant Cell Environ* 10:623–631
- Davies E (1987a) Wound responses in plants. *Biochem Plants* 12:243–264
- Davies E (1987b) Action potentials as multifunctional signals in plants: a hypothesis attempting to unify apparently disparate wound responses. *Plant Cell Environ* 10:623–631
- Davies E (2004) Commentary: new functions for electrical signals in plants. *New Phytol* 161:607–610
- Davies E, Schuster A (1981a) Intercellular communication in plants: Evidence for a rapidly generated, bidirectionally-transmitted wound signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2422–2426
- Davies E, Schuster A (1981b) Wounding, action potentials and polysome formation. *Plant Physiol* 67:538

- Davies E, Shuster A (1981) Intercellular communication in plants: evidence for rapidly generated, bidirectionally transmitted wound signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2422–2426
- Davies E, Stankovic B (2006) Electrical signals, the cytoskeleton, and gene expression: a hypothesis on the coherence of the cellular responses to environmental insult. In: Baluska F,
- Davies E, Zawadzki T, Witters D (1991) Electrical activity and signal transmission in plants: how do plants know? In: Penel C, Greppin H (eds) *Plant signaling, plasma membrane and change of state*, University of Geneva Press, Geneva, Switzerland, pp 119–137
- Davies WJ, Zhang J (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:55–76
- De Jesus, M.A., Rodríguez, Y., Non-uniform discrete short-time fourier transform - A Goertzel filter bank approach
- Dziubinska H (2003) Ways of signal transmission and physiological role of electrical potentials in plants. *Acta Soc Bot Pol* 72:309–318
- Dziubinska H, Trebacz K, Zawadzki T (2001) Transmission route for action potentials and variation potentials in *Helianthus annuus*. *L. J Plant Physiol* 158:1167–1172
- Eschrich W, Fromm J, Evert RF (1988) Transmission of electric signals in sieve tubes of zucchini plants. *Bot Acta* 101:327–331
- Evert RF, Eschrich W, Eichhorn SE (1973) P-protein distribution in mature sieve elements of *Cucurbita maxima*. *Planta* 109:193–210
- Φασσέα, Κ. 2006. Βιολογία του κύτταρου. Σύγγραμμα
- Figliola, D. Beasley. Theory and design for mechanical measurements.
- Fisahn J, Herde O, Willmitzer L, Pena-Cortes H (2004) Analysis of the transient increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> during the action potential of higher plants with high temporal resolution: requirement of Ca<sup>2+</sup> transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PINII gene expression. *Plant Cell Physiol* 45:456–459
- Fromm J (1991) Control of phloem unloading by action potentials in *Mimosa*. *Physiol Plant* 83:529–533
- Fromm J, Bauer T (1994) Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. *J Exp Bot* 273:463–469
- Fromm J, Eschrich W (1988) Transport processes in stimulated and non-stimulated leaves of *Mimosa pudica*. *Trees* 2:7–24
- Fromm J, Fei H (1998) Electrical signaling and gas exchange in maize plants of drying soil. *Plant Sci* 132:203–213
- Fromm J, Spanswick R (1993) Characteristics of action potentials in willow (*Salix viminalis* L.). *J Exp Bot* 264:1119–1125
- Gaffey CT, Mullins LJ (1958) Ion fluxes during the action potential in *Chara*. *J Physiol* 144:505–524
- Glover, D., *Sequence Analysis II: Optimal Filtering and Spectral Analysis - Power Spectral Analysis*.
- Galvani L (1791) *De viribus electricitatis in motu musculari commentarius*. Bononiae Instituti Scientiarum, Bologna
- Gamalei YV, Fromm J, Krabel D, Eschrich W (1994) Chloroplast movement as response to wounding in *Elodea canadensis*. *J Plant Physiol* 144:518–524

- Gradmann D, Mummert H (1980) Plant action potentials. In: Spanswick RM, Lucas WJ, Dainty J (eds) Membrane transport: current conceptual issues. Elsevier/North-Holland Press, Amsterdam, pp 333–344
- Grey WF (1954) The electrical activity of the brain. *Sci Am* 190:54–63
- Gunar II, Sinykhin AM (1963) Functional significance of action currents affecting the gas exchange of higher plants. *Soviet Plant Physiol* 10:219–226
- Haberlandt G (1890) Das reizleitende Gewebesystem der Sinnpflanze. Engelmann, Leipzig
- Haberlandt G (1906) Sinnesorgane im Pflanzenreich zur Perzeption mechanischer Reize. Engelmann, Leipzig
- Haberlandt G (1914) Physiological plant anatomy. Macmillan, London
- Herde O, Atzorn R, Fisahn J, Wasternak C, Willmitzer L, Pena-Cortés H (1996) Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid deficient tomato plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. *Plant Physiol* 112:853–860
- Herde O, Fuss H, Pena-Cortés H, Fisahn J (1995) Proteinase inhibitor II gene expression induced by electrical stimulation and control of photosynthetic activity in tomato plants. *Humboldt Plant Cell Physiol* 36:737–742
- Hille B (2001) Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates, Sunderland, Mass
- Hu JH, 2003. Measurement and research on vegetal bioelectricity under water stress, Dissertation. Ji Lin University, China.
- Hu, Y., et al., Application of time-frequency analysis to somatosensory evoked potential for intraoperative spinal cord monitoring. *J Neurol, Neurosurg Psychiatry*, 2003, 74(1): p. 82-7.
- Hu, Y., et al., Comparison of time-frequency analysis techniques in intraoperative somatosensory evoked potential (SEP) monitoring. *Comput Biol Med*, 2002, 32(1): p. 13-23.
- Jesus L, Muñioz, Jonah Tan, Carlito Adriano, Erwin Roldan, Jack Sadie “Detecting ESD events using a loop antenna”, Electrical Overstress/Electrostatic Discharge Symposium Proceedings, 2000 USA, pp 60-64.
- Julien JL, Desbiez MO, de Jaegher M, Frachisse JM (1991) Characteristics of the wave of depolarization induced by wounding in *Bidens pilosa* L. *J Exp Bot* 42:131–137
- Karpinski S, Gabrys H, Karpinska B, Mullineaux, P (2003) Light perception in plant disease defence mechanisms. *Curr Op Plant Biol* 6:390–396
- Kikuyama M (1986a) Ion fluxes during excitation of Characeae. *Plant Cell Physiol* 27:1213–1216
- Kikuyama M (1986b) Tonoplast action potential of Characeae. *Plant Cell Physiol* 27:1461–1468
- Knight H, Knight MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk *Trends Plant Sci* 6:262–267
- Koziolek C, Grams TE, Schreiber U, Matyssek R, Fromm J (2003) Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals. *New Phytologist* 161:715–722
- Koziolek C, Grams TEE, Schreiber U, Matyssek R, Fromm J (2004) Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals. *New Phytol* 161:715–722
- Krol E, Trebacz K (1999) Calcium-dependent voltage transients evoked by illumination in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant Cell Physiol* 40:17–24

- Ksenzhek OS, Volkov AG (1998) Plant energetics. Academic Press, San Diego
- Kurusu T, Yagala T, Miyao A, Hirochika H, Kuchitsu K (2005) Identification of a putative voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel as a key regulator of elicitor induced hypersensitive cell death and mitogen-activated protein kinase activation in rice. *Plant J* 42:798–809
- Kunkel KAJ (1878) über elektromotorische Wirkungen an unverletzten lebenden Pflanzenteilen. *Arbeiten Botan Institut Würzburg* 2:1–17
- Labady A, Thomas D'J, Shvetsova T, Volkov AG (2002) Plant electrophysiology: excitation waves and effects of CCCP on electrical signaling in soybean. *Bioelectrochem* 57:47–53
- Larkindale J, Knight MR (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene and salicylic acid. *Plant Physiol* 128:682–695
- Lautner S, Grams TEE, Matyssek R, From J (2005) Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiol* 138:2200–2209
- Leng Q, 1998. Modulation effect of acetylcholine on stomatal behavior and signal transduction in higher plant. Ph.D. Dissertation, China Agriculture University, China
- Lou CH, 1996. The messenger transmission of chemical wave in higher plant. *Acta Biophysics. Sinica*, 12(4):739–745.
- Lunevsky VZ, Zherelova OM, Vostrikov IY, Berestovsky GN (1983) Excitation of Characeae cell membranes as a result of the activation of calcium and chloride channels. *J Membr Biol* 72:43–58
- Μαρδίρης, Α. κ.α., 'Φυλλολογία', <http://kpe-kastor.kas.sch.gr/leaf/third.htm>
- Machackova I, Krekule J (1991) The interaction of direct electric current with endogenous rhythms of flowering in *Chenopodium rubrum*. *J Plant Physiol* 138:365–369
- Machackova I, Pospiskova M, Krekule J (1990) Further studies on the inhibitory action of direct electric current on flowering in the short-day plant *Chenopodium rubrum* L. *J Plant Physiol* 136:381–384
- Maffei M, Bossi S, Spitterer D, Mithofer A, Boland W (2004) Effects of feeding Spodoptera littoralis on lima bean leaves. I. Membrane potentials, intercellular calcium variations, oral secretions, and regurgitate components. *Plant Physiol* 134:1752–1762
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmidt J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet* 26:403–409
- Malone M (1994) Wound-induced hydraulic signals and stimulus perception in *Mimosa pudica* L. *New Phytol* 128:49–56
- Malone M (1996) Rapid, long-distance signal transmission in higher plants. *Adv Bot Res* 22:163–228
- Malone M, Alarcon J-L, Palumbo L (1994) A hydraulic interpretation of rapid, long-distance wound signalling in the tomato. *Planta* 193:181–185
- Malone M, Palumbo L, Boari F, Monteleone M, Jones HG (1994) The relationship between wound-induced proteinase inhibitors and hydraulic signals in tomato seedlings. *Plant Cell Environ* 17:81–87
- Mancuso S (1999) Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*. *Aust J Plant Physiol* 26:55–61
- Mayer W-E, Fischer C (1994) Protoplasts from *Phaseolus occineus* L. pulvinar motor cells show circadian volume oscillations. *Chronobiol Int* 11:156–164

- Mehedintu M, Berg H (1997) Proliferation response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on electromagnetic field parameters. *Bioelectrochem Bioenerg* 43:67–70
- Melikov KC, Frolov VA, Shcherbakov A, Samsonov AV, Chizmadzhev YA, Chernomordik LV (2001) Voltage-induced nonconductive pre-pores and metastable single pores in unmodified planar lipid bilayer. *Biophys J* 80:1829–1836
- Mills JW, Lazaro J, Mandel J (1994) Cytoskeletal regulation of membrane transport events. *FASEB J* 8:1161–1165
- Mitsumo T, Sibaoka T (1989) Rhythmic electrical potential change of motor pulvinus in lateral leaflet of *Codariocalyx motorius*. *Plant Cell Physiol* 30:1123–1127
- Montavon M, Greppin H (1983) Effet sur le développement de l'ipinard de l'application d'un potentiel électrique sur le ptiote d'une feuille. *Saussurea (Genève)* 14:79–85
- Montavon M, Greppin H (1986) Développement apical de l'ipinard et application d'un potentiel électrique de contrainte. *Saussurea (Geneve)* 17:85–91
- Muller-Moule P, Havaux M, Niyogi KK (2003) Zeaxanthin deficiency enhances the high light sensitivity of an ascorbate-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133:748–760
- Mwesigwa J, Collins DJ, Volkov AG (2000) Electrochemical signaling in green plants: effects of 2,4-dinitrophenol on resting and action potentials in soybean. *Bioelectrochem* 51:201–205
- Μπουράνης Δ, Εργαστηριακές ασκήσεις εφαρμοσμένης θρέψης φυτού.  
[http://biotech.aau.gr/EPEAEK/site\\_Biotech/gewp\\_biot/Labor\\_Bion\\_Nutr\\_Pl/course\\_material/bouranis7.htm](http://biotech.aau.gr/EPEAEK/site_Biotech/gewp_biot/Labor_Bion_Nutr_Pl/course_material/bouranis7.htm)
- Novak B, Sironval C (1976) Circadian rhythms of the transcellular current in regenerating enucleated posterior stalk segments of *Acetabularia mediterranea*. *Plant Sci Lett* 6:273–283
- Oda K (1976) Simultaneous recording of potassium and chloride effluxes during an action potential in *Chara corallina*. *Plant Cell Physiol* 17:1085–1088
- Opritov VA (1978) Propagating excitation and assimilate transport in the phloem. *Soviet Plant Physiol* 25:1042–1048
- Peters, A *The World According to Wavelets*, Wellesley, 1996
- Pickard B (1973) Action potentials in higher plants. *Botanical Reviews* 39:172–201
- Pickard B (1984a) Voltage transients elicited by sudden step-up of auxin. *Plant Cell Environ* 7:171–178
- Pickard B (1984b) Voltage transients elicited by brief chilling. *Plant Cell Environ* 7:679–681
- Pickard WF (2001) A novel class of fast electrical events recorded by electrodes implanted in tomato shoots. *Aust J Plant Physiol* 28:121–129
- Plieth C, Sattelmacher B, Hansen U-P, Thiel G (1998) The action potential in *Chara*: Ca<sup>2+</sup> released from internal stores visualized by Mn<sup>2+</sup>-induced quenching of fura-dextran. *Plant J* 13:167–175
- Pyatygin SS, Opritov VA (1990) Effect of temperature on action potentials generating in higher plant excitable cells. *Biophysics* 35:444–449
- Pyatygin SS, Opritov VA, Khudyakhov VA (1992) Subthreshold changes in excitable membranes of *Cucurbita pepo* L stem cells during cooling-induced action potential generation. *Planta* 186:161–165
- Rathore KS, Goldsworthy A (1985) Electrical control of shoot regeneration in plant tissue cultures. *Bio/Technol* 3:1107–1109



- Rathore KS, Hodges TK, Robinson KR (1988) A refined technique to apply electrical currents to callus cultures. *Plant Physiol* 88:515–517
- Ren HY, Wang XC, Lou CH, 1993. The universal existence of electrical Signals and its physiological effects in higher plants. *Acta Phyto-physiological. Sinica*, 19(1):97–101.
- Rhodes JD, Thain JF, Wildon DC (1996) The pathway for systemic electrical signal conduction in the wounded tomato plant. *Planta* 200:50–57
- Roblin G, Bonnemain J-L (1985) Propagation in *Vicia faba* stem of a potential variation induced by wounding. *Plant Cell Physiol.* 26:1273–1283
- Samejima M, Sibaoka T (1980) Changes in extracellular ion concentration in the main pulvinus of *Mimosa pudica* during rapid movement and recovery. *Plant Cell Physiol* 21:467–479
- Schurr U, Gollan T (1990) Composition of xylem sap of plants experiencing root water stress: a descriptive study. In: Davies WJ, Jeffcoat B (eds) Importance of root to shoot communication in the response to environmental stress. *Br Soc Plant Growth Regul, Bristol*, pp 201–214
- Shimmen T (1997) Studies on mechano-perception in Characeae: effects of external  $Ca^{2+}$  and  $Cl^{-}$ . *Plant Cell Physiol* 38:691–699
- Shvetsova T, Mwesigwa J, Volkov AG (2001) Plant electrophysiology: FCCP induces action potential and excitation waves in soybean. *Plant Sci* 161:901–909
- Sibaoka T (1962) Excitable cells in mimosa. *Science* 137:226–228
- Smith, S., *The Scientist and Engineer's Guide to Digital Signal Processing*, San Diego, California: California Technical Publishing.
- Simons PJ (1981) The role of electricity in plant movements. *New Phytol* 87:11–37
- Sinukhin AM, Britikov EA (1967) Action potentials in the reproductive system of plant. *Nature* 215:1278–1280
- Sinukhin AM, Gorchakov VV (1966) Characteristics of the action potentials of the conducting systems of pumpkin stems evoked by various stimuli. *Sov Plant Physiol* 13:727–733
- Sinukhin AM, Gorchakov VV (1968) Role of the vascular bundles of the stem in long-distance transmission of stimulation by means of bioelectric impulses. *Sov Plant Physiol* 15:400–407
- Sinukhin AM, Gorchakov VV (1996) Action potentials of higher plants not possessing motor activity. *Biophysics* 11:966–975
- Smith SD, McLeod BR, Liboff AR (1993) Effects of SR tuning 60 Hz magnetic fields on sprouting and early growth of *Raphanus sativus*. *Bioelectrochem Bioenerg* 32:67–76
- Spanjers AW (1981) Bioelectric potential changes in the style of *Lilium longiflorum* Thunb. after self- and cross-pollination of the stigma. *Planta* 153:1–5
- Spanwick RM (1972) Evidence for an electrogenic ion pump in *Nitella translucens*. I. The effects of pH,  $K^{+}$ ,  $Na^{+}$ , light and temperature on the membrane potential and resistance. *Biochim Biophys Acta* 288:73–89
- Spanwick RM, Costerton JWF (1967) Plasmodesmata in *Nitella translucens*: structure and electrical resistance. *J Cell Sci* 2:451–464
- Spyropoulos CS, Tasaki I, Hayward G (1961) Fractionation of tracer effluxes during action potential. *Science* 133:2064–2065
- Stahlberg R, Cleland RE, van Volkenburgh E (2005) Decrement and amplification of slow wave potentials during their propagation in *Helianthus annuus* L. shoots. *Planta* 220:550–558
-

- Stahlberg R, Cosgrove DJ (1995) Comparison of electric and growth responses to excision in cucumber and pea seedlings. II. Long distance effects are caused by the release of xylem pressure. *Plant Cell Environ* 18:33–41
- Stahlberg R, Cosgrove DJ (1996) Induction and ionic basis of slow wave potentials in seedlings of *Pisum sativum* L. *Planta* 200:416–425
- Stankovic B, Davies E (1996) Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato. *FEBS Lett* 390:275–279
- Stankovic B, Davies E (1997b) Wounding evokes rapid changes in tissue deformation, electrical potential, transcription, and translation in tomato. *Plant Cell Physiol* 39:268–274
- Stankovic B, Davies E (1998) The wound response in tomato involves rapid growth and electric responses, systemically up-regulated transcription of proteinase inhibitor and calmodulin and down-regulated translation. *Plant Cell Physiol* 39:268–274
- Stankovic B, Witters DL, Zawadzki T, Davies E (1998) Action potentials and variation potentials in sunflower: an analysis of their relationships and distinguishing characteristics. *Physiol Plant* 105:51–58
- Stankovic B, Zawadzki T, Davies E (1997) Characterization of the variation potential in sunflower. *Plant Physiol* 115:1083–1088
- Taiz L, Zeiger E (2002) *Plant physiology*. Sinauer, Sunderland, Mass., USA, pp 87–108
- Tazawa M, Shimmen T, Mimura T (1987) Membrane control in the Characeae. *Annu Rev Plant Physiol* 38:95–117
- Tester M (1990) Plant ion channels: whole cell and single channel studies. *New Phytol* 114:305–340
- Theodore Dangelmayer, “ESD Program Management- A Realistic Approach to Continuous Measurable Improvement in Static Control”, Van Noshand Ranhold, New York, 1990.
- Trebacz K, Simonis W, Schonknecht G, 1997. Effects of anion channel inhibitors on light-induced potential changes in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant and cell physiology*, 38:550–557.
- Trebacz K, Zawadzki T (1985) Light-triggered action potentials in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Physiol Plant* 64:482–486
- Van Bel AJE, van Rijen HVM (1994) Microelectrode-recorded development of symplasmic autonomy of the sieve element/companion cell complex in the stem phloem of *Lupinus luteus*. *Planta* 192:165–175
- Volkov AG (2000) Green plants/electrochemical interfaces. *J Electroanal Chem* 483:150–156
- Volkov AG, Dunkley TC, Labady AJ, Brown C (2005) Phototropism and electrified interfaces in green plants. *Electrochim Acta* 50:4241–4247
- Volkov AG, Dunkley TC, Labady AJ, Ruff D, Morgan SA (2004a) Electrochemical signaling in green plants induced by photosensory systems: molecular recognition of the direction of light. In: Bruckner-Lea C, Hunter G, Miura K, Vanysek P, Egashira M, Mizutani F (eds)
- Volkov AG, Dunkley TC, Morgan SA, Ruff D II, Boyce Y, Labady A J (2004b) Bioelectrochemical signaling in green plants induced by photosensory systems. *Bioelectrochemistry* 63:91–94
- Volkov AG, Haack RA (1995) Insect induced bioelectrochemical signals in potato plants. *Bioelectrochem Bioenerg* 35:55–60

- Volkov AG, Jovanov E (2002) Electrical signaling in green plants: action potentials. In: Jan J, Kozumplik J, Provaznik J (eds) Analysis of biomedical signals and images. Vutum Press, Brno, pp 36–38
- Volkov AG, Labady A, Thomas D’J, Shvetsova T (2001a) Green plants as environmental biosensors: electrochemical effects of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone on soybean. *Anal Sci* 17 [Suppl]:i359–i362
- Volkov AG, Mwesigwa J (2001a) Interfacial electrical phenomena in green plants: action potentials. In: Volkov AG (ed) Liquid interfaces in chemical, biological, and pharmaceutical applications. Dekker, New York, pp 649–681
- Volkov AG, Mwesigwa J (2001b) Electrochemistry of soybean: effects of uncouplers, pollutants, and pesticides. *J Electroanal Chem* 496:153–157
- Volkov AG, Mwesigwa J, Jovanov E, Labady A, Thomas DJ, Lewis K, Shvetsova T (2002a) Acid rain induces action potentials in green plants. In: Cerutti S, Akay M, Mainardi LT, Sato S,
- Volkov AG, Mwesigwa J, Labady A, Kelly S, Lewis K, Shvetsova T (2002b) Soybean electrophysiology: effects of acid rain. *Plant Sci* 162:723–731
- Volkov AG, Mwesigwa J, Shvetsova T (2001b) Soybean as an environmental biosensor: action potentials and excitation waves. In: Butler M, Vanysek P, Yamazoe N (eds) Chemical and biological sensors and analytical methods II. Electrochemical Society, Pennington, pp 229–238
- Volkov AG, Shvetsova T, Markin VS (2002c) Waves of excitation and action potentials in green plants. *Biophys J* 82:18a–218a
- Volkov AG, (2006) ‘Plant Electrophysiology: Theory and Methods’ ISBN-10: 3540327177 Publisher: Springer
- Volkov AG, (1998) ‘Plant Energetics ISBN-10: 0124273505: Springer
- Χατζής, Δ, 2005. Εργασία Msc, Κεφ. 3, Μετασχηματισμός Fourier, Κεφ. 4, Βασική θεωρία στα κυματίδια .
- Wacke M, Thiel G (2001) Electrically-triggered all-or-none liberation during action potential in the giant alga, Chara. *J Gen Physiol* 118:11–21
- Wagner E, Normann J, Albrechtova JTP, Walczysko P, Bonzon M, Greppin H (1998) Electrochemical-hydraulic signalling in photoperiodic control of flowering: is “florigen” a frequency-coded electric signal? *Flowering Newslett* 26:62–74
- Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1–14
- Wayne R (1994) The excitability of plant cells: with a special emphasis on Characeae internode cells. *Bot Rev* 60:265–367
- Wildon DC, Thain JF, Minchin PEH, Gubb IR Reilly AJ, Skipper YD, Doherty HM, O’Donnell PJ, Bowles DJ (1992) Electrical signaling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* 360:62–65
- Zavadzki T (1980) Action potentials in *Lipinus angustifolius* L. shoots. V. Spread of excitation in the stem, leaves and root. *J Exp Bot* 31:1371–1377
- Zawadzki T, Davies E, Dziubinska H, Trebacz K (1991) Characteristics of action potentials in *Helianthus annuus* L. *Physiol Plant* 83:601–604
- Zawadzki T, Dziubinska H, Davies E (1995) Characteristics of action potentials generated spontaneously in *Helianthus annuus*. *Physiol Plant* 93:291–297
- Zhu JK (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol* 4:401–406
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53:247–73