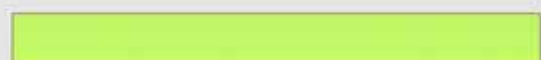
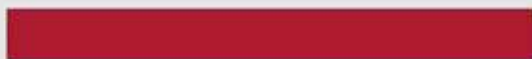
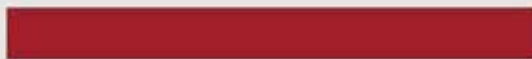




**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ  
ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ  
ΤΩΝ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΟ DMSO**





ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ  
ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ  
ΤΩΝ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΟ DMSO**

**Τριμελής Συμβουλευτική  
Επιτροπή**

**Επιβλέπων**

ΚΑΡΑΜΠΟΥΡΝΙΩΤΗΣ Γ.  
Αναπληρωτής Καθηγητής

**Μέλη**

ΜΠΟΥΡΑΝΗΣ Δ.  
Αναπληρωτής Καθηγητής

ΑΙΒΑΛΑΚΗΣ Γ.  
Λέκτορας

**Πτυχιακή Μελέτη της Φοιτήτριας  
Χριστίνας Κοργιοπούλου**

**Αθήνα 2007**



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	5
ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
1. Η φωτοσύνθεση .....	9
1.1. Η σημασία της φωτοσύνθεσης.....	9
1.2. Η φυσιολογία της φωτοσύνθεσης .....	10
1.2.1. Η οργάνωση των χλωροπλαστών .....	10
1.2.3. Οι σκοτεινές αντιδράσεις .....	14
2. Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές.....	16
2.1. Δομή και ρόλος χρωστικών .....	16
3. Τα ανατομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων .....	18
3.1. Φωτοσύνθεση σε ομοβαρή και ετεροβαρή φύλλα .....	21
4. Μέθοδοι εκχύλισης των φωτοσυνθετικών χρωστικών από τα φύλλα ..	22
4.2. Χρήση του διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) .....	22
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	25
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	27
1. Φυτικό υλικό .....	27
2. Μορφολογικές παράμετροι .....	27
2.1 Μέτρηση πάχους φύλλου και ειδικής φυλλικής επιφάνειας .....	27
2.2. Μέτρηση ποσοστού διαφανών περιοχών του ελάσματος .....	27
3. Βιοχημικές και φυσιολογικές παράμετροι .....	29
3.1. Μέτρηση χλωροφυλλών .....	29
3.1.1. Εκχύλιση DMSO .....	29
3.1.2. Εκχύλιση με ακετόνη .....	29
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	31
1. Εκχύλιση χλωροφυλλών .....	31
2. Απόδοση της εκχύλιση χλωροφυλλών με DMSO και συσχέτιση με ανατομικές παραμέτρους του φύλλου .....	34
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	37



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Το ενδιαφέρον μου για τις φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών και γενικά για τον τομέα της έρευνας, με οδήγησε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Φυτών, προκειμένου να ασκήσω την πρακτική μου και να εκπονήσω την παρούσα πτυχιακή μελέτη. Αποκόμισα ιδιαίτερες γνώσεις και εμπάθυνα στο αντικείμενο σε ένα εξαιρετο εργαστηριακό περιβάλλον, με την αμέριστη συνδρομή των καθηγητών και συμφοιτητών μου, αλλά και του λοιπού επιστημονικού προσωπικού, που με κάνουν να αισθάνομαι ευγνώμων απέναντί τους και τους ευχαριστώ γι' αυτό. Ειδικότερα,

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή καθηγητή και Διευθυντή του εργαστηρίου κ. Γεώργιο Καραμπουρνιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση του θέματος, για την επίβλεψη και για τη διόρθωση της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ το Διδάκτορα και επιστημονικό μέλος του εργαστηρίου κ. Δημοσθένη Νικολόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη που μου παρείχε σε όλα τα στάδια της μελέτης μου, η ολοκλήρωση της οποίας οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στη δική του συνδρομή.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Μπουράνη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γεώργιο Αϊβαλάκη για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή και για την διόρθωση της πτυχιακής μου μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Διδάκτορα κ. Γεώργιο Λιακόπουλο για την τεχνική προσφορά του στη σύνταξη της πτυχιακής, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την εν γένει βοήθεια τους μέσα σε άψογο κλίμα συνεργασίας. Επίσης ευχαριστώ τους φίλους μου που με υπομονή, κατανόηση και αγάπη συμπαραστάθηκαν ηθικά στην προσπάθειά μου αυτή.

Τέλος από τα βάθη της καρδιάς μου ευχαριστώ την οικογένειά μου για την αστείρευτη αγάπη, την ψυχολογική και οικονομική υποστήριξη που απλόχερα μου έχουν προσφέρει καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μου.





## 1. Η φωτοσύνθεση

### 1.1. Η σημασία της φωτοσύνθεσης

Τα φυτά ως αυτότροφοι οργανισμοί έχουν τη δυνατότητα σύνθεσης οργανικών ενώσεων από πρόδρομα ανόργανα συστατικά (Αιβαλάκις, κ.α., 2003). Για αυτή την διαδικασία απαιτείται εισροή ενέργειας η οποία παρέχεται από την ηλιακή ακτινοβολία με τη μορφή φωτονίων, τα οποία απορροφώνται από την χλωροφύλλη (Hall and Rao, 1999). Η ενέργεια αποθηκεύεται με τη μορφή σταθερών χημικών ενώσεων (ATP, NADPH) ενώ παράλληλα διασπάται το μόριο του νερού και εκλύεται μοριακό οξυγόνο ως παραπροϊόν. Η αποθηκευμένη ενέργεια χρησιμοποιείται στη συνέχεια, για τη δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα της ατμόσφαιρας και το μετασχηματισμό του σε υδατάνθρακες. Η ακτινοβολία που αξιοποιείται στην παραπάνω διαδικασία ονομάζεται φωτοσυνθετικά ενεργός ακτινοβολία (Photosynthetically Active Radiation, PAR) και περιλαμβάνει μήκη κύματος μεταξύ 400 και 700 nm στην περιοχή του ορατού (Taiz and Zeiger, 1998).

Η βασική αντίδραση (I) είναι ισχυρά ενδεργονική καθώς απαιτεί μεγάλη δαπάνη ενέργειας ( 2840 kJ) για κάθε mole εξόζης που παράγεται και εμπεριέχει πολυάριθμες αντιδράσεις που συνεργάζονται ώστε να παραχθούν τα τελικά φωτοσυνθετικά προϊόντα.



Η φωτοσύνθεση είναι μια διαδικασία πολύ σημαντική καθώς από τα οργανικά μόρια που προκύπτουν παρέχεται χημική ενέργεια και σκελετοί άνθρακα, τόσο στους αυτότροφους οργανισμούς, όσο και στους καταναλωτές (Δροσόπουλος, 1998). Τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως δομικές μονάδες σε διάφορες αναβολικές αντιδράσεις, είτε να παράσχουν μέρος της περιεχόμενης ενέργειάς τους για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου κατά την αναπνευστική λειτουργία, στην οποία ελευθερώνονται ως προϊόντα τα αρχικά υποστρώματα της φωτοσύνθεσης (CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O) (Hall and Rao, 1999). Επίσης με τη φωτοσύνθεση εμπλουτίζεται η ατμόσφαιρα με το απαραίτητο μοριακό οξυγόνο για την αναπνοή όλων των αερόβιων

## **Εισαγωγή**

οργανισμών και τα αρχέγονα προϊόντα της αποτελούν τα σημαντικότερα ενεργειακά αποθέματα της γης ( Hall and Rao, 1999).

### **1.2. Η φυσιολογία της φωτοσύνθεσης**

Η φωτοσυνθετική λειτουργία πραγματοποιείται σε εξειδικευμένα υποκυτταρικά οργανίδια, τους χλωροπλάστες. Στα οργανίδια αυτά πραγματοποιείται η αλληλουχία των φωτοχημικών και βιοχημικών σταδίων της φωτοσύνθεσης, από την αρχική δέσμευση της ενέργειας της ηλιακής ακτινοβολίας έως τη βιοσύνθεση των υδατανθράκων.

Το μονοπάτι της φωτοσύνθεσης διακρίνεται σε 2 φάσεις. Η πρώτη που χαρακτηρίζεται ως φωτεινή φάση περιλαμβάνει αντιδράσεις στις οποίες είναι απαραίτητη η παρουσία φωτός (φωτοαντιδράσεις). Σε αυτές η ενέργεια ακτινοβολίας μετατρέπεται σε χημική υπό τη μορφή σταθερών χημικών ενώσεων με υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο, του NADPH και του ATP. Σε αυτή τη φάση φωτολύονται μόρια νερού και παρέχουν πρωτόνια, ηλεκτρόνια και μοριακό οξυγόνο (Αιβαλάκις, κ.α., 2003).

Η δεύτερη φάση χαρακτηρίζεται ως σκοτεινή, καθώς δεν εξαρτάται άμεσα από την ύπαρξη φωτισμού (Taiz and Zeiger, 1998).

Εδώ περιλαμβάνονται καθαρά βιοχημικές αντιδράσεις (σκοτεινές αντιδράσεις), όπου το ATP προσφέρει ενέργεια για τη σύνθεση τριοζών από άτομα άνθρακα, οξυγόνου και υδρογόνου. Το NADPH καταναλώνεται προσφέροντας πρωτόνια και ηλεκτρόνια και το CO<sub>2</sub> προσφέρει άνθρακα και οξυγόνο.

Όλες οι παραπάνω διαδικασίες λαμβάνουν χώρα στα φύλλα τα οποία διαθέτουν συγκεκριμένα μορφολογικά και ανατομικά χαρακτηριστικά ώστε να επιτυγχάνονται μέγιστες αποδόσεις σε επίπεδο οργάνου (Αιβαλάκις, κ.α., 2003).

#### **1.2.1. Η οργάνωση των χλωροπλάστων**

Οι χλωροπλάστες συνιστούν τα οργανίδια στα οποία καθίσταται δυνατή η διεξαγωγή της φωτοσυνθετικής διαδικασίας. Τόσο οι φωτεινές όσο και οι σκοτεινές αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα σε συγκεκριμένα τμήματα των χλωροπλάστων. Τα οργανίδια αυτά περιβάλλονται από διπλή εξωτερική μεμβράνη, τον φάκελο, ο οποίος περικλείει στο εσωτερικό του ένα άμορφο ζελατινώδες υλικό, το στρώμα. Ο φάκελος αποτελείται από δύο διλιπιδιακές

## Εισαγωγή

μεμβράνες από γαλακτολιπίδια οι οποίες περιέχουν καρτενοειδή, αλλά όχι χλωροφύλλη (Δροσόπουλος, 1998; Lawlor, 2001). Στο στρώμα εντοπίζονται τα υδατοδιαλυτά ένζυμα τα οποία καταλύουν τις αντιδράσεις της φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του διοξειδίου του άνθρακα δηλαδή τις σκοτεινές αντιδράσεις. Μέσα στο στρώμα αναπτύσσεται ένα δίκτυο μεμβρανών, τα θυλακοειδή, τα οποία σε ορισμένες περιοχές στοιβάζονται σε επάλληλες σειρές σχηματίζοντας τα grana. Στα θυλακοειδή συμβαίνουν οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης καθώς εκεί εντοπίζονται όλα τα μόρια της χλωροφύλλης και των άλλων φωτοσυνθετικών χρωστικών. Η κοιλότητα η οποία σχηματίζεται στο εσωτερικό κάθε θυλακοειδούς ονομάζεται lumen.

Όλοι οι χλωροπλάστες περιέχουν λιπόφιλα μόρια χρωστικών τα οποία είναι βυθισμένα στη διπλοστοιβάδα των λιπιδίων των θυλακοειδών και σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες. Σε αυτά πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις της φωτεινής φάσης, τα ονομαζόμενα φωτοσυστήματα (PS I και PS II) και αποτελούν το πρώτο βήμα για τη μετατροπή της φωτεινής ενέργειας σε χημική. Τέλος στις μεμβράνες των θυλακοειδών εντοπίζεται το σύμπλοκο του κυτοχρώματος  $b_6f$  που αποτελεί το σημαντικότερο ενδιάμεσο φορέα για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το PS II στο ενεργό κέντρο του PS I.

### 1.2.2. Οι φωτεινές αντιδράσεις

Στις φωτοχημικές αντιδράσεις, μόνο φωτόνια με κατάλληλο μήκος κύματος μπορούν να προκαλέσουν μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων. Σε αυτή την περίπτωση τα ηλεκτρόνια μετακινούνται σε στάθμη υψηλότερου ενεργειακού περιεχομένου, ενώ το μόριο της χρωστικής βρίσκεται πλέον σε διεγερμένη κατάσταση. Η διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο ενεργειακών σταθμών αντικατοπτρίζει την ενέργεια του συγκεκριμένου quantum που απορροφήθηκε. Τα μόρια που είναι σε διεγερμένη κατάσταση έχουν την τάση να επανέλθουν στην αρχική σταθερή τους κατάσταση αποδίδοντας την ενέργεια που απορροφήθηκε (**αποδιέγερση μορίων**). Η απόδοση αυτής της ενέργειας διέγερσης του μορίου της χλωροφύλλης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τους εξής τρόπους:

## Εισαγωγή

---

α. Με τη μορφή θερμότητας λόγω δόνησης και περιστροφής του μορίου

β. Με τη μορφή ακτινοβολίας (φθορισμός)

γ. Με μεταφορά της διέγερσης σε γειτονικά μόρια που συμβάλλει στην παραγωγή φωτοσυνθετικού έργου.

---

Η διέγερση μπορεί να ξεκινήσει από οποιονδήποτε φωτοδέκτη, όπως χλωροφύλλη, καροτενοειδή, φυτόχρωμα. Στη φωτοσύνθεση, η διέγερση μιας ειδικής μορφής χλωροφύλλης *a* (Ch<sub>1</sub>a) προκαλεί διαχωρισμό φορτίου με αποτέλεσμα ηλεκτρόνια να αποσπώνται από το νερό και να μεταφέρονται στο NADP<sup>+</sup> το οποίο ανάγεται προς NADPH. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων πραγματοποιείται μέσω διαδοχικών οξειδώσεων και αναγωγών ενδιάμεσων φορέων, δηλαδή μέσω της λεγόμενης φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Αιβαλάκης, κ.α., 2003). Τα δύο φωτοσυστήματα PS I και PS II συνεργάζονται ώστε να ολοκληρωθούν οι φωτοαντιδράσεις της φωτοσύνθεσης (Lawlor, 2001).

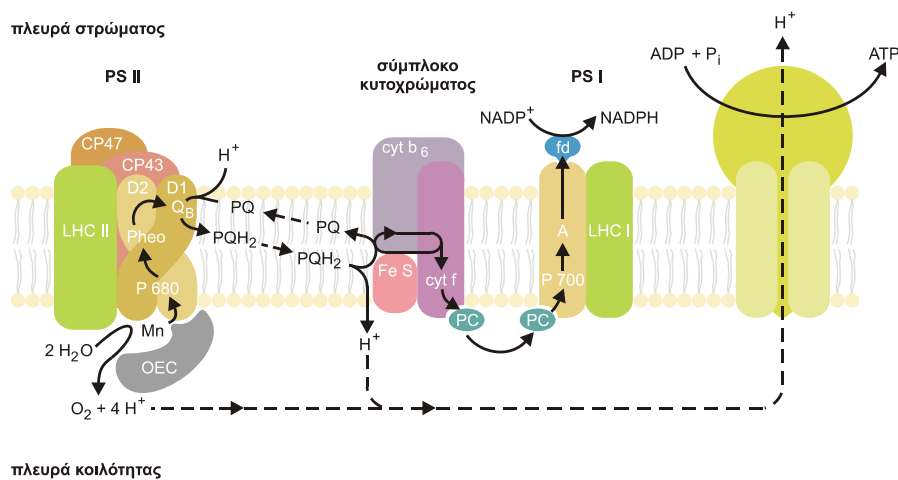
Το κάθε φωτοσύστημα διαθέτει ένα φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης, δηλαδή ένα διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο όπου εδράζεται ένα μόριο Ch<sub>1</sub>a και στο οποίο συμβαίνει ο διαχωρισμός φορτίου. Τα κέντρα αντίδρασης των PS I και PS II χαρακτηρίζονται ως P700 και P680 αντίστοιχα, από τα μέγιστα απορρόφησης που εμφανίζουν. Κάθε κέντρο αντίδρασης διαθέτει ένα μηχανισμό ή αντένα φωτοσυλλογής όπου εδράζονται πολυάριθμα σύμπλοκα – φωτοσυνθετικών χρωστικών (LHC). Οι βοηθητικές φωτοσυνθετικές χρωστικές δεν συμμετέχουν άμεσα στο διαχωρισμό φορτίου αλλά απορροφούν φωτόνια, διεγείρονται και μεταφέρουν τη διέγερση προς το κέντρο αντίδρασης (Lawlor, 2001).

Όταν ένα φωτόνιο απορροφηθεί από το φωτοσυλλεκτικό μηχανισμό του PS II, το μόριο Ch<sub>1</sub>a του ενεργού κέντρου διεγείρεται και προκαλείται διαχωρισμός φορτίου οπότε ένα ηλεκτρόνιο θα μεταφερθεί σε ένα διπλανό μόριο. Αυτό το ηλεκτρόνιο αναπληρώνεται μέσω της φωτόλυσης του νερού.

Τα ηλεκτρόνια από το PS II μεταφέρονται μέσω αλληπάλληλων οξειδώσεων και αναγωγών των ενδιάμεσων φορέων προς το ενεργό κέντρο του PS I. Ο σημαντικότερος ενδιάμεσος φορέας είναι το σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων (cyt <sub>6</sub>f). Στο PS I η απορρόφηση ενός φωτονίου από τις

## Εισαγωγή

βοηθητικές χρωστικές του φωτοσυλλεκτικού μηχανισμού του προκαλεί διέγερση και διαχωρισμό φορτίου στο ενεργό κέντρο. Ένα ηλεκτρόνιο αποσπάται από το μόριο του P700 το οποίο μέσω μιας αλυσίδας ενδιάμεσων φορέων ανάγει τον τελικό αποδέκτη που είναι το NADP. Στην περίπτωση όμως του PS I το ηλεκτρόνιο που αποσπάστηκε, προσλαμβάνεται μέσω των ενδιάμεσων φορέων από το PS II. Επομένως η όλη διαδικασία περιλαμβάνει εν σειρά σύνδεση των δύο φωτοσυστημάτων και ροή ηλεκτρονίων από το νερό προς το NADP<sup>+</sup> (Αιβαλάκης, κ.α., 2003).



Εικόνα 1. Σχηματική διάταξη των πολυενζυμικών συμπλόκων των φωτοσυστημάτων και των ενδιάμεσων φορέων οι οποίοι συμμετέχουν στη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων και την αναγωγή του NADP και τη φωσφορυλίωση του ADP, κατά μήκος των μεμβρανών των θυλακοειδών.

Στα ενεργά κέντρα των 2 φωτοσυστημάτων, η μεταφορά ηλεκτρονίου είναι δυνατή λόγω της εισροής επιπλέον ενέργειας στο σύστημα με τη μορφή φωτεινής ακτινοβολίας. Με αυτό τον τρόπο γίνεται δυνατή η αναγωγή του NADPH και η σύνθεση του ATP. Η απορρόφηση φωτονίων από τα φωτοχημικά κέντρα αντίδρασης και η επακόλουθη αναγωγή του NADP<sup>+</sup> προς NADPH έχει δύο σημαντικές επιπτώσεις. Κατ' αρχάς μόρια νερού διασπώνται, με συνέπεια να απελευθερώνονται πρωτόνια μέσα στην κοιλότητα του θυλακοειδούς και μοριακό οξυγόνο, το οποίο διαφεύγει ως παραπροϊόν. Επιπλέον η ροή των ηλεκτρονίων προκαλεί διαφορά του pH μεταξύ της κοιλότητας του θυλακοειδούς και του στρώματος. Αυτή η διαφορά του pH αντιπροσωπεύει ελεύθερη ενέργεια που μπορεί να αξιοποιηθεί για τη σύνθεση του ATP (Δροσόπουλος, 1998). Η σύνθεση του ATP πραγματοποιείται λόγω μιας αντίστροφης - αυθόρμητης εκροής

## Εισαγωγή

πρωτονίων από την κοιλότητα του θυλακοειδούς προς το στρώμα η οποία τείνει να εξισορροπήσει τη διαφορά του pH. Αυτή η ροή πρωτονίων παρέχει την ενέργεια που απαιτείται για την φωσφορυλίωση του ADP προς ATP (Εικόνα 1) . Το ATP που θα παραχθεί είναι διαθέσιμο για την σύνθεση των υδατανθράκων κατά τις σκοτεινές αντιδράσεις. Η χημειωσμητική υπόθεση του Mitchell το 1961 εξηγεί τη σύνθεση του ATP που συνοδεύει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες. Σύμφωνα με αυτή:

- 
- α. Οι ανέπαφες μεμβράνες θυλακοειδών είναι αδιαπέρατες στην παθητική ροή των πρωτονίων
  - β. Οι οξειδοαναγωγικοί παράγοντες που συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων και πρωτονίων βρίσκονται ανυσματικά τοποθετημένοι στη μεμβράνη.
  - γ. Κατά τη διάρκεια της φωτοσυνθετικής μεταφοράς των ηλεκτρονίων, μεταφέρονται H<sup>+</sup> από το στρώμα στον μικροχώρο και ως εκ τούτου δημιουργείται μια διαβάθμιση πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης του θυλακοειδούς
- 

### 1.2.3. Οι σκοτεινές αντιδράσεις

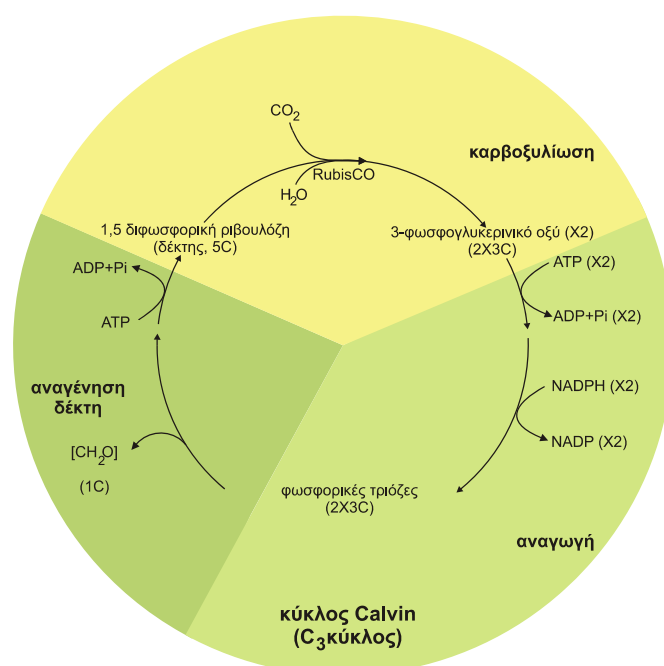
Τα προϊόντα των φωτεινών αντιδράσεων ATP και NADPH, είναι πλούσια σε ενέργεια και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πλήθος βιοχημικών αντιδράσεων σύνθεσης και μεταφοράς, που απαιτούν δαπάνη ενέργειας. Μέρος αυτής της ενέργειας καταναλώνεται για τη δέσμευση του CO<sub>2</sub> και αναγωγή του στο επίπεδο των υδατανθράκων. Μέχρι σήμερα γνωρίζουμε τρεις κύριες βιοχημικές παραλλαγές του φωτοσυνθετικού μεταβολισμού του άνθρακα:

- 
- α. Η C<sub>3</sub> φωτοσύνθεση, με πρώτο προϊόν το 3-φωσφογλυκερινικό οξύ(3-PGA)
  - β. Η C<sub>4</sub> φωτοσύνθεση με πρώτο προϊόν το οξαλοξικό οξύ, και
  - γ. Ο μεταβολισμός οξέων τύπου Crassulaceae (CAM)
- 

Στη C<sub>3</sub> φωτοσύνθεση το CO<sub>2</sub> δεσμεύεται και στη συνέχεια ανάγεται έως το επίπεδο του υδατάνθρακα μέσω μιας κυκλικής διαδικασίας, η οποία ονομάζεται αναγωγικός κύκλος των φωσφοπεντοζών (RPCC) ή κύκλος του Calvin. Το CO<sub>2</sub> μετατρέπεται σε φωσφορυλιωμένα σάκχαρα ενώ ο δέκτης

## Εισαγωγή

του  $\text{CO}_2$  (1,5-διφωσφορική ριβουλόζη) αναγεννάται. Ο κύκλος αυτός λειτουργεί σε όλους τους φωτοσυνθετικούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς καθώς και σε ορισμένους προκαρυωτικούς. Η όλη πορεία περιλαμβάνει επί μέρους αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται από υδατοδιαλυτά ένζυμα που εντοπίζονται στο στρώμα των χλωροπλαστών (Δροσόπουλος, 1998). Ο κύκλος Calvin δεν περιλαμβάνει φωτοχημικές αντιδράσεις, ωστόσο η λειτουργία του εξαρτάται άμεσα από τον εφοδιασμό σε ATP και NADPH καθώς και σε  $\text{CO}_2$ . Ο κύκλος περιλαμβάνει τρία επί μέρους στάδια: καρβοξυλίωση, αναγωγή και αναγέννηση του δέκτη (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2.** Ο κύκλος του Calvin συνίσταται από τρία στάδια με τελική κατάληξη την αφομοίωση και αναγωγή ενός μορίου  $\text{CO}_2$  και την αναγέννηση του αρχικού υποστρώματος.

Στο αρχικό στάδιο του κύκλου, το  $\text{CO}_2$  ενσωματώνεται με τη μορφή μιας καρβοξυλομάδας στο μόριο-δέκτη, την 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη και παράγονται, ως πρώτο προϊόν, δύο μόρια 3-φωσφογλυκερινικού οξέος. Την αντίδραση καταλύει το ένζυμο καρβοξυλάση-οξυγενάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (RubisCO). Στο δεύτερο στάδιο το 3PGA ανάγεται προς φωσφορικές τριόζες (3-φωσφορική γλυκεριναλδεύδη ή φωσφορική διϋδρόξυακετόνη) με κατανάλωση ATP και NADPH. Με την ολοκλήρωση του σταδίου αυτού το  $\text{CO}_2$  έχει πλέον αναχθεί στο επίπεδο του υδατάνθρακα με κέρδος μια υδατανθρακική μονάδα, ενώ για κάθε έξι

## Εισαγωγή

περιστροφές του κύκλου το καθαρό προϊόν είναι ένα μόριο εξόζης. Στο τρίτο στάδιο επιτελούνται μια σειρά από αντιδράσεις, οι οποίες είναι απαραίτητες για την αναγέννηση του μορίου-δέκτη. Στο στάδιο αυτό καταναλώνεται ενέργεια με τη μορφή ATP. Με τη συμπλήρωση και του τρίτου σταδίου ο κύκλος Calvin έχει ολοκληρωθεί και η 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη είναι διαθέσιμη εκ νέου ως υπόστρωμα της RubisCO.

## 2. Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές

### 2.1. Δομή και ρόλος χρωστικών

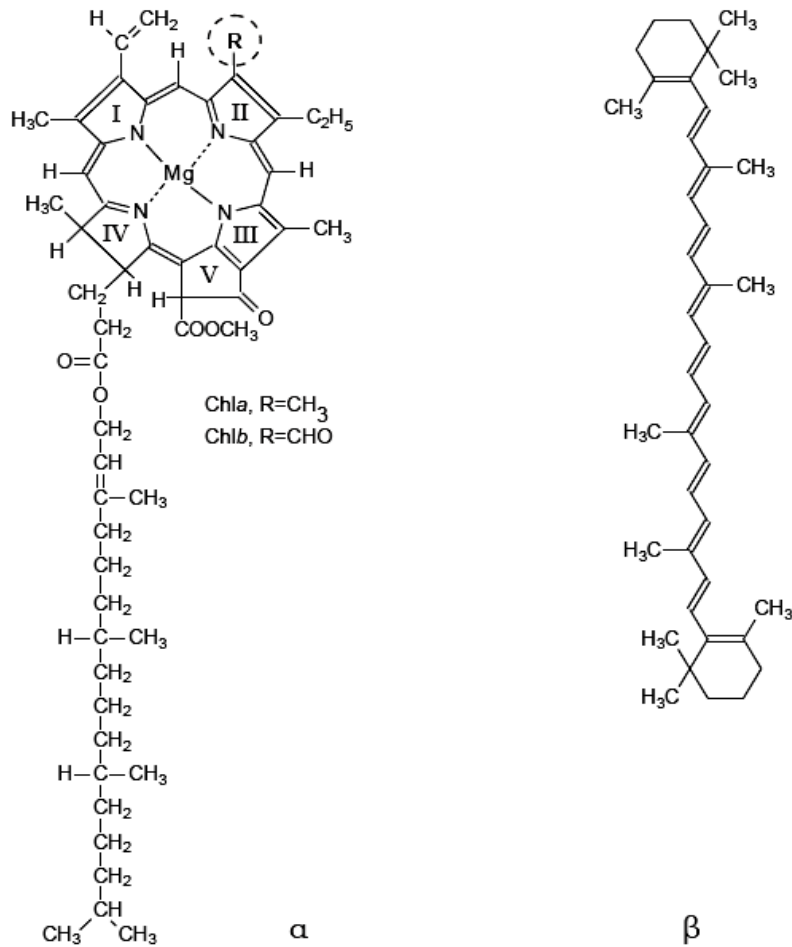
Στα βιολογικά συστήματα κάθε μόριο που απορροφά ενέργεια ακτινοβολίας στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος χαρακτηρίζεται ως χρωστική. Απορρόφηση χαρακτηρίζεται κάθε αλληλεπίδραση που έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά ενέργειας από τη δέση της ακτινοβολίας στην ύλη. Κάθε χρωστική φέρει συγκεκριμένο χρώμα, η χλωροφύλλη πράσινο, τα καροτενοειδή πορτοκαλί ή κίτρινο, το φυτόχρωμα μπλε, ανάλογα σε ποια περιοχή απορροφούν και ποιο τμήμα του ορατού επιτρέπουν να διέλθει ή να ανακλαστεί μέσα από ένα διάλυμά τους.

Όλοι οι χλωροπλάστες περιέχουν λιπόφιλα μόρια χρωστικών τα οποία είναι βυθισμένα στη διπλοστοιβάδα των λιπιδίων των θυλακοειδών και σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες. Οι χρωστικές αυτές συμμετέχουν (είτε άμεσα απορροφώντας φωτόνια, είτε έμμεσα προστατεύοντας τη φωτοσυνθετική συσκευή) στη φωτοσυνθετική λειτουργία και για το λόγο αυτό ονομάζονται φωτοσυνθετικές χρωστικές. Από την άποψη τόσο της δομής, όσο και του ρόλου τους, οι φωτοσυνθετικές χρωστικές των ανώτερων φυτών κατατάσσονται σε δύο ομάδες, τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή.

Οι χλωροφύλλες φέρουν χαρακτηριστικό πράσινο χρωματισμό στον οποίο οφείλουν το χρώμα τους οι χλωροπλάστες επομένως και τα φύλλα, ενώ τα καροτενοειδή παρουσιάζουν κίτρινο-πορτοκαλί έως ερυθρό χρωματισμό. Το μόριο της χλωροφύλλης αποτελείται από τέσσερις πυρολικούς δακτυλίους οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς άνθρακα-άνθρακα σχηματίζοντας έναν πορφυρινικό δακτύλιο (εικόνα 3α).



## Εισαγωγή



**Εικόνα 3.** α) Μόριο χλωροφύλλης β) Μόριο β-καροτενίου

Ο πορφυρινικός δακτύλιος αποτελεί τη χρωμοφόρο ομάδα του μορίου, δηλαδή το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση των φωτονίων. Ένα γενικό χαρακτηριστικό των χρωμοφόρων των βιολογικών μορίων είναι ότι περιλαμβάνουν ένα σχετικά υψηλό αριθμό συζευγμένων διπλών δεσμών. Μεταξύ των πυρολικών δακτυλίων III και IV σχηματίζεται ένας πέμπτος δακτύλιος κυκλοπεντανόνης. Τα άτομα αζώτου των πυρολικών δακτυλίων συγκρατούν στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου ένα άτομο μαγνησίου. Ο πυρολικός δακτύλιος IV συνδέεται με ένα μόριο με λιπόφιλλο χαρακτήρα, τη φυτόλη, η οποία αποτελεί την πλάγια αλυσίδα του μορίου της χλωροφύλλης. Με την απόσπαση του ατόμου του μαγνησίου από τον πορφυρινικό δακτύλιο προκύπτει το μόριο της φαιοφυτίνης (Heldt, 1997). Στους χλωροπλάστες των ανώτερων φυτών απαντώνται δύο είδη χλωροφυλλών, η χλωροφύλλη α και η

## Εισαγωγή

χλωροφύλλη b, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον υποκαταστάτη του πυρολικού δακτυλίου II (Αιβαλάκης, κ.α., 2003). Τα φάσματα απορρόφησης των χλωροφυλλών παρουσιάζουν μέγιστα στην μπλέ και κόκκινη περιοχή του ορατού φάσματος (Lawlor, 2001).

Η ομάδα των καρτενοειδών περιλαμβάνει τα καροτένια, με κύριους εκπροσώπους το α- και β- καροτένιο, και τις ξανθοφύλλες με εκπροσώπους τη λουτεΐνη, βιολοξανθίνη, ζεαξανθίνη κ.α. Το μόριο των καρτενοειδών αποτελείται από μια ευθύγραμμη αλυσίδα 40 ατόμων άνθρακα στην οποία εναλλάσσονται μονοί και διπλοί δεσμοί (εικόνα 3b). Από πλευράς δομής χαρακτηρίζονται ως τετρατερπένια και ανήκουν στην ομάδα των τερπενίων (υδρογονάνθρακες των οποίων το μόριο προκύπτει με πολυμερισμό μονάδων ισοπεντανίου). Συμμετέχουν στην συγκρότηση των φωτοσυλλεκτικών αντεννών και προστατεύουν την φωτοσυλλεκτική συσκευή από την καταστροφή σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας (Siefermann-Harms, 1985; Bartley and Scolnik 1995).

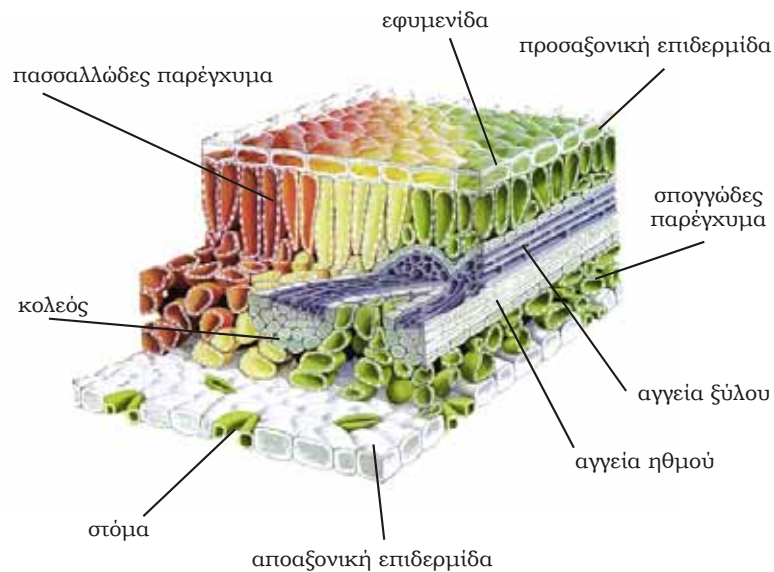
### **3. Τα ανατομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων**

Τα φύλλα είναι τα εξειδικευμένα όργανα στα οποία λαμβάνει χώρα η διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Φέρουν ελασματοειδή κατασκευή και έχουν τέτοια διάταξη ώστε να αξιοποιούνται πιο αποτελεσματικά οι πρώτες ύλες της φωτοσύνθεσης δηλαδή η ακτινοβολία και το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας. Η καλύτερη αξιοποίηση επιτυγχάνεται με την ανάπτυξη τεράστιας επιφάνειας η οποία εκτίθεται στην ηλιακή ακτινοβολία και η αρχιτεκτονική των φύλλων έχει στόχο την αποτελεσματικότερη απορρόφηση ακτινοβολίας και την ευχερέστερη διάχυση του CO<sub>2</sub> προς τα φωτοσυνθετικά κύτταρα. Γι'αυτό και τα πιο πολλά φύλλα είναι λεπτά. Με τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης τα φύλλα παράγουν οξυγόνο και δεσμεύουν το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας (Αιβαλάκης, κ.α., 2003).

Η ανατομική παρατήρηση ενός τυπικού φύλλου μας δείχνει ότι το όργανο αυτό συγκροτείται από εξειδικευμένους ιστούς με αυστηρά καταμερισμένους ρόλους. Η εξωτερική επιφάνεια του φύλλου καλύπτεται από την εφυμενίδα και την επιδερμίδα. Η περιοχή μεταξύ της προσαξονικής και της αποαξονικής επιδερμίδας αποτελεί την περιοχή του μεσοφύλλου και περιλαμβάνει τα φωτοσυνθετικά κύτταρα (τα οποία περιέχουν

## Εισαγωγή

χλωροπλάστες) και τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Taiz and Zeiger, 1998) (εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Σχηματική αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής ενός τυπικού φύλλου δικότυλου C3 φυτού. Διακρίνονται οι κυριότεροι ιστοί.

Η επιδερμίδα κυρίως λόγω του στρώματος της εφυμενίδας απαρτίζει έναν ιστό αδιαπέραστο στους υδρατμούς, ο οποίος αποτρέπει την εξάτμιση του νερού από το εσωτερικό του φύλλου προς την ατμόσφαιρα. Ταυτόχρονα όμως παρεμποδίζει και την είσοδο του διοξειδίου του άνθρακα στο εσωτερικό του ελάσματος. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος η επιδερμίδα φέρει κατά τόπους, εκτός από τα τυπικά επιδερμικά κύτταρα, ζεύγη εξειδικευμένων κύτταρων, τα καταφρακτικά κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν πόρους, τα στόματα. Η σημαντικότερη ανατομική ιδιομορφία τους είναι η χαρακτηριστική ανομοιόμορφη πάχυνση του τοιχώματός τους, ενώ τη σημαντικότερη φυσιολογική διαφορά από τα υπόλοιπα επιδερμικά κύτταρα αποτελεί η ύπαρξη χλωροπλαστών. Τα στόματα έχουν την δυνατότητα του ενεργητικού ανοίγματος και κλεισίματος με αποτέλεσμα, αφενός να ελέγχονται οι απώλειες νερού και αφετέρου να επιτρέπεται η ανταλλαγή των αερίων μεταξύ μεσοφύλλου και ατμόσφαιρας (Andersson and Barber, 1996).

Η περιοχή του φύλλου που παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο επιδερμίδων, δηλαδή το μεσόφυλλο, αποτελείται από τα κύτταρα του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος, τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και τους

## Εισαγωγή

στηρικτικούς ιστούς. Τα κύτταρα του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος διαθέτουν πολυάριθμους χλωροπλάστες και άφθονους μεσοκυττάριους χώρους, ώστε να διευκολύνεται η ανταλλαγή αερίων (Taiz and Zeiger, 1998).

Στα τυπικά φύλλα των δικότυλων το μεσόφυλλο απαρτίζεται από δύο τύπους φωτοσυνθετικού παρεγχύματος, το δρυφρακτειδές ή πασσαλώδες, και σπογγώδες παρέγχυμα (Taiz and Zeiger, 1998).

Τα πασσαλώδη κύτταρα παρουσιάζουν τη μορφή δοκών ή πασσάλων κάθετα προσανατολισμένων στην επιφάνεια του φύλλου. Διατάσσονται σε μία ή περισσότερες επάλληλες στοιβάδες προς την πλευρά της προσαξονικής επιφάνειας. Το σπογγώδες παρέγχυμα αποτελείται από ακανόνιστα κύτταρα, με άφθονους μεσοκυττάριους χώρους (Αιβαλάκις, κ.α., 2003).

Η επιμήκης κατασκευή των κυττάρων του πασσαλώδους παρεγχύματος, σε συνδυασμό με την τοποθέτηση των χλωροπλάστων στα αντικληνή τοιχώματα, διευκολύνει τη διείσδυση της ακτινοβολίας στο εσωτερικό του μεσοφύλλου. Από την άλλη πλευρά το σχήμα των κυττάρων του σπογγώδους παρεγχύματος ευνοεί την απορρόφηση της φωτεινής ακτινοβολίας, ενώ η αποαξονική επιδερμίδα συμπεριφέρεται ως εσωτερικός ανακλαστήρας που επιστρέφει τα φωτόνια προς το εσωτερικό του μεσοφύλλου. Η τελευταία, επιτρέπει επίσης την αύξηση του πάχους του φύλλου, κυρίως με την αύξηση των στοιβάδων του πασσαλώδους παρεγχύματος, χωρίς να δημιουργούνται σημαντικά προβλήματα φωτισμού στις κατώτερες στοιβάδες των κυττάρων του μεσοφύλλου (Αιβαλάκις, κ.α., 2003).

Οι ηθμαγγειώδεις αγωγοί δεσμίδες διασχίζουν το μεσόφυλλο και γίνονται αντιληπτές με τη μορφή των νευρώσεων. Στο έλασμα καταφθάνουν οι τελικές απολήξεις του συστήματος μεταφοράς που ξεκινά από τη ρίζα και διασχίζει όλο το βλαστό και το μίσχο. Η μεταφορά νερού και θρεπτικών συστατικών επιτελείται μέσω των αγγείων του ξύλου τα οποία εντοπίζονται στην πλευρά της δεσμίδας που βρίσκεται προς την προσαξονική επιφάνεια του φύλλου, ενώ η εξαγωγή των φωτοσυνθετικών προϊόντων γίνεται μέσω των στοιχείων του ηθμού τα οποία εντοπίζονται στη πλευρά της δεσμίδας που βρίσκεται προς την αποαξονική επιφάνεια (Αιβαλάκις, κ.α., 2003).

## Εισαγωγή

Οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες συνήθως προστατεύονται από σκληρεγχυματικές ίνες και περιβάλλονται από παρεγχυματικά κύτταρα του λεγόμενου δεσμικού κολεού. Οι σκληρεγχυματικές ίνες προσφέρουν μηχανική στήριξη και προστασία έναντι προσβολών παθογόνων και εντόμων. Η μηχανική θωράκιση φαίνεται ότι είναι επιβεβλημένη αν ληφθεί υπόψη ότι οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες είναι εξαιρετικά πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά και σάκχαρα, επομένως αποτελούν στόχο για τους βιοτικούς εχθρούς. Τα κύτταρα του δεσμικού κολεού βοηθούν κυρίως στη τροφοδότηση του ηθμού με σάκχαρα (Αιβαλάκης, κ.α., 2003).

### 3.1. Φωτοσύνθεση σε ομοβαρή και ετεροβαρή φύλλα

Στα φύλλα πολυάριθμων φυτικών ειδών, κυρίως ξηροφύτων, ο δεσμικός κολεός σχηματίζει προεκτάσεις που συγκροτούνται από κύτταρα παρεγχύματος, κολεγχύματος ή σκληρεγχύματος οι οποίες εφάπτονται των δύο επιδερμίδων φύλλου. Οι προεκτάσεις αυτές προσφέρουν μηχανική στήριξη, προμηθεύουν με νερό τα επιδερμικά κύτταρα αλλά και μεταφέρουν φωτεινή ακτινοβολία στα κατώτερα στρώματα του μεσοφύλλου (Karabourniotis et al., 2000). Σε αυτή την περίπτωση οι σκληρεγχυματικές προεκτάσεις δεν διαθέτουν μεσοκυττάριους χώρους και δημιουργούν κατά κάποιο τρόπο "στεγανά" διαμερίσματα στο φύλλο. Τέτοια φύλλα χαρακτηρίζονται ως "ετεροβαρή", σε αντίθεση με αυτά που δε φέρουν σκληρεγχυματικές προεκτάσεις και χαρακτηρίζονται "ομοβαρή". Η ύπαρξη αυτών των εγκάρσιων φραγμάτων επηρεάζει τη διάχυση του CO<sub>2</sub>, την ομοιογενή λειτουργία της φωτοσύνθεσης και το άνοιγμα των στοματίων.

Στα ετεροβαρή φύλλα παρατηρείται σημαντικός εμπλουτισμός σε φωτεινή ακτινοβολία σε περιοχές του μεσόφυλλου που βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση από τις δύο επιφάνειες. Αυτός ο εμπλουτισμός είναι τόσο ποσοτικός όσο και ποιοτικός, καθώς η ακτινοβολία η οποία διαφεύγει από τις προεκτάσεις των σκληρεγχυματικών κολεών είναι εμπλουτισμένη σε φασματικές περιοχές αποδοτικότερες για τη φωτοσυνθετική διαδικασία. Η κατανομή και η πυκνότητα των διάφανων περιοχών είναι σημαντική καθώς καθορίζει τη φωτοσυνθετική απόδοση των φύλλων (Nikolopoulos et al., 2002).

### **4. Μέθοδοι εκχύλισης των φωτοσυνθετικών χρωστικών από τα φύλλα**

Οι χλωροφύλλες είναι οι χρωστικές που δίνουν στα φυτά το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα. Είναι αδιάλυτες στο νερό αλλά διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες. Η Ch1a είναι γαλαζοπράσινη και είναι παρούσα σε όλους τους αερόβιους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Αντίθετα η Ch1b είναι κιτρινοπράσινη και εμπεριέχεται στα φύλλα των ανώτερων φυτών και στα πράσινα φύκη. Για τον καθορισμό της σύστασης τους στα φύλλα χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι που θα εξεταστούν στη συνέχεια.

#### **4.1. Χρήση Ακετόνης – Μεθανόλης**

Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος προσδιορισμού χλωροφύλλης στους φυτικούς ιστούς περιλαμβάνει εκχύλιση του φυτικού ιστού με οργανικούς διαλύτες και στη συνέχεια καθαρισμό του εκχυλίσματος με φυγοκέντρηση και φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των χρωστικών με τη χρήση πρότυπης καμπύλης.

Οι πιο διαδεδομένοι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται για εκχύλιση είναι η ακετόνη (80%), η αιθανόλη και η μεθανόλη. Η εκχύλιση περιλαμβάνει λειοτρίβηση του φυτικού ιστού σε γουδί με τη βοήθεια άμμου σε χαμηλή θερμοκρασία και στο σκοτάδι.

Η μέθοδος της ακετόνης προτάθηκε από τον Arnon (Arnon, 1949) και κατά καιρούς έχουν προκύψει διάφορες παραλλαγές της μεθόδου.

Η μέθοδος της αιθανόλης παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα καθώς η χλωροφύλλη σε αιθανολικό διάλυμα είναι λιγότερο ασταθής, ενώ η αιθανόλη εκχυλίζει ευκολότερα τη χλωροφύλλη από ολόκληρα τα κύτταρα ή άθικτο ιστό σε σχέση με την ακετόνη.

Η μεθανόλη χρησιμοποιείται με τον ίδιο τρόπο κατά τη λειοτρίβηση του φυτικού ιστού για την εκχύλιση των φωτοσυνθετικών χρωστικών.

#### **4.2. Χρήση του διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO)**

Το DMSO είναι ένας διαλύτης με αμφιφιλικές ιδιότητες (Notman et al. 2006) που έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την εξαγωγή των χλωροφυλλών από φύκη (Burnison 1980; Shoaf and Liem 1976), λειχήνες (Barnes et al. 1992; Ronen and Galun 1984) και φύλλα των ανώτερων φυτών (Hiscox and Israelstam 1979; Barnes et al. 1992; Tait and Hik 2003; Richardson et al. 2002). Η μέθοδος είναι απλή και βασίζεται στην

## Εισαγωγή

εμβάπτιση δίσκων φύλλων σε συγκεκριμένη ποσότητα DMSO και επώαση σε θερμοκρασία 60-65°C. Μετά την επώαση ο διαλύτης αποστραγγίζεται και μετράται η απορρόφηση σε κατάλληλα μήκη κύματος στα οποία απορροφούν οι φωτοσυνθετικές χρωστικές. Πλεονεκτεί σε σχέση με άλλες μεθόδους (μεθανόλη, ακετόνη, αιθανόλη) στο γεγονός ότι η εξαγωγή χλωροφυλλών είναι εύκολη και γρήγορη καθώς δεν απαιτείται λειοτριβήση και φυγοκέντρωση (R. Devesa et al., 2007). Για αυτό τον λόγο είναι κατάλληλη για εφαρμογή ακόμη και σε συνθήκες πεδίου (Tait and Hik 2003) και επιτρέπει την προετοιμασία και ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα. Επιπλέον η σταθερότητα της εκχυλιζόμενης χλωροφύλλης από το DMSO κατά την αποθήκευση είναι καλύτερη εκείνης της μεθόδου της ακετόνης (Hiscox and Israelstam 1979; Barnes et al. 1992). Το μειονέκτημα που εμφανίζει είναι ότι η εκχύλιση των χρωστικών βασίζεται στη διάχυση του DMSO εντός των φωτοσυνθετικών ιστών, καθώς δε μπορεί να γίνει μηχανική διάσπαση κυττάρων. Επομένως, ο χρόνος επώασης δεν είναι σταθερός αλλά εξαρτάται από τα ιδιαίτερα ανατομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων του κάθε φυτικού είδους (Hiscox and Israelstam 1979; Barnes et al. 1992). Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι τα δείγματα επωάζονται στο DMSO έως ότου αποχρωματιστούν οι ιστοί. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η πλήρης εκχύλιση χλωροφύλλης με DMSO απαιτεί πολλές ώρες επώασης (Shinano et al 1996).





## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

---

Από παρατηρήσεις και διάσπαρτες αναφορές στη βιβλιογραφία δημιουργήθηκε το ερώτημα αν και πόσο είναι αποτελεσματική η εκχύλιση των φωτοσυνθετικών χρωστικών από τα φύλλα με την χρήση του DMSO ως μέσο εκχύλισης. Παρατηρώντας τα υπολείμματα των φύλλων ορισμένων φυτών μετά την επώαση με το DMSO, διαπιστώθηκε ότι η εκχύλιση ήταν ατελής, παρά την παραμονή της για παρατεταμένο χρονικό διάστημα στο DMSO.

Έτσι διατυπώθηκε η υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία τα φυτά που έχουν ετεροβαρή φύλλα είναι αυτά που κυρίως έχουν μειωμένη απόδοση στην εκχύλιση των χλωροφυλλών με τη μέθοδο του DMSO.

Τα ετεροβαρή φύλλα είναι γνωστό ότι διαθέτουν ένα εκτεταμένο δίκτυο προεκτάσεων των δεσμικών κολεών των ηθμαγγειωδών δεσμιδων στο έλασμα τους που τους προσδίδουν επιπλέον σκληρότητα και μια έντονη διαμερισματοποίηση των χλωροφυλλούχων περιοχών. Αποτέλεσμα αυτής της ανατομικής διάταξης είναι η δυσκολία που εμφανίζει ο διαλύτης να εμποτίσει τα χλωροφυλλούχα διαμερίσματα των φύλλων ώστε να εκχυλίσει το σύνολο των χλωροφυλλών του φύλλου.

Με βάση τα παραπάνω στόχος τη εργασίας αυτής ήταν η σύγκριση της απόδοσης της εκχύλισης των χλωροφυλλών με τη μέθοδο του DMSO από διάφορα φυτικά είδη με ετεροβαρή φύλλα σε σχέση με την κλασσική μέθοδο εκχύλισης με ακετόνης.

Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν μια σειρά φυτικών ειδών με ετεροβαρή φύλλα στα οποία προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των χλωροφυλλών με τις δύο μεθόδους και συγχρόνως μετρήθηκαν μια σειρά από κρίσιμες ανατομικές παραμέτρους ώστε να διαπιστωθεί εάν οι παράμετροι αυτές σχετίζονται με την απόδοση της εκχύλισης με DMSO.



## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Φυτικό υλικό

Για την παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν τα παρακάτω φυτικά είδη (Πίνακας 1) που παρουσιάζουν διαφορετικά ανατομικά χαρακτηριστικά στα φύλλα όσον αφορά τις προεκτάσεις του σκληρεγχοματικού κολεού.

Πίνακας 1. Τα πειραματόφυτα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

πειραματόφυτο	χαρακτηριστικά φύλλου
<i>Morus alba</i>	δικτυόνευρο
<i>Arundo plinii</i>	παραλληλόνευρο
<i>Avena sativa</i>	παραλληλόνευρο
<i>Quercus coccifera</i>	δικτυόνευρο
<i>Cercis siliquastrum</i>	δικτυόνευρο
<i>Nerium oleander</i>	δικτυόνευρο
<i>Magnolia grandiflorum</i>	δικτυόνευρο
<i>Sinarundinaria murialea</i>	παραλληλόνευρο

### 2. Μορφολογικές παράμετροι

#### 2.1 Μέτρηση πάχους φύλλου και ειδικής φυλλικής επιφάνειας

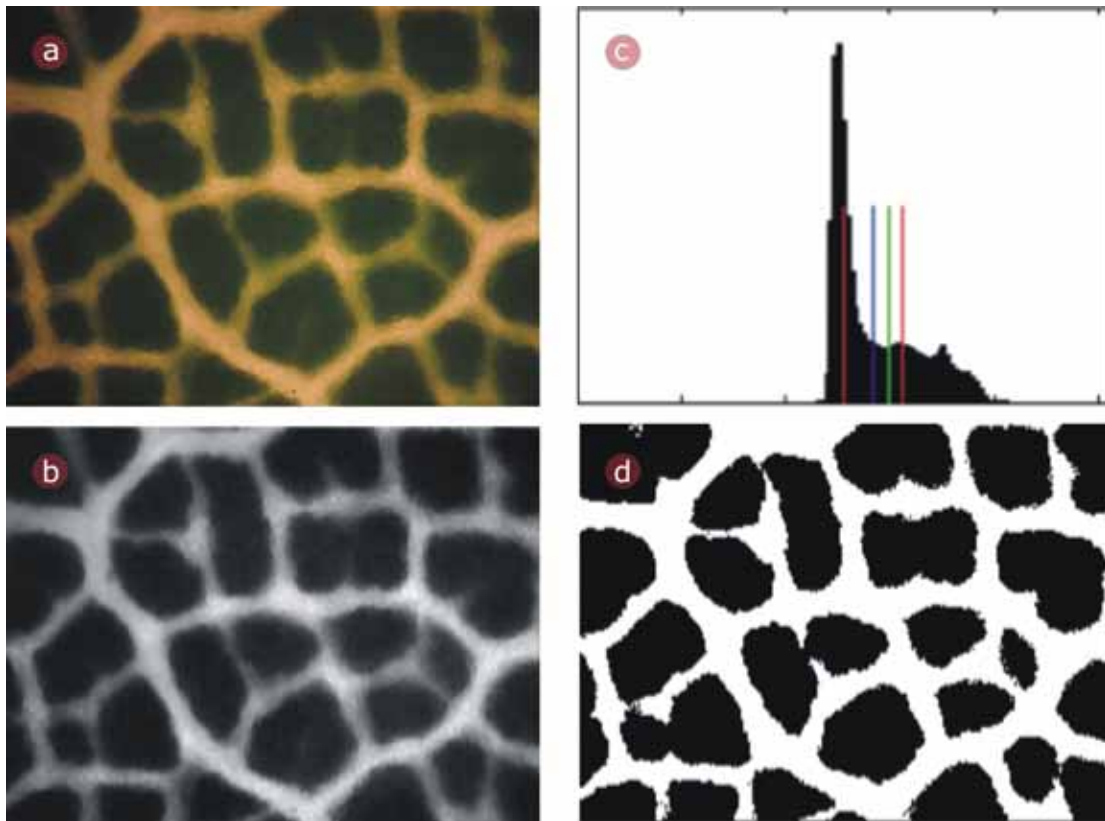
Για τη μέτρηση του πάχους των φύλλων έγιναν τομές με το χέρι σε νωπά φύλλα και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο (Zeiss AxioLab (Carl Zeiss, Jena, Germany)). Για τη μέτρηση της ειδικής φυλλικής επιφάνειας (SLA) πάρθηκαν δίσκοι διαμέτρου 1 cm από νωπά φύλλα ζυγίστηκαν και στη συνέχεια μετά από αφυδάτωση στους 70° C για 48 ώρες μετρήθηκε το ξηρό βάρος.

#### 2.2. Μέτρηση ποσοστού διαφανών περιοχών του ελάσματος

Για την μέτρηση του ποσοστού των διαφανών περιοχών ελήφθησαν φωτογραφίες του ελάσματος άθικτων φύλλων. Για το σκοπό αυτό, δίσκοι φύλλων τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και φωτίστηκαν από την αποαξονική επιφάνεια. Οι μικροφωτογραφίες καταγράφηκαν σε ψηφιακή φωτογραφική μηχανή τύπου CyberShot DSC-S75 (SONY Corporation, Japan) και αποθηκεύτηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή σε ψηφιακή μορφή. Η διάκριση των διαφανών περιοχών που αντιστοιχούν στους κολεούς των ηθμαγγειωδών δεσμίδων του φύλλου από τα χλωροφυλλούχα διαμερίσματα του ελάσματος έγινε με τη βοήθεια

## Υλικά και Μέθοδοι

προγράμματος ψηφιακής ανάλυσης εικόνας το οποίο αναπτύχθηκε σε περιβάλλον MatLab 60088 (Mathworks Inc, USA), (Nikolopoulos et al, 2002). Σύμφωνα με την παραπάνω μεθοδολογία, οι ψηφιακές μικροφωτογραφίες (εικόνα 5.a) μετατρέπονται σε μορφή γκριζας κλίμακας βάθους 8-bit (εικόνα 5b) και εξάγεται το ιστόγραμμα των συχνοτήτων των εντάσεων των εικονοστοιχείων (εικόνα.5.c). Ακολούθως εφαρμόζεται αλγόριθμος ο οποίος έχει ως εξαγόμενο την τιμή της έντασης για κάθε ένα από τα δύο μέγιστα του ιστογράμματος (εικόνα 5c). Ως σημείο



**Εικόνα 5.** Ενδεικτική αλληλουχία ανάλυσης εικόνας για τον υπολογισμό του ποσοστού των διαφανών περιοχών του φύλλου a. Αρχική μικροφωτογραφία φύλλου *Quercus coccifera* με διελαύνον φως b. Η ίδια μικροφωτογραφία μετά από τη μετατροπή της σε εικόνα γκριζας κλίμακας 256 αποχρώσεων c. Το ιστόγραμμα συχνοτήτων των τιμών έντασης των εικονοστοιχείων. Στο διάγραμμα με κόκκινη γραμμή επισημαίνονται τα δύο μέγιστα (το πρώτο αντιστοιχεί στα εικονοστοιχεία που συνιστούν τις περιοχές του μεσοφύλλου οι οποίες αποτελούνται από χλωροφυλλούχο παρέγχυμα ενώ το δεύτερο στα εικονοστοιχεία που συνιστούν τις διαφανείς περιοχές). Με πράσινη γραμμή επισημαίνεται το ελάχιστο του ιστογράμματος ενώ με μπλε γραμμή ο αριθμητικός μέσος των δύο μεγίστων ο οποίος επιλέγεται ως τιμή διαχωρισμού. d. Η τελική δυαδική εικόνα μετά την επεξεργασία. Το ποσοστό των διαφανών περιοχών επί του συνόλου της φυλλικής επιφάνειας στη συγκεκριμένη εικόνα είναι 28%. Κλίμακα 100  $\mu\text{m}$ .

## Υλικά και Μέθοδοι

διαχωρισμού των εντάσεων των εικονοστοιχείων για τη μετατροπή της εικόνας σε δυαδική μορφή (εικόνα 5d) επιλέγεται ο αριθμητικός μέσος των δύο μεγίστων (εικόνα 5c). Τέλος μετράται το ποσοστό των διαφανών περιοχών ως προς τη συνολική επιφάνεια της εικόνας (εικόνα 5).

### 3. Βιοχημικές και φυσιολογικές παράμετροι

#### 3.1. Μέτρηση χλωροφυλλών

##### 3.1.1. Εκχύλιση DMSO

Από φύλλα ίδιας ηλικίας λαμβάνονταν δίσκοι 0,5cm οι οποίοι ζυγίζονταν. Στη συνέχεια οι δίσκοι αφού τεμαχίστηκαν σε τεμάχια μεγέθους περίπου 1 mm<sup>2</sup> τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκαν 0,1gr CaCO<sub>3</sub> και 6ml DMSO και επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 65°C για 40 min. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10min στα 2972 g. Παραλήφθηκε το υπερκείμενο και μετρήθηκε η απορρόφηση του στα 665 nm 649 nm και 720nm σε φασματοφωτόμετρο. Για την κάθε μέθοδο έγιναν 5 επαναλήψεις. Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων οι εξισώσεις (Lichtenthaler et al.):

$$Chla = 12,47 A665 - 3,62 A649$$

$$Chlb = 25,06 A649 - 6,5 A665$$

οι τελικές τιμές των συγκεντρώσεων των χλωροφυλλών εκφράστηκαν σε mgr Chl.(g.f.w)<sup>-1</sup> ή mgr Chl cm<sup>-2</sup> επιφάνειας φύλλου.

Τα υπολείμματα των δίσκων κρατήθηκαν και ακολούθησε εκχύλιση με ακετόνη όπως αναφέρεται παρακάτω.

##### 3.1.2. Εκχύλιση με ακετόνη

Στη μέθοδο με ακετόνη οι δίσκοι εκχυλίστηκαν σε γουδί πορσελάνης στο οποίο είχαν προστεθεί 0,1 gr CaCO<sub>3</sub>, 10 ml ακετόνη 80% και 0,05 gr άμμος θαλάσσης. Ακολούθως το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε 10 min στα 2972 g. Στο υπερκείμενο μετρήθηκε η απορρόφηση στα 663 και 646 nm. Τα υπολείμματα των δίσκων από τη μέθοδο DMSO εκχυλίστηκαν με ακετόνη 80% (4ml) με την ίδια διαδικασία όπως παραπάνω και μετρήθηκαν οι απορροφήσεις στα 663 nm 646 nm. και 720 nm

## Υλικά και Μέθοδοι

Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων οι εξισώσεις (Lichtenhaler. Et al.):

$$Chla = 12,21 A663 - 2,81 A646$$

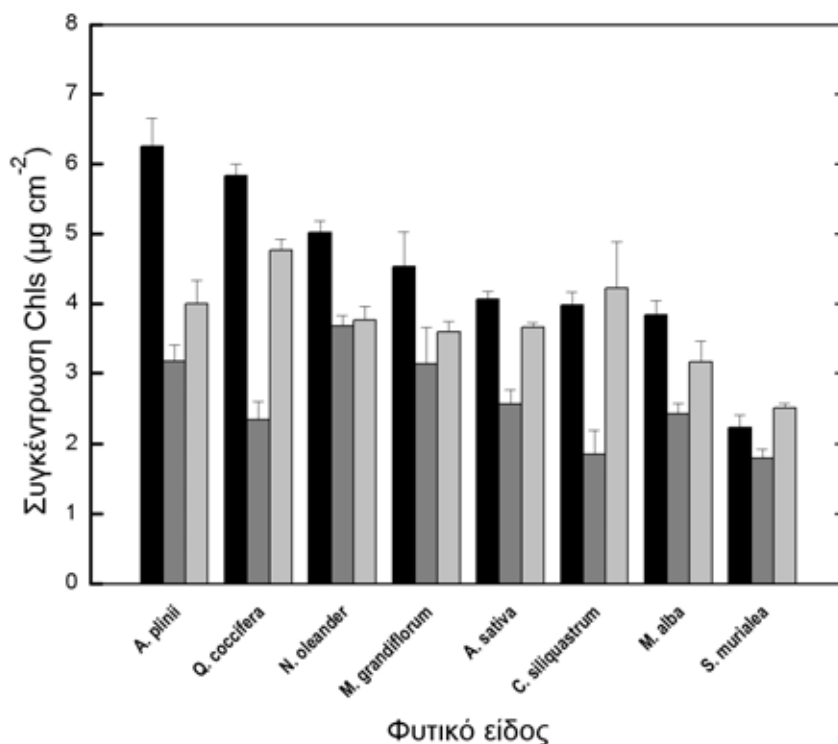
$$Chlb = 20,13 A646 - 5,03 A663$$

οι τελικές τιμές των συγκεντρώσεων των χλωροφυλλών εκφράστηκαν σε mgr Chl.(g.f.w)<sup>-1</sup> ή mgr Chl cm<sup>-2</sup> επιφάνειας φύλλου.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 1. Εκχύλιση χλωροφυλλών

Αρχικά εκχυλίστηκαν φύλλα από μια σειρά ετεροβαρών φυτικών ειδών με τους δύο οργανικούς διαλύτες, ακετόνη 80% και DMSO. Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων η απόδοση εκχύλισης με DMSO εκφράστηκε ως ποσοστό (%) της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών μετά από εκχύλιση με ακετόνη 80%. Ως ευρέως διαδεδομένη και θεωρούμενη “κλασσική” η μέθοδος με ακετόνη βοήθησε στην σύγκριση των αποδόσεων των δύο διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης.

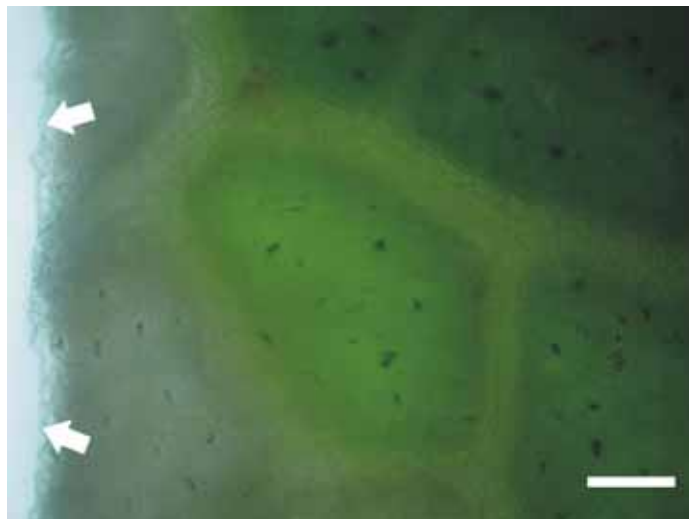


**Εικόνα 6.** Συγκέντρωση χλωροφυλλών μετά από εκχύλιση με: 80% ακετόνη (■), DMSO (■), DMSO με κενό (■)

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 6. Σε όλα τα δείγματα η ποσότητα των εκχυλιζόμενων χλωροφυλλών με DMSO εμφανίζεται χαμηλότερη σε σύγκριση με αυτήν που εκχυλίζεται με την ακετόνη 80%. Ας σημειωθεί ότι η εκχύλιση των υπολειμμάτων των φύλλων της μεθόδου του DMSO με ακετόνη 80% απέδωσε την υπολειπόμενη ποσότητα Chl σε κάθε περίπτωση.

## Αποτελέσματα

Μικροσκοπικές παρατηρήσεις φύλλων ιστών που επώαστηκαν σε DMSO έδειξαν ότι οι προεκτάσεις του σκληρεγχοματικού κολεού των ετεροβαρών φύλλων συμπεριφέρονται ως ανατομικά φράγματα τα οποία αποτρέπουν την είσοδο του διαλύτη μέσα στους φωτοσυνθετικούς ιστούς ακόμη κι όταν παραταθεί ο χρόνος επώασης (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** Φωτογραφία ενός κομμένου τμήματος φύλλου *Quercus coccifera* μετά την επώαση σε DMSO (65°C) για 40 min. Στο κομμένο άκρο του φύλλου (άσπρα βέλη) η εκχύλιση των χρωστικών έχει ολοκληρωθεί και το φύλλο έχει αποχρωματιστεί, ωστόσο στους φωτοσυνθετικούς ιστούς που περιβάλλονται από προεκτάσεις δεσμικών κολεών (aeroles) η εκχύλιση δεν έχει ολοκληρωθεί. Η διαβάθμιση του χρώματος στο κεντρικό aerole υποδεικνύει μερική εκχύλιση, ενώ το βαθύ πράσινο χρώμα δεξιά υποδεικνύει ότι ο διαλύτης δεν έχει εισχωρήσει στα σημεία αυτά.

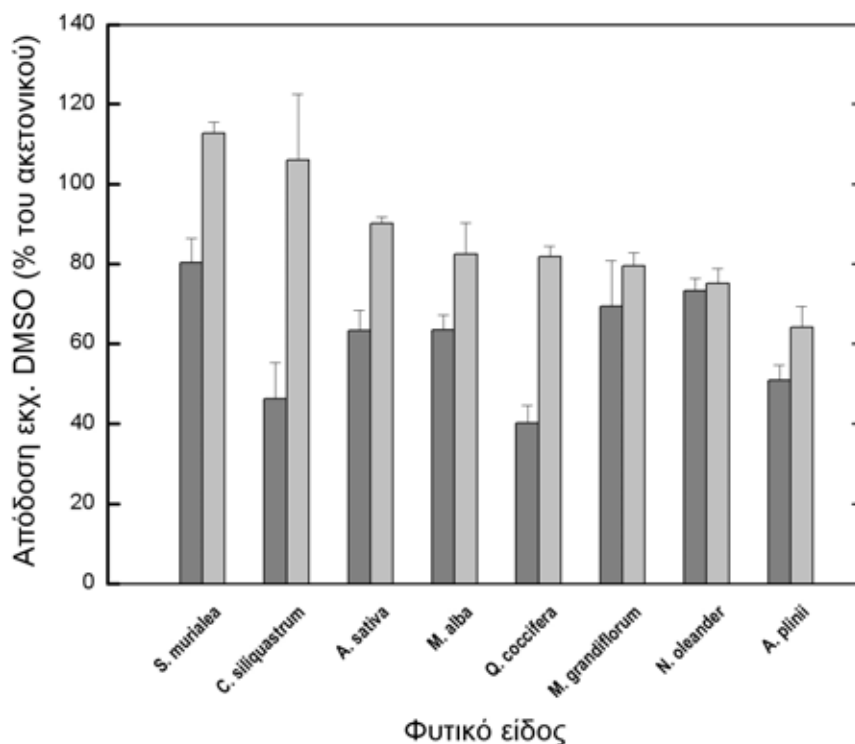
Εξαιτίας της ύπαρξης αυτών των ανατομικών φραγμάτων, έγινε η υπόθεση ότι η διήθηση με κενό των φυτικών ιστών παρουσία DMSO θα επιτάχυνε την είσοδο του διαλύτη και συνεπώς θα αυξανόταν η ικανότητα εκχύλισης των φωτοσυνθετικών χρωστικών με DMSO. Η ικανότητα εκχύλισης του DMSO αυξήθηκε σημαντικά εφαρμόζοντας την διήθηση με κενό σε τομές φύλλων με την παρουσία θερμού (65 °C) DMSO κατά τη διάρκεια της επώασης ( Εικόνα 6).

Στην Εικόνα 8 παρουσιάζεται η απόδοση της εκχύλισης των χλωροφυλλών ως το επί % της συνολικής συγκέντρωσης χλωροφύλλης κατά την εκχύλιση με ακετόνη 80%. Παρατηρούμε ότι πράγματι μετά τη διήθηση σε κενό αυξάνεται σημαντικά η απόδοση εκχύλισης του DMSO στα φύλλα όλων των φυτικών ειδών που εξετάστηκαν.



## Αποτελέσματα

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, όλα τα δείγματα εμφάνισαν υψηλότερη απόδοση εκχύλισης με DMSO (άνω του 75%) και μέση απόδοση στο 86% σε σύγκριση με την επεξεργασία χωρίς κενό με μέση απόδοση 61% (Πίνακας 1).



**Εικόνα 8.** Η απόδοση εκχύλισης με DMSO πριν (■) και μετά το κενό (□).

**Πίνακας 1.** Συγκέντρωση εκχυλιζόμενων χλωροφυλλών στα ετεροβαρή φύλλα διαφορετικών φυτικών ειδών με 80% ακετόνη και απόδοση της εκχύλισης με DMSO (ως % της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών στο ακετονικό εκχύλισμα) χωρίς προχειρισμό ή μετά από προχειρισμό με κενό (-1000 mbar). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3-10 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές αφορούν στη σύγκριση μεταξύ συγκέντρωσης χλωροφυλλών του ακετονικού εκχυλίσματος και του εκχυλίσματος σε DMSO σύμφωνα με το Student's *t*-test (\*\*  $P < 1\%$ ; \*  $P < 5\%$ ).

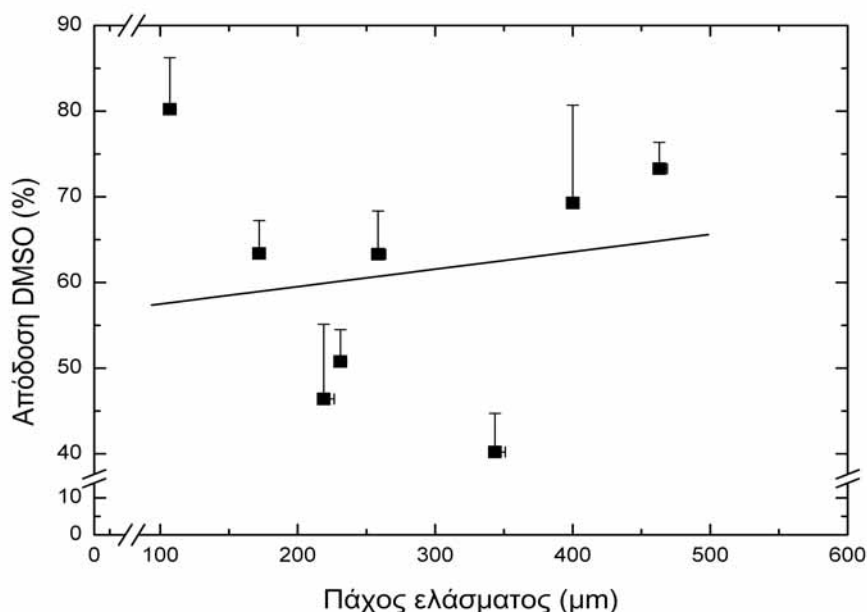
Φυτικό είδος	Μέση απόδοση χλωροφυλλών (μg cm <sup>-2</sup> )	Απόδοση DMSO (%) 0 mbar	Απόδοση DMSO (%) -1000 mbar	Significance
<i>Sinarundinaria</i>	2.23 $\pm$ 0.18	80 $\pm$ 6	113 $\pm$ 3	
<i>Magnolia grandiflorum</i>	4.53 $\pm$ 0.90	61 $\pm$ 1	86 $\pm$ 5	
<i>Morus alba</i>	3.84 $\pm$ 0.20	63 $\pm$ 4	82 $\pm$ 8	**
<i>Arundo plinii</i>	6.25 $\pm$ 0.41	51 $\pm$ 4	64 $\pm$ 5	** *
<i>Avena sativa</i>	4.06 $\pm$ 0.12	63 $\pm$ 5	90 $\pm$ 2	** *
<i>Quercus coccifera</i>	5.83 $\pm$ 0.17	40 $\pm$ 4	82 $\pm$ 3	** **
<i>Nerium oleander</i>	5.02 $\pm$ 0.17	73 $\pm$ 3	75 $\pm$ 4	** **
<i>Cercis siliquastrum</i>	3.98 $\pm$ 0.19	46 $\pm$ 9	106 $\pm$ 17	**

## 2. Απόδοση της εκχύλιση χλωροφυλλών με DMSO

### Συσχέτιση της με ανατομικές παραμέτρους του φύλλου

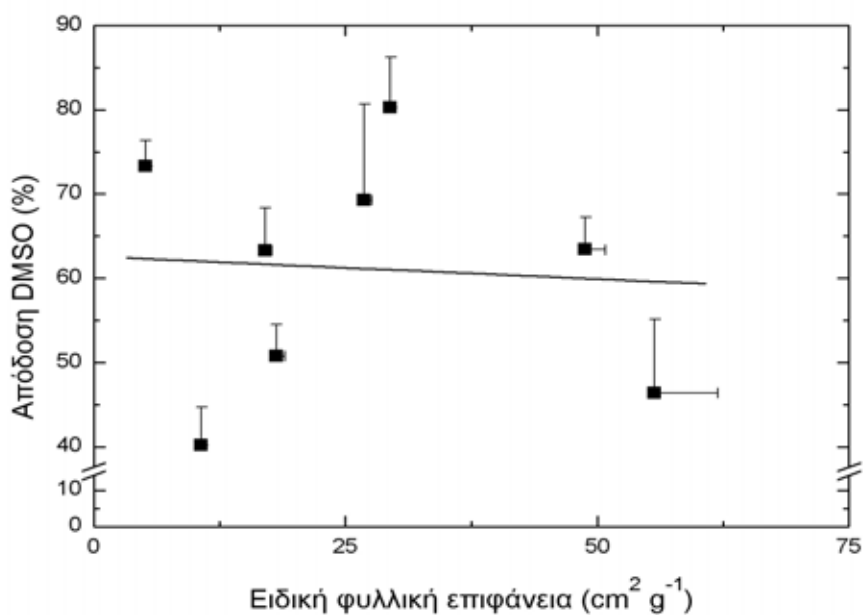
Στην προσπάθεια να ερμηνευθεί η μειωμένη απόδοση εκχύλισης των χλωροφυλλών με DMSO στα ετεροβαρή φύλλα, κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί εάν η ανατομία των φύλλων κάθε φυτικού είδους επηρεάζει την απόδοση εκχύλισης του DMSO. Υπολογίστηκαν κρίσιμες ανατομικές παράμετροι όπως το πάχος του φύλλου (LT), η πυκνότητα του (LD) και ο δείκτης φυλλικής επιφάνειας (SLA).

Η συσχέτιση της απόδοσης (% του ακετονικού) της εκχύλισης με DMSO με το πάχος του ελάσματος του φύλλου δίδεται στην Εικόνα 9, η συσχέτιση με την ειδική φυλλική επιφάνεια (SLA) στην εικόνα 10 και με την πυκνότητα φύλλου (LD) στην εικόνα 11. Όπως φαίνεται και στις τρεις περιπτώσεις, η γραμμική συσχέτιση της κάθε παραμέτρου με την απόδοση εκχύλισης του διαλύτη ήταν πολύ ασθενής.

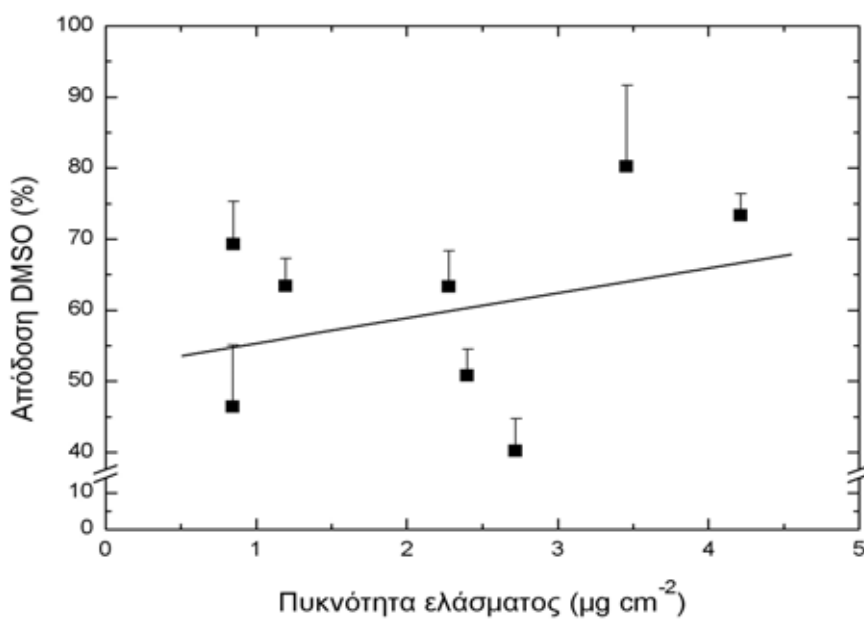


**Εικόνα 9.** Γραμμική συσχέτιση μεταξύ του πάχους του ελάσματος και της απόδοσης εκχύλισης χλωροφυλλών με DMSO. ( $r^2 = 0,0393$ ;  $P = 0,6380$ ).

## Αποτελέσματα



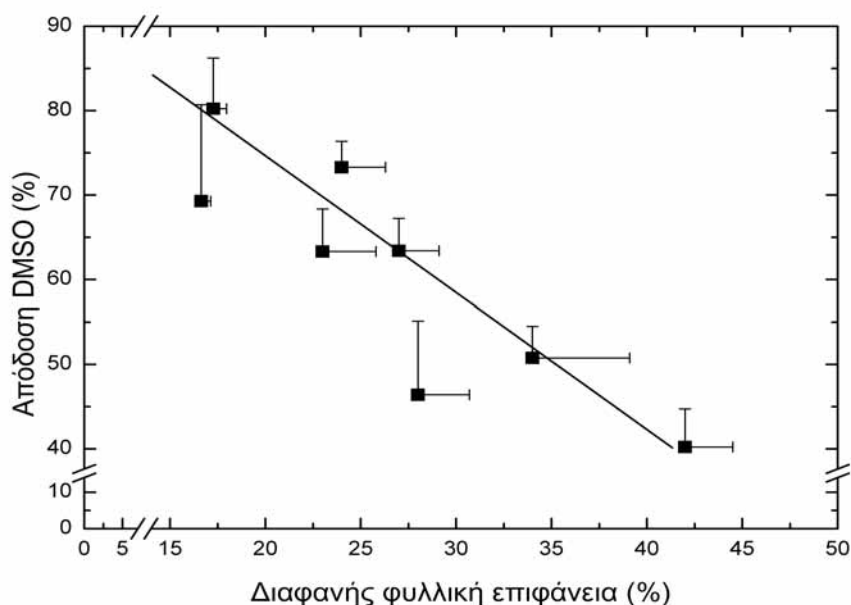
**Εικόνα 10.** Γραμμική συσχέτιση μεταξύ της ειδικής φυλλικής επιφάνειας και της απόδοσης εκχύλισης χλωροφυλλών με DMSO ( $r^2 = 0,0050$ ;  $P = 0,8678$ ).



**Εικόνα 11.** Γραμμική συσχέτιση μεταξύ της πυκνότητας του ελάσματος και της απόδοσης εκχύλισης χλωροφυλλών με DMSO ( $r^2 = 0,1275$ ;  $P = 0,3852$ ).

## Αποτελέσματα

Ισχυρή ωστόσο αρνητική συσχέτιση ( $r^2 = 0,85$ ,  $p=0,001$ ) διαπιστώθηκε μεταξύ της απόδοσης εκχύλισης του DMSO και της επιφάνειας των διάφανων περιοχών (TLA) του ελάσματος των ετεροβαρών φύλλων (Εικόνα 12). Το TLA είναι μια παράμετρος που απεικονίζει την επιφάνεια του φύλλου που καταλαμβάνεται από τις προεκτάσεις των δεσμικών κολεών και είναι κατά συνέπεια ενδεικτική του πάχους και της πυκνότητας αυτών των δομών (Nikolopoulos et al. 2003). Συνεπώς η αύξηση του TLA, αντιπροσωπεύει ισχυρότερες προεκτάσεις δεσμικών κολεών, ισχυρότερη παρεμπόδιση της διάχυσης του DMSO μέσα στους ιστούς του φύλλου, και επομένως χαμηλότερη απόδοση.



**Εικόνα 12.** Γραμμική συσχέτιση μεταξύ των διαφανών περιοχών του φύλλου (TLA) και της απόδοσης εκχύλισης χλωροφυλλών με DMSO ( $r^2 = 0,85$ ;  $P = 0,001$ ).

Σημείο εκκίνησης της μελέτης αυτής απετέλεσε η παρατήρηση ότι η απόδοση εκχύλισης φωτοσυνθετικών χρωστικών του DMSO από φύλλα αντιπροσωπευτικών φυτικών ειδών της μεσογειακής χλωρίδας υπήρξε απογοητευτική.

Σύμφωνα με τους Hiscox και Israelstam (1979) και Barnes et al. (1992) η εκχύλιση χλωροφυλλών από φυτικούς ιστούς με το DMSO απαιτεί επώαση για διαφορετικούς χρόνους, αναλόγως των ανατομικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών των φύλλων του κάθε είδους. Οι ερευνητές αυτοί, ωστόσο, δεν προσδιόρισαν ποια από τα χαρακτηριστικά αυτά επηρεάζουν την εκχύλιση των φωτοσυνθετικών χρωστικών με DMSO. Εξάλλου στάθηκε αδύνατον να προταθεί ένας σταθερός χρόνος επώασης των φύλλων με το διαλύτη. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι συγκεκριμένες ανατομικές παράμετροι όπως οι SLA, LD και LT δεν επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση εκχύλισης των χλωροφυλλών με το DMSO. Επομένως έπρεπε να εξεταστούν και άλλες παράμετροι ώστε να εξηγηθούν τα αποτελέσματα.

Τα φυτικά είδη θα μπορούσαν να χωριστούν σε δύο βασικές ομάδες, σε αυτά που φέρουν ομοβαρή φύλλα και αυτά που φέρουν ετεροβαρή. Όπως τονίστηκε στην εισαγωγή, τα ετεροβαρή φύλλα χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη προεκτάσεων του δεσμικού κολεού οι οποίες προσφέρουν μηχανική στήριξη, προμηθεύουν με νερό τα επιδερμικά κύτταρα και μεταφέρουν φωτεινή ακτινοβολία στα κατώτερα στρώματα του μεσοφύλλου. Αυτές οι προεκτάσεις δημιουργούν ανατομικά φράγματα τα οποία διαχωρίζουν τα φωτοσυνθετικά κύτταρα σε στεγανά διαμερίσματα. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα ανατομικά αυτά φράγματα πιθανόν να αποτρέπουν την είσοδο του DMSO μέσα στα επιμέρους φωτοσυνθετικά διαμερίσματα στο εσωτερικό του φύλλου. Άλλωστε, η παράμετρος TLA που σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά των προεκτάσεων του σκληρεγχυματικού κολεού παρουσιάζει ισχυρή αρνητική συσχέτιση με την απόδοση εκχύλισης του DMSO.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων είναι φανερό ότι τα φυτικά είδη με ετεροβαρή φύλλα παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή απόδοση εκχύλισης των χλωροφυλλών μετά από επώαση σε DMSO. Η μικροσκοπική

## Συζήτηση

παρατήρηση των τομών φύλλων έδειξε ότι το DMSO δεν μπορεί να φτάσει στο εσωτερικό των ιστών με αποτέλεσμα να μην πραγματοποιείται πλήρης εκχύλιση. Για να ξεπεραστεί το εμπόδιο αυτό και να μπορέσει ο διαλύτης να εισχωρήσει στο εσωτερικό του φύλλου, στα τεμαχισμένα φύλλα εφαρμόστηκε κενό παρουσία DMSO στη θερμοκρασία επώασης. Όπως έδειξαν τα αποτελέσματα η εφαρμογή του κενού πράγματι έφερε επιθυμητά αποτελέσματα. Η απόδοση αυξήθηκε σημαντικά καθώς με το κενό επιταχύνθηκε η διάχυση του DMSO στους ιστούς οπότε και πραγματοποιήθηκε πλήρης ή σχεδόν πλήρης εκχύλιση των χρωστικών η οποία έγινε φανερή ύστερα από μικροσκοπική εξέταση των τομών. Ο διαλύτης είχε εισχωρήσει σε όλους τους εσωτερικούς ιστούς και είχε ξεπεράσει το φράγμα των προεκτάσεων του δεσμικού κολεού.

Ως συμπέρασμα, η προσθήκη του σταδίου της επώασης με DMSO υπό καθεστώς κενού, βελτιώνει τη διαδικασία εκχύλισης φωτοσυνθετικών χρωστικών με DMSO. Συντομεύεται σημαντικά ο χρόνος επώασης και βελτιώνεται θεαματικά η απόδοση του διαλύτη, ακόμη και σε "δύσκολα" φύλλα πειραματόφυτων.

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andersson, B. and Barber, J. 1996. Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. In: N.R. Baker (ed) *Photosynthesis and the environment*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 101-121
- Barnes JD, Balaguer L, Manrique E, Elvira S, Davison AW (1992) A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Envir. Exp. Bot.* 32:85-100
- Bartley, G.E. and Scolnik, P.A. 1995. Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction and human health. *Plant Cell*, 7: 1027-1038
- Burnison BK (1980) Modified dimethylsulfoxide (DMSO) extraction for chlorophyll analysis of phytoplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37:729-732
- Devesa R., Moldes A. , Diaz-Fierros F., Barral M.T. (2007) Extraction study of algal pigments in river bed sediments by applying factorial designs. *Talanta* 72:1546-1551
- Hall, D.O. and Rao, K.K. 1999. *Photosynthesis*. Cambridge: Cambridge University Press
- Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhar-Nordenkamp, H.R., Leegood R.C. and Long, S.P.(1993). *Photosynthesis and Production in a Changing Environment: a field and laboratory manual*. Chapman and Hall, London.
- Heldt H-W. 1997. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford university Press. Oxford.
- Hiscox JD, Israelstam GF (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57:1332-1334
- Hopkins W.G. 1995. *Introduction to Plant Physiology*. Wiley, New York.

## Βιβλιογραφία

- Karabourniotis G, Bornman JF and Nikolopoulos D. 2000. A possible optical role of the bundle sheath extensions of the heterobaric leaves of *Vitis vinifera* and *Quercus coccifera*. *Plant, Cell and Environment*, 23:423-430.
- Lawlor, D.W. 2001. Photosynthesis. Oxford: Bios Scientific Publishers
- Lichtenthaler Hartmut K. and Alan R. Wellburn. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. 603<sup>rd</sup> Meeting, Liverpool.
- Nikolopoulos, D., Liakopoulos, G., Drossopoulos, I. and Karabourniotis, G. 2002. The relationship between anatomy and photosynthetic performance of heterobaric leaves. *Plant Physiology*, 129: 235-243
- Notman R, Noro M, O;Malley B, Anwar J (2006) Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 13982-13983
- Richardson AD, Duigan SP, Berlyn GP (2002) An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytol.* 153: 185-194
- Ronen R, Galun M (1984) Pigment extraction from lichens with dimethylsulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Envir. Exp. Bot.* 24:239-245
- Siefermann-Harms, D. 1985. Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 811: 325-355
- Shinano T, Lai TT, Kawamukai T, Inoue MT, Koike T, Tadano T (1996) Dimethylsulfoxide method for the extraction of chlorophylls a and b from the leaves of wheat, field bean, dwarf bamboo and oak. *Photosynthetica* 32:409-415
- Shoaf WT, Lium BW (1976) Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethylsulfoxide. *Limnol. Oceanog.* 21:926-928
- Tait MA, Hik DS (2003) Is dimethylsulfoxide a reliable solvent for extracting chlorophyll under field conditions? *Photos. Res.* 78:87-91



## **Βιβλιογραφία**

- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc, New York
- Αϊβαλάκης, Γ., Καραμπουρνιώτης, Γ. και Φασσέας, Κ. 2003. Σημειώσεις Γενικής Βοτανικής. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Γαβαλάς Α.Ν. 2003. Φωτοσύνθεση ΙΙ: Βιοχημικές αντιδράσεις. Από: Φυσιολογία φυτών από το μόριο στο περιβάλλον. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Α. Κ.. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Γανωτάκης Δ., Κοτζαμπάσης Κ. 2003. Από:Φυσιολογία Φυτών, από το Μόριο στο Περιβάλλον. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Κ.Α. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Δροσόπουλος Ι. 1998. Φυσιολογία Φυτών. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών



