

*Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών*

Πιθανοί φυσιολογικοί ρόλοι των λιθοκύστεων σε αντιπροσωπευτικά είδη

Βασιλική Λουρίδα



*Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του
μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης*

Αθήνα 2005

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

**Πιθανοί φυσιολογικοί ρόλοι των λιθοκύστεων σε
αντιπροσωπευτικά είδη**

Βασιλική Λουρίδα

Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακής
εξειδίκευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού
Πανεπιστημίου Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2005

Το θέμα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης εγκρίθηκε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνθεσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (ΓΣΕΣ 51/14-1-2004). Η πενταμελής εξεταστική επιτροπή εγκρίθηκε με απόφαση της ΓΣΕΣ 48/8-10-2003.

πενταμελής εξεταστική επιτροπή

Γ. Καραμπουρνιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής (επιβλέπων),
Ι. Δροσόπουλος, Καθηγητής, (μέλος)
Π. Κατινάκης, Καθηγητής, (μέλος)
Κ. Φασσέας, Αναπληρωτής Καθηγητής (μέλος),
Γ. Αϊβαλάκης, Λέκτορας (μέλος)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	ix
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Τα γενικά χαρακτηριστικά της φωτοσύνθεσης.....	9
1.2. Ο μηχανισμός της διαπνοής.....	12
1.3. Κυτταρικά έγκλειστα.....	14
1.4. Η Ανατομία των λιθοκύστεων.....	17
1.5. Πιθανή φυσιολογική σημασία των κυτταρικών εγκλείστων.....	19
1.6. Τα κοκολιθοφόρα.....	21
1.7. Μορφολογία λιθοκύστεων των πειραματόφυτων.....	23
1.7.1. Χαρακτηριστικά των λιθοκύστεων των φύλλων των φυτών του γένους <i>Ficus</i>	23
1.7.2. Χαρακτηριστικά των λιθοκύστεων των φύλλων του φυτού <i>Morus alba</i>	24
1.7.3. Χαρακτηριστικά των λιθοκύστεων των φύλλων του φυτού <i>Parietaria judaica</i>	25
2.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	29
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
3.1. Τα πειραματόφυτα.....	33
3.2. Μικροσκοπικές παρατηρήσεις.....	33
3.3. Μέτρηση διαστάσεων των κυστόλιθων.....	33
3.4. Απομόνωση κυστόλιθων.....	35
3.5. Μετρήσεις φωτοσυνθετικής έκλυσης O ₂	36
3.6. Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των κυστόλιθων φύλλων <i>Morus alba</i> με τη μέθοδο FT-RAMAN.....	36
3.7. Πείραμα υδατικής καταπόνησης.....	36
3.8. Μετρήσεις των ημερονύκτιων διακυμάνσεων των διαστάσεων των κυστόλιθων και της στοματικής αγωγιμότητας.....	37
3.9. Επίδραση ατμόσφαιρας ελεύθερης CO ₂ σε νεαρά φυτά <i>F.nitida</i>	37
3.10. Επίδραση ατμόσφαιρας ελεύθερης CO ₂ σε δισκία φύλλων <i>M.alba</i> και <i>P.judaica</i>	38
3.11. Επίδραση του ABA σε δίσκους φύλλων <i>Ficus nitida</i> , <i>Morus alba</i> και <i>Parietaria judaica</i>	39
3.12. Άλλες μετρήσεις.....	39

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
4.1. Ανατομικές παρατηρήσεις των κυστόλιθων των τριών πειραματόφυτων.....	43
4.2. Μετρήσεις των διαστάσεων των κυστόλιθων.....	46
4.3. Απομόνωση κυστόλιθων.....	46
4.4. Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των κυστόλιθων φύλλων <i>Morus alba</i> με τη μέθοδο FT-RAMAN.....	48
4.5. Εντοπισμός ασβεστίου σε κυστόλιθους φύλλων μουριάς με μικροανάλυση ακτίνων-X.....	51
4.6. Επίδραση της έλλειψης CO ₂ στις διαστάσεις των κυστόλιθων.....	51
4.7. Επίδραση των ημερονύκτιων διακυμάνσεων στις διαστάσεις των κυστόλιθων.....	54
4.8. Επίδραση του ABA στις διαστάσεις των κυστόλιθων.....	56
4.9. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στις διαστάσεις των κυστόλιθων.....	58
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να δοθεί απάντηση στην υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία οι κυστόλιθοι αποτελούν δυναμικά συστήματα που εξυπηρετούν κατά προτεραιότητα τη διαχείριση των αποθεμάτων ανόργανου άνθρακα, και όχι ασβεστίου. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκαν δεδομένα τα οποία σχετίζονται με τη δομή, τη θέση και τη συμπεριφορά των κυστόλιθων / λιθοκύστεων ως δυναμικού συστήματος διαχείρισης. Η δομή των λιθοκύστεων είναι αυτή του άμορφου χυμοτοπιακού έγκλειστου. Οι κυστόλιθοι, λόγω θέσης, θα μπορούσαν κάλλιστα να επιτελέσουν το ρόλο των εναλλακτικών πηγών ανόργανου άνθρακα για τη φωτοσυνθετική λειτουργία, δεδομένου ότι εντοπίζονται μεταξύ των φωτοσυνθετικών κυττάρων του πασσαλώδους ή και σπογγώδους παρεγχύματος, ανάλογα με το φυτικό είδος. Τα αποτελέσματα των φασμάτων FT-Raman και της μικροανάλυσης ακτίνων $-X$ σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρρωσης επιβεβαίωσαν ότι οι κυστόλιθοι των ειδών *M. alba* και *P. judaica* αποτελούνται κυρίως από ανθρακικό ασβέστιο. Διερευνήθηκε επίσης η δυνατότητα απόδοσης των αποθεμάτων άνθρακα των κυστόλιθων υπό συνθήκες αδυναμίας τροφοδοσίας με CO_2 από το εξωτερικό εναέριο περιβάλλον. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα τα οποία είχαν ως στόχο να αποκλειστεί η τροφοδοσία άνθρακα προς τα φωτοσυνθετικά κύτταρα, είτε καλύπτοντας τα φύλλα με διάφορα υλικά, είτε παρέχοντας στα φυτά ατμόσφαιρα με μηδενική συγκέντρωση CO_2 . Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ελάττωση του μεγέθους των κυστόλιθων, μέσα σε λίγες ώρες από την εφαρμογή του πειραματικού χειρισμού. Μελετήθηκε επίσης η συμπεριφορά των λιθοκύστεων σε συνθήκες κάτω από τις οποίες τα στομάτια παραμένουν κλειστά. Παρουσία ABA, μιας φυτορμόνης η οποία προκαλεί το κλείσιμο των στοματίων, το μέγεθος των κυστόλιθων μειώνεται ταχέως μέσα σε λίγες μόνο ώρες. Το ίδιο συμβαίνει και σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης, ωστόσο φαίνεται ότι οι κυστόλιθοι ανακτούν ταχέως και πάλι το αρχικό τους μέγεθος. Μάλιστα εάν τα φυτά ποτιστούν και πάλι, το μέγεθος των κυστόλιθων των φυτών αυτών είναι μεγαλύτερο εκείνου των κυστόλιθων των φυτών-μαρτύρων. Επίσης το μέγεθος των κυστόλιθων ελαττώνεται κατά τη διάρκεια της ημέρας και αυξάνεται κατά τη διάρκεια της νύκτας, ενώ μπορεί να παρατηρηθεί και πρόσκαιρη αύξηση του μεγέθους και στη διάρκεια της ημέρας, όταν τα στομάτια κλείνουν. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι οι κυστόλιθοι δεν αποτελούν μια στατική δεξαμενή αποθήκευσης ιόντων ασβεστίου τα οποία βρίσκονται σε περίσσεια, αλλά ένα δυναμικό σύστημα, το οποίο έχει τη δυνατότητα

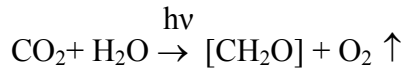
να αποδώσει εκ νέου τα αποθηκευμένα ιόντα στο κυτταρικό περιβάλλον, όταν αυτό το επιβάλλουν οι συνθήκες. Επίσης ότι η λειτουργία των λιθοκύστεων συνδέεται κυρίως με την αντιμετώπιση αντίξοων συνθηκών, κυρίως υδατικής καταπόνησης.

Εισαγωγή

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τα γενικά χαρακτηριστικά της φωτοσύνθεσης

Η φωτοσύνθεση είναι η διαδικασία μέσω της οποίας οι αυτότροφοι οργανισμοί αξιοποιούν τη φωτεινή ακτινοβολία και συνθέτουν οργανικές ενώσεις από πρόδρομα ανόργανα συστατικά. Η όλη διαδικασία μπορεί να περιγραφεί ως εξής:



Στην εξίσωση αυτή το $[\text{CH}_2\text{O}]$ αντιπροσωπεύει μια «υδατανθρακική μονάδα». Με τη συνένωση τριών υδατανθρακικών μονάδων προκύπτει ως καθαρό προϊόν ένα μόριο τριόζης. Η αντίδραση αυτή είναι ισχυρά ενδεργονική και η όλη διαδικασία μπορεί να διακριθεί σε δύο φάσεις:

Στη πρώτη φάση διεξάγονται οι λεγόμενες *φωτεινές αντιδράσεις* ή *φωτοαντιδράσεις* για τη διεξαγωγή των οποίων είναι απαραίτητη η παρουσία φωτισμού. Η ενέργεια της ακτινοβολίας μετατρέπεται σε χημική υπό τη μορφή υψηλού ενεργειακού περιεχομένου σταθερών χημικών ενώσεων, του NADPH και του ATP. Στη φάση αυτή μόρια νερού φωτολύονται παράγοντας ηλεκτρόνια και πρωτόνια καθώς και μοριακό οξυγόνο. Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει καθαρά βιοχημικές αντιδράσεις στις οποίες η ενέργεια που έχει ενσωματωθεί στα NADPH και ATP χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση οργανικών ενώσεων. Η φάση αυτή, η οποία δεν εξαρτάται άμεσα από την ύπαρξη φωτισμού, αναφέρεται ως *σκοτεινή φάση* ή *σκοτεινές αντιδράσεις* (Αϊβαλάκης κ.α., 2005).

Η φωτοσύνθεση πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες, τα εξειδικευμένα κυτταρικά οργανίδια δισκοειδούς συνήθως μορφής που απαντούν στα κύτταρα του φωτοσυνθετικού παρεγχύματος. Συγκεκριμένα οι φωτοχημικές αντιδράσεις επιτελούνται στα Φωτοσυστήματα (μεγαλομοριακά σύμπλοκα πρωτεϊνών-χρωστικών) τα οποία εντοπίζονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών των χλωροπλαστών. Το Φωτοσύστημα I, που διεγείρεται από φως μήκους κύματος άνω των 700nm, παράγει μια ισχυρά αναγωγική ένωση η οποία και οδηγεί στη σύνθεση του NADPH. Το Φωτοσύστημα II, το οποίο απαιτεί φως μήκους κύματος κάτω των 680nm, παράγει μια ισχυρά οξειδωτική ένωση η οποία προκαλεί τη διάσπαση (φωτόλυση) του νερού και έκλυση O_2 . Η ροή ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο Φωτοσυστημάτων παράγει μια διαβάθμιση ηλεκτροχημικού δυναμικού και pH μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης του θυλακοειδούς η οποία χρησιμοποιείται

ως κινητήριος δύναμη για τη σύνθεση ATP. Τα ηλεκτρόνια ρέουν από το Φωτοσύστημα II προς το Φωτοσύστημα I μέσω του συμπλόκου των κυτοχρωμάτων bf (Stryer, 1994; Taiz and Zeiger, 1998). Κάθε Φωτοσύστημα διαθέτει ένα φωτοχημικό κέντρο αντίδρασης, δηλαδή ένα διαμεμβρανικό σύμπλοκο πρωτεϊνών στο οποίο εδράζεται ένα μόριο Chla ειδικής μορφής και στο οποίο συμβαίνει ο διαχωρισμός φορτίου. Τα κέντρα αντίδρασης των Φωτοσυστημάτων I και II ονομάζονται P700 και P680 αντίστοιχα, από τα μέγιστα απορρόφησης τα οποία παρουσιάζουν. Κάθε κέντρο αντίδρασης διαθέτει το δικό του φωτοσυλλεκτικό μηχανισμό (Δροσόπουλος, 1998). Οι χρωστικές στο φωτοσυλλεκτικό μηχανισμό είναι κατάλληλα διευθετημένες, ώστε η απορρόφηση ενός φωτονίου από ένα μόριο χρωστικής να μεταφέρει τη διεγέρση αναγκαστικά προς το κέντρο αντίδρασης (Lawlor, 2001). Η αλληλεπίδραση των Φωτοσυστημάτων I και II έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το νερό στο NADP-H₂ και την παράλληλη δημιουργία της διαβάθμισης πρωτονίων για τη σύνθεση ATP (Καράταγλης, 1999; Stryer, 1994).

Τα προϊόντα των φωτεινών αντιδράσεων (ATP, NADPH) χρησιμοποιούνται για τις ενεργειακές ανάγκες των φυτών παίρνοντας μέρος σε πολυάριθμες βιοχημικές αντιδράσεις σύνθεσης και μεταφοράς. Ένα μεγάλο μέρος της ενέργειας των ATP και NADPH καταναλώνεται για τη δέσμευση του CO₂ της ατμόσφαιρας και την αναγωγή του μέχρι το επίπεδο των υδατανθράκων (φωτοσυνθετική αφομοίωση του CO₂). Δηλαδή η ενέργεια που παράγεται στις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης καταναλώνεται για τη δημιουργία του ανθρακικού σκελετού των φυτικών οργανισμών και επομένως την παραγωγή βιομάζας (Αϊβαλάκης κ.α., 2005). Μέχρι σήμερα είναι γνωστές τρεις κύριες βιοχημικές παραλλαγές του φωτοσυνθετικού μεταβολισμού του άνθρακα (Hall and Rao, 1999):

- α. Η C₃ φωτοσύνθεση που ονομάζεται έτσι γιατί το πρώτο προϊόν της δέσμευσης του CO₂ είναι μία ένωση με τρία άτομα άνθρακα (3-φωσφορογλυκερικό οξύ -3PGA).
- β. Η C₄ φωτοσύνθεση στην οποία το πρώτο προϊόν της δέσμευσης του CO₂ είναι το οξαλοξικό οξύ, μια ένωση με τέσσερα άτομα άνθρακα και
- γ. Ο μεταβολισμός οξέων τύπου Crassulaceae (CAM) η ονομασία του οποίου οφείλεται στο γεγονός ότι ο τρόπος αυτός δέσμευσης CO₂ παρατηρήθηκε αρχικά σε παχύφυτα, μέλη της οικογένειας Crassulaceae (Αϊβαλάκης κ.α., 2005).

Στη C₃ φωτοσυνθετική οδό το CO₂ δεσμεύεται και στη συνέχεια ανάγεται έως το επίπεδο του υδατάνθρακα μέσω μια κυκλικής βιοχημικής διαδικασίας που ονομάζεται

αναγωγικός κύκλος των φωσφοπεντοζών (RPPC) ή κύκλος του Calvin. Το CO₂ μετατρέπεται σε φωσφορυλιωμένα σάκχαρα ενώ ταυτόχρονα αναγεννάται ο δέκτης του CO₂ (η 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη- RuDP). Η όλη πορεία περιλαμβάνει επιμέρους αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται από υδατοδιαλυτά ένζυμα που είναι εντοπισμένα στο στρώμα των χλωροπλαστών (Δροσόπουλος, 1998; Ridge 2002). Η λειτουργία του κύκλου του Calvin εξαρτάται άμεσα από τον εφοδιασμό σε ATP και NADPH (επομένως εξαρτάται έμμεσα από την ύπαρξη φωτισμού) καθώς και σε CO₂. Ο κύκλος περιλαμβάνει τρία επιμέρους στάδια:

Στο πρώτο στάδιο του κύκλου, την καρβοξυλίωση, το CO₂ ενσωματώνεται με τη μορφή μιας καρβοξυλομάδας στο μόριο-δέκτη, την 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη και παράγονται δύο μόρια 3-φωσφογλυκερινικού οξέος. Την αντίδραση καταλύει το ένζυμο καρβοξυλάση-οξυγενάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (Rubisco).

Στο δεύτερο στάδιο, την αναγωγή, το 3PGA ανάγεται προς φωσφορικές τριόζες(3-φωσφορική γλυκεριναλδεύδη ή φωσφορική διϋδρόξυακετόνη) με κατανάλωση ATP και NADPH. Με την ολοκλήρωση του σταδίου αυτού το CO₂ έχει πλέον αναχθεί στο επίπεδο του υδατάνθρακα με κέρδος μία υδατανθρακική μονάδα, ενώ για κάθε τρεις περιστροφές του κύκλου το καθαρό προϊόν είναι ένα μόριο τριόζης.

Στο τρίτο στάδιο, την αναγέννηση του δέκτη, επιτελούνται μια σειρά από αντιδράσεις με κατανάλωση ενέργειας (ATP) ώστε η 1,5-διφωσφορική ριβουλόζη να είναι διαθέσιμη εκ νέου ως υπόστρωμα της Rubisco (Taiz and Zeiger, 1998; Heldt 1997).

Η C₄ οδός λειτουργεί ως ένα πολύπλοκο βιοχημικό και φυσιολογικό προσάρτημα του κύκλου του Calvin το οποίο εξυπηρετεί στη δέσμευση, μεταφορά και συγκέντρωση ατμοσφαιρικού CO₂ στις περιοχές όπου λειτουργεί ο κύκλος του Calvin (Αϊβαλάκης κ.α. 2005). Ενώσεις με τέσσερα άτομα άνθρακα (C₄) μεταφέρουν CO₂ από τα κύτταρα του μεσοφύλλου, στα οποία συμβαίνει η αρχική ενσωμάτωση του CO₂, στα κύτταρα του δεσμικού κολεού στα οποία λειτουργεί ο κύκλος του Calvin (Stryer, 1994). Στο βιοχημικό επίπεδο η C₄ φωτοσυνθετική οδός περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: α) την καρβοξυλίωση β) τη μεταφορά μεταβολιτών γ) την αποκαρβοξυλίωση και επαναδέσμευση του CO₂ στον κύκλο του Calvin και δ) την αναγέννηση του δέκτη (Αϊβαλάκης κ.α. 2005). Η λειτουργία της C₄ οδού, παρόλο ότι παρουσιάζει αυξημένο ενεργειακό κόστος έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό απωλειών άνθρακα μέσω της φωτοαναπνοής και εξαναγκάζει την Rubisco να λειτουργεί ουσιαστικά μόνο ως καρβοξυλάση και όχι ως οξυγονάση. Το γεγονός αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία όταν επικρατούν στο περιβάλλον υψηλές θερμοκρασίες. Τα φυτά C₄ αποκτούν

προσαρμοστικά πλεονεκτήματα σε ένα περιβάλλον με υψηλές θερμοκρασίες και υψηλή ένταση φωτισμού, κάτι που εξηγεί την επικράτησή τους στην τροπική-υποτροπική ζώνη. Αντίθετα στα C₃ φυτά (όπως π.χ. η *Parietaria judaica*) λόγω της λειτουργίας της φωτοαναπνοής είναι πιο αποτελεσματικά σε θερμοκρασίες κάτω των 28°C γι' αυτό και επικρατούν στις εύκρατες ζώνες (Stryer, 1994).

Στο μεταβολισμό τύπου Crassulaceae τα φυτά δεσμεύουν το CO₂ κατά τη διάρκεια της νύχτας κατά την οποία τα στομάτια παραμένουν ανοικτά. Η αντίδραση αυτή καταλύεται όπως και στα C₄ φυτά από την καρβοξυλάση του PEP και ακολουθεί αναγωγή του σχηματιζόμενου οξαλοξικού σε μηλικό οξύ. Το μηλικό οξύ αποθηκεύεται στα χυμοτόπια και αποκαρβοξυλιώνεται στη διάρκεια της ημέρας, όταν τα στομάτια παραμένουν κλειστά. Με το μηχανισμό αυτό εξασφαλίζεται τεράστια οικονομία νερού.

Η C₄ οδός και ο μεταβολισμός τύπου Crassulaceae (CAM) χρησιμεύουν ουσιαστικά στην αποτελεσματικότερη άντληση CO₂ στις θέσεις όπου λειτουργεί ο κύκλος του Calvin με στόχο να περιορίζονται οι απώλειες νερού.

1.2. Ο μηχανισμός της διαπνοής

Ο μηχανισμός απώλειας, ενός σημαντικού ποσοστού (95% ή και περισσότερο), του νερού που μεταφέρεται από τη ρίζα στα υπέργεια φυτικά όργανα με τη μορφή υδρατμών μέσω των στοματίων χαρακτηρίζεται ως διαπνοή (Αιβαλάκης κ.α, 2005).

Η διαπνοή επιταχύνει την κίνηση του ανιόντος χυμού του ξύλου και σε περίπτωση μη αναπλήρωσης των απωλειών (λόγω ανεπάρκειας του εδαφικού νερού) είναι δυνατόν να προκαλέσει έλλειμα νερού και μαρασμό των υπέργειων φυτικών οργάνων (Δροσόπουλος, 1998). Μέσω όμως της διεργασίας αυτής εκτελούνται δύο ζωτικής σημασίας λειτουργίες:

α) Ψύξη των φύλλων λόγω εξάτμισης νερού, διότι ένα μέρος της ενέργειας ακτινοβολίας που προσπίπτει στο φύλλο χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του νερού από υγρό σε αέριο. Με τον τρόπο αυτό βελτιώνεται το θερμικό ισοζύγιο του ελάσματος. Το φαινόμενο αυτό παίζει καθοριστικό ρόλο για την επιβίωση των φυτών σε θερμά κλίματα.

β) Δημιουργία διαπνευστικού ρεύματος, δηλαδή μίας συνεχής ροής νερού δια μέσου των αγγείων του ξύλου με κατεύθυνση από τη ρίζα προς τα φύλλα λόγω της συνεχής αναπλήρωσης του διαπνεόμενου νερού από το έδαφος. Η ύπαρξη του ρεύματος αυτού είναι αναγκαία γιατί τροφοδοτεί τα υπέργεια όργανα με τα απαραίτητα θρεπτικά

στοιχεία τα οποία συμπαρασύρονται από το διακινούμενο νερό (Αϊβαλάκης κ.α, 2003).

Τα στόματα εκτός από πύλες εξόδου των υδρατμών, αποτελούν και πύλες εισόδου του CO₂ προς τα φωτοσυνθετικά κύτταρα, τα οποία παρέχουν οργανικό άνθρακα και ενέργεια προς το σύνολο του φυτικού οργανισμού. Ανοικτά στομάτια σημαίνει φωτοσύνθεση και ανάπτυξη, αλλά συγχρόνως και κίνδυνο αφυδάτωσης. Αντίθετα με κλειστά τα στομάτια διαφυλάσσονται τα αποθέματα νερού αλλά συγχρόνως περιορίζεται η φωτοσύνθεση. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να υπάρχει ένα ρυθμιστικός μηχανισμός που να συμβιβάζει επιτυχώς τις δύο αυτές αντιτιθέμενες λειτουργίες. Το εύρος του στοματικού πόρου αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα ρύθμισης των ανταλλαγών των αερίων και βεβαίως των απωλειών νερού από τα φύλλα. Ο έλεγχος των στοματικών κινήσεων διασφαλίζει την βελτιστοποίηση της φωτοσυνθετικής λειτουργίας με τις ελάχιστες δυνατές απώλειες σε νερό. Όταν τα φυτά υφίστανται υδατική καταπόνηση τότε προέχει η επιβίωση, δηλαδή η αποφυγή της αφυδάτωσης, και τα στόματα παραμένουν κλειστά έστω και αν οι υπόλοιποι περιβαλλοντικοί παράγοντες ευνοούν τη φωτοσύνθεση (Αϊβαλάκης κ.α, 2005).

Οι παράγοντες του περιβάλλοντος που επηρεάζουν το μηχανισμό ρύθμισης του εύρους του στοματικού πόρου εν συντομία είναι οι εξής:

α) *Ένταση φωτεινής ακτινοβολίας* : Στα περισσότερα φυτά (τόσο C₃ όσο και C₄), τα στομάτια ανοίγουν την ημέρα και κλείνουν τη νύχτα. Στα φυτά CAM συμβαίνει το αντίθετο.

β) *Συγκέντρωση CO₂* : Η επικράτηση χαμηλών συγκεντρώσεων CO₂ στο εσωτερικό ενός φύλλου προκαλεί άνοιγμα των στοματίων, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ προκαλούν το κλείσιμο. Με τη ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται ο συντονισμός της φωτοσυνθετικής λειτουργίας με το μηχανισμό των κινήσεων των καταφρακτικών κυττάρων.

γ) *Σχετική υγρασία της ατμόσφαιρας*: Σε ορισμένα φυτικά είδη τα καταφρακτικά κύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη σχετική υγρασία της εξωτερικής ατμόσφαιρας και κλείνουν όταν αυτή μειωθεί κάτω από μία ορισμένη τιμή, χαρακτηριστική για κάθε είδος.

δ) *Επάρκεια νερού στο έδαφος*: Η διαμόρφωση χαμηλού δυναμικού του νερού στο έδαφος επηρεάζει αρνητικά την τροφοδοσία των υπέργειων οργάνων με νερό. Εάν δεν ελεγχθούν οι διαπνευστικές απώλειες, υπάρχει κίνδυνος να χάσουν τη σπαργή

τους τα κύτταρα ή να δημιουργηθούν ασυνέχειες στη στήλη του νερού στα αγγεία του ξύλου. Συνεπώς σε συνθήκες έλλειψης νερού στο έδαφος επιβάλλεται το όσο το δυνατό ταχύτερο κλείσιμο των στοματιών ώστε να περιοριστούν στο ελάχιστο οι απώλειες νερού το οποίο δεν μπορεί να αναπληρωθεί μέσω του διαπνευστικού ρεύματος με τροφοδοσία από τη ρίζα. Η αντίληψη διαμόρφωσης συνθηκών ανεπάρκειας νερού στο έδαφος γίνεται μέσω ενός ορμονικού σήματος, του αμπισισικού οξέος (ABA). Η ορμόνη αυτή είναι ένα σεσκιτερπένιο(15C) το οποίο συντίθεται στις ρίζες και σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης η συγκέντρωση της αυξάνεται. Το ABA μεταφέρεται μέσω των αγγείων του ξύλου στα φύλλα με κύριο στόχο τα στομάτια. Ο μηχανισμός της δράσης του ABA ασκείται δια μέσου της αύξησης της διαρροής ιόντων K^+ από τα καταφρακτικά κύτταρα η οποία προκαλεί ελάττωση της σπαργής τους οπότε τα στομάτια κλείνουν.

ε) *Θερμοκρασία*: Αύξηση της θερμοκρασίας επιφέρει και αύξηση της διαφοράς των μερικών πιέσεων των υδρατμών ανάμεσα στο εσωτερικό του φύλλου και στην ελεύθερη ατμόσφαιρα. Όταν π.χ. η θερμοκρασία του αέρα αυξάνεται, συμπαρασύρεται και αυτή των φύλλων. Επειδή στο εσωτερικό των φύλλων η ατμόσφαιρα διατηρείται πάντα κορεσμένη σε υδρατμούς, η δε πίεση κορεσμού αυξάνεται με τη θερμοκρασία, έπεται ότι αυξάνεται και η διαφορά των μερικών πιέσεων, οπότε τα στόματα τείνουν να κλείσουν (Καραμπουρνιώτης, 2003).

1.3. Τα κυτταρικά έγκλειστα

Ο όρος «κυτταρικά έγκλειστα» αναφέρεται συνήθως σε εναποθέσεις στερεών συστατικών σε εξειδικευμένα κύτταρα. Τα συστατικά αυτά ταξινομούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: i) κρύσταλλοι και ii) πρωτεϊνόκοκκοι

i) Με τον όρο «κρύσταλλοι» περιγράφονται εναποθέσεις κυρίως ανόργανων ή οργανικών αλάτων του Ca σε κρυσταλλική μορφή. Οι κρύσταλλοι π.χ οξαλικού ασβεστίου είναι κυτταρικά έγκλειστα ευρύτατα διαδεδομένα στα φυτά. Αποτελούνται από μονοϋδρικό ($Ca(C_2O_4) \cdot H_2O$) ή δυϊδρικό ($Ca(C_2O_4) \cdot 2H_2O$) οξαλικό ασβέστιο και θεωρούνται ως τελικά προϊόντα του μεταβολισμού. Σχηματίζονται στα χυμοτόπια αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις αναφέρεται η κρυστάλλωσή τους και στο κυτόπλασμα (Γαλάτης, Κατσαρός και Αποστολάκος, 1998).

Οι κρύσταλλοι του μονοϋδρικού οξαλικού ασβεστίου εμφανίζονται είτε μεμονωμένοι είτε κατά ομάδες (π.χ.ως ραφίδες, κρυσταλλική άμμος ή σφαιρίτες). Οι τελευταίοι

αποτελούνται από βελονοειδείς κρυστάλλους ακτινωτά διατεταγμένους. Οι τετραγωνικοί κρύσταλλοι του διυδρικού οξαλικού ασβεστίου απαντώνται συνήθως ως μεμονωμένοι. Έχουν πρισματική μορφή και είναι απλοί ή σύνθετοι (όπως στα επιδερμικά κύτταρα του Allium) ή οκτάεδρα ή συσσωματώματα οκταέδρων (όπως σε ορισμένους κρυσταλλώδεις αδένες). Σπανιότερα σχηματίζονται κρύσταλλοι διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) στο τοίχωμα των επιδερμικών κυττάρων, ή πυριτικά σώματα, άμορφες υαλώδεις μάζες μέσα στον πρωτοπλάστη. Έχει αναφερθεί ακόμη και η ύπαρξη κρυστάλλων θειϊκού ασβεστίου (CaSO_4) (Γαλάτης, Κατσαρός και Αποστολάκος, 1998).

Οι κρύσταλλοι συνήθως σχηματίζονται στα χυμοτόπια των κυττάρων και μπορεί να εναποτίθενται σε κάθε τμήμα του φυτού. Στο σχηματισμό τους φαίνεται ότι έχει ενεργό ρόλο το ενδοπλασματικό δίκτυο (Kostman et al, 2003). Οι υποκυτταρικές περιοχές σχηματισμού κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου είναι πλούσιες σε καλρετικουλίνη, μια πρωτεΐνη με υψηλή ικανότητα δέσμευσης ιόντων ασβεστίου (Nakata et al, 2003). Εκτός από τους κρυστάλλους οι οποίοι σχηματίζονται στα χυμοτόπια των κυττάρων, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις σχηματισμού κρυστάλλων τόσο στα κυτταρικά τοιχώματα όσο και στον αποπλασματικό χώρο (Metcalf and Chalk, 1985).

Τα κύτταρα τα οποία φέρουν κρυστάλλους μπορεί να είναι μορφολογικά όμοια με τα γειτονικά τους τα οποία δε φέρουν κρυστάλλους ή να διαθέτουν χαρακτηριστική μορφή. Τα κύτταρα που φέρουν κρυστάλλους είτε μεμονωμένα είτε κατά ομάδες και διακρίνονται εμφανώς από τα γειτονικά τους χαρακτηρίζονται ως ιδιοβλάστες. Οι ιδιοβλάστες αυτοί εντοπίζονται συνήθως στην περιοχή του μεσόφυλλου ή σε σκληρεγχυματικούς κολεούς. Στα φύλλα η παρουσία τους είναι συχνότερη στην περιοχή των δεσμικών κολεών ή των προεκτάσεών τους στην περιοχή της ηθμαγγειώδους δεσμίδας.

Ο διαφορετικός τρόπος κρυστάλλωσης και οι πιθανές διαφορές στη σύσταση των κρυστάλλων δημιουργούν μια μεγάλη ποικιλία μορφών. Μάλιστα ο τύπος των κρυστάλλων σχετίζεται και με την οικογένεια, γένος ή ακόμη και το είδος στο οποίο σχηματίζεται και για το λόγο αυτό έχει καθιερωθεί ειδική ονοματολογία η οποία βρίσκει εφαρμογή σε ταξινομικές μελέτες:

α. *Ραφίδες*: επιμήκεις, λεπτοί, βελονοειδείς, μονοϋδρικοί συνήθως κρύσταλλοι με αιχμηρές απολήξεις που συνήθως αθροίζονται σε δέσμες. Οι μεμονωμένοι κρύσταλλοι περιβάλλονται από μία μεμβράνη και ολόκληρη η δέσμη συνήθως

καλύπτεται από μία μάζα βλενωδους υφής. Οι ραφίδες συνήθως σχηματίζονται μέσα σε ογκώδη ιδιοβλαστικά κύτταρα, γνωστά ως «σάκοι ραφίδων», τα οποία λόγω του μεγέθους τους διακρίνονται από τα γειτονικά κύτταρα. Οι ραφίδες είναι άφθονες σε οικογένειες δικότυλων όπως Balsaminaceae, Rubiaceae και Dilleniaceae αλλά και σε ορισμένες οικογένειες μονοκότυλων. Ασυνήθιστες ραφίδες με ακίδες και αυλακώσεις έχουν αναφερθεί στο είδος *Xanthosoma sagittifolium* της οικογένειας Araceae.

β. *Βελονοειδείς κρύσταλλοι*: βελονοειδείς σχηματισμοί μικρότερου μεγέθους από τις ραφίδες που δεν απαντώνται σε δέσμες. Ο τύπος αυτός των κρυστάλλων απαντάται στις οικογένειες Acanthaceae, Lauraceae και Myristicaceae.

γ. *Βοτρυόμορφοι κρύσταλλοι (druses)*: κρύσταλλοι που είναι χαλαρά ενωμένοι σε μία αιχμηρή σφαιρική μάζα στην οποία τα περισσότερα συστατικά των κρυστάλλων προεξέχουν από την επιφάνεια και παράγουν μια δομή αστεροειδούς σχήματος. Ο τύπος αυτός κρυστάλλων παρουσιάζεται συχνά σε ορισμένες οικογένειες όπως Leguminosae, Juglandaceae, Polygonaceae και Tiliaceae.

δ. *Πρισματικοί κρύσταλλοι*: ρομβοεδρικοί ή οκταεδρικοί μεταβλητού μεγέθους ευρέως διαδεδομένοι. Απαντώνται συνήθως σε παρεγχυματικά κύτταρα της δευτερογενούς ανατομικής διάπλασης των ηθμαγγειωδών δεσμίδων.

ε. *Κρυσταλλική άμμος*: κοκκώδης μάζα από λεπτούς, ιδιαίτερα συμπαγείς μικροκρυστάλλους οι οποίοι διασπείρονται σε όλο το κύτταρο στο οποίο προσδίδουν μία αμμώδη υφή. Απαντάται συνήθως στα γένη *Acuba* (Cornaceae), *Amaranthus* (Amaranthaceae) και *Sambucus* (Caprifoliaceae).

ζ. *Στηλοειδείς κρύσταλλοι (ή στηλοειδή)*: μεγάλου μεγέθους και μήκους μεμονωμένοι κρύσταλλοι με τουλάχιστον τέσσερις φορές μεγαλύτερο μήκος από το πλάτος τους με αιχμηρές ή τετραγωνισμένες απολήξεις. Απαντώνται στην οικογένεια Liliaceae και στα φύλλα φυτών του γένους *Iris* (Iridaceae) (Dickison, 2000).

Οι κρύσταλλοι στα αγγειόσπερμα συνήθως αποτελούνται από οξαλικό ασβέστιο. Οι Al-Rais, Myers και Watson (1971) έδειξαν ότι όταν το ασβέστιο δεν είναι διαθέσιμο σε επαρκείς ποσότητες στο φυτό για το σχηματισμό των κρυστάλλων, μπορεί να αντικατασταθεί από στρόντιο, μαγνήσιο ή βάριο. Επίσης το οξαλικό ασβέστιο από το οποίο αποτελούνται οι κρύσταλλοι μπορεί να περιέχει και ποσότητες άλλων συστατικών ή οι κρύσταλλοι μπορεί να αποτελούνται ολοκληρωτικά από άλλα άλατα ασβεστίου.

Αν και λιγότερο σύνηθες από το οξαλικό ασβέστιο, το ανθρακικό ασβέστιο εντοπίζεται με τη μορφή εναποθέσεων σε κύτταρα ορισμένων φυτικών ειδών (βλ.

παρακάτω). Στις περιπτώσεις αυτές το ανθρακικό ασβέστιο εναποτίθεται είτε στα κυτταρικά τοιχώματα, είτε συγκροτεί ογκώδεις δομές, τους κυστόλιθους.

Η παρουσία, αλλά και η μορφή των κρυστάλλων αποτελούν εξαιρετικά σημαντικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στη μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των φυτικών ειδών. Ένα ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό αποτελεί ο τρόπος εξάπλωσης των κρυστάλλων στα επί μέρους όργανα. Τα κύτταρα-ιδιοβλάστες δεν κατανέμονται τυχαία στο φυτικό σώμα, αλλά πάντα σε ειδικές περιοχές όπως η υποδερμίδα και οι προεκτάσεις των δεσμικών κολεών.

ii) Οι πρωτεϊνόκοκκοι αποτελούν έγκλειστα που σχηματίζονται στα χυμοτόπια κυττάρων σπερμάτων ή άλλων αποταμιευτικών οργάνων ή ιστών. Οι πρωτεϊνόκοκκοι των κοτυληδόνων και του ενδοσπερμίου παρουσιάζουν ποικιλία μεγέθους και μορφής. Στη θεμελιώδη μάζα τους μπορεί να εντοπίζονται «κρυσταλλοειδή», «σφαιροειδή» ή «κρύσταλλοι» (Γαλάτης, Κατσαρός και Αποστολάκος, 1998). Ας σημειωθεί επίσης ότι έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη κυτταρικών εγκλείστων τα οποία αποτελούνται από διάφορα οργανικά συστατικά, όπως χρωστικές ή προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού, των οποίων ωστόσο η διάδοση είναι περισσότερο περιορισμένη.

1.4. Η Ανατομία των λιθοκύστεων

Οι λιθοκύστες είναι ογκώδη ιδιοβλαστικά κύτταρα στα οποία εναποτίθεται ανθρακικό ασβέστιο με τη μορφή κυστολίθων. Οι λιθοκύστες απαντώνται κυρίως σε μέλη των οικογενειών Moraceae, Acanthaceae, Cucurbitaceae, Urticaceae, και Cannabaceae, ορισμένα από τα οποία είναι φυτά γεωργικού ενδιαφέροντος, όπως η συκιά (*Ficus carica*), η μουριά (*Morus alba*), το περδικάκι (*Parietaria judaica*), οι καλλωπιστικοί φίκοι (*Ficus sp*), κ.ά. (Metcalf, 1985; Fahn, 1990; Dickison 2000; Esau 1965; Wu and KuoHuang, 1997). Οι λιθοκύστες αποτελούν πολύπλοκες δομές οι οποίες απαρτίζονται από κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο σχηματίζει έναν μίσχο που προεκτείνεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Στο εσωτερικό αυτό έπαρμα εναποτίθεται ανθρακικό ασβέστιο, σχηματίζοντας τον ογκώδη κυστόλιθο. Έχει παρατηρηθεί ότι η συσσώρευση ανθρακικού ασβεστίου συνοδεύεται και από εναπόθεση πηκτινικών, αλλά και άλλων υλικών των κυτταρικών τοιχωμάτων (Mauseth, 1988). Οι λιθοκύστες στα φύλλα της μουριάς σχηματίζουν θηλές στην εξωτερική προσαξονική επιφάνεια του ελάσματος. Σε ορισμένες περιπτώσεις στις

θηλές αυτές εναποτίθεται πυρίτιο, πιθανότατα για λόγους μηχανικής ενδυνάμωσης της δομής στα σημεία αυτά (Sugimura et al,1999). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ο πυρήνας παραμένει σε λειτουργική κατάσταση μέσα στις ώριμες λιθοκύστες. Εκτός αυτού, ο ογκώδης κυστόλιθος περιβάλλεται και από κυτόπλασμα (Sugimura et al,1999). Οι λιθοκύστες προκύπτουν από τη διαφοροποίηση επιδερμικών κυττάρων κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης των οργάνων. Συνήθως νεκρώνονται μετά τον πλήρη σχηματισμό του κρυστάλλου, είναι όμως δυνατόν να παραμένουν ζωντανά εφ'όσον ο κρύσταλλος παραμένει καλά διαχωρισμένος από το πρωτόπλασμα του κυττάρου (Δροσόπουλος, 1992).

Το μέγεθος και η πυκνότητα των λιθοκύστεων μεταβάλλεται σύμφωνα με την ηλικία του φύλλου. Στα νεαρά φύλλα η πυκνότητα των ιδιοβλαστών είναι υψηλή, ενώ με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται απότομη μείωση στην πυκνότητα των ιδιοβλαστών φτάνοντας ένα μέσο όρο 23 ιδιοβλάστες mm^{-2} σε ώριμα φύλλα. Η απότομη μείωση στην πυκνότητα των ιδιοβλαστών οφείλεται στην επέκταση της φυλλικής επιφάνειας χωρίς αύξηση του αριθμού των ιδιοβλαστών για κάθε φύλλο (Sugimura et al,1999).

Ιστοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι ένας κυστόλιθος καταλαμβάνει την κοιλότητα της λιθοκύστης σε ώριμα φύλλα ενώ τα νεαρά φύλλα διαθέτουν πολυάριθμες λιθοκύστες χωρίς εμφανείς κυστόλιθους (Sugimura et al,1999). Η αύξηση του ποσοστού Ca των φύλλων είναι ευθέως ανάλογη με την αύξηση της ηλικίας του φύλλου και φαίνεται ότι σχετίζεται στενά με την σταδιακή εναπόθεση Ca στους αναπτυσσόμενους κυστόλιθους. Η μέγιστη ποσότητα Ca φθάνει περίπου τα 40 ng για κάθε λιθοκύστη όταν οι μουριές αναπτύσσονται υδροπονικά με πλεόνασμα Ca (Sugimura et al,1999). Σε ώριμα φύλλα φυτών των γενών *Boehmeria* και *Ficus* η παραγωγή των κυστόλιθων εξαρτάται από την περιεκτικότητα ασβεστίου στο έδαφος. Σύμφωνα με τους Metcalfe and Chalk (1985), οι κυστόλιθοι δημιουργούνται ακόμη και σε συνθήκες πλήρους έλλειψης ασβεστίου, ωστόσο το μέγεθος του εγκλείστου καθορίζεται από τη συγκέντρωση ασβεστίου στο μέσο της καλλιέργειας. Παρατεταμένη σκίαση επίσης εμποδίζει την ανάπτυξη των κυστόλιθων σε νεαρά φυτά. Εάν η συγκέντρωση του ατμοσφαιρικού διοξειδίου του άνθρακα αυξηθεί δέκα φορές, οι μεμονωμένοι κυστόλιθοι αυξάνουν το μεγεθός τους, αλλά ο αριθμός τους δεν αυξάνεται. Από την άλλη πλευρά, αν η ατμόσφαιρα στερείται διοξειδίου του άνθρακα μόνο στοιχειώδεις κυστόλιθοι παράγονται (Freisleben, 1933).

1.5. Πιθανή φυσιολογική σημασία των κυτταρικών εγκλείστων

Οι μελέτες σχετικά με τους κρυστάλλους, αλλά και γενικότερα όσον αφορά παραπλήσιες δομές (π.χ. λιθοκύστες) που σχηματίζονται σε ιδιοβλαστικά φυτικά κύτταρα, περιορίζονται κυρίως στο περιγραφικό-ανατομικό επίπεδο. Οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τη φυσιολογική σημασία και το λειτουργικό ρόλο των δομών αυτών είναι ελάχιστες και ως εκ τούτου διατυπώνονται μόνον υποθέσεις. Έτσι όσον αφορά τους κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου, οι υποθέσεις που έχουν διατυπωθεί μέχρι στιγμής για το λειτουργικό τους ρόλο μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

1. Οι ιδιοβλάστες που περιέχουν κρυστάλλους ασβεστίου θα πρέπει να παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συγκέντρωσης των κατιόντων ασβεστίου στους φυτικούς ιστούς (Dickison 2000; Franceschi and Horner, 1980; Franceschi and Nakata, 2005; Macnish *et al* 2003; Nakata, 2003). Επίσης η διαπίστωση ότι σε μια σειρά ιστούς διαφορετικών ειδών παρατηρείται αποδόμηση των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου (και επομένως το μέγεθος του κρυστάλλου επιδέχεται ρύθμιση) σχετίστηκε με τη διαχείριση των αποθεμάτων ασβεστίου, χωρίς ωστόσο να δοθεί ικανοποιητική ερμηνεία για τη μεταβολική τύχη του άνθρακα του οξαλικού (Harslan *et al*, 2001). Οι Arnott and Pautard (1970) πρότειναν ότι το οξαλικό ασβέστιο (που σχηματίζεται στους ιδιοβλάστες) μπορεί να παρέχει ένα πρόσκαιρο απόθεμα Ca και επομένως η ανταλλαγή μεταξύ διαλυτών και αδιάλυτων δεξαμενών Ca ρυθμίζεται ανάλογα με τις ανάγκες των φυτικών ιστών. Πράγματι, τα επίπεδα οξαλικού Ca στους ιδιοβλάστες μπορεί να αυξηθούν ή να μειωθούν ανάλογα με τα επίπεδα του ασβεστίου στο μέσο ανάπτυξης (Franceschi, 1989; Volk *et al*, 2002).

2. Οι κρύσταλλοι παίζουν ρόλο στην άμυνα έναντι φυτοφάγων ή/και παθογόνων καθώς και στη μηχανική στήριξη των ιστών σε περίπτωση αφυδάτωσής τους. (Franceschi and Horner, 1980; Metcalfe, 1985; Lucas *et al* 2000; Nakata, 2003). Η συσσώρευση σχετικών με παθογένεση πρωτεϊνών μέσα σε ιδιοβλάστες που περιέχουν κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου ενισχύει την υπόθεση αυτή (Dixon, Cutt and Klessig, 1991).

3. Οι κρύσταλλοι αποτελούν μία μορφή αποθήκευσης οξαλικού οξέος το οποίο επανεισάγεται στον μεταβολικό κύκλο όταν το απαιτούν οι συνθήκες. Η αδρανοποίηση του οξαλικού οξέος επιβάλλεται ώστε να μη δημιουργούνται παρενέργειες στους ιστούς λόγω του ισχυρά όξινου χαρακτήρα του (Franceschi and Horner 1980).

4. Η αποθήκευση ιόντων ασβεστίου και οξαλικού οξέος με τη μορφή οξαλικού ασβεστίου σχετίζεται πιθανόν με μηχανισμούς οσμωρύθμισης (Raven and Smith, 1976). Τα ιόντα ασβεστίου και οξαλικού που παίρνουν μέρος στη δημιουργία των κρυστάλλων ουσιαστικά «αποσύρονται από την κυκλοφορία» και δεν είναι πλέον οσμωτικά ενεργά. Το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση αποδόμησης των κρυστάλλων.

5. Στο παρελθόν έχουν επίσης διατυπωθεί υποθέσεις για πιθανή σχέση κρυστάλλων που εντοπίζονται σε φωτοσυνθετικά κύτταρα με τη φωτοσυνθετική λειτουργία (Franceschi and Horner, 1980), χωρίς ωστόσο να συνοδεύονται από πειραματικά δεδομένα.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι πρόσφατα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένα φυτά *Medicago truncatula* έδειξαν ότι η απουσία των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου δεν επηρεάζει τους ρυθμούς ανάπτυξης των πειραματοφύτων (Nakata and McConn 2003).

Όσον αφορά στις λιθοκύστες, επειδή δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα σχετικά με τη φυσιολογία τους, δεν υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία διατυπωμένες υποθέσεις σχετικές με το ρόλο τους. Οι περισσότεροι συγγραφείς θεωρούν ότι οι φυσιολογικοί ρόλοι των λιθοκύστεων θα πρέπει να είναι αντίστοιχοι των ρόλων των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου και επικεντρώνονται κυρίως σε δύο από αυτούς.

1. Ρύθμιση των ιόντων ασβεστίου καθώς και των ανθρακικών ιόντων (Metchalfe and Chalk, 1985). Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι τα μοναδικά πειράματα που έδωσαν πληροφορίες για την λειτουργία των λιθοκύστεων δημοσιεύτηκαν το 1933 από τον Freisleben και αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Ωστόσο ο ερευνητής αυτός κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι λιθοκύστες λειτουργούν ως αποθήκες πλεονασματικών ιόντων ασβεστίου, χωρίς να δώσει σημασία στην ύπαρξη και των ανθρακικών ιόντων, τα οποία προφανώς θεωρούσε ως συνοδά ανιόντα.

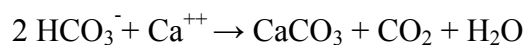
2. Συμμετοχή σε μηχανισμούς άμυνας έναντι φυτοφάγων και παθογόνων. Η υπόθεση αυτή βασίζεται στην παρατήρηση ότι στην περιοχή της επιφανειακής θηλής που σχηματίζουν οι λιθοκύστες της μουριάς συσσωρεύεται πυρίτιο (Sugimura *et al*, 1999). Είναι γνωστό ότι το πυρίτιο που εναποτίθεται στα επιδερμικά κύτταρα ορισμένων φυτικών ειδών, κυρίως σιτηρών, παίζει ρόλο στην άμυνα των φυτικών επιφανειακών ιστών έναντι παθογόνων. Επομένως το ανιχνεύσιμο πυρίτιο μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην αντοχή του κυτταρικού τοιχώματος στην περιοχή της

θηλής και επομένως να συμβάλλει στην άμυνα έναντι προσβολών (Sugimura *et al*, 1999).

1.6. Τα κοκκολιθοφόρα

Το άμορφο ανθρακικό ασβέστιο, παρόλο που αποτελεί μια ασταθή χημικά ένωση (Levi-Kalisman *et al*, 2000), συσσωρεύεται όχι μόνο με τη μορφή κυστολίθων σε φυτικά είδη, αλλά και σε ένα μεγάλο αριθμό οργανισμών με διαφορετικές μορφές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συσσώρευσή του σε μια ομάδα μονοκύτταρων φυτοπλακτονικών οργανισμών, τόσο του γλυκού, όσο και του θαλασσινού νερού, που αναφέρονται ως κοκκολιθοφόρα. Τα κοκκολιθοφόρα είναι μονοκύτταρο θαλάσσιο φυτοπλακτόν που περιβάλλεται από μία κοκόσφαιρα, η οποία αποτελείται από ένα στρώμα από επικαθίσματα CaCO_3 που είναι γνωστά ως κοκκόλιθοι (Marsch *et al*, 2002). Οι μικροοργανισμοί αυτοί παίζουν σημαντικό ρόλο στο βιογεωχημικό κύκλο του άνθρακα του ασβεστίου και του θείου σε επίπεδο βιόσφαιρας, αλλά και στην ανταλλαγή του CO_2 μεταξύ ωκεανών και ατμόσφαιρας (Gattuso and Buddemeier 2000; Paasche 2001; Riebesell *et al*, 2000). Περισσότερα από 200 είδη κοκκολιθοφόρων είναι γνωστά: Το *Gephyrocapsa oceanica* είναι το επικρατέστερο είδος σε υποτροπικές περιοχές ενώ το *Emiliania huxleyi* (το πιο άφθονο κοκκολιθοφόρο) σχηματίζει εκτεταμένες αποικίες σε παράκτιες περιοχές μέσου γεωγραφικού πλάτους οι οποίες είναι ορατές ακόμη και σε δορυφορικές φωτογραφίες (Jeffrey and Anderson, 2000; Paasche 2001).

Το ανθρακικό ασβέστιο, το οποίο παράγεται από την αντίδραση



σχηματίζει λεπιοειδείς εναποθέσεις (κοκκόλιθους) στην εξωτερική πλευρά των κυττάρων. Οι μορφή των κοκκόλιθων παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τα οποία δεν παρατηρούνται στο αβιοτικό περιβάλλον, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία μεταβολικού ελέγχου στη διαδικασία της ανοργανοποίησης. Η μορφή τους επηρεάζεται επίσης από μια σειρά παράγοντες του περιβάλλοντος, αλλά και το είδος του οργανισμού (Marsch, 1999). Η εναπόθεση ασβεστίου σε πολλά είδη κοκκολιθοφόρων διεγείρεται από την φωτεινή ακτινοβολία. Πειράματα ιχνηθέτησης με ^{14}C έδειξαν ότι η παραγωγή των κοκκόλιθων στο *E. huxleyi* εξαρτάται άμεσα από την ύπαρξη φωτισμού (Paasche, 2001).

Ο ανόργανος «εξωσκελετός» των θαλάσσιων πλακτονικών μικροοργανισμών μετά το θάνατο του οργανισμού καταβυθίζεται στο βυθό των ωκεανών και παίρνει σημαντικό μέρος στην ιζηματογένεση. Η δημιουργία των κοκκολίθων σχετίζεται με την ικανότητα τοπικής αύξησης της συγκέντρωσης CO_2 στο υδατικό περιβάλλον και επομένως επηρεάζει άμεσα τη φωτοσυνθετική αφομοίωση του CO_2 των μικροοργανισμών αυτών (Herfort *et al*, 2002; Riebesell *et al*, 2000). Σχετίζεται επίσης με τη μηχανική στήριξη και προστασία του οργανισμού. Σημαντικό ρόλο στη δέσμευση των ιόντων ασβεστίου, αλλά και στη δημιουργία των κοκκολίθων παίζουν πολυανιονικά μόρια πολυσακχαριτών, γαλακτοροναμανανών καθώς και πρωτεϊνών (Bilan and Usov 2001; Marsh *et al* 2002; Marsh *et al* 1992; Marsh 1996; Marsh and Dickinson 1997; Corstjens *et al* 1998). Οι κοκκόλιθοι σχηματίζονται ενδοκυτταρικά μέσα σε κυστίδια που προέρχονται από το σύστημα Colgi και στη συνέχεια τα κυστίδια μετακινούνται προς την περιφέρεια του κυττάρου και ο κοκκόλιθος τελικά αποβάλλεται με εξωκύτωση (Brownlee and Taylor, 2002). Η μορφή αλλά και ο τρόπος εναπόθεσης του ανθρακικού ασβεστίου παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των οργανισμών και πιθανόν σχετίζονται και με το λειτουργικό ρόλο των κοκκόλιθων (Levi Kalisman *et al*, 2000).

Ο άνθρακας ο οποίος ενσωματώνεται στους κοκκόλιθους προέρχεται από ανόργανες μορφές άνθρακα του υδατικού περιβάλλοντος, δηλ. το CO_2 , τα όξινα ανθρακικά και ανθρακικά ιόντα. Η ισορροπία μεταξύ CO_2 , HCO_3^- και CO_3^{2-} εξαρτάται κυρίως από το pH και τη συγκέντρωση και σε μικρότερο βαθμό από τη θερμοκρασία και αλατότητα (Herfort *et al*, 2002).

Εχει διαπιστωθεί ότι οι κοκκόλιθοι σχηματίζονται κυρίως από όξινα ανθρακικά ιόντα τα οποία επικρατούν στο υδατικό περιβάλλον των ωκεανών έναντι των δύο άλλων μορφών ανόργανου άνθρακα (Paasche, 2001). Κατά τη διάρκεια σχηματισμού των κοκκόλιθων παράγεται CO_2 το οποίο χρησιμοποιείται άμεσα από τη RubisCO των πλακτονικών μικροοργανισμών. Επίσης κατά τη διάρκεια της διαδικασίας το υδατικό περιβάλλον εμπλουτίζεται συνεχώς με CO_2 , με αποτέλεσμα η μερική πίεση του διαλυμένου CO_2 να παρουσιάζεται αυξημένη. Ο ρυθμός σχηματισμού των κοκκόλιθων φαίνεται ότι είναι ταχύτατος, αφού μπορεί να σχηματίζεται ένας μεμονωμένος κοκκόλιθος ανά ώρα (Brownlee and Taylor 2002; Paasche 2001). Κάτω από ευνοϊκές συνθήκες περιβάλλοντος ο ρυθμός σχηματισμού κοκκόλιθων μπορεί να εξισωθεί με το ρυθμός αφομοίωσης CO_2 μέσω της φωτοσύνθεσης.

1.7. Μορφολογία λιθοκύστεων των πειραματόφυτων

1.7.1 Χαρακτηριστικά των λιθοκύστεων των φύλλων των φυτών του γένους

Ficus

Οι κυστόλιθοι γενικότερα στο γένος *Ficus* είναι ιδιαίτερα διαδεδομένοι και καλά ανεπτυγμένοι. Μπορεί να εμφανιστούν σε παρεγχυματικά κύτταρα διαφορετικών οργάνων του φυτού είτε ακόμα σε αγγεία του ξύλου ή και τον ηθμό αλλά συνήθως εντοπίζονται στην επιδερμίδα, σε τρίχες ή εξειδικευμένα υπερμεγέθη κύτταρα που καλούνται λιθοκύστες (Fahn, 1990; Metcalfe and Chalk, 1985). (Εικόνα 4.1, 4.3). Οι λιθοκύστες προέρχονται απ'ευθείας από ένα πρωτοδερμικό κύτταρο το οποίο παύει να διαιρείται ενώ τα διπλανά του κύτταρα υποβάλλονται σε πολλαπλές περικλινείς διαιρέσεις (Haberlandt, 1979). Στο είδος *Ficus elastica*, αλλά και στο *F. nitida*, τα φύλλα διαθέτουν πολύστρωμη επιδερμίδα η οποία δημιουργείται μέσω περικλινών διαιρέσεων των πρωτοδερμικών κυττάρων. Οι περικλινείς αυτές διαιρέσεις συμβαίνουν με μία σχετική καθυστέρηση σε μεταγενέστερα οντογενετικά στάδια π.χ. στα φύλλα του *Ficus elastica* η επιδερμίδα παραμένει μονού στρώματος μέχρι το στάδιο που απορίπτονται τα παράφυλλα και το φύλλο αρχίζει να αναπτύσσεται στο βλαστό (Fahn, 1990). Το είδος *Ficus elastica* αλλά και *Ficus nitida* εμφανίζει τις λιθοκύστες τόσο στην προσαξονική όσο και στην αποαξονική επιφάνεια των φύλλων του (Εικόνα 4.3).

Στο είδος *F. carica* μικροανάλυση με ακτίνες -X, έδειξε ότι στον αναρτήρα, όπως και στο εξωτερικό έπαρμα ή την τρίχα, υπάρχει κυρίως πυρίτιο ενώ στο σφαιρικό τμήμα του κυστόλιθου, υπάρχει κυρίως ασβέστιο. Ο χαρακτηριστικός κίτρινος-καφέ φθορισμός τους, δείχνει την ύπαρξη φαινολικών ουσιών στο σφαιρικό τμήμα του κυστόλιθου, όχι όμως και στον αναρτήρα. Το εξωτερικό περικλινές κυτταρικό τοίχωμα του ιδιόβλαστου κυττάρου, είναι κατά πολύ λεπτότερο του εξωτερικού τοιχώματος των γειτονικών επιδερμικών κυττάρων, χωρίς εφυμενίδα, ενώ εμφανίζεται έντονα ηλεκτρονιακά πυκνό (Δαρμογιάννη, 2002).

Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι καθώς τα φύλλα του ωριμάζουν, ελαττώνεται το περιεχόμενο των κυστόλιθων σε ασβέστιο και συρρικνώνεται ο μίσχος τους (Ajello, 1941).

Παλαιότερες μελέτες που έχουν γίνει στα φυτά *P. officinalis* και *Ficus elastica* έχουν δείξει ότι κατά τη δημιουργία των κυστόλιθων η διαβάθμιση της συγκεντρώσεως του Ca στη λιθοκύστη, υποδεικνύει ότι το Ca προέρχεται κυρίως από το κυτταρικό

τοίχωμα (Chevalier & Pireyre, 1979). Το ασβέστιο αρχικά συσσωρεύεται στο τοίχωμα της λιθοκύστης. Στη συνέχεια μεταφέρεται από τα τοιχώματα προς τον κυστόλιθο μέσω του διαύλου του μίσχου. Ο μίσχος είναι πάντα πιο πλούσιος σε ασβέστιο σε σχέση με τα τοιχώματα ή το γειτονικό κυτόπλάσμα. Τα τοιχώματα της λιθοκύστης διαθέτουν υψηλότερη συγκέντρωση ασβεστίου έναντι του κυτοπλάσματος και επιπλέον, οι ουσίες που συγκρατούν το ιόν αυτό, είναι σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση μέσα στις λιθοκύστες, απ' ό,τι στα γειτονικά κύτταρα (Chevalier & Pireyre, 1979). Παρόλον ότι δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σχετικές με τους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των λιθοκύστεων, αξίζει να αναφερθεί η παρατήρηση της Chistikina (Chistikina, 1961), ότι ο σχηματισμός των κυστόλιθων στο γένος *Ficus* εγείρεται από προσβολή μυκήτων.

Στις λιθοκύστες, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει πάντα ένας λειτουργικός πυρήνας, ο οποίος είναι αρκετά μεγαλύτερος από τους πυρήνες γειτονικών κυττάρων. Τα παρακείμενα κύτταρα τείνουν να προσαρμοστούν στην εξέλιξη του φαινομένου της γένεσης του κυστόλιθου μέσα από συνεχείς διαιρέσεις, σε αντίθεση με την ίδια την λιθοκύστη, η οποία δεν διαιρείται ποτέ. Το ανθρακικό ασβέστιο δεν εναποτίθεται πάνω στο μίσχο, πριν από την ολοκληρωτική ανάπτυξη του τελευταίου και την πλήρη έκπτυξη του φύλλου (Ajello, 1941).

1.7.2. Χαρακτηριστικά των λιθοκύστεων των φύλλων του φυτού *Morus alba*

Τα φύλλα της μουριάς χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μεγάλου μεγέθους σφαιρικών ιδιοβλαστών οι οποίοι φέρουν κυστόλιθους (Lucas *et.al*, 2000; Sugimura *et.al*, 1999). Οι ιδιοβλάστες αυτοί εντοπίζονται κυρίως στην προσαξονική επιφάνεια του ελάσματος (βλ.επίσης Εικόνα 4.1). Το εξωτερικό τμήμα του ιδιοβλάστη εντοπίζεται στην προσαξονική επιφάνεια με τη μορφή μιας θηλής. Ο ογκώδης κυστόλιθος αναρτάται στο άκρο μιας κυλινδρικής προεκβολής (μίσχου) που σχηματίζεται στην περιοχή της θηλής.

Στοιχειακή ανάλυση των ιδιοβλαστών, έδειξε στη περιοχή της θηλής και του μίσχου εντοπίζεται πυρίτιο, ενώ το ασβέστιο εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή του κυστόλιθου. Η ειδική αυτή κυτταρική διαμερισματοποίηση των στοιχείων αυτών (Ca, Si) είναι ενδεχομένως μοναδική, καθώς δεν έχει βρεθεί σε ιδιοβλάστες άλλων φυτών (Sugimura *et al*, 1999).

Η μορφολογία των κυστόλιθων διαφέρει μεταξύ των ποικιλιών Μουριάς, γεγονός που μπορεί να αποτελέσει πολύτιμο ταξινομικό χαρακτηριστικό (Katsumata,

1971). Πέρα από τις μορφολογικές μελέτες που έχουν γίνει στους κρυστάλλους και τους ιδιοβλάστες της μουριάς, δεν υπάρχει μέχρι στιγμής, διαθέσιμη πληροφορία που να αφορά τη φυσιολογική σημασία της συσσώρευσης του ανθρακικού ασβεστίου στους ιδιοβλάστες.

1.7.3. Χαρακτηριστικά των λιθοκύστεων των φύλλων του φυτού *Parietaria judaica*

Για το φυτό αυτό δεν υπάρχουν διαθέσιμα στη διεθνή βιβλιογραφία δεδομένα σχετικά με την ανατομία των φύλλων του, και ιδιαίτερα των λιθοκύστεων. Τα μοναδικά στοιχεία που υπάρχουν αντλούνται από την πτυχιακή εργασία της Ζ. Γκιάφη στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του ΓΠΑ. Σύμφωνα με την εργασία αυτή, το φυτό *P.judaica*, εμφανίζει τις λιθοκύστες μόνο στην προσαξονική επιφάνεια των φύλλων του (βλ. επίσης εικόνα 4.2). Η διαμετρός τους κυμαίνεται μεταξύ 40-50μm και η μορφή τους εμφανίζεται ως εξαγωνική. Η συχνότητα των λιθοκύστεων είναι $52\pm 3/\text{mm}^2$ (Γκιάφη, 2003). Σε εγκάρσιες τομές φύλλων του φυτού με το οπτικό μικροσκόπιο παρατηρείται ο μίσχος και το κυτταρικό περίβλημα του κυστόλιθου ενώ το δρυφρακτοειδές και το σπογγώδες παρέγχυμα παρουσιάζονται ιδιαίτερα αραιά. Η λιθοκύστη δεν φαίνεται να διαθέτει χυμοτόπιο, και το ρόλο του φαίνεται να παίζει ο ίδιος ο κυστόλιθος, ενώ το υπόλοιπο του πρωτοπλάστη καταλαμβάνεται από το κυτόπλασμα, το οποίο περιέχει μιτοχόνδρια, πλαστίδια κ.α. Στο εξωτερικό περίβλημα των κυστόλιθων εντοπίζεται λιγνίνη. Σε απομονωμένους κυστόλιθους είναι ιδιαίτερα εμφανή τα επάρματα στην επιφάνεια τους.

Όσον αφορά το είδος *P.judaica*, ο κυστόλιθος, αποτελείται από μία ακανόνιστη σφαιρική δομή και έναν αναρτήρα, από τον οποίο αναρτάται από το κυτταρικό τοίχωμα. Η μάζα του κυστόλιθου είναι ανομοιογενής. Στο εσωτερικό του κυστόλιθου κυρίως κατά την ανάπτυξή του, διακρίνονται με το Η.Μ.Δ(Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης), κυστίδια, , δομές που μοιάζουν με κυτταρικό τοίχωμα και ηλεκτρονικά πυκνές μάζες με κοκκιώδη ή ινώδη μορφή (Γκιάφη, 2003).

Στο φυτό *P.judaica* η λιθοκύστη διαφέρει απ'αυτή της συκιάς και άλλων φυτών ως προς την παρουσία εφυμενίδας στο εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα και την απουσία θηλής από αυτό. Προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής έδειξαν ότι το μέγεθος των κυστόλιθων επηρεάζεται από το καθεστώς φωτισμού κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των φύλλων. Επίσης

χειρισμοί απομονωμένων κυστόλιθων με διαλύματα διαφορετικού pH έδειξαν ότι η αποδόμηση των κρυστάλλων ευνοείται σε όξινο περιβάλλον (Γκιάφη, 2003).

Σκοπός

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Λαμβάνοντας υπόψη ότι **α.** μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν επαρκή πειραματικά δεδομένα ώστε να δοθεί ικανοποιητική ερμηνεία για τη φυσιολογική σημασία των κυστολίθων που εντοπίζονται σε κύτταρα ανώτερων φυτών και **β.** το ρόλο τον οποίο επιτελούν ανάλογες δομές σε φωτοσυνθετικούς πλαγκτονικούς μικροοργανισμούς, θα μπορούσε να διατυπωθεί υπόθεση εργασίας, σύμφωνα με την οποία οι κυστόλιθοι *διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαχείριση του ανόργανου άνθρακα των φωτοσυνθετικών ιστών.* Το άμορφο ανθρακικό ασβέστιο που εναποτίθεται στις δομές αυτές θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μια δεξαμενή ανθρακικών ιόντων τα οποία κάτω από κατάλληλες συνθήκες προκύπτουν από τη διάσπαση του CaCO_3 και είναι διαθέσιμα προς αφομοίωση από την καρβοξυλάση-οξυγενάση της διφωσφοροριβουλόζης (RubiSCO). Σε συνθήκες “πενίας” άνθρακα, όταν π.χ. τα στομάτια παραμένουν κλειστά στη διάρκεια της ημέρας λόγω αντίξοων συνθηκών (επικράτηση ισχυρών ανέμων για μεγάλα χρονικά διαστήματα ή υδατική καταπόνηση) η διάσπαση του ανθρακικού ασβεστίου των κυστολίθων θα μπορούσε να προμηθεύσει το αναγκαίο CO_2 για την απρόσκοπτη λειτουργία του κύκλου του Calvin, χωρίς να παραστεί ανάγκη να ανοίξουν τα στομάτια και να λάβει χώρα απώλεια νερού. Τα ιόντα ασβεστίου θα μπορούσαν να δεσμευτούν προσωρινά από τα πηκτινικά υλικά του μίσχου της λιθοκύστης με μια διαδικασία ανάλογη αυτής που προαναφέρθηκε για τα κοκκολιθοφόρα. Το έναυσμα για τη διάσπαση των κυστολίθων θα μπορούσε ενδεχομένως να δίδεται από το αμπισικό οξύ, το ορμονικό σήμα που, ως γνωστόν, προκαλεί κλείσιμο των στοματίων. Εάν αρθούν οι δυσμενείς συνθήκες, ή κατά τη διάρκεια της νύκτας όπου πλέον η φωτοσύνθεση δεν λειτουργεί, ξεκινά και η διαδικασία επαναδημιουργίας του κυστολίθου. Το ασβέστιο απελευθερώνεται από τα πηκτινικά υλικά και αντιδρά με όξινα ανθρακικά ιόντα. Τα τελευταία μπορεί να προέρχονται από τρεις διαφορετικές πηγές: *α.* από την ατμόσφαιρα. *β.* από την αναπνευστική δραστηριότητα και *γ.* από το έδαφος. *Προτείνεται λοιπόν ότι οι κυστόλιθοι αποτελούν ένα δυναμικό σύστημα αποθήκευσης και διαχείρισης κυρίως ανόργανου άνθρακα παρά ασβεστίου.*

Η παρούσα εργασία κλήθηκε να απαντήσει στα ακόλουθα ερωτήματα:

1. Ποιά η ανατομία των λιθοκύστεων των πειραματοφύτων που επιλέχθηκαν;
2. Ποιά είναι η καταλληλότερη μέθοδος απομόνωσης και μέτρησης των διαστάσεων των κυστόλίθων;
3. Αποτελούνται οι κυστόλιθοι από ανθρακικό ασβέστιο;

4. Κάτω από ποιές συνθήκες οι κυστόλιθοι αποδομούνται;

Υλικά και Μέθοδοι

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Τα πειραματόφυτα

Ως πειραματόφυτα χρησιμοποιήθηκαν τα *Morus alba*, *Parietaria judaica* και *F. carica*. Για τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις συλλέχθηκαν φύλλα από κάθε είδος από τις εγκαταστάσεις του Γ.Π.Α. Για τα πειράματα υδατικής καταπόνησης στον θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών και για τα πειράματα σε ατμόσφαιρα απουσία CO₂ χρησιμοποιήθηκαν νεαρά φυτά *F. nitida* ανεπτυγμένα σε γλάστρες μέσα σε θερμοκήπιο. Τα φυτά εγκλιματίστηκαν για 10 ημέρες στις συνθήκες του θαλάμου σταθερών συνθηκών και στη συνέχεια υποβλήθηκαν στους διαφορετικούς πειραματικούς χειρισμούς.

Για τα πειράματα με τους δίσκους φύλλων αναπτύχθηκαν φυτά *P. judaica* σε γλάστρες από μοσχεύματα που πάρθηκαν από φυτά ανεπτυγμένα ως ζιζάνια στον αγρό του Γ.Π.Α. Για την επιτυχή ριζοβόληση των μοσχευμάτων οι αποκομμένοι βλαστοί εμβαιπίστηκαν σε ορμόνη ριζοβολίας.

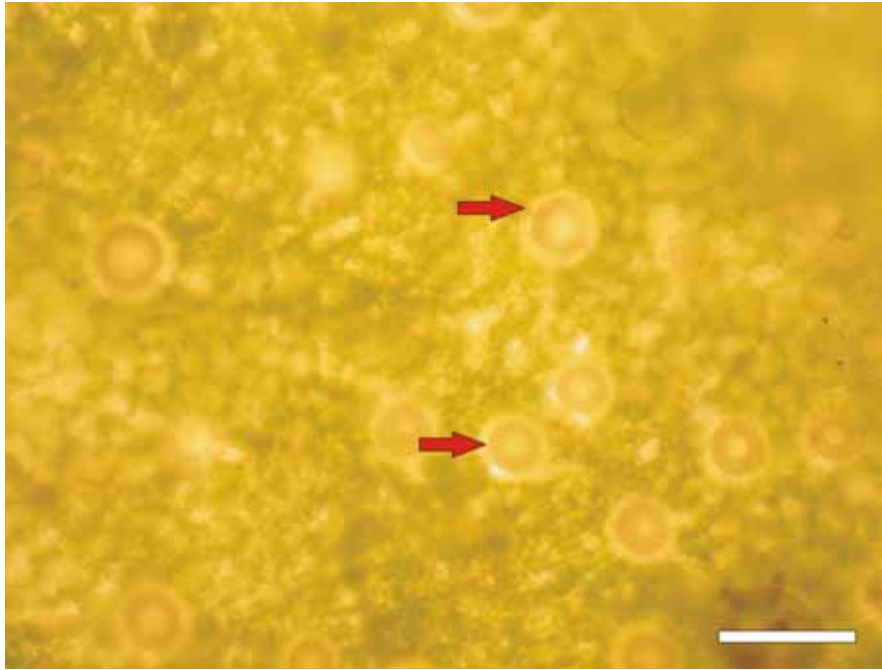
3.2. Μικροσκοπικές παρατηρήσεις

Για την μελέτη της ανατομίας των λιθοκύστεων χρησιμοποιήθηκαν νωπά δείγματα από τα οποία ελήφθησαν εγκάρσιες τομές με ξυράφι και οι μικροφωτογραφίες πάρθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο Zeiss Axiolab (Carl Zeiss, Jena, Germany) με τη χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής SONY DSC75-S (SONY Corp., Tokyo, Japan). Σε ορισμένες περιπτώσεις η παρατήρηση των κυστόλιθων σε εγκάρσιες τομές έγινε μετά από προηγούμενη χρώση με υδατικό διάλυμα νιτρικού αργύρου 10% (w/v).

3.3. Μέτρηση διαστάσεων των κυστόλιθων

Η μέτρηση των διαστάσεων των κυστόλιθων έγινε μέσω δύο μεθόδων:

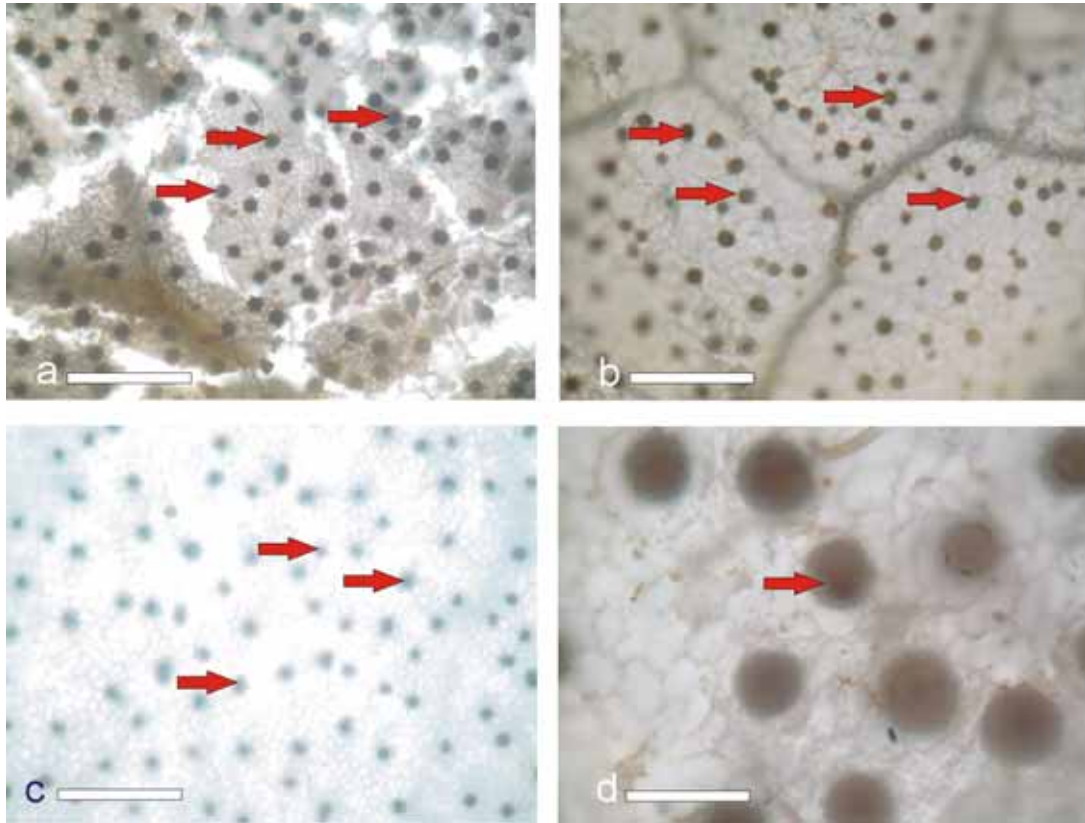
A. Παρατήρηση φύλλων με διερχόμενο φως τα οποία προηγουμένως είχαν αποχρωματιστεί σε ζέουσα αιθανόλη (εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Παρατήρηση κυστόλιθων σε διερχόμενο φώς μετά τον αποχρωματισμό με αιθανόλη. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν κυστόλίθους. Η μπάρα αντιπροσωπεύει 80 μm .

B. Μέτρηση διαστάσεων κυστόλιθων μετά από καύση σε πυρατήριο (παρασκευή σταχτογραμμάτων)

Ακολουθήθηκε η μέθοδος του Freisleben (1933). Δίσκοι φύλλων γνωστής διαμέτρου τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους και ακολούθησε καύση σε πυρατήριο στους 500°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα υπολείμματα των φύλλων παρατηρήθηκαν σε διερχόμενο φως στο οπτικό μικροσκόπιο. Η μέθοδος επιτρέπει τον υπολογισμό των διαστάσεων και της πυκνότητας των κυστόλιθων σε ένα φύλλο με σχετικά καλή ακρίβεια (εικόνα 3.2.). Η μέτρηση των διαστάσεων των κυστόλιθων, ανεξάρτητα μεθόδου απομόνωσης, έγινε με τη χρήση κατάλληλης κλίμακας ενσωματωμένης στον προσοφθάλμιο φακό.



Εικόνα. 3.2. Παρατήρηση κυστόλιθων σε σταχτογράμματα, όπως παρουσιάζονται στο οπτικό μικροσκόπιο σε διερχόμενο φωτισμό. *a. P. judaica b. M. alba c. F. nitida.* Τα κόκκινα βέλη δείχνουν κυστόλιθους. Στην *d* παρουσιάζονται κυστόλιθοι *P. judaica* σε μεγαλύτερη μεγέθυνση. Η μπάρα αντιπροσωπεύει 20 μm στην *d* και 80 μm στις *a, b, c*.

3.4. Απομόνωση κυστόλιθων

Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι το άμορφο ανθρακικό ασβέστιο το οποίο εναποτίθεται στους κυστόλιθους αποτελεί ασταθές συστατικό το οποίο σε υδατικά διαλύματα αποδομείται σταδιακά. Ακολούθησε χρήση διαλύματος απομόνωσης NaOH με μη ικανοποιητικά αποτελέσματα. Γι'αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα απομόνωσης NaOH (ώστε να αυξηθεί το pH) και μαννιτόλης (ώστε να μειωθεί το οσμωτικό δυναμικό). Στις συνθήκες αυτές δεν ευνοείται η αποδόμηση των κυστόλιθων στο περιβάλλον υδατικό μέσο. Η μέθοδος απομόνωσης περιλαμβάνει τεμαχισμό ώριμων φύλλων των υπό μελέτη φυτικών ειδών και ομογενοποίηση σε διάλυμα μαννιτόλης 0.46 m σε pH=10 με την προσθήκη NaOH. Η ομογενοποίηση πραγματοποιείται σε ομογενοποιητή με μικρή ταχύτητα περιστροφής ώστε να μη

διαλύονται οι κυστόλιθοι. Ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις με απιονισμένο H₂O κατά τη διάρκεια των οποίων οι στατόλιθοι καθιζάνουν ταχύτερα όλων των άλλων κυτταρικών συστατικών. Με συνεχή επανάληψη της διαδικασίας παραλαμβάνεται ίζημα πλούσιο σε κυστόλιθους το οποίο στη συνέχεια καθαρίζεται περαιτέρω με τη διέλευσή του από φίλτρα διαμέτρου 1,1mm και 140μm. Στη συνέχεια γίνεται λήψη του ιζήματος με πιπέτα και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο.

Επειδή η εξέταση των απομονωμένων σε υδατικά διαλύματα κυστόλιθων (ακόμη και με πρόσθετα μέτρα προφύλαξης) σε FT-Raman έδειξε ότι υπήρχαν απώλειες σε ανθρακικό ασβέστιο, χρησιμοποιήθηκε τελικά η ισοπροπυλική αλκοόλη ως εκχυλιστικό μέσο. Η υπόλοιπη διαδικασία απομόνωσης πραγματοποιήθηκε χωρίς μεταβολές, όπως αναφέρεται πιο πάνω.

3.5. Μετρήσεις φωτοσυνθετικής έκλυσης O₂

Οι μετρήσεις έγιναν με οξυγονόμετρο αερίου φάσεως τύπου Hansatech (Walker, 1993). Ο φωτισμός του δείγματος πραγματοποιήθηκε μέσω συστήματος οπτικών ινών. Οι μετρήσεις φωτοσυνθετικής έκλυσης O₂ ελήφθησαν σε κορεσμένη(5%) ατμόσφαιρα CO₂ (μάρτυρες) και σε ατμόσφαιρα απουσίας CO₂. Οι μετρήσεις αφορούν την φωτοσυνθετική ικανότητα (capacity) και όχι τη φωτοσυνθετική ταχύτητα.

3.6. Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των κυστόλιθων φύλλων *Morus alba* με τη μέθοδο FT-RAMAN.

Απομονωμένοι κυστόλιθοι φύλλων μουριάς τοποθετήθηκαν σε δειγματοφορείς και αναλύθηκαν με τη βοήθεια συσκευής FT-Raman δονητικής φασματοσκοπίας (Vagenas et al 2003; Kontoyannis and Vagenas 2000). Πραγματοποιήθηκαν 300 σαρώσεις σε κάθε δείγμα και λήφθηκαν φάσματα των δειγμάτων.

3.7. Πείραμα υδατικής καταπόνησης

Νεαρά φυτά *F. nitida* ανεπτυγμένα σε γλάστρες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών (φωτοπερίοδος 14/10 hrs, θερμοκρασία 25/20 °C, ένταση φωτισμού 300 μmole m⁻² s⁻¹). Μετά τον εγκλιματισμό τους στις νέες συνθήκες (μετά από δέκα ημέρες) τα φυτά χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Η μία ομάδα περιελάμβανε τα

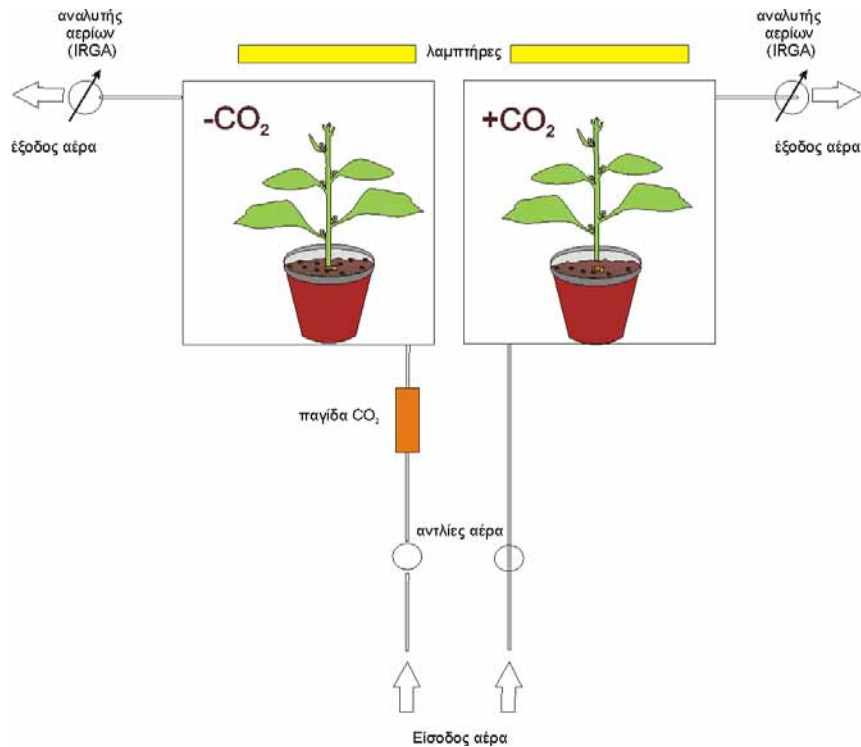
φυτά μάρτυρες τα οποία ποτίζονταν κάθε 48 ώρες, ενώ η δεύτερη ομάδα περιελάμβανε φυτά τα οποία αφέθηκαν απότιστα. Στο διάστημα αυτό λαμβάνονταν καθημερινές μετρήσεις στις διαστάσεις των κυστόλιθων. Παράλληλα καταγραφόταν στα αντίστοιχα δείγματα η αγωγιμότητα των στοματίων με πορόμετρο τύπου PMR-5 Steady State Porometer(PP- Systems, Amesbury, MA,U.S.A.).

3.8. Μετρήσεις των ημερονύκτιων διακυμάνσεων των διαστάσεων των κυστόλιθων και της στοματικής αγωγιμότητας.

Νεαρά φυτά *F. nitida* ανεπτυγμένα σε γλάστρες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών (φωτοπερίοδος 14/10 hrs, θερμοκρασία 25/20 °C, ένταση φωτισμού 300 $\mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Μετά την πάροδο δέκα ημερών, για τον εγκλιματισμό τους, ελήφθησαν φύλλα από φυτά ίδιας ηλικίας ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε διάστημα ενός 48ωρου. Σ'αυτά τα δείγματα προσδιορίστηκε το μέγεθος των κυστόλιθων με τη μέθοδο των σταχτογραμμάτων. Παράλληλα καταγράφονταν στα αντίστοιχα δείγματα η αγωγιμότητα των στοματίων με πορόμετρο τύπου PMR-5 Steady State Porometer(PP- Systems, Amesbury, MA,U.S.A.).

3.9. Επίδραση ατμόσφαιρας ελεύθερης CO₂ σε νεαρά φυτά *F. nitida*

Νεαρά φυτά *F. nitida* ανεπτυγμένα σε γλάστρες τοποθετήθηκαν σε κλειστούς θαλάμους οι οποίοι τροφοδοτήθηκαν είτε με αέρα της ατμόσφαιρας (360-370 ppm CO₂)(φυτά μάρτυρες), είτε με αέρα περιεκτικότητας 0-3 ppm CO₂. Η ροή του αέρα ρυθμίστηκε με κατάλληλα ροόμετρα. Η αφαίρεση του CO₂ από τον αέρα πραγματοποιήθηκε με χρήση παγίδων που περιείχαν soda lime. Τα επίπεδα CO₂ ελέγχονταν συνεχώς με αναλυτή CO₂ (Licor, Li-6262). Τα φυτά παρέμειναν στους θαλάμους για τρεις ημέρες (φωτοπερίοδος 14/10 hrs, θερμοκρασία 25°C, ένταση φωτεινής ακτινοβολίας 300 $\mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Στο διάστημα αυτό λαμβάνονταν καθημερινά φύλλα στα οποία προσδιορίστηκε το μέγεθος των κυστόλιθων με τη μέθοδο των σταχτογραμμάτων. Η πειραματική διάταξη παρουσιάζεται διαγραμματικά στην εικόνα 3.3.



Εικόνα 3.3. Η πειραματική διάταξη ανάπτυξης φυτών σε ατμόσφαιρα 370 και 0 ppm CO_2 . Στον αριστερό θάλαμο στο φυτό παρέχεται αέρας μηδενικής συγκέντρωσης σε CO_2 μέσω της συγκράτησης του CO_2 σε κατάλληλη παγίδα η οποία περιέχει soda lime. Στον δεξιό θάλαμο χορηγείται αέρας από το περιβάλλον. Η συγκέντρωση CO_2 ελέγχεται μέσω αναλυτή αερίων (IRGA). Η ροή αέρα ρυθμίζεται με ροόμετρα ώστε να είναι ίδια και στους δύο θαλάμους.

3.10. Επίδραση ατμόσφαιρας ελεύθερης CO_2 σε δισκία φύλλων *M. alba* και *P. judaica*

Δίσκοι φύλλων γνωστής διαμέτρου από *M. alba* ή *P. judaica* τοποθετήθηκαν σε τρυβλία (30 ανά τρυβλίο) τα οποία περιείχαν 3 στρώσεις διηθητικού χαρτιού με βαμβάκι που είχε εμποτιστεί σε H_2O . Τρία (3) από τα πέντε (5) τρυβλία περιείχαν μικρότερα τρυβλία με soda lime για την αφαίρεση του CO_2 του αέρα. Τα υπόλοιπα δύο (2) με στηρίγματα διατηρήθηκαν μισάνοιχτα επιτρέποντας έτσι τη διέλευση ατμοσφαιρικού αέρα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών και ανά 24ώρο λαμβάνονταν 5 δίσκοι φύλλων (από κάθε χειρισμό) οι οποίοι ρίπτονταν σε ζέουσα αιθανόλη προς αποχρωματισμό για να ακολουθήσει μέτρηση των διαστάσεων τους με το οπτικό μικροσκόπιο.

3.11.Επίδραση του ABA σε δίσκους φύλλων *Ficus nitida*, *Morus alba* και *Parietaria judaica*

Δίσκοι φύλλων γνωστής διαμέτρου από κάθε φυτό τοποθετήθηκαν σε τρυβλία (30 ανά τρυβλίο) τα οποία περιείχαν διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις ABA (50, 100, 200 και 1000 μM). Οι δίσκοι επέπλεαν στο αντίστοιχο διάλυμα. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε ένταση φωτισμού $50 \mu\text{mole m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δίσκοι στους οποίους προσδιορίστηκε η έκλυση O_2 σε συνθήκες 0 ppm CO_2 . Για το σκοπό αυτό διοχετεύτηκε στο θάλαμο του οξυγονομέτρου αέρας από τον οποίο είχε αφαιρεθεί το CO_2 με τη βοήθεια παγίδας που περιείχε Soda lime. Στη συνέχεια στους δίσκους αυτούς μετρήθηκε το μέγεθος των κυστόλιθων με τη μέθοδο των σταχτογραμμάτων.

3.12. Άλλες μετρήσεις

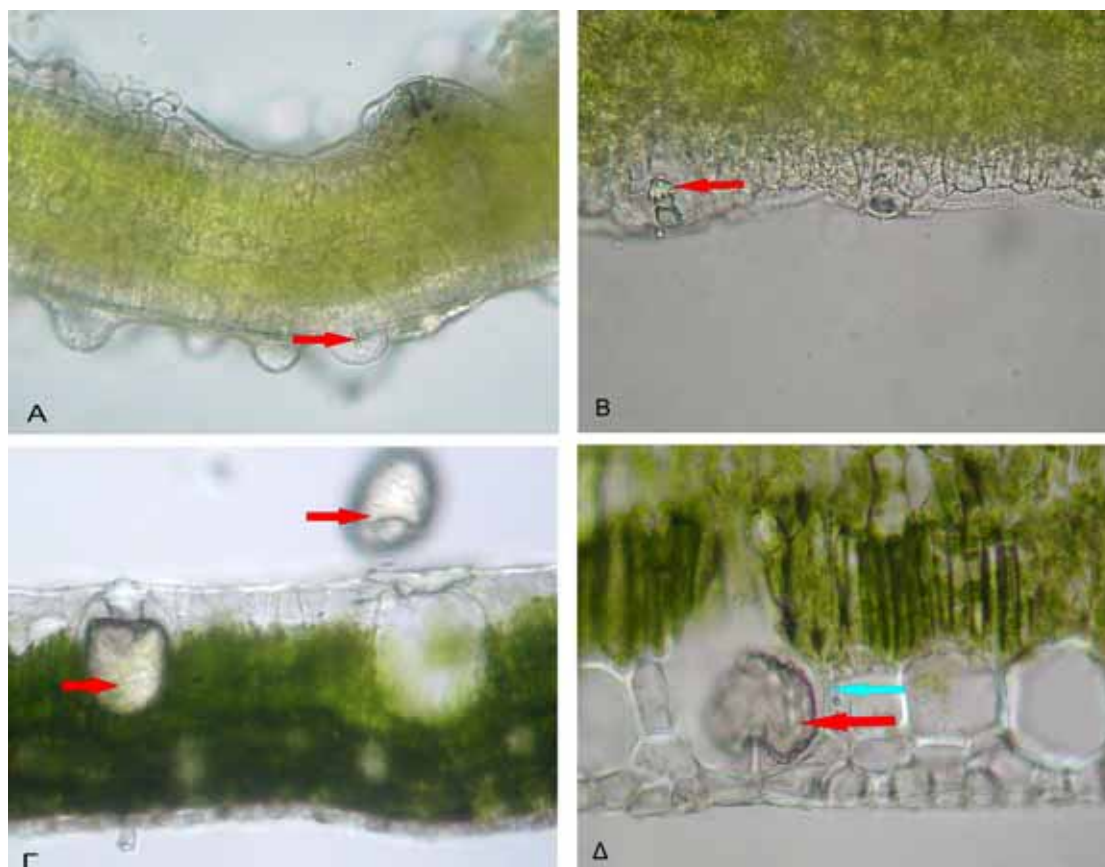
Η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας μετρήθηκε με τον ανιχνευτή quanta Li188B της εταιρείας LiCOR

Αποτελέσματα

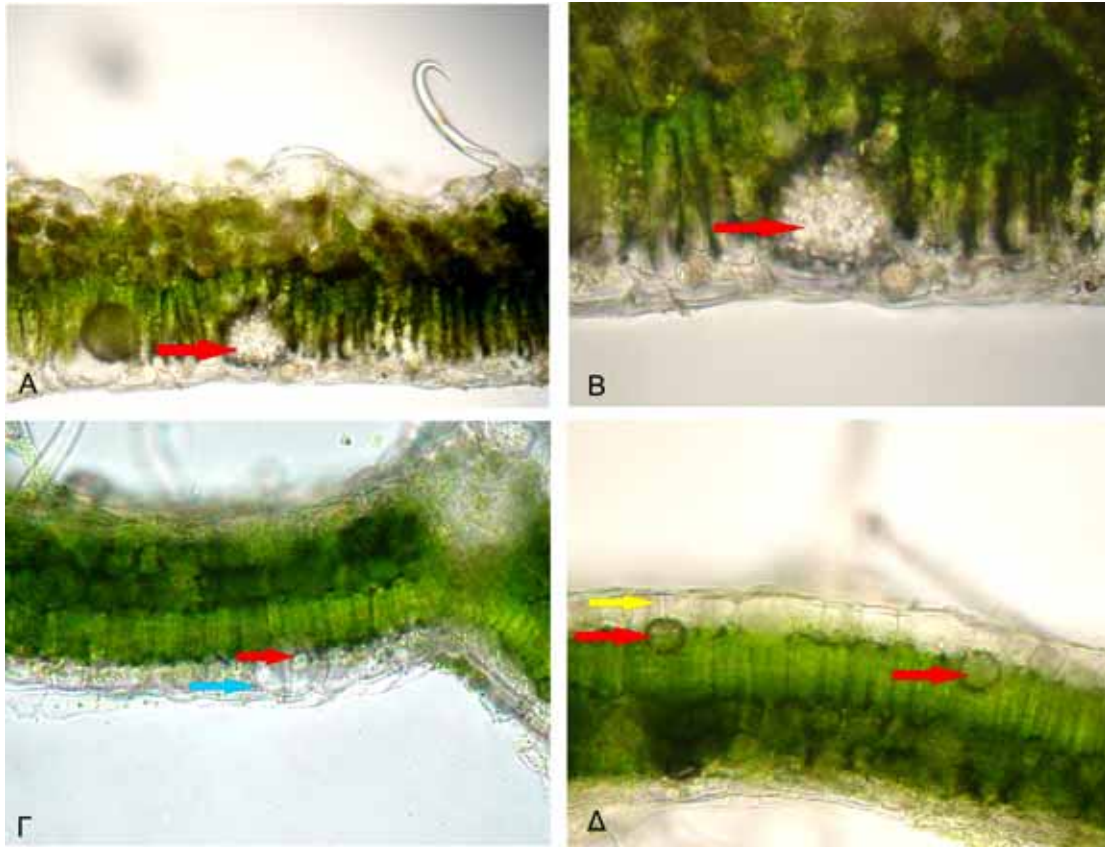
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Ανατομικές παρατηρήσεις των κυστόλιθων των τριών πειραματόφυτων

Οι λιθοκύστες και των τριών φυτικών ειδών που εξετάστηκαν, διαθέτουν κοινά χαρακτηριστικά. Σε κάθε λιθοκύστη διακρίνουμε ένα κυστόλιθο ο οποίος συγκρατείται μέσω ενός μίσχου από το κυτταρικό τοίχωμα της λιθοκύστης. Στις περισσότερες περιπτώσεις η επιφάνεια των κυστολίθων δεν είναι λεία επειδή εκτός από τις άμορφες αποθέσεις ανθρακικού ασβεστίου περιέχουν και άλλου είδους κρυστάλλους (βλ. εικόνα 4.2B, 4.3, 4.5A, 4.6Δ). Οι κρύσταλλοι αυτοί γίνονται πλήρως ορατοί εάν αποδομηθεί το άμορφο ανθρακικό ασβέστιο (εικόνα 4.5.B). Και στα τρία είδη που εξετάστηκαν οι λιθοκύστες εντοπίζονται πλησίον της επιφάνειας



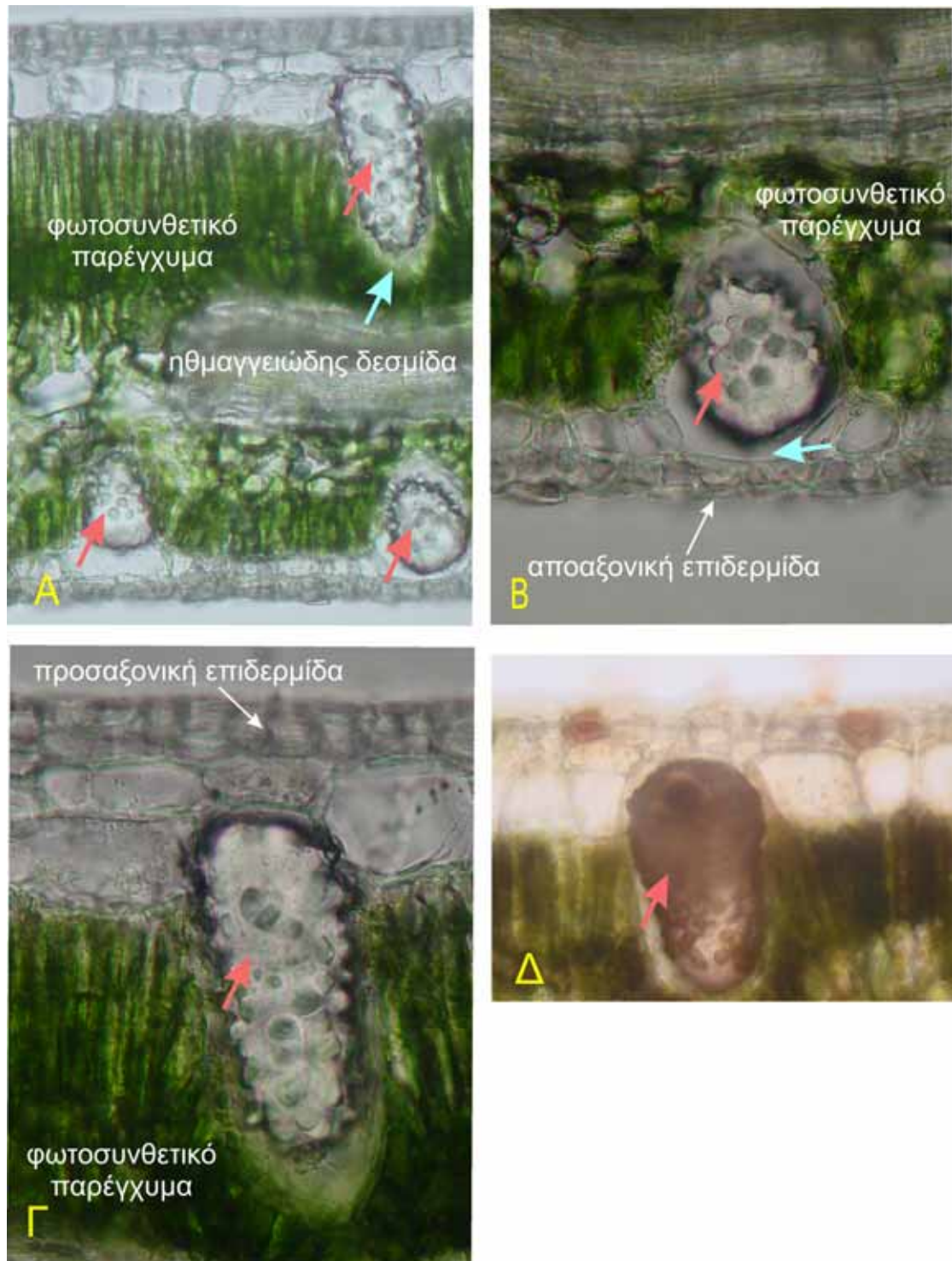
Εικόνα 4.1. Εγκάρσια τομή φύλλων *Morus alba*-προσαζονική επιφάνεια(Γ) και αποαζονική επιφάνεια (Α,Β,Δ). Οι Α,Β αντιστοιχούν σε νεαρά φύλλα *Morus Alba* ενώ οι Γ,Δ σε ώριμα. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τους κυστόλιθους ενώ τα γαλάζια βέλη δείχνουν τις λιθοκύστες.



Εικόνα 4.2. Εγκάρσιες τομές φύλλων *Parietaria judaica*. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τους κυστόλιθους, το γαλάζιο τη λιθοκύστη και το κίτρινο τον αναρτήρα του κυστόλιθου. Οι Γ,Δ αντιστοιχούν σε νεαρά φύλλα ενώ οι Α και Β σε ώριμα.

του φύλλου. Το ένα τμήμα της κάθε λιθοκύστης βρίσκεται σε επαφή με τα επιδερμικά ή υποδερμικά κύτταρα, ενώ το υπόλοιπο βρίσκεται σε επαφή με φωτοσυνθετικά κύτταρα.

Η μορφή των κυστόλιθων ποικίλει από σφαιρική και ατρακτοειδής έως βακιλοειδής (εικόνα 4.1,4.2,4.3)



Εικόνα 4.3. Εγκάρσια τομή *Ficus nitida*. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τους κυστόλιθους και το μπλέ την λιθοκύστη. Στη Δ έχει γίνει χρώση με 0.05M AgNO₃. Οι Β,Γ,Δ αντιστοιχούν σε μεγαλύτερη μεγέθυνση.

4.2. Μετρήσεις των διαστάσεων των κυστόλιθων

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης αποτελούσε η εξεύρεση αξιόπιστης μεθόδου μέτρησης των διαστάσεων των κυστόλιθων (βλ. Υλικά- Μέθοδοι). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο εναλλακτικές μέθοδοι (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), η μία εκ των οποίων (παρασκευή σταχτογραμμάτων) κρίθηκε ως η πλέον αξιόπιστη επειδή τα περιγράμματα των κυστόλιθων στο οπτικό μικροσκόπιο παρουσιάζονταν περισσότερο ευκρινή.

Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζεται ο όγκος των κυστόλιθων στα είδη που εξετάσαμε :

Πίνακας 4.2. Όγκος των κυστόλιθων στα είδη: *F. nitida*, *M. alba*, *P. judaica*

Όγκος κυστόλιθων σε $\mu\text{m}^3 \times 10^3$		
<i>F. nitida</i>	<i>M. alba</i>	<i>P. judaica</i>
107.5±5.8	49.1±0.71	32.8±1.7

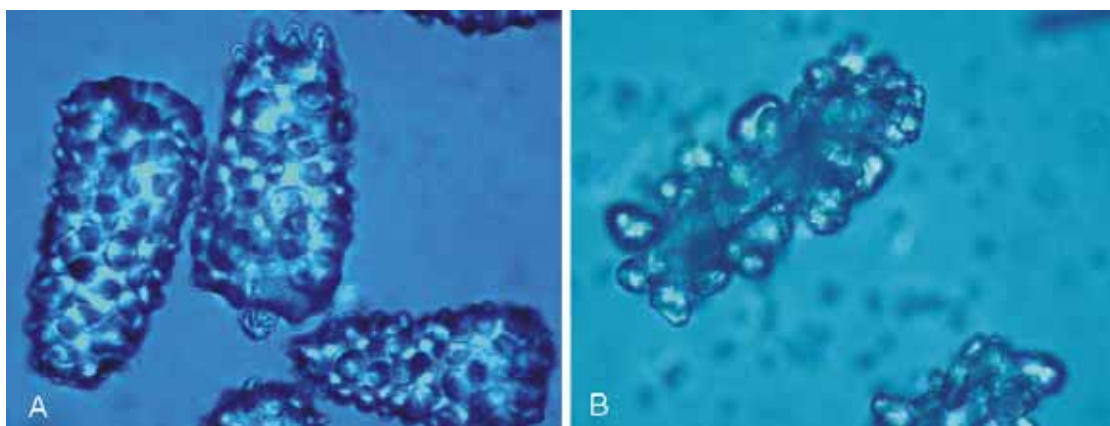
4.3. Απομόνωση κυστόλιθων.

Αρχικά οι κυστόλιθοι απομονώθηκαν σε απιονισμένο νερό με αποτέλεσμα οι απομονωμένοι κυστόλιθοι να παρουσιάζουν αλλοιωμένη μορφή στο μικροσκόπιο (εικόνα 4.4) επειδή το ανθρακικό ασβέστιο από το οποίο αποτελούνται οι κυστόλιθοι είναι ευδιάλυτο στο νερό.



Εικόνα 4.4. Κυστόλιθοι *F. nitida* μετά την απομόνωση τους σε απιονισμένο νερό.

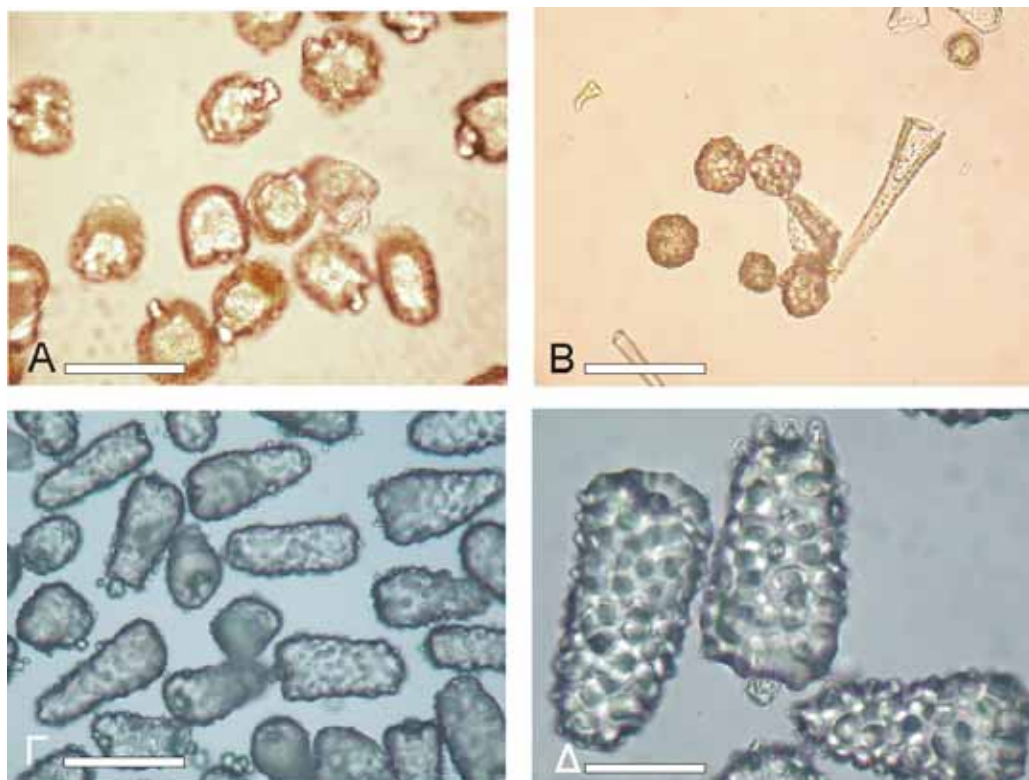
Στην εικόνα 4.5.B φαίνεται καθαρά ότι οι κυστόλιθοι στο *F. nitida* εκτός από το άμορφο ανθρακικό ασβέστιο, το οποίο σταδιακά διαλύεται σε υδατικό περιβάλλον, αποτελούνται και από κρυστάλλους διαφορετικής δομής και ενδεχομένως και σύστασης οι οποίοι βρίσκονται διάχυτα τοποθετημένοι μέσα στην κύρια μάζα του ανθρακικού ασβεστίου.



Εικόνα 4.5. Αποδόμηση κυστόλίθων φύλλων *F. nitida* μετά από παραμονή τους σε υδατικό διάλυμα για 3 hrs (B). Το άμορφο ανθρακικό ασβέστιο έχει διαλυθεί, ενώ κάνουν την εμφάνισή τους εσωτερικοί κρυστάλλοι πιθανόν διαφορετικής δομής και σύστασης. Στην A παρουσιάζονται απομονωμένοι κυστόλιθοι σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο. Οι μικροφωτογραφίες ελήφθησαν σε οπτικό μικροσκόπιο κάτω από πεδίο πολωμένου φωτός.

Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως διάλυμα απομόνωσης NaOH με σκοπό την παρεμπόδιση – καθυστέρηση της διάλυσης του ανθρακικού ασβεστίου λόγω του ισχυρά αλκαλικού περιβάλλοντος που δημιουργείται. Η μορφή των απομονωμένων κυστόλίθων βελτιώθηκε σε ένα βαθμό σε σχέση με αυτούς που απομονώθηκαν σε απιονισμένο νερό αλλά παρέμενε μη ικανοποιητική. Στη συνέχεια στο διάλυμα απομόνωσης προστέθηκε μαννιτόλη σε υψηλή συγκέντρωση 0,46m με σκοπό να παρεμποδιστεί η διάλυση του ανθρακικού ασβεστίου και λόγω του χαμηλού οσμωτικού δυναμικού του διαλύματος. Η μέθοδος αυτή έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, αφού απομονώθηκαν δείγματα κυστόλίθων υψηλής καθαρότητας (εικόνα 4.6) από τα φύλλα *M. alba* και *F. nitida*. Τα δείγματα από τα φύλλα των φυτών *P. judaica* (δεν παρουσιάζεται εικόνα) και *F. carica* (εικόνα 4.6.B) δεν ήταν

πλήρως καθαρά, διότι περιείχαν και θραύσματα από τις επιφανειακές τρίχες με τις οποίες καλύπτονται τα ελάσματα.

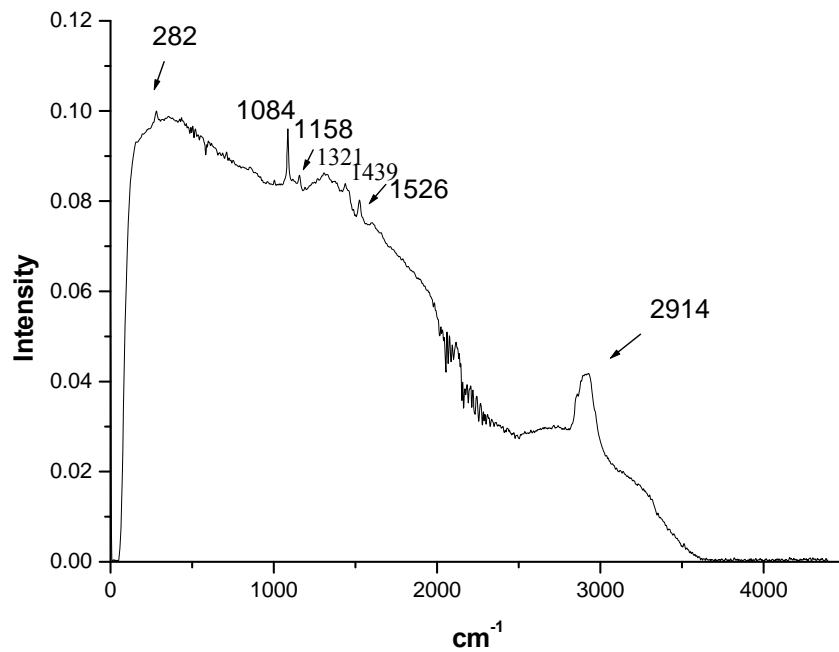


Εικόνα 4.6. Απομονωμένοι κυστόλιθοι *M. alba* (A), *F. carica* (B) και *F. nitida* (Γ και Δ). Οι εικόνες έχουν ληφθεί σε κοινό οπτικό μικροσκόπιο σε πεδίο διερχόμενου φωτός (A και B) ή σε πεδίο πολωμένου φωτός (Γ και Δ). Η μπάρα αντιπροσωπεύει 50 μm (A,B,Γ) και 25 μm (Δ).

4.4. Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των κυστόλίθων φύλλων *Morus alba* με τη μέθοδο FT-RAMAN

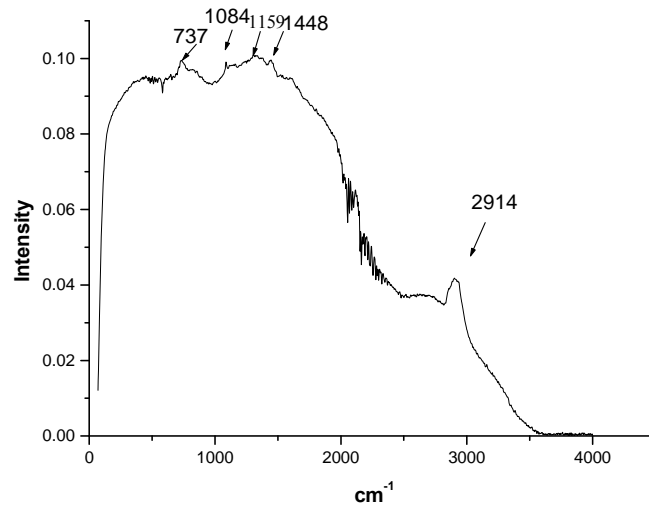
Αρχικά έγινε προσπάθεια να ανιχνευτεί ανθρακικό ασβέστιο σε στάχτη φύλλων μουριάς μετά από καύση τους στους 500 °C για 24 ώρες. Ωστόσο στα φάσματα FT-Raman που ελήφθησαν δεν παρατηρήθηκαν εμφανείς κορφές, διότι η ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου των δειγμάτων ήταν σε χαμηλά επίπεδα, κάτω από το όριο ανίχνευσης του οργάνου.

Στη συνέχεια απομονώθηκαν κυστόλιθοι από νεαρά και ώριμα φύλλα μουριάς σε απεσταγμένο νερό (βλ. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ). Τα φάσματα FT-Raman παρουσιάζονται στις εικόνες 4.7 και 4.8.



Εικόνα 4.7. Φάσμα *FT-Raman* απομονωμένων κυστόλιθων νεαρών φύλλων μουριάς

Στο φάσμα που προκύπτει από απομονωμένους κυστόλιθους νεαρών φύλλων εντοπίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του ασβεστίτη στα 1084, 1439 και 282 cm^{-1} αλλά και οι κορυφές 1158, 1321, 1526 και μια ευρεία στα 2914 cm^{-1} . Η τελευταία οφείλεται πιθανότατα σε προσμίξεις των κυστόλιθων με οργανικά συστατικά των λιθοκύστεων ή και άλλων κυττάρων.



Εικόνα 4.8. Φάσμα *FT-Raman* απομονωμένων κυστόλιθων ώριμων φύλλων μουριάς

Στο φάσμα που προκύπτει από απομονωμένους κυστόλιθους ώριμων φύλλων, η χαρακτηριστική κορυφή του ασβεστίτη στα 1084 είναι ασθενής και υπάρχει έντονη η δόνηση στα 737 μαζί με τις δονήσεις στους κυματάριθμους 1159 και 1448 καθώς και η ευρεία κορυφή στα 2914 cm^{-1} .

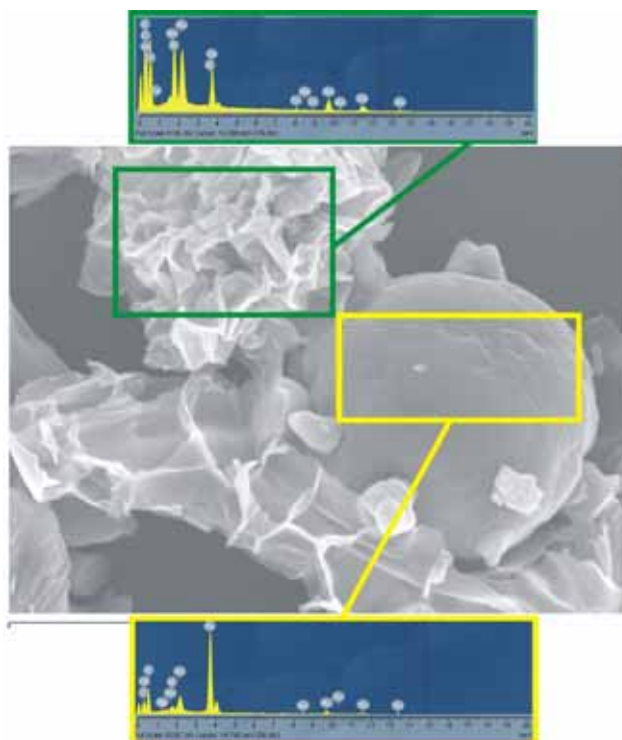
Συμπερασματικά μπορεί να αναφερθεί ότι τα φάσματα των κυστόλιθων που λήφθηκαν παρουσιάζουν μεν ομοιότητες με το φάσμα του ασβεστίτη αλλά ορισμένες κορυφές ενδεχομένως οφείλονται σε διάφορα άλλα ανόργανα συστατικά που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα (Πίνακας 4.4).

Πίνακας 4.4. Σύνοψη των χαρακτηριστικών των φασμάτων *FT-Raman* από απομονωμένους κυστόλιθους νεαρών και ώριμων φύλλων μουριάς.

Προέλευση δείγματος	ασβεστίτης	Σχετική ποσότητα	Ισχυρές κορυφές που προέρχονται από άλλες ουσίες (cm^{-1})	Ασθενείς κορυφές που προέρχονται από άλλες ουσίες (cm^{-1})	Ευρείες κορυφές που οφείλονται σε οργανικά συστατικά (cm^{-1})
Νεαρά φύλλα	εντοπίζεται	+++	1158, 1526, 1439	1321	2914
Ωριμα φύλλα	εντοπίζεται	+	737, 1159, 1448		2914

Από τον πίνακα 4.4 φαίνεται ότι εκτός από τον ασβεστίτη εντοπίζονται τουλάχιστον 2 ακόμη ανόργανες ενώσεις. Η μία εντοπίζεται στα νεαρά φύλλα μουριάς με δονήσεις 1526, 1158 και 1439 ενώ στα ώριμα φύλλα εντοπίζονται ίχνη από την προαναφερθείσα ένωση (δονήσεις 1159 και 1448) αλλά και μια ακόμη ένωση σε σημαντική ποσότητα με ισχυρή κορυφή στα 737.

4.5. Εντοπισμός ασβεστίου σε κυστόλιθους φύλλων μουριάς με μικροανάλυση ακτίνων -X.



Εικόνα 4.9. Εντοπισμός ασβεστίου σε απομονωμένο κυστόλιθο και σε γειτονικά παρεγχυματικά κύτταρα σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρρωσης με μικροανάλυση ακτίνων-X. Τα έγχρωμα πλαίσια υποδηλώνουν τις περιοχές σάρρωσης και τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται πάνω και κάτω από την εικόνα.

Μικροανάλυση με ακτίνες-X σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρρωσης απομονωμένων κυστόλιθων φύλλων μουριάς (εικόνα 4.9) επιβεβαίωσε ότι οι κυστόλιθοι είναι πλούσιοι σε ασβέστιο.

4.6. Επίδραση της έλλειψης CO₂ στις διαστάσεις των κυστόλιθων.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν τα εξής πειράματα:

A. Κάλυψη φύλλων με διαφανή μεμβράνη ή σιλικόνη. Οι πειραματικοί αυτοί χειρισμοί αποσκοπούσαν στη παρεμπόδιση της ανταλλαγής αερίων και επομένως στη δημιουργία «πενίας άνθρακα». Σύμφωνα με την υπόθεση εργασίας η έλλειψη CO₂ θα μπορούσε να προκαλέσει μερική τουλάχιστον αποδόμηση των κυστόλιθων, σε μια απεγνωσμένη προσπάθεια του φυτού να εξασφαλίσει CO₂ για τη φωτοσύνθεση. Για το σκοπό αυτό φύλλα *M. alba* καλύφθηκαν με κόλα σιλικόνης στην αποαζονική (κάτω) επιφάνεια, ενώ φύλλα *P. Judaica* καλύφθηκαν πλήρως με διαφανή μεμβράνη. Η υπόθεση εργασίας επαληθεύτηκε και στις δύο περιπτώσεις. Η διάμετρος των κυστόλιθων των καλυμμένων φύλλων βρέθηκε μικρότερη εκείνης των ακάλυπτων (Πίνακας 4.6.1).

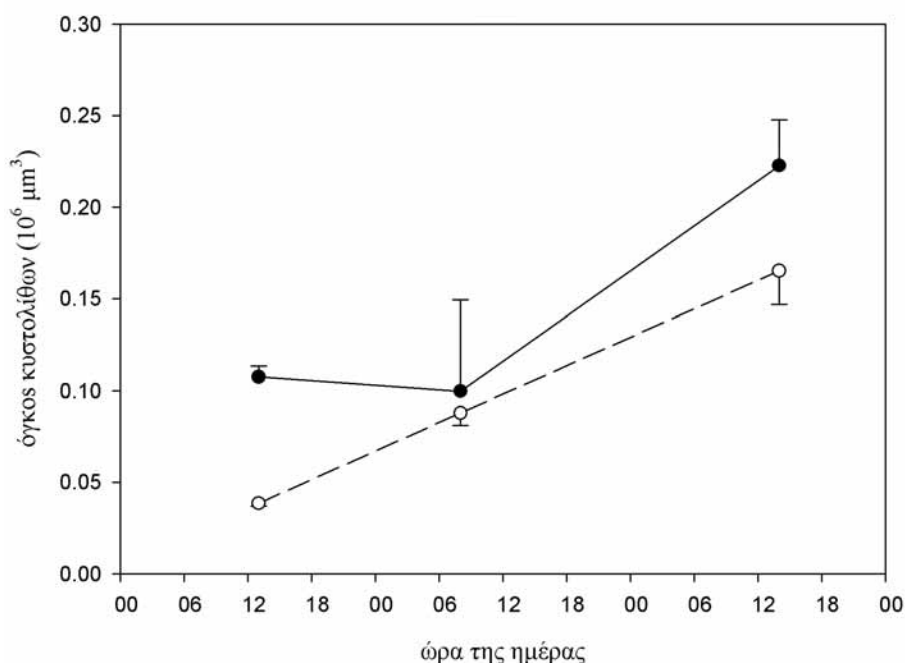
Πίνακας 4.6.1. Μεταβολή της διαμέτρου των κυστόλιθων μετά από κάλυψη της αποαζονικής επιφάνειας των φύλλων του *M. alba* με σιλικόνη ή μετά από επικάλυψη των φύλλων του *P. judaica* με διαφανή μεμβράνη για 5 ημέρες. $n=5$.

Χειρισμός	<i>Parietaria judaica</i>	<i>Morus alba</i>
	Διάμετρος κυστόλιθων (μm)	
Φύλλα μάρτυρες	60.85±2.98	15.9±1.57
Καλυμμένα φύλλα	46.55±1.65	12.7±0.57

B. Παραμονή φυτών *F. nitida* σε ατμόσφαιρα μηδενικής συγκέντρωσης CO₂.

Οι πειραματικοί αυτοί χειρισμοί αποσκοπούσαν στην άμεση εφαρμογή «πενίας» άνθρακα στα πειραματόφυτα, ώστε να δοθεί απάντηση στο ερώτημα εάν στις συνθήκες αυτές οι κυστόλιθοι αποδομούνται, και επομένως η διάμετρός τους μειώνεται. Χρησιμοποιήθηκε η πειραματική διάταξη που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.9. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο πειραματικών χειρισμών παρατηρούνται κατά την πρώτη ημέρα δειγματοληψίας, ενώ κατά τις δύο επόμενες μέρες οι διαφορές αμβλύνονται. Είναι χαρακτηριστικό ότι κατά την παραμονή των πειραματοφύτων στους αεροστεγείς διαφανείς θαλάμους η διάμετρος των κυστόλιθων παρουσίασε σταδιακή αύξηση και στους δύο πειραματικούς χειρισμούς. Ωστόσο η αύξηση αυτή

ήταν υψηλότερη στα φυτά τα οποία παρέμεναν σε ατμόσφαιρα μηδενικής συγκέντρωσης CO₂ (εικόνα 4.10). Οι μεταβολές που παρατηρούνται στα φυτά-μάρτυρες κατά τη διάρκεια του πειράματος είναι παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος των ημερονύκτιων διακυμάνσεων στις διαστάσεις των κυστόλιθων (βλ. παράγραφο 4.7)



Εικόνα 4.10. Μεταβολή του όγκου των κυστόλιθων του *F.nitida* σε συνθήκες (+CO₂) και (-CO₂). Με συνεχή γραμμή απεικονίζονται οι συνθήκες (+CO₂) και με διακεκομμένη οι συνθήκες (-CO₂).

Γ. Παραμονή φυτών *M. alba* και *P. judaica* σε ατμόσφαιρα μηδενικής συγκέντρωσης CO₂.

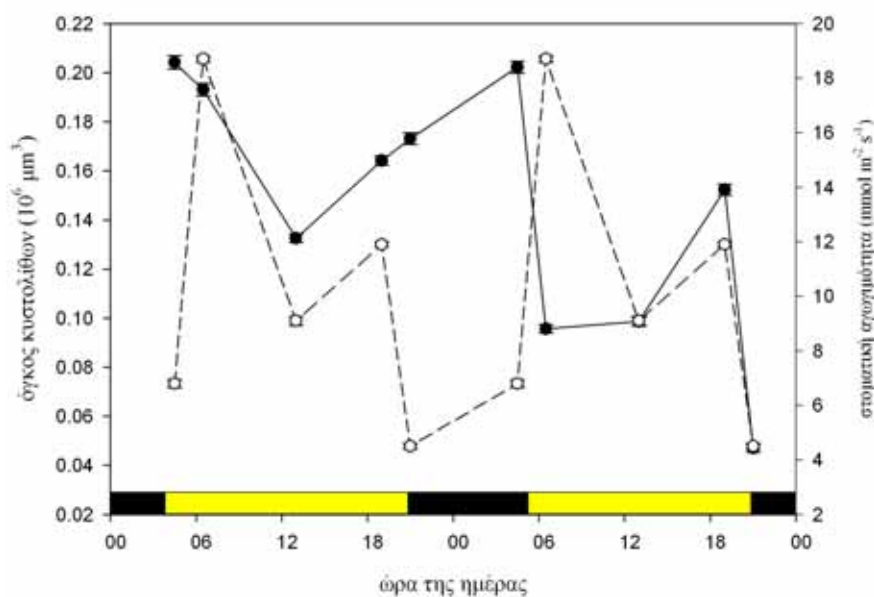
Οι πειραματικοί αυτοί χειρισμοί αποσκοπούσαν, όπως και οι προηγούμενοι, στην εφαρμογή «πενίας» άνθρακα στα πειραματόφυτα με χρήση τρυβλίων που περιείχαν soda lime. Αυτό που παρατηρούμε είναι η μείωση της διαμέτρου των κυστόλιθων στους δίσκους φύλλων που τοποθετήθηκαν στα τρυβλία με soda lime (δηλαδή σε συνθήκες έλλειψης CO₂) γεγονός που επαληθεύει την υπόθεσή μας για αποδόμηση των κυστόλιθων υπό τέτοιες συνθήκες (Πίνακας 4.6.2)

Πίνακας 4.6.2. Μεταβολή της διαμέτρου των κυστόλιθων σε δίσκους φύλλων *P. Judaica* και *M.alba* σε τρυβλία χωρίς *soda lime*(+CO₂) και με *soda lime*(-CO₂) μετά από είσοδο τους σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών για 5 ημέρες. Ακολουθεί η ρίψη τους σε ζέουσα αιθανόλη και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. n=5.

Χειρισμός	<i>Parietaria judaica</i>	<i>Morus alba</i>
	Διάμετρος κυστόλιθων (μm)	
Δίσκοι φύλλων σε τρυβλία χωρίς <i>soda lime</i>	62.25±1.09	26.01±1.83
Δίσκοι φύλλων σε τρυβλία με <i>soda lime</i>	51.33±1.05	19.34±1.07

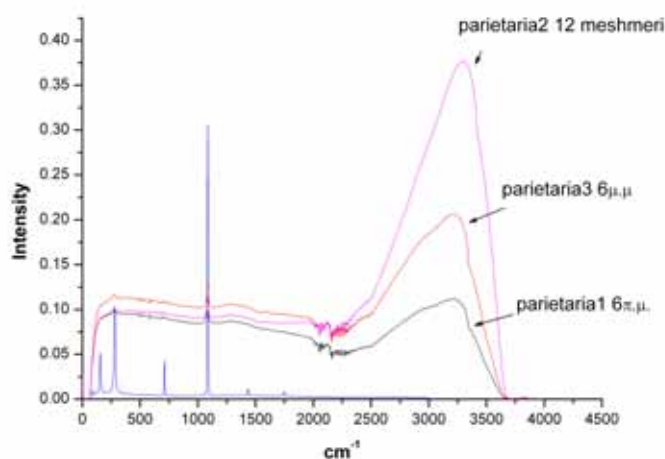
4.7. Επίδραση των ημερονύκτιων διακυμάνσεων στις διαστάσεις των κυστόλιθων

Με βάση την υπόθεση εργασίας, ότι δηλ. οι λιθοκύστες αποτελούν ένα δυναμικό και συνεχώς μεταβαλλόμενο σύστημα αποθήκευσης ανόργανου άνθρακα, διερευνήθηκαν οι πιθανές μεταβολές στις διαστάσεις των κυστόλιθων στη διάρκεια δύο επαναλαμβανόμενων ημερονύκτιων κύκλων. Καταγράφηκαν αφενός μεν οι διαστάσεις των κυστόλιθων σε τακτά χρονικά διαστήματα, αφετέρου η αγωγιμότητα των στοματίων, προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή συσχέτιση μεταξύ αγωγιμότητας των στοματίων και διαστάσεων των κυστόλιθων. Κατά το τέλος της νυκτερινής περιόδου οι κυστόλιθοι αποκτούν τον μέγιστο, ενώ προς το τέλος της ημερήσιας περιόδου τον ελάχιστο όγκο τους. Επιπλέον παρατηρούμε ότι αύξηση της αγωγιμότητας των στομάτων κατά τη διάρκεια της δεύτερης νυκτερινής περιόδου, όπου τα στομάτια είναι ανοιχτά, συνοδεύεται από μια αντίστοιχη αύξηση του όγκου των κυστόλιθων (Εικόνα 4.11).



Εικόνα 4.11. Μεταβολή του όγκου των κρυστόλιθων του *F.parietaria* κατά τη διάρκεια δύο ημερονύκτιων κύκλων σε σχέση με την αγωγιμότητα των στομάτων. Με συνεχή γραμμή απεικονίζεται ο όγκος των κρυστόλιθων και με διακεκομμένη η αγωγιμότητα των στοματιών.

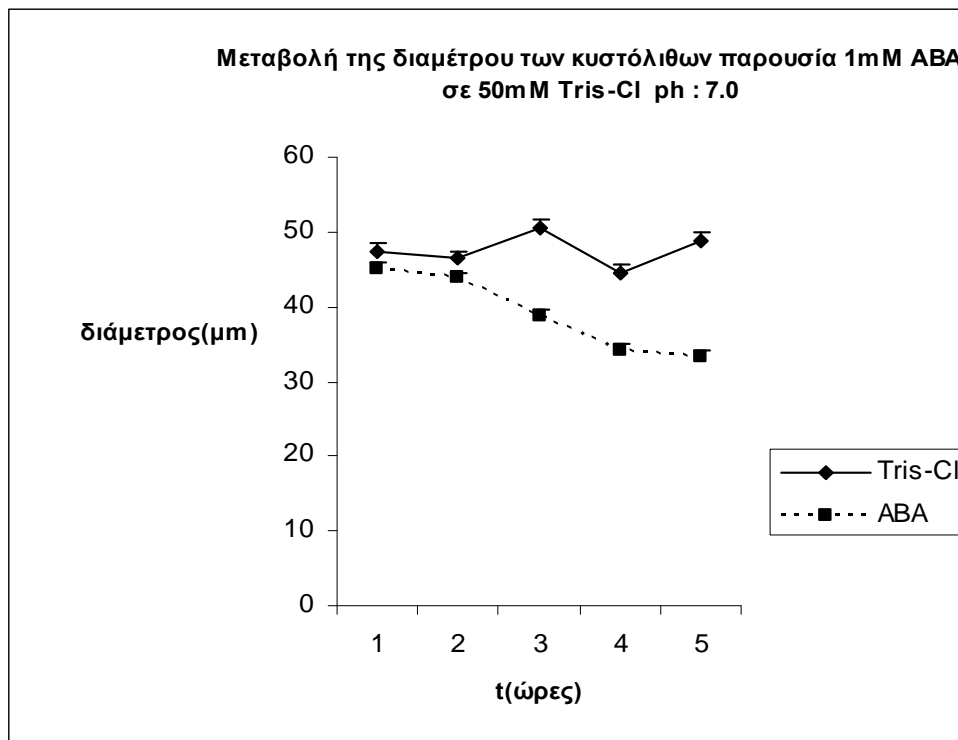
Σε φάσματα FT-Raman που ελήφθησαν από απομονωμένους κρυστόλιθους *P. judaica* σε διαφορετικές ώρες του ημερονύκτιου κύκλου δεν παρατηρήθηκαν εμφανείς διαφορές στη σύστασή τους (εικόνα 4.12).



Εικόνα 4.12. Φάσματα FT-Raman απομονωμένων κρυστόλιθων φύλλων *P.judaica* σε διαφορετικές χρονικές στιγμές του ημερονύκτιου κύκλου. Οι κρυστόλιθοι απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας ως εκχυλιστικό μέσο ισοπροπυλική αλκοόλη (βλ. «ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ»).

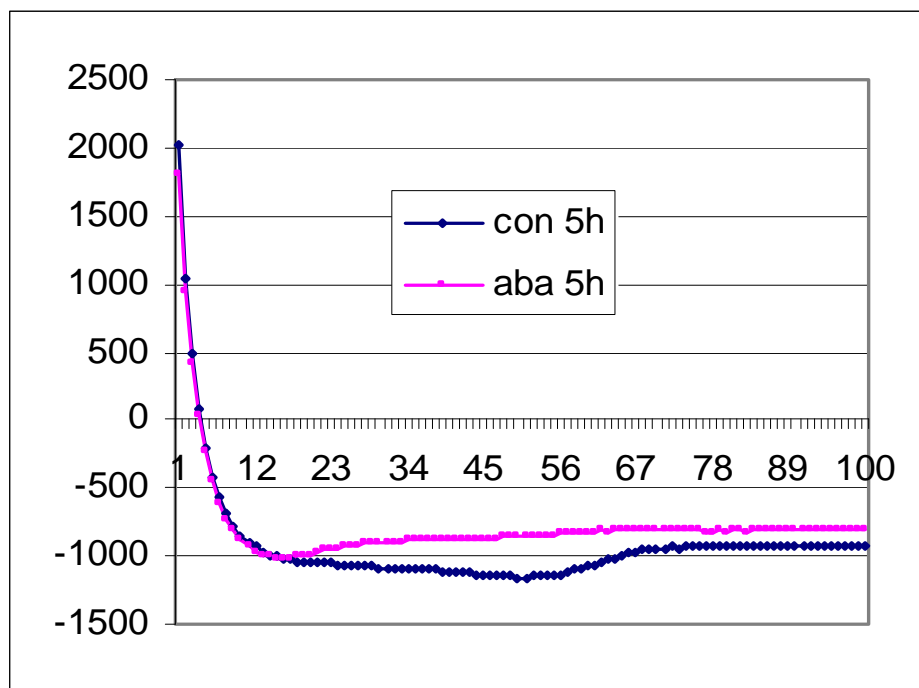
4.8. Επίδραση του ABA στις διαστάσεις των κυστόλιθων.

Από το πείραμα των ημερονύκτιων διακυμάνσεων των διαστάσεων των κυστολίθων προέκυψε ότι είναι πιθανό κατά τη διάρκεια της ημέρας οι κυστόλιθοι να αποδομούνται μερικώς και το CO₂ που προκύπτει να χρησιμοποιείται για τη φωτοσύνθεση. Κατά τη διάρκεια της νύχτας οι κυστόλιθοι ανακτούν τις διαστάσεις τους πιθανόν μέσω εναπόθεσης ανθρακικού ασβεστίου του οποίου ο άνθρακας προέρχεται από την αναπνοή. Θεωρήσαμε πιθανό ότι η αποδόμηση των κυστόλιθων εντείνεται σε περιόδους κατά τις οποίες τα στομάτια είναι κλειστά και επομένως δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί ανταλλαγή αερίων. Προκειμένου να διαπιστώσουμε το αληθές της υπόθεσης αυτής εφαρμόσαμε σε δίσκους φύλλων διάλυμα αμπισσικού οξέος (ABA) διαφορετικών συγκεντρώσεων. Ως γνωστόν το ABA είναι φυτορμόνη η οποία επάγει το κλείσιμο των στοματίων. Το ABA εφαρμόστηκε σε συγκεντρώσεις 1, 50, 100, 200 και 1000 μM. Σε όλες τις συγκεντρώσεις το ABA προκάλεσε μερική αποδόμηση των κυστόλιθων, γεγονός που καταγράφηκε ως μείωση των διαστάσεων των κυστόλιθων. Στην εικόνα 4.13 παρουσιάζεται η ελάττωση της διαμέτρου των κυστολίθων δίσκων φύλλων οι οποίοι επέπλεαν σε διάλυμα 1 mM ABA. Ανάλογα αποτελέσματα πάρθηκαν και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ABA που χρησιμοποιήθηκαν. Οι κυστόλιθοι στους δίσκους μάρτυρες οι οποίοι επέπλεαν σε νερό διατήρησαν τις διαστάσεις τους καθόλη τη διάρκεια του πειράματος.



Εικόνα 4.13. Η μεταβολή της διαμέτρου των κυστόλιθων σε δίσκους φύλλων *M. alba* οι οποίοι επέπλεαν σε διάλυμα Tris-Cl 50 mM pH:7.0 και ABA 1mM. n=πέντε δίσκοι, 50 παρατηρήσεις σε κάθε δίσκο.

Προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν το CO₂ το οποίο προέρχεται από την αποδόμηση των κυστόλιθων που προκαλείται από το ABA χρησιμοποιείται από τα φωτοσυνθετικά κύτταρα, μετρήσαμε τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα των δίσκων σε οξυγονόμετρο και σε ατμόσφαιρα μηδενικής συγκέντρωσης CO₂ (για λεπτομέρειες βλ. «Υλικά και Μέθοδοι»). Ωστόσο οι παρατηρούμενες διακυμάνσεις στο εκλυόμενο O₂ δεν έδειξαν διαφορές μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών χειρισμών (με ή χωρίς ABA) όσον αφορά στην έκλυση O₂ απουσία CO₂ και παρουσία φωτισμού (εικόνα 4.14). Τα αποτελέσματα αυτά οφείλονται πιθανόν στις πολύ μικρές διαφορές στη συγκέντρωση του O₂, οι οποίες ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης του οργάνου.



Εικόνα 4.14. Η μεταβολή του εκλυόμενου O_2 στο οξυγονόμετρο δίσκων φύλλων *M. alba* μετά από παραμονή 5 ωρών σε διάλυμα ABA 1mM. Ο θάλαμος του οξυγονόμετρου περιείχε ατμόσφαιρα μηδενικής συγκέντρωσης CO_2 .

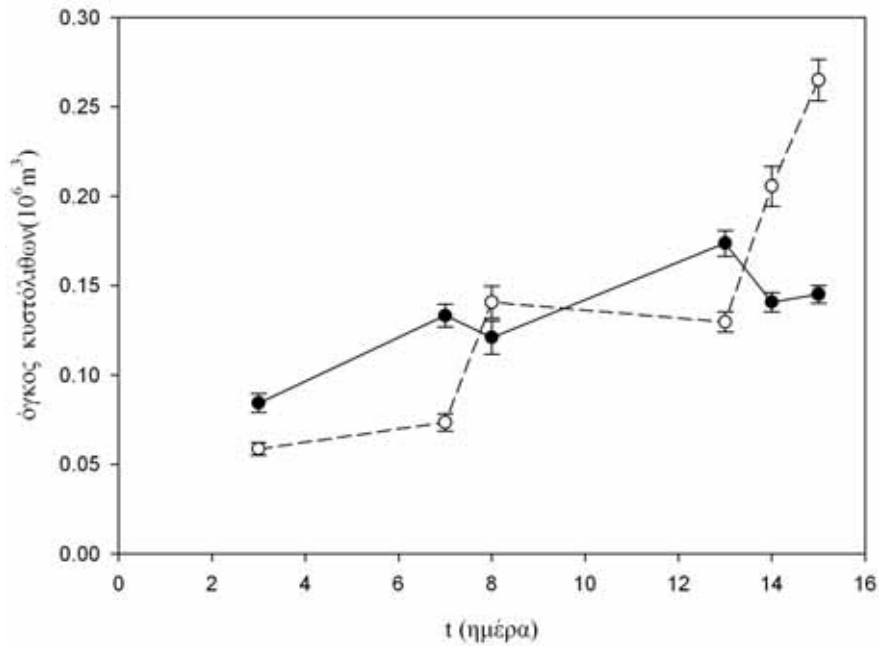
4.9. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στις διαστάσεις των κυστόλιθων

Στο συγκεκριμένο πείραμα φυτά *F.nitida* υποβλήθηκαν σε υδατική καταπόνηση για να διαπιστωθεί αν το κλείσιμο των στομάτων που θα επιφέρει η καταπόνηση θα εντείνει την αποδόμηση των κυστόλιθων ως μια «προσπάθεια» του φυτού για παραγωγή CO_2 και επιτέλεσης της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης.

Για το σκοπό αυτό 12 φυτά *F.nitida* της ίδιας ηλικίας τα οποία αφού διένυσαν ένα διάστημα προσαρμογής (10 ημερών) με κανονικό πότισμα στο θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών χωρίστηκαν σε δύο ομάδες των 6 φυτών (A: ποτισμένα και B: απότιστα). Στη συνέχεια τα φυτά της ομάδας B παρέμειναν απότιστα για διάστημα 10 ημερών. Κατά τη διάρκεια του πειράματος λαμβάνονταν δείγματα φύλλων καθημερινά, στο μέσο της φωτοπεριόδου, για τη μέτρηση του μεγέθους των κυστόλιθων με τη μέθοδο των σταχτογραμμάτων στο οπτικό μικροσκόπιο. Την 13^η ημέρα ποτίστηκαν και τα φυτά της ομάδας B.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.15, μετά από 10 ημέρες υδατικής καταπόνησης το μέγεθος των κυστόλιθων στην ομάδα B βρέθηκε μειωμένο περίπου 30% σε σχέση με

το μέγεθος των κυστόλιθων της ομάδας A. Μετά το πότισμα των φυτών της ομάδας B την 13^η ημέρα παρατηρείται μία έντονη αύξηση του μεγέθους των κυστόλιθων.



Εικόνα 4.15. Μεταβολή του όγκου των κυστόλιθων σε ποτισμένα και απότιστα φυτά *F.nitida*. Με συνεχή γραμμή απεικονίζονται τα ποτισμένα και με διακεκομμένη τα απότιστα φυτά.

Συζήτηση

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να δοθεί απάντηση στην υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία οι κυστόλιθοι, και πιθανόν και άλλες συναφείς δομές όπως οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου, αποτελούν δυναμικά συστήματα που εξυπηρετούν κατά προτεραιότητα τη διαχείριση των αποθεμάτων ανόργανου άνθρακα, και όχι του ασβεστίου. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, τα αποθέματα ανόργανου άνθρακα των κυστόλιθων μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τη φωτοσυνθετική αφομοίωση άνθρακα. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκαν δεδομένα τα οποία σχετίζονται με τη δομή, τη θέση και τη συμπεριφορά των κυστόλιθων / λιθοκύστεων ως δυναμικού συστήματος διαχείρισης. Η δομή των κυστόλιθων είναι αυτή του άμορφου χυμοτοπιακού έγκλειστου. Οι λιθοκύστες, λόγω θέσης, θα μπορούσαν κάλλιστα να επιτελέσουν το ρόλο των εναλλακτικών πηγών ανόργανου άνθρακα για τη φωτοσυνθετική λειτουργία, δεδομένου ότι εντοπίζονται μεταξύ των φωτοσυνθετικών κυττάρων του πασσαλώδους ή και σπογγώδους παρεγχύματος, ανάλογα με το φυτικό είδος. Τα αποτελέσματα των φασμάτων FT-Raman και της μικροανάλυσης ακτίνων – X σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρρωσης επιβεβαίωσαν ότι οι κυστόλιθοι των ειδών *M. alba* και *P. judaica* αποτελούνται κυρίως από ανθρακικό ασβέστιο. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας (Fahn, 1990; Metcalfe and Chalk 1985; Lucas *et.al*, 2000; Sugimura *et.al*, 1999).

Τα αποτελέσματα επίσης έδειξαν ότι υπάρχουν ενδεχομένως και άλλου είδους προσμίξεις από οργανικά ή/και ανόργανα μόρια.

Περαιτέρω, επιχειρήθηκε να απαντηθεί η υπόθεση σύμφωνα με την οποία η απόδοση των αποθεμάτων άνθρακα των κυστόλιθων πραγματοποιείται υπό συνθήκες αδυναμίας τροφοδοσίας με CO₂ από το εξωτερικό εναέριο περιβάλλον. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα τα οποία είχαν ως στόχο να αποκλειστεί η τροφοδοσία άνθρακα προς τα φωτοσυνθετικά κύτταρα, είτε καλύπτοντας τα φύλλα με διάφορα υλικά, είτε παρέχοντας στα φυτά ατμόσφαιρα με μηδενική συγκέντρωση CO₂. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ελάττωση του μεγέθους των κυστόλιθων, μέσα σε λίγες ώρες από την εφαρμογή του πειραματικού χειρισμού. Τα πειραματικά αυτά δεδομένα συμφωνούν με εκείνα του Freisleben (Freisleben 1933). Ο ερευνητής αυτός είχε διαπιστώσει ότι εάν τα φυτά *Ficus* αναπτυχθούν σε ατμόσφαιρα με μηδενική συγκέντρωση CO₂, μόνο υποτυπώδεις κυστόλιθοι σχηματίζονται. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι κυστόλιθοι δεν

αποτελούν μια στατική δεξαμενή αποθήκευσης ιόντων ασβεστίου τα οποία βρίσκονται σε περίσσεια, αλλά ένα δυναμικό σύστημα, το οποίο έχει τη δυνατότητα να αποδώσει εκ νέου τα αποθηκευμένα ιόντα στο κυτταρικό περιβάλλον, όταν αυτό το επιβάλλουν οι συνθήκες. Ωστόσο τα πειράματα της παρούσας μελέτης δεν στάθηκαν ικανά να επιβεβαιώσουν την τύχη των ανθρακικών ιόντων τα οποία προκύπτουν από την αποδόμηση του ανθρακικού ασβεστίου των κυστόλιθων (εκ νέου αφομοίωση μέσω της φωτοσυνθετικής οδού). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται στην ευαισθησία των οργάνων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Η διαπίστωση ότι οι κυστόλιθοι αποτελούν ένα δυναμικό σύστημα, ικανό να αποδώσει ανθρακικά ιόντα (και ιόντα ασβεστίου) στα κύτταρα, έχει επιβεβαιωθεί και για ανάλογες δομές, όπως οι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου. Αρκετοί ερευνητές είχαν διαπιστώσει κατά το παρελθόν ότι οι ήδη σχηματισμένοι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου μπορεί να αποδομηθούν και να μην είναι ορατοί στο μικροσκόπιο σε ορισμένα στάδια του βιολογικού κύκλου ορισμένων φυτικών ειδών (Metchalfe and Chalk, 1985; Franceschi and Horner 1980 και η συναφής βιβλιογραφία που αναφέρεται στα άρθρα αυτά).

Η δυνατότητα αποδόμησης των κυστόλιθων σε συνθήκες μηδενικής συγκέντρωσης CO₂ στην ατμόσφαιρα υποστηρίζει την υπόθεση σύμφωνα με την οποία στα είδη που διαθέτουν κυστόλιθους είναι δυνατή η φωτοσυνθετική αφομοίωση CO₂ ανεξάρτητα από την ταχύτητα διάχυσης του CO₂ από την ατμόσφαιρα προς τα φωτοσυνθετικά κύτταρα μέσω των στοματίων (δηλ. ανεξάρτητα από το άνοιγμα των στοματίων). Με τον τρόπο αυτό ελαχιστοποιούνται οι απώλειες νερού και παρέχεται προσαρμοστικό πλεονέκτημα σε συνθήκες που ευνοούν τις έντονες απώλειες νερού σε συνδυασμό με ξηρασία. Επιπλέον η αποδόμηση των κυστόλιθων (ή των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου) είναι δυνατό να αντιπροσωπεύει τη μοναδική οδό χορήγησης CO₂ για φωτοσυνθετικούς ιστούς οι οποίοι δεν διαθέτουν στομάτια (π.χ. νεαρά αναπτυσσόμενα φύλλα, καρποί ή βλαστοί). Η απόδοση στο περιβάλλον των φωτοσυνθετικών κυττάρων ακόμη και περιορισμένων ποσοτήτων CO₂ σε συνθήκες αδυναμίας ανταλλαγής αερίων με την περιβάλλουσα ατμόσφαιρα παρέχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

1. Περιορίζονται οι απώλειες νερού, αφού μπορεί εξασφαλιστεί ως ένα βαθμό η συντήρηση τουλάχιστον του φυτού παρουσία κλειστών ή μισόκλειστων στοματίων.

Εάν η υπόθεση εργασίας αληθεύει, θα δοθεί ικανοποιητική ερμηνεία όσον αφορά στην ανθεκτικότητα ορισμένων φυτικών ειδών γεωργικού ενδιαφέροντος (όπως η

συκιά και η μουριά) έναντι της υδατικής καταπόνησης και των ισχυρών ανέμων, παρά το γεγονός ότι τα φύλλα τους δεν διαθέτουν τα τυπικά ξηρομορφικά χαρακτηριστικά. Είναι χαρακτηριστικό ότι η μουριά αποτελεί το επικρατέστερο φυτό για τη δημιουργία δενδροστοιχιών στις Κυκλάδες, στις οποίες ως γνωστό επικρατούν ισχυροί βόρειοι άνεμοι (μελέμια) για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα στη διάρκεια της θερμής και ξηρής περιόδου. Η υπόθεση εργασίας μπορεί επίσης να εξηγήσει γιατί το περδικάκι, παρόλο που είναι τυπικό C₃ φυτό, αποτελεί ένα από τα πλέον δυσεξόντωτα ζιζάνια.

2. Αποτρέπεται η φωτοπαρεμπόδιση. Το φαινόμενο της φωτοπαρεμπόδισης μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες για τη φωτοσυνθετική συσκευή όταν σε συνθήκες άπλετου φωτισμού (δηλ. πλήρους ενεργειακής παροχής) η διαθεσιμότητα CO₂ είναι περιορισμένη (όταν δηλ. τα στομάτια παραμένουν κλειστά) (Καραμπουρνιώτης 2003).

3. Δίδεται η δυνατότητα ανάκτησης του CO₂ το οποίο απελευθερώνεται μέσω της αναπνοής (του υπέργειου, αλλά και του υπόγειου τμήματος του φυτού) και επομένως εξοικονομούνται σκελετοί άνθρακα. Το φαινόμενο αυτό θα πρέπει να έχει ιδιαίτερη σημασία στους καρπούς.

4. Γίνεται πιθανή η τροφοδοσία με ανόργανο άνθρακα από το υπόγειο τμήμα του φυτού ή από το έδαφος. Με τον τρόπο αυτό δίδεται η δυνατότητα πλήρους ανεξαρτητοποίησης της φωτοσυνθετικής λειτουργίας από τη παροχή CO₂ μέσω της ατμόσφαιρας. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι έχει αναφερθεί τουλάχιστον μία περίπτωση φυτικού είδους το οποίο δεν διαθέτει στομάτια στα υπέργεια όργανα και η τροφοδοσία με ανόργανο άνθρακα γίνεται αποκλειστικά από το έδαφος (Keeley *et al* 1984). Εκτός αυτού, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η τροφοδοσία των φωτοσυνθετικών κυττάρων του βλαστού με ανόργανο άνθρακα επιτελείται και μέσω της ρίζας (Hibberd and Quick, 2002).

Όπως είναι φυσικό, το προτεινόμενο μοντέλο προσφέρει τα πλεονεκτήματα που προαναφέρθηκαν κάτω από ορισμένες μόνο συνθήκες. Και αυτό γιατί η σύνθεση και η διάσπαση των κυστολίθων, καθώς και η δημιουργία και συντήρηση εξαιρετικά εξειδικευμένων κυττάρων όπως οι λιθοκύστες, συνεπάγεται υψηλό μεταβολικό κόστος. Ανάλογο μεταβολικό κόστος απαιτεί και η λειτουργία των εναλλακτικών βιοχημικών οδών αφομοίωσης CO₂ που λειτουργούν στα C₄ και CAM φυτά, ωστόσο παρέχουν προσαρμοστικό πλεονέκτημα κάτω από ορισμένες συνθήκες.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η λειτουργία των λιθοκύστεων συνδέεται κυρίως με την αντιμετώπιση αντίξοων συνθηκών, κυρίως υδατικής καταπόνησης. Για το λόγο αυτό στα επόμενα πειράματα έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί η συμπεριφορά των ιδιοβλαστών αυτών σε συνθήκες κάτω από τις οποίες τα στομάτια παραμένουν κλειστά. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία ABA, μιας φυτορμόνης η οποία προκαλεί το κλείσιμο των στοματίων (Taiz and Zeiger 1998; Δροσόπουλος 1991; Καραμπουρνιώτης 2003), το μέγεθος των κυστόλιθων μειώνεται ταχέως, μέσα σε λίγες μόνο ώρες. Το ίδιο συμβαίνει και σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης, ωστόσο φαίνεται ότι οι κυστόλιθοι ανακτούν ταχέως και πάλι το αρχικό τους μέγεθος. Μάλιστα εάν τα φυτά ποτιστούν και πάλι, το μέγεθος των κυστόλιθων των φυτών αυτών είναι μεγαλύτερο εκείνου των κυστόλιθων των φυτών-μαρτύρων. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν υποδηλώνει μεταφορά ανόργανων μορφών άνθρακα διαμέσου του διαπνευστικού ρεύματος.

Τα πειράματα επίσης της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι το μέγεθος των κυστόλιθων παρουσιάζει ημερονύκτιες διακυμάνσεις. Οι Seal and Sen (1970) είχαν παρατηρήσει ημερονύκτιες διακυμάνσεις στο περιεχόμενο σε οξαλικό οξύ στο φυτό *Oxalis corniculata*. Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα το μέγεθος των κυστόλιθων ελαττώνεται κατά τη διάρκεια της ημέρας και αυξάνεται κατά τη διάρκεια της νύκτας, ενώ μπορεί να παρατηρηθεί και πρόσκαιρη αύξηση στη διάρκεια της ημέρας, όταν τα στομάτια κλείνουν. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου που εναποτίθεται στους κυστόλιθους βρίσκεται υπό συνεχή έλεγχο. Κατά τη διάρκεια της ημέρας ένα ποσοστό του ανθρακικού ασβεστίου μπορεί να διασπάται και τα ανθρακικά ιόντα να χρησιμοποιούνται στη φωτοσύνθεση, ενώ κατά τη διάρκεια της νύκτας το ποσοστό αυτό αναπληρώνεται μέσω της αναπνοής ή / και μέσω της μεταφοράς ανθρακικών ιόντων από το έδαφος.

Συμπερασματικά θα μπορούσε να ειπωθεί ότι προέκυψαν αρκετές πειραματικές ενδείξεις για την ισχύ της υπόθεσης εργασίας χωρίς ωστόσο να έχει αποσαφηνιστεί πλήρως κάποια πτυχή του προτεινόμενου φυσιολογικού ρόλου των κυστόλιθων. Πιστεύεται ότι το όποιο φυσιολογικό φαινόμενο διέπει την παρουσία των ασυνήθιστων αυτών δομών, είναι εξαιρετικά πολύπλοκο όσο και δύσκολο στην πειραματική του προσέγγιση (π.χ. από την παρούσα μελέτη προέκυψαν ενδείξεις ότι στη δημιουργία των κυστόλιθων είναι πολύ πιθανό να λαμβάνουν μέρος ανόργανες μορφές άνθρακα οι οποίες προέρχονται από το υπόγειο τμήμα του φυτού ή από το έδαφος). Πρόκειται ωστόσο για ένα θέμα ενδιαφέρον το οποίο αξίζει να διερευνηθεί

σε ένα βάθος χρόνου και αξιοποιώντας το σύνολο των σύγχρονων τεχνικών οι οποίες είναι ή θα γίνουν διαθέσιμες στο προσεχές μέλλον στην έρευνα της φυσιολογίας των φυτών.

Βιβλιογραφία

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ajello L. 1941.** Cytology and cellular interrelations of cystolith-formation in *Ficus elastica*. *American Journal of Botany* **28**: 589-594.
- Al-Rais A.H., Myers A. and Watson L. 1971.** The isolation and properties of oxalate crystals from plants. *Ann.Bot.* **35**: 1213-8.
- Arnott H.J. and F.G.E. Pautard. 1970.** Calcification in plants. Pages 375-446 In H.Schraer (ed). *Biological calcification; cellular and molecular aspects*. Appleton-Century-Crofts, New York.
- Bilan M.I. and Usov A.I. 2001.** Polysaccharides of calcareous algae and their effect on the calcification process. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **27**: 2-16.
- Brownlee C & Taylor AR 2002.** Algal Calcification and Silification in *Encyclopedia of Life Sciences*, <http://www.els.net>, London: Nature Publishing Group.
- Corstjens P.L.A.M., van der Kooij A., Linschooten C. et al. 1998.** GPA, a calcium binding protein in the coccolithophorid *Emiliania Huxleyi*(Prymnesiophyceae). *Journal of Phycology* **34**: 622-630.
- Chevalier S. and Pireyre N.P. 1979.** Physiologie Végétale.- Transport du calcium au niveau des cystolithes de feuilles de *Parietaria officinalis* L.et de *Ficus elastica* Roxb. *Comptes Rendus de l'Academie de Science, Paris*, **D, 288**: 1099-1102.
- Chistikina F.I. 1961.** On the problem of the origin of cystoliths. *Bot. J.USSR* **46**:1237-45 [English summary].
- Dickison W.C. 2000.** *Inregrative Plant Anatomy*. Academic Press. San Diego Ca.
- Dixon DC, Cut JR, Klessig DF.1991.** Differential targeting of the tobacco PR-1 pathogenesis-related proteins to the extracellular space and vacuoles of crystal idioblasts. *The EMBO Journal* **10**: 1317-1324.
- Esau K. 1965.** *Plant anatomy*.New York: John Wiley & Sohns.
- Fahn A. 1990.** *Plant anatomy*. 4th Edition. Oxford: Pergamon Press.
- Franceschi V.R. and Nakata P.N. 2005.** Calcium oxalate in plants: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 41-71.
- Franceschi V.R. 1989.** Calcium oxalate formation is a rapid and reversible process in *Lemna minor* L, *Protoplasma* **148** : 130-137.
- Franceschi V.R. and Horner H.T. 1980.** Calcium oxalate crystals in plants. *The Botanical Review.* **46**: 360-427.

- Freisleben R. 1933.** Untersuchungen über Bildung und Auflösung von Cystolithen beider Urticales.
- Gattuso J.-P. and Buddemeier R.W. 2000.** Calcification and CO₂. *Nature* **407**: 311-312.
- Haberlandt G. 1854.** Physiological Plant Anatomy. Translated by Montagu D. Macmillan and Co. Ltd. London 1914. Reprinted by Lubrecht & Cramer Ltd 1979.
- Hall DO and Rao KK. 1999.** Photosynthesis. Cambridge: Cambridge University Press.
- Heldt H-W. 1997.** Plant Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Herfort L., Thake B. and Roberts J. 2002.** Acquisition and use of bicarbonate by *Emiliana huxleyi*. *New Phytologist* **156**: 427-436.
- Hibberd J.M., Quick W.P. 2002.** Characteristics of C₄ photosynthesis in stems and petioles of C₃ flowering plants. *Nature* **415**: 451-453.
- Harslan H., Palmer R. G. and Horner H.T. 2001.** Calcium oxalate crystals in developing seeds of soybean. *Annals of Botany* **88**: 243-257.
- Jeffrey SW; Anderson JM. 2000.** *Emiliana huxleyi*(Haptophyta) holds promising insights for photosynthesis. *Journal of Phycology* **36**: 449-452.
- Katsumata F. 1971.** Shape of idioblasts in mulberry leaves with special reference to the classification of mulberry trees. *Journal of Sericultural Science* **40**: 313-322.
- Keeley J.E., Osmond C.B., Raven J.A. 1984.** *Stylites*, a vascular land plant without stomata absorbs CO₂ via its roots. *Nature* **310**: 694-695.
- Kontoyannis C.G. and Vagenas N.V. 2000.** Calcium carbonate phase analysis using XRD and FT-Raman spectroscopy. *Analyst*. **125**: 251-255
- Kostman T.A., Franceschi V.R. and Nakata P.A. 2003.** Endoplasmic reticulum sub-compartments are involved in calcium sequestration within raphide crystal idioblasts of *Pistia stratiotes* L. *Plant Science* **165**: 205-212.
- Lawlor, D.W. 2001.** Photosynthesis. Oxford: Bios Scientific Publishers.
- Levi-Kalisman Y., Raz S., Weiner S., Addadi L. and Sagi I. 2000.** X-ray absorption spectroscopy studies on the structure of a biogenic “amorphous” calcium carbonate phase. *Journal of the chemical Society-Dalton Transactions* **21**: 3977-3982.
- Lucas P.W., Turner I.M., Dominy N.J. and Yamashita N. 2000.** Mechanical defences to herbivory. *Annals of Botany*. **86**: 913-920.

- Macnish A.J, Irving^A D.E., Joyce^AD.C, Vinthanage^B Vasante, Wearing^A A.H, Webb^C R.I., and Frost^DR.L.2003.** Identification of intracellular calcium oxalate crystals in *Chamelaucium uncinatum* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* **51**: 565-572.
- Marsh M.E., Chang D-K., King G.C. 1992.** Isolation and characterization of a novel acidic polysaccharide containing tartrate and glyoxylate residues from the mineralized scales of a unicellular coccolithophorid alga *Pleurochrysis carterae*. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 20507-20512.
- Marsh M.E. 1996.** Polyanion-mediated mineralization-a kinetic analysis of the calcium-carrier hypothesis in the phytoflagellate *Pleurochrysis carterae*. *Protoplasma* **190**: 181-188.
- Marsh M.E., Dickinson D.P. 1997.** Polyanion-mediated mineralization-mineralization in coccolithophore (*Pleurochrysis carterae*) variants which do not express PS2, the most abundant and acidic mineral associated polyanion in wild-type cells. *Protoplasma* **199**: 9-17.
- Marsh M.E. 1999.** Coccolith crystals of *Pleurochrysis carterae*: crystallographic faces, organization, and development. *Protoplasma* **207**: 54-66.
- Marsh M.E., Ridall A.L., Azadi P., Duke P.J. 2002.** Galacturonomannan and Golgi-derived membrane linked to growth and shaping of biogenic calcite. *Journal of Structural Biology* **139**: 39-45.
- Mauseth J.D. 1988.** *Plant Anatomy*. The Benjamin/Cummings Publ. Comp. Inc. Menlo Park, Ca.
- Metcalf C.R. and Chalk L.1985.** *Anatomy of the Dicotyledons-Volume II Wood structure and conclusion of the general introduction*. 2nd Edition. Oxford.
- Metcalf C.R.1985.** Calcareous deposits, calcified cell walls, cystoliths and similar structures. Pages 94-97 In C.R.Metcalf and L .Chalk (ed). *Anatomy of the Dicotyledons- Volume II Wood structure and conclusion of the general introduction*. 2nd Edition. Oxford.
- Nakata P.A., Kostman T.A, Franceschi V.R. 2003.** Calreticulin is enriched in the crystal idioblasts of *Pistia stratiotes*. *Plant Physiology and Biochemistry* **41** : 425-430.
- Nakata P.A., Michele M.McConn. 2002.** Calcium oxalate crystal formation is not essential for growth of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 325-329.

- Nakata P.A. 2003.** Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* **164**: 901-909.
- Paasche E. 2001.** A review of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular reference to growth, coccolith formation and calcification-photosynthesis interactions. *Phycologia* **40**: 503-529.
- Raven J.A. and Smith F.A. 1976.** Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytologist* **76**: 415-431.
- Ridge I. 2002.** Plants. Oxford University Press. Oxford, UK.
- Riebesell U., Zondervan I., Rost B., Tortell P.D., Zeebe R.E. and Morel F.M.M. 2000.** Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature* **407**: 364-367.
- Seal S.N. and Sen S.P. 1970.** The photosynthetic production of oxalic acid in *Oxalis corniculata*. *Plant and Cell Physiology* **11**: 119-128.
- Sugimura Y., Mori, T., Nitta I., Kotani E., Furusava T., Tatsumi M., Kusakari S.-I., Wada M. and Morita Y. 1999.** Calcium deposition in idioblasts of mulberry leaves. *Annals of Botany* **83**: 543-550.
- Stryer Lubert. 1994.** Βιοχημεία - Τόμος Πρώτος. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Taiz L. and Zeiger E. 1998.** Photosynthesis: Carbon metabolism. In: *Plant Physiology* 1st ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, pp. 219-248.
- Walker DA. 1993.** Polarographic measurement of oxygen. In: DO Hall, JMO Scurlock, HR Bolhar-Nordenkampf, RC Leegood and SP Long, eds. *Photosynthesis and Production in a changing environment*. Chapman and Hall, London.
- Wu CC, KuoHuang LL. 1997.** Calcium crystals in the leaves of some species of Moraceae. *Botanical Bulletin of the Academy Sinica* **38** (2): 97-104.
- Vagenas N.V., Gatsouli A., Kontoyannis C.G. 2003.** Quantitative analysis of synthetic calcium carbonate polymorphs using FT-IR spectroscopy. *Talanta* **59**: 831-836.
- Volk G.M., Goss L.J. and Franceschi V.R. 2004.** Calcium Channels are Involved in Calcium Oxalate Crystal Formation in Specialized Cells of *Pistia stratiotes* L. *Annals of Botany* **93**: 741-753
- Αϊβαλάκις Γ., Καραμπουρνιώτης Γ. και Φασσέας Κ. 2005.** Γενική Βοτανική. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

- Αϊβαλάκης Γ., Καραμπουρνιώτης Γ. και Φασσέας Κ. 2003.** Σημειώσεις Γενικής Βοτανικής. Αθήνα : Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Γαλάτης Β., Κατσαρός Χ. και Αποστολάκος Π, 1998.** Εισαγωγή στη Βοτανική. Εκδόσεις Α.Σταμούλης. Αθήνα.
- Γκιάφη Ζ. 2003.** “Ανατομικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των λιθοκύστεων του φυτού *Parietaria judaica*”. Πτυχιακή μελέτη. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Δαρμογιάννη Α. , Δεμπονέρα Ε. ,Φιλίππου Μ. και Φασσέας Κ. 2002** «Οντογένεση και υφή των κυστόλιθων σε ιδιόβλαστα κύτταρα της επιδερμίδας αναπτυσσόμενων φύλλων της συκιάς(*Ficus carica* L.)». *Πρακτικά 24^ο Συνεδρίου Ε.Ε.Β.Ε. Ερέτρια, σελ.50.*
- Δροσόπουλος Ι.1992.** *Η μορφολογία και η ανατομία των φυτών.* Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Δροσόπουλος Ι. 1998.** *Φυσιολογία φυτών.* Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Καραμπουρνιώτης Γ. 2003.** *Φυσιολογία Καταπονήσεων των φυτών.* Εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα.
- Καράταγλης Σ. 1999.** *Φυσιολογία Φυτών.* Art of Text, Θεσσαλονίκη.

